

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PEDRO GRACHINSKI BUIAR

UTILIZAÇÃO DE UMA REDE COMPLEXA NA AVALIAÇÃO DO
MICROAMBIENTE DO CÂNCER DE MAMA COM HIPEREXPRESSÃO DE HER-2

PONTA GROSSA

2024

PEDRO GRACHINSKI BUIAR

**UTILIZAÇÃO DE UMA REDE COMPLEXA NA AVALIAÇÃO DO
MICROAMBIENTE DO CÂNCER DE MAMA COM HIPEREXPRESSÃO DE HER-2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências
Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de
Ponta Grossa/PR.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero

PONTA GROSSA

2024

B932 Buiar, Pedro Grachinski
Utilização de uma rede complexa na avaliação do microambiente do câncer de mama com hiperexpressão de HER-2 / Pedro Grachinski Buiar. Ponta Grossa, 2024.
87 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.

1. Câncer - mama. 2. Her-2. 3. Redes complexas. I. Favero, Giovani Marino. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615

 UNICENTRO Universidade Estadual do Centro-Oeste pública e gratuita	PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa	 UEPG Universidade Estadual de Ponta Grossa
--	---	--

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO **10/2024** DO DOUTORANDO **PEDRO GRACHINSKI BUIAR**, REALIZADA NO DIA 15 DE AGOSTO DE 2024, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

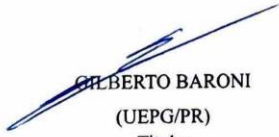
Aos quinze dias do mês de agosto de dois mil e vinte e quatro, às 8h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, no Anfiteatro de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, Bloco M, sob a presidência do Prof. Dr. Giovani Marino Fávero, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas do doutorando **PEDRO GRACHINSKI BUIAR**, na linha de pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, constituída pelo Professor Doutor GIOVANI MARINO FÁVERO e demais Doutores (membros titulares): GILBERTO BARONI (UEPG/PR); FELIPE DE LARA JANZ (UEPG/PR); LARISSA LOUISE CAMPANHOLI (CESCAGE/PR); e LEANDRO LIPINSKI (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: "**UTILIZAÇÃO DE UMA REDE COMPLEXA NA AVALIAÇÃO DO MICROAMBIENTE DO CÂNCER DE MAMA COM HIPEREXPRESSÃO DE HER-2**". Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a tese, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

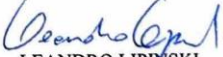
Novo título: _____


GIOVANI MARINO FÁVERO
(UEPG)
Presidente


GILBERTO BARONI
(UEPG/PR)
Titular


FELIPE DE LARA JANZ
(UEPG/PR)
Titular


LARISSA LOUISE CAMPANHOLI
(CESCAGE/PR)
Titular


LEANDRO LIPINSKI
(UEPG/PR)
Titular

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Fone (42) 2102-8937 Email – ppgcf@uepg.br
Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M
Ponta Grossa – Paraná – Brasil

À minha amada esposa Caroline, que sempre esteve ao meu lado...

Aos meus filhos amados, Artur e Cecília.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marco Antônio e Maria Salete, por me ensinarem o valor do suor e da disciplina, por me estimularem desde a infância e me proporcionarem apoio, segurança e amor.

À minha esposa Caroline, por todo o amor, suporte e compreensão nos momentos mais difíceis, quando precisei insistir e persistir na minha jornada acadêmica e profissional.

Aos meus filhos, Artur e Cecília, pelas horas e momentos juntos dos quais abdiquei, na esperança de que, quando compreenderem melhor a jornada, sintam orgulho do pai deles.

Ao meu orientador, Dr. Giovani Marino Favero, pela oportunidade, paciência, suporte acadêmico e parceria neste doutorado.

Aos doutores José Danilo Szezech Junior e Matheus Rolim Sales, colegas das Ciências Exatas, pela parceria essencial para o andamento e concretização deste projeto.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo fomento e investimento na formação e manutenção da pós-graduação.

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais comum nas mulheres, em todo o mundo. Nos últimos anos, o conhecimento sobre o câncer de mama avançou muito e temos ciência do caráter multifatorial da fisiopatologia do câncer. Fatores moleculares e celulares múltiplos estão envolvidos em uma complexa estrutura de interações que traduz a dificuldade de progredir tratamentos oncológicos efetivos. Um dos modelos teóricos para estudar múltiplas interações é o modelo de Grafos, também conhecidos como Redes Complexas. Esse método é capaz de criar figuras gráficas ligando vértices (fatores) entre si, através de arestas (interações). E realiza isso através de um modelo de matriz. Através desta metodologia, conseguimos definir as complexas interações entre os fatores moleculares e celulares envolvidos no microambiente tumoral do câncer de mama HER positivo com a posterior manipulação de elementos da rede para determinar o impacto de cada fator. Através desta análise, objetivamos determinar potenciais alvos terapêuticos e possíveis mecanismos para atuação no tratamento desta neoplasia. Uma revisão narrativa da literatura foi realizada na busca de elementos para compor uma rede complexa e dela foram selecionados 37 elementos moleculares e celulares. Estes fatores foram inseridos na criação de uma rede complexa, tendo como ponto de início o vértice HER-2. O impacto de cada vértice na rede foi determinado através do cálculo do erro relativo. A rede foi manipulada através de uma análise com knockout dos vértices para determinar aqueles potenciais alvos que poderiam influenciar a rede. O teste de Wilcoxon foi utilizado para analisar a significância estatística de cada knockout. Dentre os vértices cujos knockouts que mais causaram alterações na estrutura da rede estavam MMP 2 e 9, CDK4/6, TWIST, VEGF e TGF-Beta. Ressaltamos o impacto do knockout de metaloproteases de matriz MMP 2 e 9 na estrutura da rede, e o "downregulation" causado no vértice HER-2, o vértice de início da rede complexa. Guardadas as devidas ressalvas de um modelo experimental teórico, o resultado obtido com este modelo de rede complexa poderia prever o desenvolvimento de novas terapêuticas oncológicas em um futuro próximo do tratamento do câncer de mama HER-2 positivo.

Palavras chave: Câncer de mama. HER-2. Redes complexas.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of neoplasm in women worldwide. In recent years, knowledge about breast cancer has advanced significantly, and we are now aware of the multifactorial nature of its pathophysiology. Multiple molecular and cellular factors are involved in a complex network of interactions, reflecting the difficulty in advancing effective oncological treatments. One theoretical model used to study these interactions is the Graph Model, also known as Complex Networks. This method creates graphical representations that connect vertices (factors) through edges (interactions), utilizing a matrix-based approach. Using this methodology, we aimed to define the complex interactions between the molecular and cellular factors involved in the tumor microenvironment of HER2-positive breast cancer, followed by manipulating elements of the network to assess the impact of each factor. Through this analysis, we sought to identify potential therapeutic targets and mechanisms for cancer treatment. A narrative literature review was conducted to select elements for constructing a complex network, resulting in 37 molecular and cellular factors. These factors were incorporated into the network, with HER-2 as the starting vertex. The impact of each vertex on the network was determined by calculating the relative error. The network was manipulated by performing knockout analyses on the vertices to identify potential targets that could influence the network. The Wilcoxon test was used to analyze the statistical significance of each knockout. Among the vertices whose knockouts significantly altered the network structure were MMP 2 and 9, CDK4/6, TWIST, VEGF, and TGF-Beta. We highlight the impact of knocking out the matrix metalloproteinases MMP 2 and 9, which caused a downregulation of the HER-2 vertex, the starting point of the complex network. Despite the limitations of a theoretical experimental model, the results obtained from this complex network model may predict the development of new oncological therapies for the treatment of HER-2 positive breast cancer in the near future.

Keywords: Breast cancer. HER-2. Complex networks.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Hallmarks of Cancer.....	13
Figura 2 - Exemplos de redes complexas, com as variantes não-direcionada.....	17
Figura 3 - Exemplo de interação entre vértices e representação matemática através.....	19
Figura 4 - Via de sinalização/cascata após ativação do HER-2 com subsequente ativação.....	26
Figura 5. Via de sinalização intracelular no câncer de mama.....	31
Figura 6. A rede complexa de interações entre os vértices.....	56
Figura 7. Comparativo da estrutura das redes complexas mediante knockouts.....	59
Figura 8. Variação na média de fluxo de caminhantes pelo vértice HER-2.....	65
Gráfico 1 - Interação entre os 37 vértices da rede complexa.....	55
Gráfico 2 - O grau de entrada (vermelho) e o grau de saída (preto) da rede complexa.....	57
Gráfico 3 - Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto).....	60
Gráfico 4 - Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto).....	60
Gráfico 5 - Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto).....	61
Gráfico 6 - Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto).....	62
Gráfico 7 - Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto).....	62
Gráfico 8 - Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto).....	63

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Fluxo médio de caminhantes para cada componente da rede complexa.....	58
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AR - Receptor de Andr6genos
- AKT - Prote6na quinase B
- CAAs - Adip6citos Associados ao C6ncer
- CAF - Fibroblastos Associados ao C6ncer
- CCL-2 - Quimiocina C-C Motif Ligand 2
- CDK 4/6 - Quinasas Dependentes de Ciclinas 4/6
- CSC - C6lulas-Tronco do C6ncer
- EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epid6rmico
- EMT - Transi6o Epitelial-Mesenquimal
- ER - Receptor de Estrog6nio
- ERK - Quinase Regulada por Sinais Extracelulares
- FGF2 - Fator de Crescimento de Fibroblastos 2
- HER2 - Receptor 2 do Fator de Crescimento Epid6rmico Humano
- HIF-1 - Fator Induzido por Hip6xia 1
- IGF1 - Fator de Crescimento Semelhante 6 Insulina 1
- KO - Nocaute
- IL-6 - Interleucina-6
- JAK - Janus Quinase
- MAPK - Quinase de Prote6na Ativada por Mit6geno
- MMP2 e MMP9 - Metaloproteinases da Matriz 2 e 9
- mTOR - Alvo da Rapamicina em Mam6feros
- MYC - Proto-Oncogene MYC
- NF-kB - Fator Nuclear Kappa-light-chain-enhancer de C6lulas B Ativadas
- PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

- PELP1 - Proteína Rica em Prolina, Glutamato e Leucina 1
- PI3K - Fosfoinosítideo 3-quinase
- PTEN - Fosfatase e Homólogo da TENSina
- Rb - Proteína Retinoblastoma
- RH - Receptor Hormonal
- RAS - Proteína do Vírus do Sarcoma de Rato
- SCF - Fator de Células-Tronco
- Src - Proto-oncogene Src
- SNAIL - Proteína de Dedo de Zinco SNAI1
- STAT3 - Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
- TANs - Neutrófilos Associados ao Tumor
- TAMs - Macrófagos Associados ao Tumor
- TAZ - Coativador Transcricional com Motivo de Ligação a PDZ
- TGF- β - Fator de Crescimento Transformador Beta
- TILs - Linfócitos Infiltrantes de Tumor
- TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa
- TWIST - Proteína Relacionada ao Twist
- VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular
- Wnt - Site de Integração Relacionado ao Wingless

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
4 MÉTODOS.....	53
5 RESULTADOS.....	55
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa a neoplasia mais comum no sexo feminino em todo o mundo, totalizando 24.5% de todos os novos casos de câncer (Globocan, 2020). Segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer) a estimativa de novos casos para o triênio 2023-2025 é de 73.610 no Brasil (INCA, 2022).

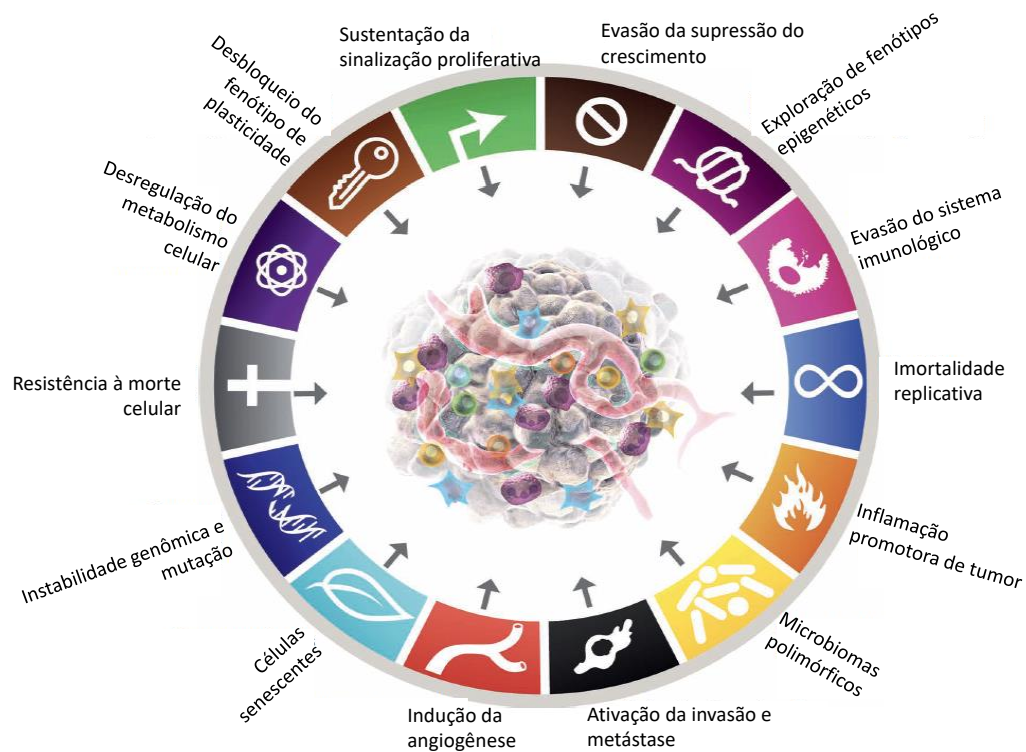
Hoje o câncer de mama é classificado em 4 subtipos moleculares, baseados na expressão de receptores hormonais (RH) e de HER-2 (Human Epidermal Growth Factor 2). A classificação molecular categoriza os tumores em 1) Receptores Hormonais Positivos RH (+) / HER-2 (-) e RH(+) / HER-2 (+), também chamados Luminais - os quais podem expressar concomitante o HER-2; 2) HER-2 “puro” ou hiperexpresso RH(-) / HER-2 (+); 3) Triplo Negativo RH (-) / HER-2 (-). A taxa de sobrevida em 05 anos câncer-específica é de 95,5% para o subtipo RH(+)/HER-2(-), seguido de 94,1% para o subtipo RH(+)/HER-2(+), 89,3% para RH(-)/HER-2(+) e 83,1% para o subtipo RH(-)/HER-2(-) (Hwang,2019). Estas diferenças são explicadas pela variação na fisiopatologia entre os subtipos desta neoplasia, compreendidos como espectros diferentes de uma mesma doença.

A maioria dos óbitos em pacientes com câncer de mama ocorre nas pacientes com doença no estágio clínico IV, ou seja, metastática (Amin, 2018). O processo de metastatização é um processo complexo, que envolve mecanismos a nível celular, tecidual e sistêmico. Para dar origem a chamada metástase, a célula tumoral precisa passar por uma série de etapas e adquirir habilidades que incluem perder a capacidade de diferenciação (tornar-se mais indiferenciada), resistir à mecanismos de morte celular, adquirir capacidade de invasão, constituir uma unidade junto a células mesenquimais, escapar do sistema imune, adentrar a corrente sanguínea sobrevivendo ao stress da circulação, aderir ao endotélio, invadir o tecido-alvo e proliferar no sítio de implantação metastático (Fares, 2020).

A patogênese do câncer é representada através de uma complexa associação de múltiplos fatores, os quais interagem e interferem em maior ou menor grau entre si - os chamados "hallmarks" do câncer", conforme demonstrado na figura 1 (Hanahan, 2022). Toda neoplasia, necessita desenvolver algumas características em conjunto, para poder crescer, sobreviver e se disseminar. Dentre estas características incluímos a capacidade de evadir-se de fatores de supressão de crescimento, reprogramação do seu metabolismo, o escape/fuga do sistema imune, tendência a replicação descontrolada e “imortalidade celular”, promoção de inflamação e modelamento do microambiente para um cenário pró-tumorigênico, angiogênese para a formação de neovasos e obtenção de suprimentos, migração celular e invasão de

tecidos adjacentes e à distâncias - o chamado processo de metastatização e outros. Sendo assim, atualmente não admite-se analisar a fisiopatologia e o tratamento do câncer sob uma ótica unifatorial.

Figura 1. Características fundamentais do Câncer (*Hallmarks of Cancer*)



Fonte: Adaptado de HANAHAN, 2022.

Todo tumor, histologicamente corresponde a um complexo microambiente tumoral composto pelas células cancerígenas e por células não-cancerígenas. Essas interagem entre si contribuindo para a progressão da neoplasia. Dentre as células não-cancerígenas temos as células imunes, os fibroblastos associadas ao câncer, células endoteliais, mastócitos, adipócitos, neutrófilos e outras (De Visser, 2023). As células tumorais recrutam as células não-tumorais que irão compor o microambiente e também as moldam para favorecer a sustentabilidade da massa tumoral, através da comunicação celular. Seja através de uma comunicação por contato, através de integrinas e caderinas, ou parácrina por meio de citocinas e fatores de crescimento.

Intrinsecamente a célula tumoral também apresenta uma complexa maquinaria composta de várias cascatas enzimáticas iniciadas por gatilhos (receptores) disparados por estímulos

(ligantes) diferentes. Muitas destas moléculas (tanto receptores quanto ligantes) já se tornaram alvos terapêuticos no câncer de mama, e hoje compõem o arsenal terapêutico contra esta doença, incluindo o receptor de estrogênio e o receptor HER-2 (Osborne, 2005; Montemurro, 2013).

Até 15 % dos casos de câncer de mama apresentam superexpressão de HER-2 (KING, 1985). Este subtipo também é chamado de HER-2 positivo, e HER2 superexpresso. O receptor HER-2 é um receptor transmembrana que pertence a família de receptores de crescimento epitelial, cuja sigla é EGFR (do inglês, Epidermal Growth Factor Receptor). Esses receptores ao serem ativados desencadeiam a maquinaria celular através de cascatas moleculares como vias de crescimento, proliferação celular, angiogênese e muitos outros (Swain, 2023). Um dos maiores avanços na oncologia ocorreu através dos resultados do tratamento do câncer de mama atacando o alvo HER-2, primeiramente através do anticorpo monoclonal anti HER-2 Trastuzumabe. Em 2001 tivemos o primeiro dado robusto de eficácia com a demonstração de que a adição Trastuzumabe à quimioterapia aumentou a mediana de sobrevida global das pacientes com câncer de mama metastático, em aproximadamente 5 meses (Slamon, 2001). Não demorou para que estes resultados fossem replicados no cenário adjuvante, possibilitando a cura de pacientes após a cirurgia, com aumentos absolutos entre 8-9% nas taxas de sobrevida livre de progressão e sobrevida global em 5 anos (Piccart-Gebhart, 2005; Romond, 2005; Slamon, 2011). Seguiu-se a associação do duplo bloqueio do receptor HER-2 com a associação de Pertuzumabe a Trastuzumabe e a mudança radical no prognóstico e curso desta doença seguiu evoluindo. No cenário metastático esta estratégia prolongou o tempo de sobrevida mediano de 40,8 meses para 57,1 meses (Swain, 2015). No cenário neoadjuvante, o duplo bloqueio com Trastuzumabe + Pertuzumabe + Docetaxel atingiu taxas de resposta patológica completa de 39,3% versus 21,8% (braço controle com Trastuzumabe + Docetaxel) (Shao, 2020).

O papel central do HER-2 na fisiopatologia deste subtipo de câncer de mama foi comprovada pelo impacto que o bloqueio molecular causou nas taxas de resposta e o ganho de sobrevida livre de progressão e sobrevida global. Mas a fisiopatologia do câncer não depende de apenas uma via. E o câncer consegue progredir através de outros mecanismos. No extremo de variantes do câncer de mama, temos o subtipo triplo negativo e o subtipo luminal A, sendo que tumores com HER2 superexpresso podem estar em vários pontos desta linha. Muitas vezes expressando concomitantemente receptores hormonais de estrogênio e progesterona além do HER2 superexpresso (Harbeck, 2019).

No subtipo de câncer de mama RH(+)/HER (-) o advento dos inibidores de CDK (do inglês, Cyclin Dependent Kinases) no subtipo luminal impactou de maneira significativa a sobrevida das pacientes com câncer de mama receptor hormonal positivo (Johnston, 2019; O'Shaughnessy, 2018; Rugo, 2019). Por esse motivo, a associação de inibidores de CDK ao trastuzumabe na doença HER-2 positiva foi testada, porém não demonstrou ganhos significativos em comparação à quimioterapia padrão associada ao trastuzumabe (Tolaney, 2020). Outros dados apontam que pacientes tratados com inibidores de CDK cujos tumores possuíam HER-2 score 0 respondiam melhor, do que aqueles que expressavam HER-2 low (score 1)(Sharaf, 2023; Zattarin, 2023).

Outro avanço recente no tratamento do câncer de mama, desta vez no subtipo triplo negativo, foi o emprego da Imunoterapia a base de inibidores de checkpoint imunológico. Este tratamento sagrou-se tanto no cenário neoadjuvante como metastático para tumores Triplo Negativos. Entretanto, no subtipo HER-2 positivo, a adição da imunoterapia não trouxe os mesmos resultados satisfatórios ou estatisticamente significativos (Huober, 2022; Emens, 2020).

As respostas não favoráveis observadas com imunoterapia, bloqueio hormonal e inibidores de ciclina no cenário do câncer de mama com HER-2 superexpresso demonstram a singularidade de cada tipo de câncer de mama. Seguindo esta linha de raciocínio, estudar a fisiopatologia deste subtipo de câncer de mama dentro das complexas interações entre os demais fatores moleculares e celulares do microambiente tumoral é o caminho para novas descobertas científicas e desenvolvimento de novas drogas. Neste trabalho é descrita uma revisão narrativa da literatura, a qual embasou a confecção de uma rede complexa. Incluindo vários componentes da fisiopatologia tumoral, partindo do vértice HER-2, seguindo suas interações a nível molecular e celular dentro do microambiente tumoral.

2 OBJETIVOS

- Usar a teoria dos grafos para estudar a relação e interação entre os fatores envolvidos na fisiopatologia do câncer de mama com superexpressão de HER-2.
- Desenhar uma rede complexa ilustrando a complexidade da fisiopatologia do câncer de mama.
- Avaliar as características da rede complexa, determinando o fluxo de entradas e saídas de cada vértice na rede.
- Avaliar o impacto do knockout de cada vértice na estrutura da rede, gerando hipóteses sobre a magnitude da influência de cada fator e seu potencial como alvo terapêutico no câncer de mama.

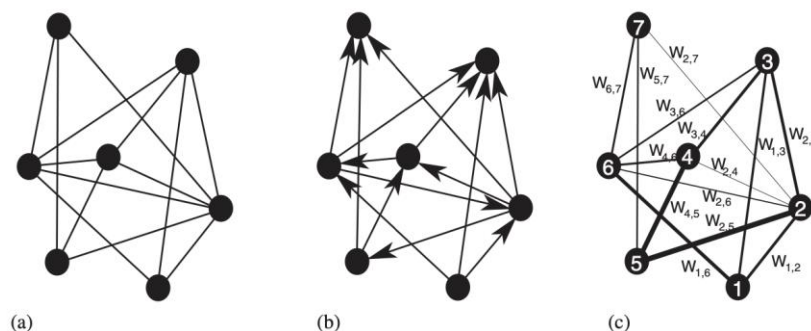
3 REVISÃO DA LITERATURA

A rede complexa

Uma rede complexa é uma estrutura única que agrupa vários vértices e desenha relações entre cada um destes através de arestas (Metz, 2007). Toda rede complexa seria um grafo, que nada mais é do que uma abstração visual de vários elementos e as relações entre si. As redes complexas existem na vida real em muitos cenários e teorizam muitos campos. Por exemplo, dentro de uma Secretaria de Estado existem vários funcionários e servidores, os quais se relacionam de maneiras diferentes, em intensidades diferentes, com colegas diferentes e nem sempre com todos. Alguns podem se relacionar entre si diretamente ou indiretamente por meio de outros. Esta complexa estrutura pode ser recriada através de um grafo. Outro exemplo do cotidiano seria a rede de computadores mundial, a internet, com a sua complexa interação de usuários e sites. E por fim, dentro da biologia, a teoria de redes complexas vem ganhando cada vez mais destaque na sua interseção com cenários biológicos multifatoriais como a biologia celular e a fisiopatogênese.

Um grafo é a estrutura matemática que representa redes complexas (West, 1995). De forma simplificada um grafo é estruturado por 02 elementos: vértices (também chamados nodos) e arestas (linhas); onde os vértices representam os elementos que interagem e as linhas representam estas interações, como exemplificado na figura 2 (BOCCALETTI, 2006).

Figura 2. Exemplos de redes complexas, com as variantes não-direcionada, direcionada e com pesos. a) Uma rede direta; b) Indireta ponderada; c) Grafo com $N=7$ e $K=14$ conexões



Fonte: Boccaletti, et al. *Complex networks: Structure and dynamics. Physics Reports* (2006), 424(4-5), 175–308.

Desta forma, para desenvolver uma rede complexa, precisamos primeiramente definir os nós (vértices). Estes seriam os fatores entre os quais queremos verificar as interações. Em seguida, devemos procurar estabelecer ou definir as conexões existentes entre nós. Quando um nó se relaciona com outro, esta relação é representada na rede através de uma aresta. E esta conexão pode se dar de muitas formas. Basicamente existem 3 tipos de redes complexas.

1. Rede Aleatória: Os pares de nós são conectados de uma maneira aleatória, sem nenhum padrão ou regra específica, gerando assim uma rede com conexões de forma imprevisível. Proposto inicialmente por Erdős e Rény, arestas seriam inseridas aleatoriamente entre um número fixo de N vértices nós gerando assim grafos aleatórios (Barabasi, 1999).
2. Rede de Pequeno Mundo: Esta rede idealizada por Watts e Strogatz se inicia conectando nós "vizinhos", que possuam uma proximidade entre si, para na sequência conectar de forma aleatória a outros nós (Watts, 1998). Esta rede possui como característica arestas curtas determinando interações fáceis e rápidas entre os seus vértices e a teoria por trás desta rede seria de que a distância média entre dois vértices quase nunca ultrapassa um pequeno número de vértices, com conexões similares em sua maioria e poucas aleatórias em meio à rede (Buchanan, 2002).
3. Rede sem escala: são redes em que os novos nós tendem a se conectar àqueles que já possuem mais conexões. Isso gera redes com vértices tendendo a acumular mais conexões na rede do que outros, os chamados hubs (Barabasi, 1999).

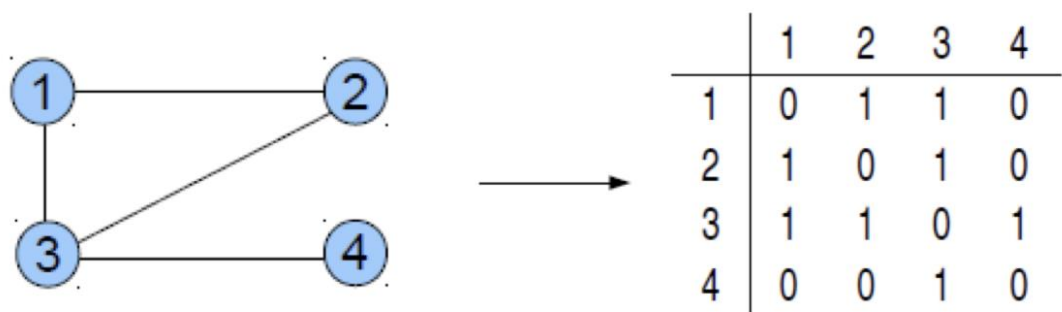
As redes possuem propriedades em comum e podem resultar em uma análise complexa envolvendo várias métricas. Mas abaixo cito algumas das principais propriedades:

1. Transitividade ou Clusterização: Quando o vértice A se conecta a B e o vértice B se conecta a C, existe uma probabilidade maior de o vértice A também se conectar a C. Isso gera uma tendência a agrupamentos em certos pontos da rede, também chamados clusters (Scott, 2000).

2. Grau: a Gradação de um vértice representa o número de arestas (conexões) incidentes sobre ele (Newman, 2003).
3. Resiliência: É a propriedade de um grafo manter sua estrutura mediante a remoção de um vértice. Portanto a resiliência pode variar para mais ou para menos dependendo dos outros fatores como a clusterização, o número de vértices, de conexões e o grau de cada vértice (Albert, 2000).

Matematicamente uma rede complexa é definida como um conjunto de V nós, ou vértices, e L ligações, ou arestas. A topologia das conexões é representada pela matriz de adjacência, ou conectividade, $A = \{a_{ij}\}$, onde $i, j = 1, 2, \dots, V$, com elementos iguais a 1 se o nó j está conectado ao nó i , e 0 caso contrário (figura 3).

Figura 3. Exemplo de interação entre vértices e representação matemática através de uma matriz 4x4



Fonte: o autor

Se as conexões são direcionadas, então $a_{ij} \neq a_{ji}$, em geral. A rede complexa é considerada uma rede fixa, com um número constante de vértices e arestas. A rede também é completa, ou seja, não há vértices desconectados no gráfico (Strogatz, 2001). Existem várias medidas para caracterizar a estrutura de uma rede complexa. Vamos focar na medida mais simples, o grau. O grau caracteriza a propriedade de conectividade de um único vértice em uma rede complexa. Definimos duas medidas de grau para cada vértice: o grau de entrada, $k_{i,in}$, e o grau de saída, $k_{i,out}$, respectivamente como:

$$k_{i,\text{in}} = \sum_{j=1}^V a_{ji},$$

$$k_{i,\text{out}} = \sum_{j=1}^V a_{ij}.$$

Essas medidas simplesmente contam o número de conexões de entrada (grau de entrada) e de saída (grau de saída) de um vértice. Em uma rede conectada, $k_i \neq 0$ para todos os vértices. Os vértices na rede interagem dinamicamente através das conexões dadas pela matriz de adjacência. Para modelar essa dinâmica, definimos uma caminhada aleatória na rede. A caminhada aleatória é um processo estocástico em passos de tempo discretos, no qual um caminhante segue um caminho definido pela topologia da rede. Em nosso modelo, os caminhantes partem de um vértice fixo, e o processo é dado pelos seguintes passos:

1. Em um instante inicial de tempo t (discreto), um caminhante w inicialmente no vértice $i = 1$ da rede, muda sua posição para um vértice j à medida que o tempo muda de t para $t + 1$.
2. O caminhante muda sua posição aleatoriamente respeitando a direcionalidade das arestas, ou seja, o caminhante pode mudar do vértice i para o vértice j se, e somente se, $a_{ij} = 1$.
3. À medida que o tempo muda de t para $t + 1$, um novo caminhante é criado no vértice $i = 1$, e as posições de todos os caminhantes são atualizadas de acordo com os passos 1 e 2.

O número total de caminhantes na rede é $N(t) = t$ e a concentração de caminhantes em cada vértice em um instante de tempo t é dada pelo vetor

$$\mathbf{S}(g; t) = (s_1(t), s_2(t), \dots, s_V(t))$$

onde $s_i(t)$ corresponde ao número total de caminhantes no i -ésimo vértice no instante de tempo t . Portanto, a densidade, ou fluxo, de caminhantes de cada vértice é

$$f_i(t) = \frac{s_i(t)}{t},$$

e o fluxo do vértice é definido como

$$\mathbf{f}(g; t) = (f_1(t), f_2(t), \dots, f_V(t))$$

Quanto maiores os valores de $f_i(t)$, mais o vértice i está sendo ativado, ou mais informações estão passando por esse agente. Como a rede está conectada, o vetor de fluxo de caminhantes, $\mathbf{f}$, tende a uma distribuição estacionária à medida que $t \rightarrow \infty$. Para entender como as mudanças topológicas na rede influenciam o comportamento estatístico de $\mathbf{f}$, nocauteamos (KO) um vértice, ou seja, removê-lo da rede, resultando em um novo grafo g' , e estudamos a quantidade

$$\Delta \mathbf{f} = \mathbf{f}(g; T) - \mathbf{f}(g'; T)$$

onde $\mathbf{f}(g'; T)$ corresponde ao vetor de fluxo na rede KO. Os elementos de $\Delta \mathbf{f}$ podem ser positivos ou negativos. Se positivos (negativos), isso significa que o KO aumenta (diminui) a ativação do agente i . O erro relativo de cada vértice é definido como

$$\mu_i = \begin{cases} \frac{\Delta f_i}{f_i(g, T)} & \text{if } \Delta f_i > 0, \\ \frac{|\Delta f_i|}{f_i(g'; T)} & \text{if } \Delta f_i < 0. \end{cases}$$

Observe que $\dim(\boldsymbol{\mu}) = \dim(\Delta \mathbf{f}) = V - 1$. A média do erro relativo é simplesmente

$$M(g, g'; T) = \frac{1}{V-1} \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq i_{\text{KO}}}}^V \mu_i.$$

onde iKO corresponde ao índice do vértice KO. Para obter numericamente o fluxo de caminhantes, consideramos um tempo total de $T = 10^4$, onde a cada passo de tempo um novo caminhante é criado, resultando em 10^4 caminhantes. Repetimos este procedimento $L = 100$ vezes e calculamos o vetor de fluxo médio como

$$\bar{\mathbf{f}}(g; T, L) = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \mathbf{f}_i(g; T).$$

Fatores moleculares e celulares (vértices da rede)

A revisão bibliográfica narrativa foi realizada partindo da busca por HER-2 e sua implicação no câncer de mama. Para cada parágrafo da revisão a seguir, um dos vértices da rede será descrito, trazendo as referências quanto às suas funções e suas interações com os demais vértices escolhidos.

1- HER-2 - Human Epidermal Growth Factor 2

O receptor HER2 é um receptor de membrana celular membro da família de receptores HER/ErbB, composta pelos quatro subtipos a seguir: HER1 (também chamado EGFR), HER2, HER3 e HER4. São receptores transmembrana com um domínio extracelular e um domínio intracelular com função enzimática de tirosino-quinase, responsável por disparar uma cascata intracelular mediante estímulo externo e ativação do receptor (Van de Geer, 1994). Os receptores HER existem como monômeros, porém mediante o estímulo de ligantes no domínio extracelular, estes receptores se juntam formando dímeros. Estes podem ser homodímeros (quando formados pela ligação de receptores do mesmo subtipo HER1-HER1) ou heterodímeros (quando formados pela ligação de receptores de subtipos diferentes, por exemplo HER3 - HER2).

Diferentemente dos demais receptores da família, o HER2 não possui ligantes identificados sendo incapaz de formar homodímeros - exercendo sua função através da formação de heterodímeros com os demais subtipos (Tzahar, 1998). Apesar de não ter ligantes específicos e não formar homodímeros, o HER2 parece possuir a maior afinidade de ligação dentre todos os receptores da família HER, determinando assim uma maior influência sua na sinalização celular mediante a heterodimerização (Tzahar, 1996). Heterodímeros tendem a

transmitir sinalizações mais potentes que homodímeros, principalmente heterodímeros contendo HER2. Isso ocorre devido ao HER2 possuir uma taxa menor de dissociação de ligantes e também por sofrer um processo de endocitose mais lento que os demais receptores, ficando desta forma mais tempo em atividade (Baulida, 1996; Alroy, 1997).

O receptor HER2 dispara vários sinais intracelulares por meio do seu domínio tirosino quinase ao fosforilar resíduos de tirosina levando a ativação de cascatas de sinalização moleculares por meios de múltiplos ligantes. Dentre eles o proto-oncogene Src (Src), o fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K, do inglês Phosphoinositide 3-kinase), o receptor de estrogênio (ER, do inglês Estrogen Receptor) e o Ativador do transdutor de sinal de transcrição 3 (STAT3, do inglês Signal Transducer Activator of TRanscription 3) dentre outros. De dados de estudos no campo da embriologia sabemos que a família de receptores HER é essencial para a replicação celular e proliferação tecidual, estando envolvida no crescimento e formação de vários sistemas durante a organogênese e também na reparação tecidual (Chen, 2016).

Mas sabemos que existe uma linha muito tênue entre a realização de todas estas funções orgânicas/fisiológicas e a carcinogênese. Muitos dos efeitos celulares e teciduais induzidos pelo estímulo de EGFR - como a proliferação celular, estímulo à vascularização, modulação do estroma e interação com células do sistema imune - são também características intrínsecas de uma neoplasia. E os receptores HER podem estar diretamente envolvidos na carcinogênese ao estarem superexpressos ou com ganho de função. Isso pode ocorrer de várias formas, as quais incluem mutações no domínio de tirosino quinase do gene HER2 que acarretam em hiperativação ou superexpressão do receptor. Ou então através de mutações que amplificam o DNA do HER-2, ocasionando maior síntese e expressão deste receptor (Galore, 2023). Esta superexpressão, ou ganho de função, com implicações prognósticas e terapêuticas está presente não só no câncer de mama, mas também no câncer de estômago, câncer de pulmão e outros (Amisha, 2023).

A proteína HER-2 também apresenta uma interação particular com o receptor de estrogênio, podendo ativar vias de sinalização sobrepostas. Vias de sinalização estas que se cruzam, como a via PI3K /AKT e a via MAPK (mitogen-activated protein kinase) / ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase), promovendo a sobrevivência e proliferação celular. A ativação de HER-2 pode levar à fosforilação do receptor de estrogênio, modulando sua atividade e promovendo a transcrição de genes dependentes de estrogênio. A ativação de HER-2 também pode diretamente amplificar a sinalização de ER, levando a um aumento na

transcrição de genes que promovem a progressão do ciclo celular (Massarweh, 2007 e Shou, 2004).

A interação entre o HER-2 e a interleucina-6 (IL-6) no contexto do câncer de mama é um campo de estudo ativo, dado o papel dessas moléculas na proliferação celular, inflamação e resistência ao tratamento. A superexpressão de HER-2 aumenta a produção de IL-6, que por sua vez ativa a via de sinalização STAT3. Esta ativação promove características de células-tronco no câncer de mama, contribuindo para a tumorigênese e resistência ao tratamento (Sansone, 2007).

Uma característica essencial a qualquer bloco tumoral é sua capacidade de invasividade e disseminação, o chamado processo de formação de metástases. Estudos têm mostrado que a expressão de N-caderina em células de carcinoma de mama está correlacionada com uma maior invasão tumoral e motilidade celular. Especificamente, a N-caderina promove a motilidade celular e a invasão através da sinalização mediada por HER-2/HER-3 (Qian, 2014).

A ativação de HER-2 não atua apenas a nível de cascatas de sinalização da mesma via, as chamadas "downstream regulated pathways". A capacidade de ativar vias paralelas também é uma característica intrínseca do câncer, e o HER-2 também pode interagir e estimular vias ativadas por receptores paralelos como o Wnt (do inglês Wingless-related integration site). A via do Wnt/ β -catenina é fundamental para vários processos celulares, como o desenvolvimento embrionário e a homeostase dos tecidos adultos. Em células cancerosas, a ativação autócrina da sinalização Wnt leva à estabilização da β -catenina, que se acumula no citoplasma e se transloca para o núcleo, promovendo a transcrição de genes oncogênicos (Choi, 2019).

A inflamação também é uma característica essencial aos tumores em progressão/crescimento. E a CCL2 (Chemokine C-C Motif Ligand 2), uma quimiocina inflamatória, é frequentemente elevada em tumores de câncer de mama e está associada ao recrutamento de Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs). Estes TAMs promovem a angiogênese, o crescimento tumoral e a metástase. Estudos demonstraram que a sinalização de HER2 pode aumentar a expressão de CCL2, criando um microambiente tumoral que favorece a progressão do câncer de mama através do recrutamento de células imunes e promoção da inflamação tumoral (Triulzi, 2018).

Outra importante característica que o HER-2 possui, como via inicial de sinalização pró-tumoral, é a capacidade de transformar vias anti-tumorais em pró-tumorais. Uma destas vias afetadas pelo estímulo de HER-2 é o TGF-Beta (Transforming Growth Factor-beta). O

TGF-Beta pode ter funções distintas dependendo dos estímulos do microambiente tumoral. Em fases precoces ele pode inibir a proliferação celular e bloquear o processo neoplásico, enquanto que em fases mais tardias, quando um pool de células tumorais já se formou ele pode promover metástases através da transição epitélio-mesenquimal e migração celular (Huang, 2018).

Apesar de ser uma proteína transmembrana, a nível de integração interno-externo, o HER-2 também consegue atuar na transcrição de genes associados à tumorigênese. A proteína TAZ (sigla do inglês para transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) é um fator de transcrição que regula genes envolvidos na proliferação celular, sobrevivência e invasão; e esta é diretamente estimulada pelo HER-2. A ativação do TAZ pelo HER-2 pode levar à supressão da apoptose, aumento da migração e invasão celular, bem como resistência à terapia direcionada contra o HER-2. Além disso, o TAZ também pode modular a expressão do próprio HER-2, criando um loop de retroalimentação positiva que amplifica os efeitos da sinalização do HER-2 no crescimento tumoral (Panciera, 2020). Outro modo de ação sobre a TAZ se dá através da PI3K. Estudos indicam que a ativação da PI3K, especialmente através de mutações como PIK3CA-H1047R, pode positivamente regular a atividade de TAZ, promovendo a tumorigênese em células mamárias. A interação entre PI3K e TAZ foi observada em diversos modelos experimentais, sugerindo que essa via pode ser um alvo terapêutico promissor para o tratamento de cânceres relacionados à hiperativação de PI3K (Zhao, 2018).

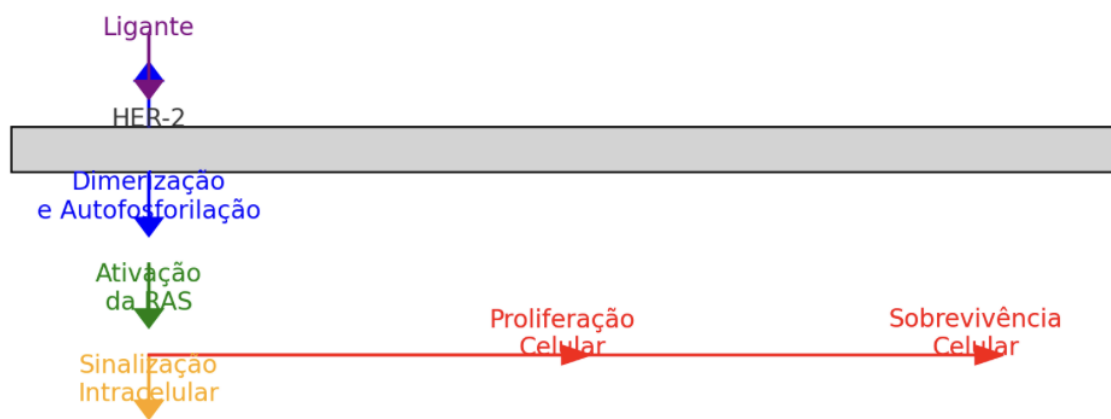
A sinalização HER2 também impacta na população celular do microambiente tumoral. A hiperexpressão de HER-2 pode estimular a proliferação celular, incluindo a proliferação das células-tronco tumorais, levando ao aumento do número de células-tronco no tumor. Com o aumento do pool de células tronco, existe um estímulo à sobrevivência celular, incluindo a sobrevivência das células-tronco tumorais, tornando esses clones mais resistentes à morte celular programada (apoptose). Lembramos que células tronco tumorais também possuem uma maior plasticidade, podendo derivar linhagens tumorais ou de células não tumorais essenciais ao microambiente, como fibroblastos, adipócitos e células endoteliais (Korkaya, 2009).

A partir deste ponto iremos revisar cada vértice que foi incluído na rede a partir da revisão narrativa, iniciada com o HER-2.

RAS (Rat Sarcoma Virus protein)

A proteína RAS é uma proteína de "meio", uma proteína de transdução de sinais intracelulares. Ela está presente no citoplasma da maioria das células, incluindo as células tumorais, e é responsável por propagar os sinais transmitidos do meio ambiente através da ativação dos receptores transmembrana (Figura 4). Dentre estes, os receptores da família EGFR, incluindo o HER-2. A proteína RAS é portanto uma importante via de sinalização e ativação de cascatas moleculares que irão em última instância regular a proliferação celular, dentre outros processos intracelulares (Karnoub, 2008).

Figura 4. Via de sinalização/cascata após ativação do HER-2 com subsequente ativação do RAS



Fonte: o autor

As proteínas RAS são sistemas binários que encontram-se em duas formas, ativas quando ligada a Guanosina trifosfato e inativas na forma ligada a Guanosina Difosfato. E este estado molecular varia de acordo com o estímulo recebido (Bourne, 1990). Em células normais a proteína RAS, após estimulada, tende a em algum momento ser inativada e entrar no estado de latência. No seu estado hiperativado, as proteínas do sistema RAS estimulam outras proteínas importantes para a multiplicação celular, como RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma) quinase, PI3K (phosphoinositide-3 kinase), ERK (Extracellular signal-regulated kinase) e outros (Mendoza, 2011).

Através da ativação de via da PI3K, o RAS pode ativar também indiretamente a molécula mTOR(Mammalian Target of Rapamycin), uma serina/treonina quinase central que regula o crescimento celular em resposta a nutrientes, fatores de crescimento e energia celular (ROJAS, 2012 e CASTELLANO, 2011). E a ativação do RAS em última instância também impacta na regulação de CDK4/6 (Cyclin Dependent Kinases 4/6), enzimas "chave" na progressão do ciclo celular e mitose. A ativação de RAS leva à indução da expressão de

ciclina D através da via MAPK-ERK. Ciclina D se liga e ativa CDK4/6, formando complexos que fosforilam a proteína do retinoblastoma (Rb, do inglês Retinoblastoma Protein). A fosforilação de Rb libera o fator de transcrição E2F, permitindo a transcrição de genes necessários para a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Ewen, 2000 and Marshall, 1999).

PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)

A fosfatidilinositol 3-quinase é uma proteína com função enzimática envolvida na sinalização celular, desempenhando papéis cruciais em diversos processos biológicos, incluindo crescimento celular, sobrevivência, metabolismo e mobilidade celular. As PI3Ks são ativadas por várias moléculas de sinalização, como receptores de tirosina quinase (como por exemplo o HER-2), receptores acoplados à proteína G e receptores de antígeno em células imunológicas (Fruman, 2017). Quando ativada por receptores de tirosina quinase ou receptores acoplados à proteína G, a PI3K catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). O PIP3 serve como um segundo mensageiro que recruta proteínas contendo domínios PH (pleckstrin homology), incluindo a proteína quinase B. E esta por sua vez ativa a mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), proteína essencial na tradução de mRNA e síntese protéica (Saxton, 2017).

A via PI3K influencia indiretamente a via Wnt por meio da ativação da via AKT. AKT leva a inativação de GSK-3 β , um componente crucial do complexo de degradação da β -catenina. A β -catenina acumulada em maior quantidade então se transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes Wnt-alvo (Liu, 2002). Esta sinalização cruzada pode promover a proliferação e sobrevivência das células tumorais.

A via PI3K/AKT também estimula a mitose e progressão do ciclo celular por meio de CDK4/6, através da produção de ciclinas. A AKT derivada da via PI3K leva a inativação de proteínas inibidoras de CDK (CKIs), como p21 e p27, através de fosforilação, promovendo sua exclusão do núcleo e degradação citoplasmática. E esta redução dos níveis de CKIs permite uma maior atividade dos complexos CDK4/6-Ciclina D (Musgrove, 2006).

A via da PI3K também é uma via muito acionada nas outras populações de células do microambiente tumoral. Os macrófagos associados ao câncer têm sua via de PI3K estimulada pelo fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e outras citocinas (Solinas, 2017). Além da ativação da proliferação, ocorre uma polarização dos macrófagos para um fenótipo que suporta o crescimento tumoral, o chamado fenótipo M2 (Vergadi,

2017). Outra população para a qual a via do PI3K sinaliza sobrevivência, crescimento e degranulação são os mastócitos. E especificamente na população de mastócitos intratumorais, a degranulação (processo no qual liberam mediadores inflamatórios) promove a progressão tumoral ao aumentar a angiogênese e remodelar o microambiente para favorecer o crescimento do tumor (Fukao, 2003). Uma outra célula com papel central no microambiente tumoral são os adipócitos, e a hiperativação da via PI3K nestas células leva ao aumento da lipólise, que fornece ácidos graxos livres para células tumorais, suportando assim o crescimento e a proliferação do tumor (Koudouros, 2020).

Src - proto-oncogene Src

O proto-oncogene Src é um gene que codifica uma proteína tirosina quinase chamada Src. Esta proteína desempenha um papel importante na regulação do crescimento celular, proliferação e diferenciação. Src é um exemplo clássico de um oncogene, um gene que, quando mutado ou expresso em níveis elevados, pode contribuir para o desenvolvimento de câncer (Lieu, 2010). Ele está ligado à co-estimulação de muitas outras vias celulares como a via do RAS, com a qual desempenha um loop de feedback. A proteína Src, uma tirosina quinase não receptora, pode ser ativada por diversos estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, e atua upstream (uma etapa acima na cascata de sinalização) da família RAS, especialmente da isoforma RAS-GRF1. E esta por sua vez, ativa diversas vias de sinalização, incluindo a via MAPK, que culmina na regulação da expressão gênica e na progressão do ciclo celular (Frame, 2002). Outra molécula diretamente estimulada pela proteína Src é a PI3K e estudos têm demonstrado que a regulação do PI3K por Src é complexa e multifacetada, envolvendo interações diretas entre as duas proteínas, bem como modulação indireta através de outras proteínas de sinalização (Wheeler, 2009). Outra molécula central na maquinaria celular envolvida na tumorigênese é o STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), e esta também pode ser ativada diretamente pela Src por meio de fosforilação em resíduos específicos, levando à sua translocação para o núcleo e ativação de genes-alvo. Além disso, Src também pode modular indiretamente a atividade de STAT3 por meio de outras vias de sinalização, como a via JAK/STAT (Yu, 2004).

Src pode estimular a expressão e secreção de VEGF por várias células, incluindo as células tumorais e células endoteliais, através de diferentes vias de sinalização intracelular. Src também pode modular a sinalização do receptor de VEGF (VEGFR), potencializando

assim os efeitos angiogênicos do VEGF, conforme demonstrado em modelos animais (Summy, 2005).

ERK - Extracellular signal-Regulated Kinase

A proteína ERK é uma enzima quinase que desempenha um papel fundamental na transdução de sinais intracelulares em resposta a estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, hormônios e estresse celular. Uma vez ativada, a ERK é translocada para o núcleo da célula, onde pode fosforilar uma variedade de proteínas-alvo, incluindo fatores de transcrição, regulando assim a expressão gênica e influenciando uma ampla gama de processos celulares, como proliferação, diferenciação, sobrevivência celular e resposta a estresse (Roskoski, 2012). A influência da via de sinalização ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) sobre a via mTOR tem sido amplamente estudada em diversos contextos biológicos, incluindo crescimento celular, sobrevivência e metabolismo. A ativação da via ERK, que faz parte da cascata MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), pode levar à modulação da via mTOR, uma serina/treonina quinase que regula processos celulares cruciais como a síntese proteica e a autofagia. Além disso, sabe-se que a via ERK pode interagir com PI3K e Akt (protein kinase B), outra via importante na regulação de mTOR (Mendoza, 2011).
protein kinase B

Estudos apontam que a ativação de ERK é crucial para o processo de invasão e disseminação de metástases. Isso passa pela expressão de metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 (do inglês, Matrix Metalloproteinase 2 and 9) através da regulação da transcrição gênica. A ativação de ERK leva à fosforilação de fatores de transcrição como AP-1 (activator protein 1) e NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), que se ligam aos promotores dos genes MMP-2 e MMP-9, aumentando sua transcrição. A sinalização ERK também modula negativamente as moléculas intermediárias chamadas TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases), levando a uma maior atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9 no tecido tumoral (Smith, 2010 e Zucker, 2002). Em conjunto com a alteração de matriz extracelular tumoral, a ativação da via ERK está ativamente relacionada à transcrição e expressão do VEGF, estimulando a angiogênese e neoformação vascular (Liu, 2014). Dentro do microambiente tumoral, outras células também são influenciadas pela ativação da via ERK, incluindo as células musculares lisas. Estas aumentam sua expressão de PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) mediante ativação desta via. E o PDGF é um importante regulador da proliferação e migração celular, especialmente em células

mesenquimais e endoteliais (Zhang, 2009). Esta combinação de estímulos de outras células, invasividade tumoral e remodelação da matriz extracelular favorece a progressão tumoral e a isso soma-se a estímulos para o processo de transição epitélio mesenquimal - processo onde as células tumorais com perfil epitelial (mais aderidas e mantendo um conformacao) mudam seu fenótipo para o de células mesenquimais (mais desgarradas, disseminadas e com capacidade de locomoção dentro do estroma). E a proteína SNAIL (Zinc finger protein SNAI1) é um fator diretamente envolvido na transição epitélio-mesenquimal, e que por sua vez é mais expresso e também mais duradouro mediante estímulo de ERK (Vega, 2004). A ativação de ERK também reduz a degradação das ciclinas, favorecendo o funcionamento das CDK4 e 6 e a progressão do ciclo e replicação celular (Mulloy, 2003).

mTOR - Mammalian Target of Rapamycin

A mTOR é uma serina/treonina quinase que integra sinais de nutrientes, fatores de crescimento, energia celular e estresse para coordenar processos biológicos críticos. A via da mTOR é uma das principais vias de sinalização celular envolvidas na regulação do crescimento, proliferação, metabolismo e sobrevivência celular (Saxton, 2017).

Quando estimulada, esta via pode estimular outras moléculas como o MYC, um fator de transcrição que regula a expressão de muitos genes envolvidos na proliferação, metabolismo e crescimento celular. A ativação desregulada de MYC, frequentemente observada em muitos tipos de câncer, pode ser sustentada pela sinalização mTORC1. Isso resulta em um ciclo de retroalimentação positiva onde MYC e mTORC1 se potencializam mutuamente, promovendo a proliferação celular e a sobrevivência das células tumorais (Mills, 2008).

As matrizes de metaloproteases 2 e 9, que já foram citadas anteriormente, também sofre um aumento em sua expressão mediante ação da via mTOR e estudos mostraram que a inibição desta via reduz a expressão de MMP2 e MMP9 (JOECHLE, 2022; CIOŁCZYK-Wierzbicka, 2020 e Mao, 2021).

A proteína TWIST (vértice 13 do grafo) é um fator de transcrição básico helix-loop-helix que promove a EMT (Epithelial - mesenchymal transition), o processo essencial para invasão e disseminação de células tumorais. A ativação da via mTOR pode aumentar a expressão de TWIST, promovendo a progressão tumoral e a metástase (Gener, 2019). Estudos também apontam sobre a regulação direta da via mTOR sobre a ativação de CDKs e ciclinas, favorecendo a proliferação celular e contribuindo para o crescimento tumoral, conforme

devido ao seu papel na promoção da proliferação celular e na inibição da apoptose (Yu, 2000). Uma das principais vias de sinalização ativadas pelo IGF-1 é a via PI3K/Akt, que é essencial para a sobrevivência celular, crescimento, proliferação e metabolismo celular tumoral (Manning, 2017). Especificamente no cenário do câncer de mama, outra interação importante de IGF-1 ocorre com o receptor de estrogênio (ER), onde IGF-1 pode aumentar a transcrição e a atividade do receptor de estrogênio de várias maneiras (Lee, 2001). Além destas funções já descritas acima, IGF-1 influencia também a expressão e atividade de várias metaloproteinases de matriz (MMPs), particularmente MMP-2 e MMP-9. Em pesquisa com células de câncer de mama, foi observado que IGF-1 pode aumentar a transcrição e ativação de metaloproteinases de matriz, o que contribui para a invasão celular e a metastização (Walsh, 2011).

MYC - MYC Proto-Oncogene

MYC é um gene regulador que codifica um fator de transcrição nuclear essencial para o controle de muitos processos biológicos fundamentais. A proteína MYC, também chamada c-Myc, desempenha um papel crucial na regulação do crescimento celular, proliferação, metabolismo, síntese de proteínas, diferenciação celular e apoptose. A proteína MYC é um fator de transcrição que pertence à família de proteínas bHLH (basic Helix-Loop-Helix) de leucina zíper. Esta estrutura permite à MYC dimerizar com outra proteína chamada MAX, formando um complexo MYC/MAX. Este complexo se liga a sequências específicas de DNA conhecidas como E-boxes (CACGTG) para regular a transcrição de genes-alvo (Meyer, 2008). MYC pode regular diretamente a expressão do gene IGF-1, bem como de outros componentes da via de sinalização do IGF-1 através de um aumento na produção de IGF-1 e na sinalização de IGF-1R. De forma complementar, a sinalização aumentada de IGF-1 pode estabilizar a proteína MYC, prolongando sua atividade oncogênica. (Lee, 2022 e Petrashen, 2023). MYC também influencia a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), especificamente MMP-2 e MMP-9 através da ativação de transcrição dos genes que codificam MMP-2 e MMP-9 (Pello, 2012 e Meskyte, 2020). Outros genes cujo MYC pode ativar diretamente incluem TWIST (Selmi, 2015), o VEGF (Baudino, 2002), e de SCF (Geiller, 2014 e Wilson, 2004) levando a estímulos para transição epitélio-mesenquimal, angiogênese e desdiferenciação/resistência celular.

MYC também pode influenciar o ciclo celular diretamente pela expressão de genes que codificam para CDK4 e CDK6, aumentando sua transcrição e, conseqüentemente, seus

níveis de proteína. Além disso, MYC também induz a expressão de ciclinas D1, D2 e E, que formam complexos ativos com CDK4 e CDK6 (Obaya, 2002).

A interação entre MYC e TGF- β (Transforming Growth Factor-beta) é complexa. Além da proliferação celular, MYC e TGF- β interagem na regulação da transição epitelial-mesenquimal (EMT), um processo crítico na invasão e metástase do câncer. TGF- β é um potente indutor da EMT, promovendo mudanças fenotípicas que aumentam a capacidade invasiva das células tumorais. Embora MYC seja tradicionalmente associado à proliferação celular, ele também pode influenciar a EMT. Por exemplo, MYC pode modular a resposta ao TGF- β durante a EMT, promovendo a expressão de genes associados ao fenotipo mesenquimal (Sanchez-Tilló, 2012).

ER (Estrogen Receptor)

Os receptores de estrogênio (ER, do inglês "estrogen receptor") são proteínas nucleares que atuam como fatores de transcrição, regulando a expressão de genes em resposta ao hormônio estrogênio. A presença e a atividade dos receptores de estrogênio exercem um papel crucial no desenvolvimento e progressão do câncer de mama, sendo um dos principais alvos terapêuticos no tratamento dessa doença. Existem dois principais subtipos de receptores de estrogênio: ER α e ER β . Ambos possuem domínios funcionais que permitem a ligação ao estrogênio à região promotora de genes alvo e à interação com co-ativadores e co-repressores. A ligação do estrogênio ao receptor ativa uma mudança conformacional que permite ao complexo receptor-estrogênio ligar-se ao DNA em regiões específicas chamadas de Elementos de Resposta ao Estrogênio, regulando a transcrição de genes envolvidos no crescimento e na sobrevivência celular (Nilsson, 2001). O ER apresenta interações importantes com várias moléculas envolvidas na progressão tumoral, dentre elas o PELP1 (Proline, Glutamate And Leucine Rich Protein 1) (Brann, 2008), MMP2 e MMP9 (Nilsson, 2007), TWIST (Han, 2018), CDK4/6 (MUSGROVE, 2011), TAZ (ZHOU, 2015) e TGF-Beta, cujo papel ainda é complexo e muitos dados são conflitantes sobre co-estimulação ou inibição entre estes dois (Tau, 1998 e Matsuda, 2001).

Além de influenciar moléculas, a atividade do receptor de estrogênio também estimula células do microambiente tumoral, como por exemplo os neutrófilos. O estrogênio é capaz de modular a produção de citocinas e quimiocinas, influenciando o recrutamento e a ativação de neutrófilos nos locais de inflamação. Isso se dá através de uma maior produção de interleucina-8, que atrai neutrófilos, promovendo sua migração para o sítio tumoral. (Khan,

2016). A sinalização do ER também pode afetar a apoptose de neutrófilos estendendo sua vida útil (Klein, 2016). O receptor de estrogênio aumenta a degradação dos mastócitos, levando à liberação de fatores que podem promover a angiogênese e a remodelação da matriz extracelular, facilitando a invasão tumoral (Jensen, 2010). A produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucinas 6 e 8 secretadas pelos mastócitos, também aumentam mediante estimulação pelo estrogênio. A modulação da degranulação, da produção de citocinas e da angiogênese pelos mastócitos, mediada pelo estrogênio, pode criar um microambiente tumoral que favorece o crescimento e a invasão tumoral. Além disso, a interação entre estrogênio e mastócitos pode contribuir para a resistência a terapias, uma vez que os mediadores liberados pelos mastócitos podem promover a sobrevivência celular e a evasão das respostas imunes (Ribatti, 2011).

PELP1 (Proline, Glutamate And Leucine Rich Protein 1)

PELP1 é co-regulador de transcrição, que atua na modulação da sinalização tanto genômica quanto não-genômica de vários genes, promovendo a proliferação celular e sobrevivência, processos críticos no desenvolvimento do câncer de mama. Na sinalização genômica, PELP1 funciona como um coativador do ER, facilitando a ativação da transcrição de genes regulados por estrogênio. Estudos mostram que PELP1 se associa a complexos de remodelação da cromatina e a outros co-reguladores, modulando a acessibilidade do DNA para a transcrição (Brann, 2008). PELP1 também pode modular a sinalização mediada pelo HER-2, interagindo diretamente com o HER-2, facilitando a ativação de vias de sinalização downstream, como a via PI3K/AKT e MAPK - cruciais para a sobrevivência e proliferação celular (Ratna, 2005). O PELP1 também interage diretamente com componentes da PI3K, facilitando a fosforilação de AKT e a subsequente ativação da via mTOR. A presença da PELP1 é necessária para a máxima ativação da PI3K/AKT em resposta a sinais de crescimento e fatores hormonais, como o estradiol, que podem influenciar a progressão do câncer (Vadlamudi, 2005). Outra proteína regulada pelo PELP1 é o fator de transcrição MYC, que tem sua expressão facilitada por um aumento da transcrição em células cancerígenas (Gonugunta, 2014). Ele também regula a transcrição de MMP2 e MMP9 (WAN, 2012), bem como do receptor de androgênio (Ravindranathan, 2013). PELP1 influencia a atividade de TWIST (Twist-related Protein) indiretamente através de várias vias moleculares. E esta interação entre PELP1 e TWIST pode promover a transcrição de genes alvo de TWIST, facilitando a progressão da EMT e, conseqüentemente, aumentando a capacidade invasiva e metastática das células cancerosas (Gonugunta, 2014 e Sudipa, 2012). Estudos indicam que

PELP1 pode aumentar a estabilidade e a atividade transcricional de SNAIL, recrutando complexos co-repressores e remodeladores de cromatina aos promotores de genes alvo de SNAIL. Essa interação é crucial para a repressão da E-caderina e para a ativação de genes associados ao fenótipo mesenquimal, promovendo assim a capacidade invasiva e metastática das células cancerosas (Balasenthil, 2003). A superexpressão de PELP1 tem sido correlacionada com níveis elevados de atividade de CDK4/6 em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama e de próstata (Nair, 2008)

AR (Androgen receptor)

O receptor de androgênio (AR, do inglês Androgen receptor) é uma proteína nuclear que, ao se ligar a androgênios (hormônios sexuais masculinos), atua como um fator de transcrição regulando a expressão de genes envolvidos em diversas funções biológicas, incluindo o desenvolvimento e a manutenção das características sexuais masculinas. Embora os androgênios sejam tradicionalmente associados ao sexo masculino, eles também estão presentes em mulheres e desempenham papéis importantes na fisiologia feminina, incluindo a regulação do crescimento celular (Michmerhuizen, 2020). Neste sentido, o receptor de androgênio tem sido identificado em aproximadamente 60-70% dos casos de câncer de mama, e sua expressão está associada a diferentes implicações prognósticas e terapêuticas, bem como sua expressão é variada de acordo com o subtipo molecular do câncer de mama. A coexistência de receptores de Androgênio em cânceres de mama com HER2 superexpresso pode chegar a aproximadamente 66% (Yu, 2011).

O AR está envolvido na modulação de várias vias de sinalização celular, incluindo a via PI3K/Akt, que é crucial para a sobrevivência, crescimento e metabolismo celular. O AR pode regular diretamente a expressão de genes envolvidos na sinalização de PI3K e proteínas como a quinase dependente de fosfoinosítido-1 e AKT, aumentando assim a sinalização de sobrevivência e proliferação celular (Carver, 2011). Outras via afetada pelo AR é a via ERK. A ativação do AR por andrógenos pode resultar na fosforilação e ativação de ERK1/2, promovendo a proliferação celular (Gioli, 2006). Estudos indicam que a ativação do AR pode levar à ativação da via mTOR, promovendo a proliferação celular e o crescimento tumoral (Carver, 2011). E sinalização de AR pode levar a perda de PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), um inibidor da via PI3K/Akt/mTOR, levando desta forma à hiperativação de mTORC1 (Taylor, 2010). Estudos mostraram que o AR pode interagir com componentes da via WNT, como a proteína β -catenina, potencializando a transcrição de genes alvo da via WNT (Truica, 2000). O AR também pode modular a atividade da CDK4/6 e influenciar a

progressão do ciclo celular em células neoplásicas. Por exemplo, foi demonstrado que a ativação do AR pode resultar na regulação positiva da expressão de CDK6, uma quinase importante na ativação do complexo CDK4/6-Ciclina D, promovendo assim a progressão do ciclo celular (Comstock, 2013).

MMP2 e MMP9 (Metaloproteinases de Matriz 2 e 9)

As metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP2 e MMP9) são enzimas envolvidas no desenvolvimento e progressão do câncer de mama, estudando através da degradação da matriz extracelular, levando a invasão local do tumor, formação de metástases e progressão da doença (Roy, 2009). Estudos apontam uma influência de MMP2 e MMP9 sobre a sinalização do HER-2. A ativação destas metaloproteinases acarretaria uma liberação de fatores de crescimento e citocinas que ativam o HER-2 e suas vias de sinalização (Kessenbrock, 2010). MMP2 e MMP9 têm sido implicadas também na regulação da atividade biológica do IGF 1 (Insulin Growth factor 1) por meio da remodelação da matriz extracelular e liberação de IGF 1 na matriz extracelular, tornando-o disponível para se ligar aos seus receptores (Siddle, 2011). Outra molécula que é liberada na matriz extracelular mediante estímulo por MMP2 e MMP9 é o VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), responsável pela angiogênese e interação com vários outros fatores moleculares e celulares (Bergers, 2000). De modo similar, MMP2 e MMP9 promovem a liberação de FGF2 (Fibroblast growth Factor 2) no microambiente tumoral (Kleinner, 1999). Quando falamos da relação entre MMP2 e MMP9 com TGF- β , temos uma via de mão dupla. Estudos mostram que MMP2 e MMP9 podem ativar e ativar o TGF- β , liberando-o na matriz extracelular e tornando-o disponível para se ligar aos seus receptores e iniciar vias de sinalização celulares (Yu, 2000). Do outro lado, TGF- β pode induzir a expressão de MMP2 e MMP9, promovendo assim a degradação da matriz extracelular e a progressão tumoral (Mu, 2002).

13 - TWIST - Twist-related Protein

O gene TWIST codifica um fator de transcrição conhecido por desempenhar um papel importante na regulação da morfogênese durante o desenvolvimento embrionário. Além disso, o TWIST tem sido implicado na progressão tumoral em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. Estudos têm demonstrado que a expressão aumentada do TWIST está associada à invasão e metástase em cânceres de mama e outros tipos de câncer e que o TWIST pode induzir a transição epitélio-mesenquimal (EMT) (Yang, 2004). Ele também

pode regular positivamente a expressão de HER-2, promovendo assim a proliferação celular e a resistência à apoptose (Kwok, 2005). Interage com vias de sinalização que regulam a atividade do HER-2 (Kyo, 2006). O TWIST pode induzir também a expressão de FGF2 (Fator de crescimento de fibroblastos 2), promovendo assim a angiogênese e a progressão tumoral, e do PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) (Yang, 2004 e Šosic, 2003). Outro gene cuja expressão é induzido por TWIST é o SNAIL, promovendo assim a transição epitélio-mesenquimal e a progressão tumoral (Yook, 2006). Em cânceres de mama e outros tipos de câncer, o TWIST tem sido associado à regulação positiva da expressão de CCL2 e TGF- β . (Zhou, 2016; YANG, 2004 e Fan, 2015). A nível tecidual, TWIST regula positivamente a atividade de Fibroblastos, e de Células tronco tumorais (CSCs, do inglês Cancer stem cells), promovendo a auto-renovação das CSCs, aumentando sua capacidade de formar tumores e promover a resistência aos tratamentos convencionais (Chen, 2019 e Mani, 2008).

IL-6 (Interleukin-6)

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel crucial na regulação da resposta imune e na inflamação. Além disso, a IL-6 tem sido implicada na progressão tumoral em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. Estudos têm demonstrado que níveis elevados de IL-6 estão associados a um pior prognóstico neste tipo de tumor. A IL-6 pode promover a progressão tumoral de várias maneiras, incluindo o aumento da proliferação celular, a indução da angiogênese e a regulação da resposta imune (Rose-John, 2012). A interleucina 6 acarreta no disparo de uma série de sinais e cascatas moleculares, incluindo a via RAS e a via PI3K/Akt através da ligação ao seu receptor, o receptor de IL-6 (IL-6R) (Rowley, 2002 e Schaper, 2015). A ativação do sistema JAK/STAT3 induzida pela IL-6 também pode resultar na transcrição dos genes MYC, TWIST e VEGF (Hodge, 2005, Sullivan, 2009 e Huang, 2016). A IL-6 também atua a nível de membrana celular, aumentando a expressão de N-caderinas, aumentando o potencial de invasividade e metástases (Na, 2013). Isso aumenta ainda mais o papel desta interleucina no processo de plasticidade tumoral e transição epitélio-mesenquimal associado a um upregulation de da proteína SNAIL (Abaurrea, 2021).

A nível tecidual, estudos mostram que a IL-6 pode aumentar a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama. A IL-6 também influencia a diferenciação de linfócitos T e na presença da IL-6, os linfócitos T CD4⁺

naïve podem se diferenciar em células T helper 17 (Th17), que são conhecidas por sua capacidade de promover a inflamação crônica e a progressão tumoral (Briukhovetska, 2021). Outra população diretamente afetada pela IL-6 são os neutrófilos. A IL-6 contribui para o recrutamento e a ativação de neutrófilos no microambiente tumoral, induzindo quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos ao tumor (Grivennikov, 2010). Além disso, a IL-6 pode ativar diretamente neutrófilos, promovendo a liberação de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio, que podem afetar células tumorais ou promover mutações genéticas que favorecem a progressão tumoral (Coffelt, 2016).

JAK (Janus Kinase Factor)

A proteína JAK desempenha um papel crucial na regulação da sinalização intracelular em várias células, incluindo células tumorais. As JAKs são quinases que, quando ativadas por ligantes específicos, como citocinas e fatores de crescimento, fosforilam os receptores de citocinas associados e desencadeiam uma cascata de sinalização que envolve a ativação do fator de transcrição STAT. Em células tumorais, a ativação aberrante das proteínas JAK pode resultar em uma proliferação celular descontrolada, contribuindo para o crescimento tumoral (Brooks, 2020). A ativação sequencial de STAT promovida pelas JAK leva a uma transcrição de genes relacionados à proliferação celular como o CDK4 (Xu, 2017). A nível tecidual, a atuação da proteína JAK tem impacto importante sobre a população de fibroblastos intra-tumorais, em grande parte devido à maior transcrição do FGF2 (Kalluri, 2016).

STAT 3 (signal transducer and activator of transcription 3)

A proteína STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) desempenha um papel crucial na regulação da sinalização celular e está implicada em vários processos-chave na progressão tumoral, incluindo proliferação celular, sobrevivência celular, angiogênese, invasão e metastização. A ativação anormal de STAT3 está associada a diversos tipos de câncer, e consequentemente à sua ativação ela regula a expressão de genes envolvidos na carcinogênese, dentre eles o MYC, IL-6, CDK, VEGF, MMP9 e MMP2, TWIST, TGF-Beta, SNAIL, e N-caderina (Yu, 2014; Saitoh, 2016 e Yu, 2009).

A nível tecidual a hiperativação de STAT3 estimula uma variada população de células não-cancerígenas dentro do microambiente tumoral. STAT3 regula a expressão de várias citocinas e fatores de crescimento que modulam a função imunológica. Particularmente em

relação aos linfócitos, o STAT3 regula a diferenciação e modulação dos linfócitos T CD8 no microambiente tumoral (Sun, 2023). Os fibroblastos associados ao câncer (CAF, do inglês Cancer associated fibroblasts) são componentes críticos deste microambiente, promovendo a progressão tumoral e a metástase. E a ativação de STAT3 nos CAFs ocorre em resposta a vários estímulos, incluindo citocinas e fatores de crescimento como interleucina-6 (IL-6), interleucina-11 (IL-11), e fator de crescimento de fibroblastos (FGF, do inglês Fibroblast Growth factor) (YU, 2009). A ativação de STAT3 nos TAMs (Macrófagos associados ao câncer) tem sido identificada como um fator determinante para suas atividades pró-tumorais, influenciando a progressão do câncer através da polarização dos macrófagos para variante de Macrófagos M2 (variante pró-tumoral) (Yu, 2009). A ativação de STAT3 também ocorre nas células tronco tumorais (CSCs), em resposta a várias citocinas, e estimula a capacidade dos CSCs se diferenciarem em vários tipos celulares que compõem o tumor. Essa plasticidade é um fator que contribui para a heterogeneidade tumoral e a capacidade de adaptação às terapias. de crescimento, como interleucina-6 (IL-6) (Allam, 2021 e Chakraborty, 2017).

N-Caderina

A N-caderina, também conhecida como CDH2, é uma proteína de adesão celular do tipo caderina amplamente estudada no contexto do câncer devido ao seu papel crucial na progressão tumoral e geração de metástases. Esta caderina é um mediador fundamental da adesão célula-célula em tecidos mesenquimais, e sua expressão anômala tem sido associada a diversas malignidades, incluindo o câncer de mama. A N-caderina parece estar diretamente envolvida na transição epitélio-mesenquimal, processo em que as qual células tumorais epiteliais perdem suas propriedades de adesão célula-célula e ganham características mesenquimais (Kalluri, 2009 e Loh, 2019).

A N-caderina medeia interações célula-célula que são cruciais para a ativação da via ERK. Quando a N-caderina se liga a outra molécula de N-caderina na superfície de uma célula adjacente, esta interação pode ativar várias cascatas de sinalização intracelular. Uma dessas cascatas é a via Ras-Raf-MEK-ERK, que é essencial para a transdução de sinais mitogênicos do ambiente extracelular para o núcleo da célula (Mcneill, 2010). A N-caderina também realiza a regulação de MMP2 e MMP9 através da ativação de vias que culminam na regulação transcricional e pós-transcricional dessas MMPs (Smith, 2016). A N-caderina influencia também a sinalização do FGF2 por meio de interações diretas e indiretas com seus receptores (FGFRs). Uma delas é a formação de complexos entre N-caderinas e FGFRs na membrana celular, facilitando a ativação dessas vias de sinalização. Essa interação é essencial

para a modulação das respostas celulares ao FGF2, impactando processos como a migração e proliferação celular (Cavallaro, 2011).

VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma glicoproteína secretada que desempenha um papel crucial na angiogênese, o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Este processo é vital não apenas para o desenvolvimento normal e a cicatrização de feridas, mas também é um fator chave na progressão de diversos tipos de câncer. A angiogênese mediada pelo VEGF fornece ao tumor nutrientes e oxigênio, além de uma via para a disseminação metastática (Ferrara, 2004). A expressão do VEGF é frequentemente aumentada em diversos tipos de câncer, correlacionando-se com a angiogênese tumoral e a progressão da doença. A hipóxia, uma condição comum no microambiente tumoral, é um dos principais indutores da expressão do VEGF no microambiente tumoral (Hicklin, 2005). A ligação do VEGF aos seus receptores específicos na superfície celular, principalmente o VEGFR-2 (KDR/Flk-1), desencadeia a dimerização e a autofosforilação dos receptores. Esta ativação leva ao recrutamento de várias proteínas adaptadoras e enzimas, incluindo a PI3K, Src, ERK, WNT e SNAIL (Karar, 2011; Holmes, 2007; Makinen, 2001 e Lamouille, 2014). VEGF e TWIST possuem uma reciprocidade de ativações onde a ativação de cascatas enzimáticas pelo receptor VEGFR leva em última análise a uma expressão de TWIST e este em contrapartida leva a regulação de genes pró-VEGF (Yang, 2004 e Bhattacharya, 2017). Quando falamos no aspecto histológico, destacamos o papel da influência que o VEGF exerce sobre os neutrófilos. O VEGF induz a quimiotaxia de neutrófilos para o microambiente tumoral através da interação com receptores específicos, como VEGFR-1 e VEGFR-2, expressos não apenas em células endoteliais, mas também nos próprios neutrófilos (Ozel, 2022). Por outro lado, o pool de neutrófilos associados ao tumor produz e secreta mais VEGF no microambiente tumoral, aumentando os fenômenos de vascularização, crescimento tumoral, e disseminação angiolinfática (Kalafati, 2020).

FGF2 (Fibroblast Growth factor 2)

O fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2) é uma proteína multifuncional que desempenha papéis críticos no desenvolvimento, angiogênese e regeneração tecidual. No contexto do câncer, FGF2 emerge como um importante regulador da progressão tumoral, afetando vários aspectos do comportamento das células cancerosas (Turner, 2010). Como um receptor transmembrana, a ativação de FGF2 acarreta em um disparo de várias cascatas

enzimáticas intracelulares que desencadeiam processos celulares replicativos, como RAS, PI3K, ERK, mTOR e STAT (Ornitz, 2015). Ativando a via da MPK/ERK, o FGF2 também acaba regulando a expressão de receptores de estrogênio, além de estimular diretamente a expressão destes receptores (Digiacomio, 2021). Outras moléculas induzidas pelo FGF2 são as metaloproteinases de matriz MMP2 e MMP9 (Liu, 2002) e também as N-caderinas (Nakajima, 2004). E outra função impactante do FGF2 no microambiente tumoral é o estímulo de adipócitos relacionados ao câncer (Rybinska, 2021).

PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês Platelet-Derived Growth Factor) é uma proteína multifuncional envolvida em vários processos biológicos, incluindo a proliferação celular, a angiogênese e a cicatrização de feridas. Sua influência no câncer tem sido amplamente estudada, devido ao seu papel significativo na progressão tumoral e na metástase. PDGF exerce suas funções biológicas através da ligação a receptores específicos na superfície celular, conhecidos como receptores de PDGF (PDGFRs). A ativação desses receptores leva à fosforilação de diversas proteínas intracelulares, ativando várias vias de sinalização, incluindo as vias de ERK, PI3K e NF-kB, que são cruciais para a sobrevivência e proliferação celular (Romashkova, 1999 e Andrae, 2008). A invasão e processo de metastatização também é favorecido pela atuação de PDGF, via upregulation de metaloproteinases de matriz e VEGF, (Mammer, 2017 e PAN, 2020). No microambiente tumoral, o fator de crescimento derivado de plaquetas influencia a população de fibroblastos associados ao câncer, macrófagos e células tronco tumorais. A ativação dos fibroblastos pelo PDGF leva à sua diferenciação em miofibroblastos, um fenótipo associado à produção aumentada de componentes da ECM (matriz extracelular), como colágeno, fibronectina e proteoglicanos, que são essenciais para a formação do estroma tumoral. No microambiente tumoral, os CAFs ativados por PDGF também secretam diversas citocinas e fatores de crescimento que promovem a sobrevivência e a proliferação das células tumorais. Por exemplo, PDGF pode induzir a produção de fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que contribui para a formação de novos vasos sanguíneos, fornecendo nutrientes e oxigênio ao tumor em crescimento (Pietras, 2008). Os macrófagos tumorais são estimulados na medida em que o PDGF estimula sua proliferação e sobrevivência no microambiente tumoral (Son, 2014). E as células tronco tumorais são

afetadas pelo disparo de vias essenciais para a sobrevivência, auto-renovação e proliferação mediado pelo PDGF (Andrae, 2008).

SNAIL

SNAIL é um fator de transcrição que desempenha um papel crucial na progressão do câncer, principalmente por sua influência no processo de EMT. A EMT é um fenômeno biológico onde células epiteliais, que são normalmente aderentes e organizadas, adquirem características mesenquimais, como maior capacidade migratória e invasiva, resistência à apoptose e propriedades de células-tronco (Thierry, 2009). Uma parte desta ação se deve à estimulação do SNAIL sobre a via ERK (Smith, 2014). A modulação do estroma do microambiente tumoral através das MMP2 e MMP9 também é influenciado pelo SNAIL (Miyoshi, 2004). SNAIL também pode estimular a via Wnt de uma maneira complexa e multifacetada, envolvendo tanto a regulação direta quanto indireta dos componentes dessa via de sinalização. (Stemmer, 2008). A influência de SNAIL sobre TGF- β é complexa e bidirecional. De um lado SNAIL pode ser induzido pela sinalização de TGF- β , e por outro lado, SNAIL pode modular a resposta celular ao TGF- β , ampliando seus efeitos promotores da EMT e da invasão tumoral (Peinado, 2003). Além de promover a migração e invasão celular, SNAIL tem sido implicado na manutenção e promoção de células-tronco tumorais (CSCs), que é uma subpopulação de células intra-tumorais com capacidades de auto-renovação e resistência ao tratamento oncológico (Mani, 2008).

WNT

O gene WNT regula uma via de sinalização, a via WNT, que representa um conjunto de caminhos moleculares que desempenham um papel crucial em diversos processos biológicos, incluindo a embriogênese, a homeostase tecidual e a regeneração celular. No contexto do câncer, a desregulação da sinalização WNT é frequentemente associada à iniciação, progressão e metástase tumoral (Clevers, 2006). A via WNT exerce esse papel na carcinogênese através da estimulação de MMP2 e MMP9, TWIST, CDK4/6 e N-caderina (Howe, 2003; Alexander, 2006; Wu, 2007 e Cordani, 2023). Dentro do microambiente tumoral a via WNT é primordial na ativação de células tronco tumorais. Esta influência é multifacetada e envolve a promoção de características de células-tronco, manutenção da pluripotência e suporte à agressividade tumoral (Reya, 2005). Outra população celular impactada no microambiente tumoral pela hiperativação da via WNT é a população de

adipócitos tumorais. Estudos demonstram que a ativação da via Wnt/ β -catenina em adipócitos leva à desdiferenciação destas células, tornando-as mais semelhantes a células-tronco mesenquimais. Essas células desdiferenciadas podem secretar fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas que promovem a pro-tumorigênicas (Gesta, 2007).

CCL2 (Quimiocina C-C ligante 2)

A CCL2 (Quimiocina C-C ligante 2), também conhecida como MCP-1 (Proteína Químioatraente de Monócitos-1), é uma quimiocina crucial na regulação da migração e infiltração de monócitos e macrófagos em locais de inflamação. No contexto do câncer, CCL2 desempenha um papel significativo na promoção da progressão tumoral, metástase e na modulação do microambiente tumoral (Kadomoto, 2021). Estudos indicam que CCL2 pode induzir a fosforilação e ativação das STATs em diferentes tipos celulares. Por exemplo, em células de câncer de mama, CCL2 promove a fosforilação de STAT3, uma das principais STATs envolvidas na transdução de sinais inflamatórios e de crescimento celular (Biswas, 2008). Ela tem papel de destaque na estimulação de MMP2 e MMP9 e foi identificada como um regulador positivo da expressão de MMP2 e MMP9 em células cancerígenas, facilitando assim a capacidade invasiva das células tumorais (Lim, 2016).

CDK 4/6 (quinases dependentes de ciclina 4 e 6)

As quinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4/6) desempenham um papel crucial na regulação do ciclo celular, promovendo a transição do ciclo celular da fase G1 para a fase S através da fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb). As CDKs são frequentemente hiperativadas em muitos tipos de câncer, o que contribui diretamente para a proliferação celular descontrolada e a progressão tumoral. Estudos têm mostrado que a hiperativação de CDK4/6 está associada a várias características malignas do câncer. Em particular, CDK4/6 tem sido implicada na resistência à supressão de tumores e na evasão da senescência celular. As CDKs promovem a fosforilação de Rb, inibindo assim sua função supressora tumoral e permitindo a progressão do ciclo celular mesmo em condições adversas (Fry, 2004). Além disso, CDK4/6 desempenham um papel crucial na regulação da resposta ao estresse celular e na reparação do DNA. Estudos recentes destacaram o papel de CDK4/6 na promoção da sobrevivência celular em condições de estresse oxidativo e genotóxico, características comuns do microambiente tumoral (Otto, 2017). CDK4/6 regula a atividade do complexo mTORC1 (mTOR complex 1), um regulador central do crescimento celular e do metabolismo

energético, através da modulação de vias de sinalização upstream, como as vias de sinalização de insulina e fatores de crescimento (Rodriguez, 2023). Estudos mostram que, no câncer de mama, CDK4/6 foi associada à regulação positiva de VEGF, promovendo assim a vascularização do tumor e facilitando a sua progressão (Pandey, 2019). Ademais também estimulam a atividade de SNAIL através da sua estabilização (YU, 2017). Por fim, CDK4/6 também contribuem para a carcinogênese através da fosforilação e ativação da NF- κ B (Buss, 2012).

SCF (Stem Cell Factor)

O Fator Estimulador de Colônias (SCF, do inglês Stem Cell Factor) é uma citocina essencial para a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas, além de outros tipos celulares. Seu papel no câncer tem sido intensamente estudado devido à sua capacidade de influenciar a progressão tumoral através de diversas vias moleculares. Estudos indicam que a sinalização SCF/c-Kit pode interagir com a via de sinalização do HER-2, influenciando a progressão do câncer. Em modelos de câncer de mama, foi observado que o SCF pode aumentar a expressão e ativação de HER-2 e ativar suas vias de sinalização associadas, como PI3K/Akt e MAPK/ERK, que são cruciais para a sobrevivência e proliferação das células tumorais (Hines, 1999 e Dehbashi, 2017). Outras vias ativadas diretamente através da estimulação do receptor c-KIT pelo SCF são as vias RAS e STAT3 (Dehbashi, 2017). Estas vias também são bastante acionadas na população de mastócitos intra-tumorais, estimulando sua proliferação e atuação no microambiente tumoral (Huang, 2008).

TGF-Beta (Transforming Growth Factor-Beta)

O fator de Transformação de crescimento Beta (TGF- β) é uma citocina multifuncional que desempenha papéis complexos na regulação de muitos processos biológicos, incluindo a proliferação celular, diferenciação, migração e apoptose. No contexto do câncer, o TGF- β possui uma influência dual e paradoxal: atua tanto como supressor tumoral quanto como promotor de tumor, dependendo do estágio de desenvolvimento do câncer e do contexto celular. Inicialmente, durante as fases precoces da tumorigênese, o TGF- β atua predominantemente como supressor tumoral. Ele inibe a proliferação celular, induz a apoptose e promove a manutenção da homeostase tecidual. Mecanismos pelos quais o TGF- β exerce esse efeito incluem a ativação de Smads, proteínas que transmitem sinais do TGF- β

para o núcleo, onde regulam a expressão de genes que controlam o ciclo celular e a apoptose (Massague, 2008).

Contudo, à medida que o câncer progride, muitas células tumorais desenvolvem resistência aos efeitos supressores do TGF- β e começam a explorar suas funções pró-tumorais. Nessa fase avançada, o TGF- β promove a invasão, migração e geração de metástase nas células tumorais (Lamouille, 2014). A “mudança pró-carcinogênese” do TGF-Beta se dá mediante a estimulação de várias vias moleculares já previamente abordadas nesta revisão. Dentre elas a ativação de PI3K, ERK, NF- κ B, RAS, HER-2, (Baba, 2022 e Zhang, 2009). A ação de TGF-Beta também se dá no remodelamento do estroma do microambiente tumoral através da estimulação de metaloproteinases de matriz e VEGF (Moore-Smith, 2017). A transição epitélio mesenquimal também é orquestrada por TGF-beta mediante o aumento da expressão de TWIST, SNAIL, WNT e N-caderina (Fan, 2015; Wu, 2017; Cho, 2007 e Hirano, 2020). A produção de TGF-beta na fase pró-tumoral aumenta a produção de Interleucina-6, principalmente pela estimulação dos fibroblastos tumorais (Eickelberg, 1999). A ação do TGF-Beta nos linfócitos é ampla, favorecendo tanto a infiltração de linfócitos como a imunotolerância destes dentro do microambiente tumoral, ajudando estes a moldarem/remodelarem a massa tumoral (Lainé, 2021).

Desempenhando tantos papéis a nível celular e tecidual, era de se esperar que o TGF-Beta possuísse um importante papel em outras populações celulares. Dentre estas estão os Macrófagos associados ao tumor (TAMs). O TGF- β é um dos principais fatores que promovem a polarização dos TAMs para o fenótipo M2, que está associado a um ambiente tumoral imunossupressor e à promoção da angiogênese, invasão e metástase tumorais (Biswas, 2013). O TGF- β influencia os TAMs através de vários mecanismos moleculares. Primeiro, ele induz a expressão de genes associados ao fenótipo M2, incluindo aqueles envolvidos na produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10, e fatores de crescimento, como o VEGF, que promove a angiogênese (Mantovani, 2002). O TGF-Beta também atua na polarização da população de neutrófilos tumorais, estimulando o fenótipo N2 - o qual é pró-tumoral, angiogênico e imunossupressor (Sengupta, 2021). Nas fases mais avançadas da carcinogênese, quando o TGF-Beta se torna pro-tumorigênico, ele estimula a manutenção das células tronco tumorais (Derynck, 2021). Outra célula da população tumoral que passa por transformações fenotípicas mediante estímulo pelo TGF-Beta são os adipócitos, que passam a exibir um fenótipo pró-inflamatório e pró-tumoral (Rybinska, 2021).

TNF- α - Tumor Necrosis Factor-alpha

O fator de necrose Tumoral Alfa (TNF- α , do inglês Tumor Necrosis Factor-alpha) é uma citocina pró-inflamatória com um papel paradoxal na oncogênese, apresentando tanto efeitos antitumorais quanto pró-tumorais dependendo do contexto biológico e do microambiente tumoral. A influência do TNF- α no câncer é complexa e multifacetada, afetando diversos aspectos da progressão tumoral, incluindo a inflamação, o crescimento celular, a apoptose e a angiogênese. Em altas concentrações, o TNF- α pode induzir apoptose nas células tumorais através da ativação da via extrínseca de apoptose mediada pelos receptores de morte (Waters, 2013). Esse efeito antitumoral é potencializado pela capacidade do TNF- α de aumentar a permeabilidade vascular, facilitando a infiltração de células imunológicas no tumor (Balkwill, 2009). No entanto, evidências crescentes indicam que, em concentrações mais baixas e no microambiente tumoral crônico, o TNF- α exerce efeitos pró-tumorais significativos. No tumor, o TNF- α pode promover a inflamação crônica, criando um ambiente propício para a carcinogênese. Este ambiente inflamatório é caracterizado pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que podem causar danos ao DNA e promover mutações (Grivennikov, 2010). Além disso, o TNF- α pode ativar vias de sinalização celular pró-tumorais, como NF- κ B, CCL2, SNAIL, PI3K, TWIST e MMP2 e MMP9 (Balkwill, 2009; Wu, 2010; Yu, 2014 e Wolczyk, 2016).

O TNF- α consegue estimular a população de fibroblastos associados ao câncer (Monteran, 2019). E através da transição epitélio-mesenquimal o TNF- α pode converter células endoteliais em fibroblastos (Guo, 2024). Estudos indicam que o TNF- α pode alterar a fenotipagem dos Neutrófilos associados ao Tumor (TANs, inglês Tumor associated neutrophils), influenciando seu potencial pró-tumoral. A presença de TNF- α no microambiente tumoral pode polarizar os neutrófilos para um fenótipo N2, que é associado à promoção do crescimento tumoral, angiogênese e supressão da resposta imune antitumoral (Kobayahi, 2008). O TNF- α também influencia a capacidade dos TANs de remodelar a matriz extracelular e facilitar a invasão tumoral através da secreção de metaloproteinases da matriz (MMPs), que degradam componentes da matriz extracelular e promovem a invasão e metastização das células cancerígenas (Sionov, 2015). Por fim, o TNF- α pode promover a manutenção e sobrevivência das CSCs enriquecendo a população de no tumor, através do aumento da expressão da proteína TAZ (Liu, 2020).

NF- κ B (fator nuclear kappa B)

O fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês fator nuclear kappa B) é uma proteína de transcrição que desempenha um papel crucial na regulação de processos celulares, incluindo

inflamação, resposta imune, crescimento celular e sobrevivência. No contexto do câncer, a ativação da via de sinalização de NF- κ B está fortemente associada à promoção da tumorigênese, progressão tumoral, metástase e resistência ao tratamento. A ativação constitutiva de NF- κ B é observada em muitos tipos de câncer e está frequentemente associada à inflamação crônica, um fator de risco significativo para a carcinogênese (Karin, 2002).

Esta proteína está envolvida em muitos processos tumorais, incluindo a transição epitélio-mesenquimal. E esta ação se dá diretamente através do aumento na expressão de TWIST, bem como de MMP2 e MMP9 (Pham, 2007 & Kumar, 2013). Aqui precisamos destacar também o papel complexo que NF- κ B desempenha sobre TAZ e vice-versa, podendo estimular a transcrição de vias que promovem a transição epitélio-mesenquimal (Deng, 2018). O estímulo à proliferação celular também é ditado via NF- κ B através da estimulação das quinases dependentes de ciclina CDK4/6 (Karin, 2002). Associado a estas interações moleculares, dados apontam para um fortalecimento das células tronco tumorais no microambiente mediante o acionamento de NF- κ B. (Rinkenbaugh, 2016).

TILs - Tumor-Infiltrating Lymphocytes

No contexto do câncer, os linfócitos T tumorais (TILs, do inglês Tumor-Infiltrating Lymphocytes) são linfócitos que infiltram o microambiente tumoral e podem influenciar significativamente a progressão da doença. A presença, a função e a ativação dos TILs são fatores críticos que afetam a resposta imunológica contra o tumor e a eficácia das terapias imunológicas. Os TILs podem ter efeitos tanto protetores quanto promotores no contexto do câncer. Em muitos tipos de câncer, a presença de uma alta densidade de TILs está associada a um prognóstico melhor. Além disso, os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ são particularmente importantes na medição da resposta antitumoral. Esses linfócitos têm a capacidade de reconhecer e destruir células tumorais através do reconhecimento de antígenos específicos apresentados por moléculas do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe I. Sabe-se que uma alta infiltração de linfócitos T CD8⁺ está correlacionada com um melhor prognóstico em vários tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão e câncer de ovário. A atividade desses linfócitos está associada à liberação de granzimas e perforinas que induzem a apoptose das células tumorais (FRIDMAN, 2012). Além das células T CD8⁺, as células T auxiliares (CD4⁺) também desempenham um papel importante na resposta imunológica contra o câncer. As células T auxiliares podem promover a ativação e a função dos linfócitos T citotóxicos através da liberação de citocinas como IL-2 e IFN- γ . No entanto, dependendo do contexto e da polarização, as células T CD4⁺ também podem promover a progressão tumoral.

Por exemplo, as células T auxiliares do tipo 2 (Th2) e as células T auxiliares foliculares (Tfh) podem apoiar a angiogênese e a progressão tumoral através da secreção de fatores de crescimento e citocinas pró-tumorais (Tokumaru, 2020).

Os linfócitos tumorais secretam várias citocinas que ajudam a arquitetar o microambiente tumoral, dentre elas TGF- β , IL-6 e TNF- α (Burkholder, 2014). CCL2 também parece estar envolvido e com uma maior expressão nos linfócitos tumorais (Jin, 2021). Através destes e de outros mecanismos, os linfócitos T tumorais podem induzir uma proliferação do fenotipo M2 de macrófagos tumorais, promovendo angiogênese, remodelação tecidual e supressão da resposta imune antitumoral (Biswas, 2010).

TANs - Tumor Associated neutrophils

Os neutrófilos tumorais (TANs, do inglês Tumor associated neutrophils) desempenham um papel complexo e, muitas vezes, contraditório na carcinogênese. A influência desses leucócitos no microambiente tumoral pode variar entre efeitos pró-tumor e anti-tumor, dependendo do contexto e das condições específicas do microambiente. Em muitos tipos de câncer, os neutrófilos são recrutados para o microambiente tumoral, onde podem promover o crescimento e a progressão do tumor. Eles fazem isso através da liberação de fatores de crescimento, citocinas, e metaloproteinases de matriz (MMPs) como MMP-9, que facilitam a remodelação da matriz extracelular e a invasão tumoral (Galdiero, 2013). Os neutrófilos também podem contribuir para a angiogênese tumoral, o processo pelo qual novos vasos sanguíneos se formam para fornecer nutrientes e oxigênio às células tumorais, por meio da ativação de VEGF (Coffelt, 2016). Vários fatores de crescimento como o VEGF e outras citocinas secretadas pelos neutrófilos vão agir sobre eles mesmos e também sobre outras células do microambiente tumoral ativando a via central do PI3K (Houghton, 2010). Os TANs podem secretar diretamente IL-6 em resposta a estímulos presentes no microambiente tumoral. E esta interleucina secretada pelos TANs atua de forma autócrina e parácrina, afetando não apenas os próprios neutrófilos, mas também outras células presentes no tumor, como as próprias células tumorais, fibroblastos associados ao tumor e células endoteliais (Coffelt, 2016).

CAFs - Cancer associated fibroblasts

Os fibroblastos tumorais, também conhecidos como fibroblastos associados ao câncer (CAFs, do inglês Cancer-Associated Fibroblasts), desempenham um papel crucial no

microambiente tumoral, influenciando significativamente o desenvolvimento e a progressão do câncer. Essas células não malignas, presentes no estroma tumoral, contribuem para a carcinogênese e a progressão do tumor através de várias vias. Os fibroblastos tumorais são células estromais que se reprogramam em resposta a sinais do tumor, adquirindo um fenótipo pró-tumorigênico. Eles secretam uma variedade de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e enzimas que remodelam a matriz extracelular, criando um ambiente propício para o crescimento tumoral. Esses fatores incluem o PDGF, TGF- β , VEGF, e o FGF2 (KALLURI, 2016 e SUH, 2020). Através destas vias, em especial de FGFs, os fibroblastos estimulam a transcrição de HER-2 (Fernandez-Nogueira, 2020).

Os CAFs também secretam várias MMPs, incluindo MMP-2 e MMP-9, que estão particularmente implicadas na remodelação da matriz extracelular (Kalluri, 2006). E também estimulam a produção de IL-6 e N-caderinas, o que favorece a transição epitélio-mesenquimal e a invasividade tumoral (Goulet, 2019).

Estimulando também a produção de CCL2, os fibroblastos tumorais promovem a supressão da vigilância imunológica no microambiente tumoral (Yang, 2016).

TAMs - Tumor associated macrophages

Os macrófagos são células imunes essenciais no microambiente tumoral, desempenhando funções críticas que podem influenciar tanto a progressão quanto a regressão do câncer. Os macrófagos associados ao tumor (TAMs, do inglês Tumor associated macrophages) são particularmente importantes na carcinogênese, modulando diversos processos que contribuem para o desenvolvimento e a progressão do câncer. Os TAMs são frequentemente classificados em dois principais fenótipos funcionalmente distintos: M1 e M2. Macrófagos M1 são ativados classicamente e têm propriedades pró-inflamatórias e anti tumorais, secretando citocinas como TNF- α , Interleucina 12 e Interleucina-1 β , que promovem a destruição de células tumorais (Murray, 2014). Por outro lado, os macrófagos M2 são ativados alternativamente e estão associados a funções pró-tumorais, incluindo a promoção da angiogênese, a remodelação tecidual, e a supressão da resposta imune (Biswas, 2010). Uma das vias moleculares mais ativadas nos macrófagos tumorais é o NF- κ B (Cornice, 2024).

Macrófagos tumorais estimulam o remodelamento do microambiente tumoral e angiogênese através da produção de VEGF, TGF- β , MMP2 e MMP9 e CCL2 (Qian, 2010; Li, 2020 e Kuznetsova, 2024). A transição epitélio-mesenquimal é favorecida através da produção de N-caderina. A imortalidade celular e resistência celular também é estimulada por

meio dos macrófagos celulares através da estimulação da via WNT (Kuznetsova, 2024). Outra citocina que modula várias interações celulares no microambiente tumoral, e que pode ser produzida pelos macrófagos tumorais é o TNF- α (Tu, 2021). Uma importante interação celular dos macrófagos tumorais se faz com as células tronco tumorais, através da secreção de IL-6 (Radharani, 2022).

Mastócitos intra-tumorais

Os mastócitos, células conhecidas principalmente por seu papel nas reações alérgicas e inflamatórias, têm se mostrado participantes ativos no microambiente tumoral, influenciando diretamente a progressão do câncer. A presença e a atividade dos mastócitos em tumores têm sido associadas a várias etapas da carcinogênese, desde a iniciação e promoção tumoral até a angiogênese e a metástase. Estudos sugerem que os mastócitos contribuem para a progressão tumoral através da liberação de mediadores pró-inflamatórios, como histamina, proteases, citocinas e fatores de crescimento, que podem promover a proliferação celular e a angiogênese. Estes mediadores não só promovem o crescimento tumoral, mas também modificam a matriz extracelular, facilitando a invasão de células cancerígenas. Estes mediadores incluem VEGF, TGF- β , TNF- α , IL-6 e até mesmo SCF (Marichal, 2013). Além do VEGF, os mastócitos tumorais classicamente estimulam a angiogênese no microambiente tumoral através do estímulo da secreção de PDGF e FGF2 e estimulam a degradação da matriz extra-celular e invasão tecidual por meio da produção de metaloproteinases de matriz MMP2 e MMP9 (Komi, 2020). Estudos apontam para um "up regulation" de receptores de estrogênio mediante a infiltração de mastócitos no tecido tumoral, em modelos tumorais de câncer de mama (Majorini, 2020). A interação e influência entre os mastócitos tumorais e o receptor HER-2 parece ainda necessitar de mais dados, porém evidências relacionam os dois fatores (Carpenco, 2019)

CSCs - Cancer stem cells

As células-tronco tumorais (CSCs, do inglês Cancer stem cells) têm emergido como um componente crítico na compreensão da carcinogênese, desempenhando papéis essenciais na iniciação, progressão e recidiva do câncer. Estas células possuem características semelhantes às das células-tronco normais, como a capacidade de autorrenovação e diferenciação, mas são patologicamente adaptadas para promover a sobrevivência e a propagação do tumor. Um dos principais aspectos da influência das CSCs na carcinogênese é

a sua capacidade de iniciar tumores. Devido à sua capacidade de autorrenovação, as CSCs podem sustentar o crescimento tumoral por períodos prolongados. Estas células são frequentemente resistentes a terapias convencionais, como quimioterapia e radioterapia, que tendem a eliminar as células diferenciadas do tumor, mas não conseguem erradicar completamente as CSCs, levando à recidiva e metástase do câncer (Clevers, 2011). As CSCs também contribuem para a heterogeneidade tumoral, uma característica marcante dos tumores sólidos que dificulta o tratamento eficaz. A plasticidade das CSCs permite que estas células se diferenciam em várias subpopulações de células tumorais, cada uma com diferentes perfis genéticos e fenotípicos. Esta heterogeneidade facilita a adaptação do tumor a diferentes ambientes e pressões seletivas, como aquelas impostas por terapias anticâncer (Vermeulen, 2008). As células tronco-tumorais possuem muitas características que as colocam no papel chave da transição epitélio-mesenquimal já que conseguiriam moldar seu fenótipo mediante o estímulo do microambiente. Além disso elas secretam também uma série de fatores pró-carcinogênicos como FGF2, VEGF, IL-6, TGF- β , MMP9 e PDGF, o quais interagem e geram mecanismos de co-estimulação com vários subtipos celulares no microambiente tumoral, como fibroblastos, macrófagos e adipócitos (Ayob, 2018)

TAZ - Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif

O fator transcricional TAZ (TAZ, do inglês Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif) é uma proteína codificada pelo gene WWTR1 que desempenha um papel crucial na regulação da expressão gênica. Sua influência na carcinogênese tem sido objeto de intenso estudo, especialmente em contextos como o câncer de mama e outros tipos de cânceres epiteliais. TAZ é um componente crítico da via de sinalização Hippo, que é essencial para a regulação do crescimento celular e da apoptose. A desregulação desta via pode levar à proliferação celular descontrolada e, consequentemente, à carcinogênese (Yu, 2015). A proteína TAZ pode aumentar a expressão de IL-6 (Kim, 2019). Além disso, tem papel importante na ativação e no funcionamento dos fibroblastos associados ao câncer (Calvo, 2013). Estudos também apontam que a ativação de TAZ favorece as células tronco tumorais, incluindo com ganho de resistência à quimioterapia (Liu, 2023 e Park, 2018).

CAAs - Cancer-associated adipocytes

Os Adipócitos associados ao câncer (CAAs, do inglês Cancer-associated adipocytes) desempenham um papel significativo na carcinogênese, atuando através de uma complexa

rede de sinalização que promove a progressão tumoral. Esses adipócitos, presentes no microambiente tumoral, não apenas fornecem energia às células cancerígenas por meio da lipólise, mas também secretam diversas citocinas, hormônios e fatores de crescimento que influenciam diretamente a proliferação e a invasão das células tumorais (Dirat, 2011).

Os adipócitos associados ao câncer podem influenciar a carcinogênese através da modulação do microambiente tumoral e estimulação para a transição epitélio-mesenquimal. Eles atuam através de um aumento na secreção de CCL2, VEGF, TNF-alfa, TGF-Beta, MMP9, FGF, PDGF, dentre outros (Wu, 2023; Yao, 2021; Zhao, 2020). Boa parte do funcionamento destas células se dá através da ativação de ER, Src, NF-kB, TWIST e STAT3 (Wu, 2019; Sankofi, 2023, Na, 2023). Uma outra população celular com a qual os adipócitos interagem bastante através destas moléculas são os fibroblastos, podendo até mesmo adquirir este fenótipo, dentro do microambiente tumoral (Jones, 2020).

Hipóxia tecidual

A hipóxia tecidual, caracterizada pela baixa disponibilidade de oxigênio em tecidos, desempenha um papel crucial na carcinogênese. Diversos estudos demonstram que a hipóxia induz uma série de alterações celulares e moleculares que favorecem o desenvolvimento e a progressão do câncer. Essas alterações são mediadas, em grande parte, pela ativação do fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1, do inglês Hypoxia-inducible factor 1), um fator de transcrição que regula a expressão de genes associados à adaptação celular à baixa oxigenação. A hipóxia tecidual consegue induzir nos tecidos a ativação de vias como HER2, PI3K e STAT3 (Jun, 2017 e Franovic, 2007). A hipóxia tecidual também pode aumentar a expressão de genes como VEGF, MMPs, TGF-Beta, PDGF, FGF2, SCF, dentre outros (Carmeliet, 1998; Ortmann, 2024; Franovic, 2007 e Han, 2008). A transição epitélio-mesenquimal também é estimulada pela hipóxia tecidual tumoral, por meio da expressão aumentada de genes como TWIST, SNAIL e N-Caderina (Ortman, 2024 e Zhao, 2021). Mediante tantos estímulos a nível celular, a hipóxia tecidual também promove alterações a nível tecidual tumoral. As populações de células não-oncológicas estimuladas por hipóxia inclui os fibroblastos, mastócitos tumorais e células tronco tumorais (Petrova, 2018; Ramírez-Moreno, 2020 e Heddlestone, 2010).

4 MÉTODOS

Baseado no modelo de Hanahan sobre os hallmarks of cancer (HANAHAHAN, 2022), foi realizada uma extensa revisão narrativa da literatura através dos buscadores Pubmed e Google Acadêmico utilizando os termos "Breast Cancer" + [alteração molecular/celular a ser pesquisada].

Como ponto de partida para a revisão, foram selecionadas as alterações genéticas mais expressivas e com maior impacto na fisiopatogênese e no tratamento do câncer de mama. Os artigos eram selecionados após avaliação de título e resumo até esgotarem ao menos 10 artigos para cada fator associado ao câncer de mama. Por sua vez, durante a revisão dos artigos daquele fator molecular, sempre quando identificado um novo fator molecular ou celular interagindo com o fator em questão, este segundo fator também era incluído a seguir na revisão. O número pré-determinado de fatores (cada um a compor um vértice do grafo) foi trinta e sete. Após a definição dos 37 fatores a comporem o grafo, a revisão foi encerrada e foi definida a interação entre cada um deles.

Utilizando-se de um modelo matemático da teoria dos grafos foi desenhada uma rede complexa envolvendo 37 vértices e suas relações entre si, derivados dos fatores envolvidos na fisiopatogênese, conforme descrito na revisão acima.

Uma rede complexa, em seu sentido mais simples, é formada por um conjunto de sítios (nós ou vértices), os quais estão conectados entre si por meio de ligações (conexões ou arestas). Existem vários modelos de redes. As redes regulares, onde todos nós têm as mesmas propriedades, e o mesmo número de ligações. As redes de acoplamento aleatório, onde as conexões entre os vértices são geradas de forma aleatória. As redes de pequeno mundo, que misturam características de ambas as anteriores. E por fim, as Redes sem escala, na qual o número médio de conexões não converge à medida que aumenta-se o tamanho da rede. Neste tipo de modelo, alguns poucos vértices podem possuir muitas conexões, mais do que outros. Este modelo é o que mais se aplica para a fisiopatologia do câncer.

Para a criação da rede, foi utilizada a linguagem de programação Python, empregando recursos do pacote Igraph, juntamente com o pacote NumPy para realizar as caminhadas por entre os vértices.

Após a criação do grafo, realizamos uma análise de knockout (KO) de cada um dos vértices da rede, exceto o vértice 1, que é o vértice de partida. Então, calculamos o vetor de fluxo médio para cada rede KO. Dado o vetor de fluxo médio da rede saudável e o vetor de fluxo médio de todas as redes KO, calculamos o erro relativo médio, $\bar{u}_i$, que é o erro relativo

das distribuições médias, e calculamos o erro relativo médio $M(g, g'; T, L)$. Isso determinou os vértices que, após excluídos da rede, mais impactam em sua estrutura.

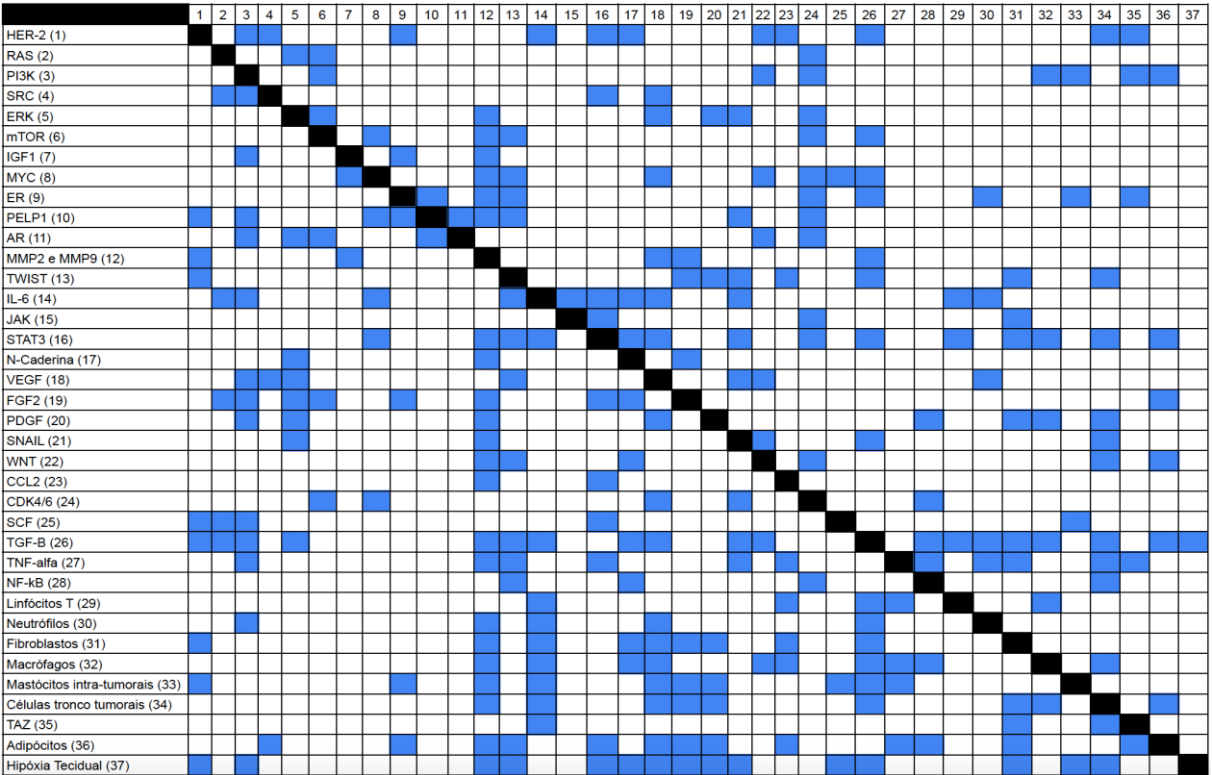
Para a análise dos resultados e avaliação de significância estatística, realizamos um teste comparativo envolvendo os 6 knockouts mais impactantes. Tendo como controle a rede "saudável", comparamos seus fluxos em cada vértice com os dos modelos knockout. A análise estatística foi feita através do teste de Wilcoxon para análise não paramétrica de amostras pareadas. Foi usado um valor de $p < .05$ para definição de significância estatística.

5 RESULTADOS

Desenvolvimento Visual da rede complexa

Após a conclusão da revisão da literatura, foram determinadas as interações entre os vértices da rede, conforme ilustrado no gráfico 1.

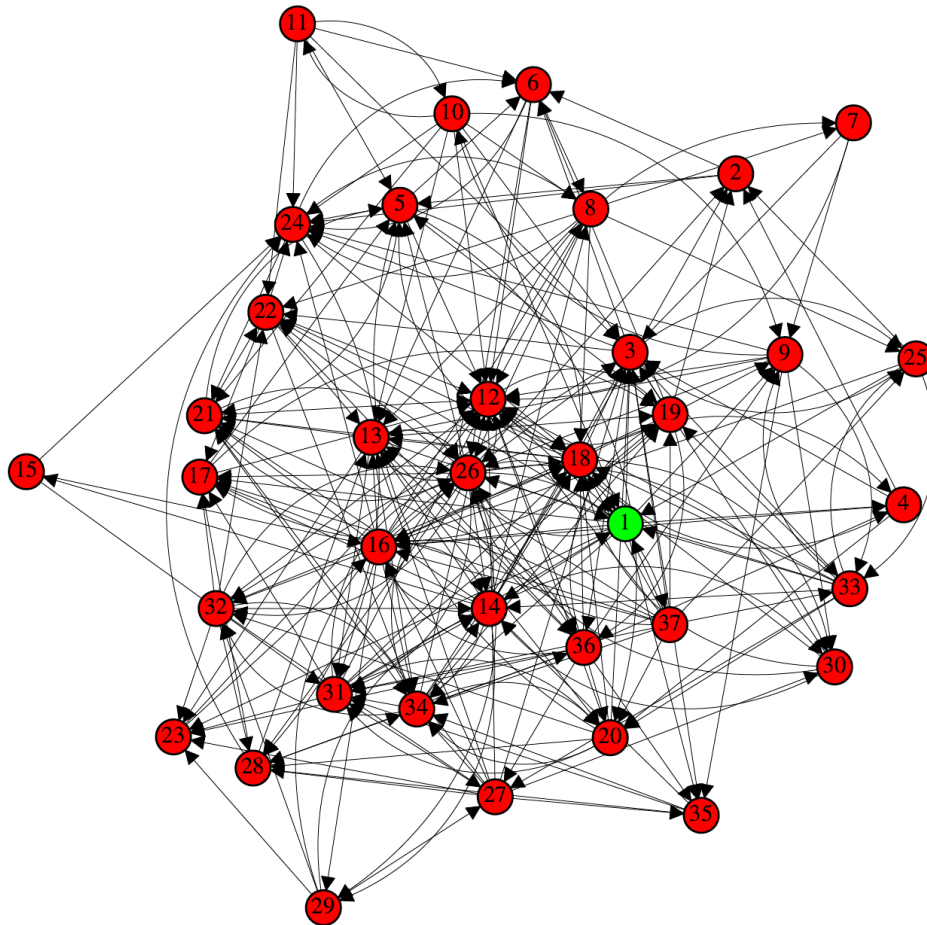
Gráfico 1 - Matriz de interações entre os 37 vértices da rede complexa (indicada pelas células em azul)



Fonte: o autor

A matriz de interações entre os vértices permitiu o processamento da rede complexa, dando origem ao grafo ilustrado na figura 6.

Figura 6. A rede complexa de interações entre os vértices: 1 – HER-2, 2 – RAS, 3 – PI3K, 4 – Src, 5 – ERK, 6 – mTOR, 7 – IGF1, 8 – MYC, 9 – ER, 10 – PELP1, 11 – AR, 12 – MMP2 e MMP9, 13 – TWIST, 14 – IL-6, 15 – JAK, 16 – STAT3, 17 – N-caderina, 18 – VEGF, 19 – FGF2, 20 – PDGF, 21 – SNAIL, 22 – WNT, 23 – CCL2, 24 – CDK4/6, 25 – SCF, 26 – TGF- β , 27 – TNF- α , 28 – NF-kB, 29 – TILs, 30 – TANs, 31 – CAFs, 32 – TAMs, 33 – Mastócitos intra-tumorais, 34 – CSCs, 35 – TAZ, 36 – CAAs, e 37 – Hipóxia tecidual.



Fonte: o autor

Análise do grau de cada vértice

Em uma mera análise visual do grafo, nós podemos perceber que alguns vértices possuem maior grau do outros, tendendo a concentrar um maior número de arestas, representando mais interações de entrada e saída. Isso fica facilmente visível perante o maior grau e densidade em alguns pontos dentro da rede complexa.

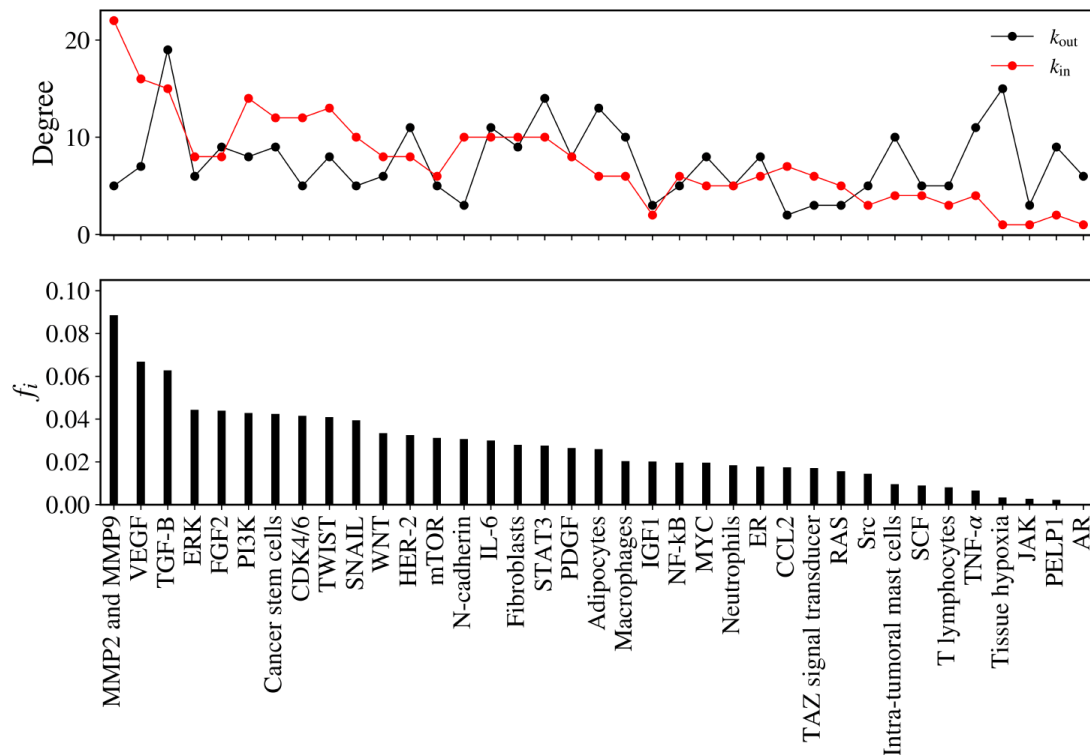
Para obter a grandeza numérica do fluxo de caminhantes $f_i(t)$, nós consideramos um tempo total $T = 104$, onde a cada passo, um novo caminhante foi criado, totalizando 104 caminhantes ao final da simulação. Este procedimento foi repetido $L = 100$ vezes e ao final, foi calculada a média do vetor $f(g; T)$, demonstrada pela fórmula matemática a seguir,

$$\bar{f}(g; T, L) = \frac{\sum_{i=1}^L f_i(g; T)}{L}$$

onde $f_i(g; T)$ corresponde à distribuição estacionária obtida para $T = 104$.

O fluxo médio de caminhantes por cada vértice, incluindo a entrada e saída, está ilustrada no gráfico 2, onde os vértices estão dispostos no eixo horizontal e ordenados em ordem decrescente de acordo com o fluxo médio de caminhantes, f_i , que passam por ele.

Gráfico 2. O grau de entrada (vermelho) e o grau de saída (preto) da rede complexa para cada vértice + fluxo médio de caminhantes (abaixo).



Fonte: o autor

O vértice que apresentou o maior fluxo médio de caminhantes foi as Metaloproteínas de Matriz MMP2 e MMP9 ($f_i = 0.08845$), seguido de VEGF ($f_i = 0.06685$), TGF-B ($f_i = 0.06270$), ERK ($f_i = 0.04431$), CDK4/6 ($f_i = 0.04145$), Células tronco-tumorais (f_i

= 0.04241), TWIST ($f_i = 0.04087$), SNAIL ($f_i = 0.03938$), PIK3K ($f_i = 0.04278$), e STAT3 ($f_i = 0.02760$), conforme ilustrado na tabela 1.

Tabela 1. Fluxo médio de caminhantes para cada componente da rede complexa

MMP2 and MMP9	0.08845	N-cadherin	0.03064	RAS	0.01554
VEGF	0.06685	PDGF	0.02642	Src	0.01441
TGF-B	0.06270	IL-6	0.02996	ER	0.01770
ERK	0.04431	Fibroblasts	0.02785	SCF	0.00893
CDK4/6	0.04145	Adipocytes	0.02591	T lymphocytes	0.00803
Cancer stem cells	0.04241	MYC	0.01952	Intra-tumoral mast cells	0.00954
TWIST	0.04087	NF-kB	0.01956	TNF- α	0.00658
SNAIL	0.03938	Macrophages	0.02028	IGF1	0.02013
PI3K	0.04278	CCL2	0.01739	Tissue hypoxia	0.00330
STAT3	0.02760	Neutrophils	0.01838	JAK	0.00271
FGF2	0.04389	HER-2	0.03244	PELP1	0.00225
WNT	0.03341	TAZ signal transducer	0.01706	AR	0.00025
mTOR	0.03114				

Fonte: o autor

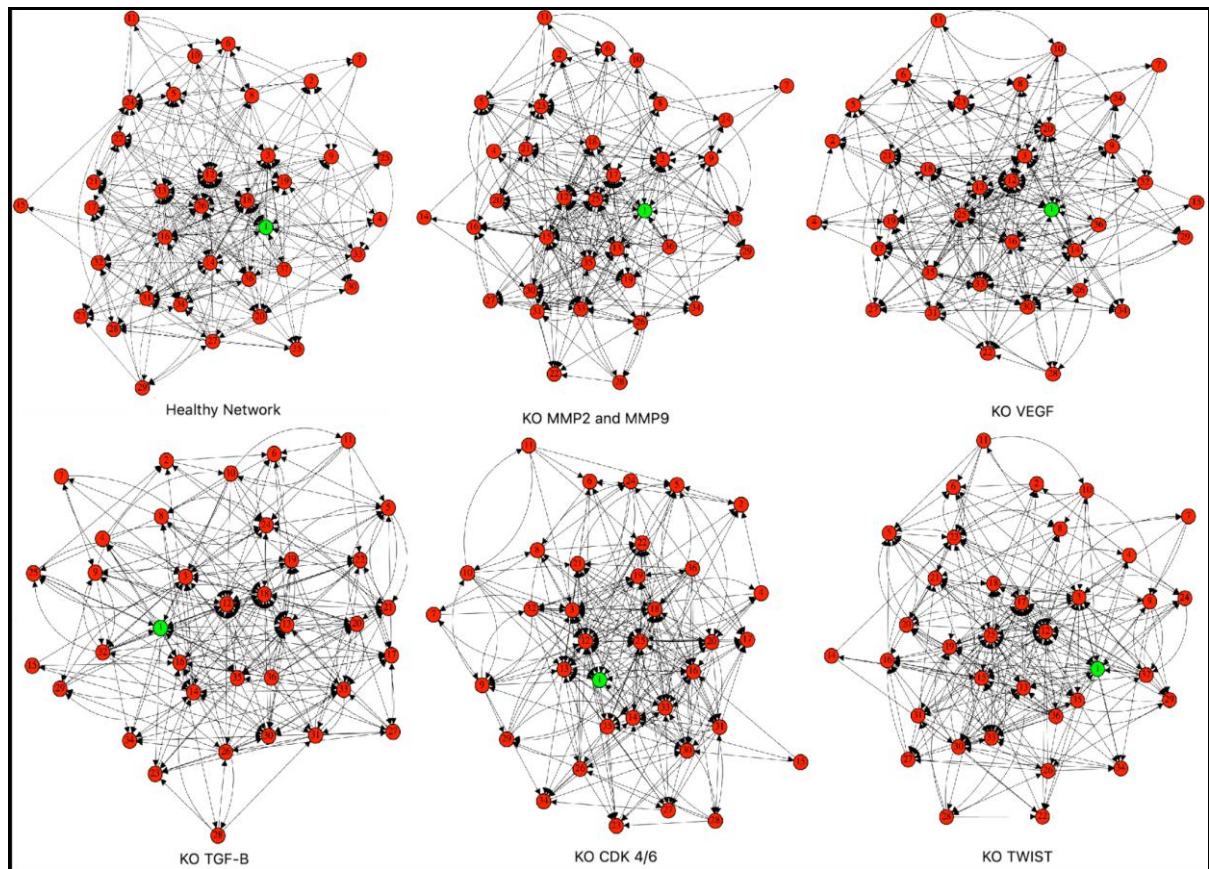
Knockout de Vértices

Uma análise de knockout foi realizada para cada vértice. O impacto de cada knockout foi calculado usando o princípio matemático do erro relativo. Após os cálculos, os vértices que demonstraram os maiores "erros relativos", impactando a rede em maior grau foram: MMP2 e MMP9 (0.19943), VEGF (0.18514); PI3K (0.16268), TGF-B (0.15465), CDK4/6 (0.12628), e TWIST (0.12596).

Para mensurar e comparar a "rede saudável" com cada modelo experimental de "rede com knockout", realizamos uma análise estatística através do teste de Wilcoxon, não paramétrico, para variáveis numéricas em amostras pareadas. Neste teste, o fluxo médio de caminhantes em cada vértice das duas redes (saudável VS knockout) foi comparado, buscando a magnitude da diferença através do escore Z e a significância estatística para um p bicaudal ≤ 0.05 .

Os knockouts analisados foram de MMP2 e MMP9, VEGF, PI3K, TGF-B, CDK4/6, e TWIST - descritos a seguir. A figura 7 ilustra as alterações na rede complexa mediante cada knockout.

Figura 7. Figura com as estruturas das redes complexas com os knockouts que demonstraram diferenças estatisticamente significativas.

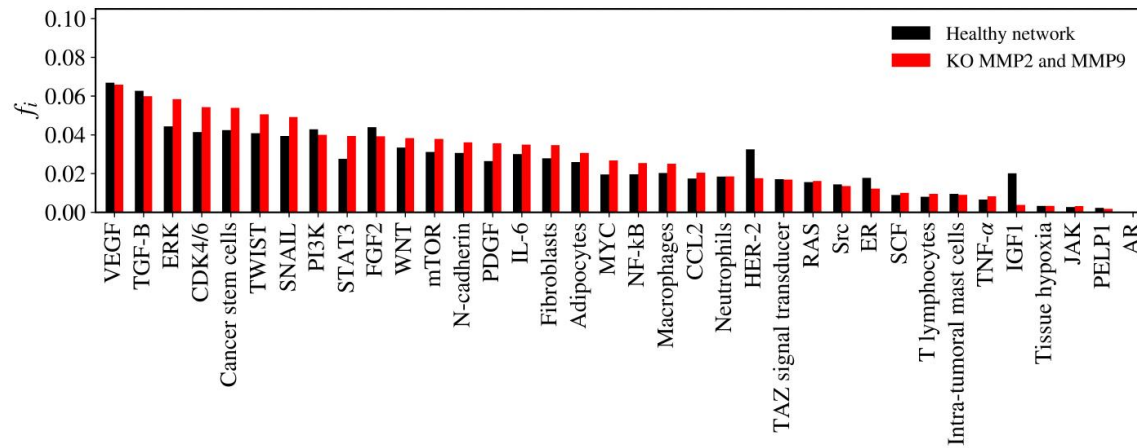


Fonte: o autor

Knockout de MMP-2 e MMP-9

O knockout de MMP2 e MMP9 impactou significativamente na estrutura da rede complexa ($Z = -2.443$; $p = 0.01468$), alterando o fluxo de entradas e saídas de caminhantes pelos demais vértices (gráfico 3). Os cinco vértices com as maiores variações foram IGF-1 ($\Delta f_i = -0.01631$); HER-2 ($\Delta f_i = -0.01492$); ERK ($\Delta f_i = 0.01411$); CDK4/6 ($\Delta f_i = 0.01276$); STAT3 ($\Delta f_i = 0.01176$).

Gráfico 3. Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto) e para a rede KO de MMP2 e MMP9 (em vermelho)

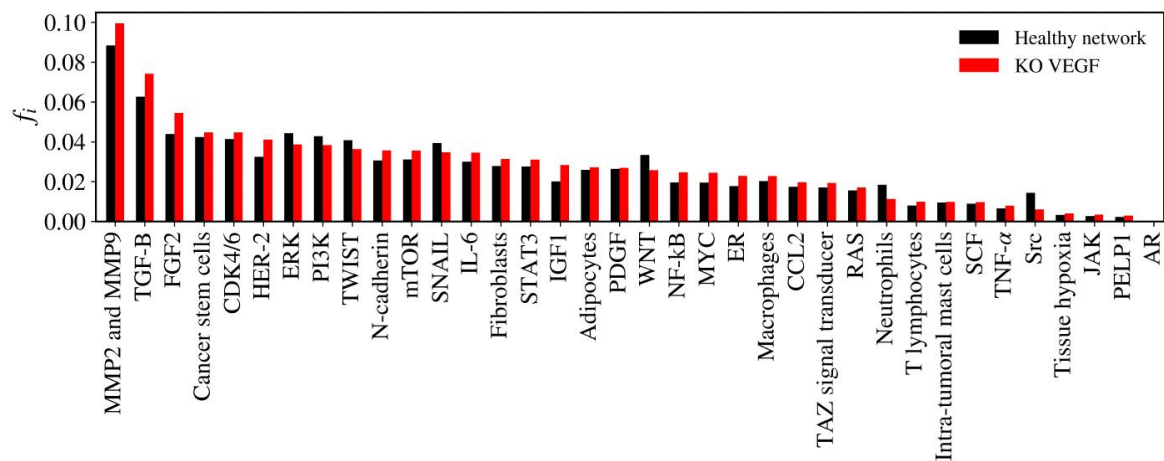


Fonte: o autor

Knockout de VEGF

O knockout de VEGF resultou em uma alteração significativa na rede ($Z = -2.3723$; $p = 0.01778$) conforme demonstrado no gráfico 04. Os cinco vértices com a maior diferença nos fluxos de caminhantes após o knockout foram TGF-B ($\Delta f_i = 0.01147$); MMP2 and MMP9 ($\Delta f_i = 0.01106$); FGF2 ($\Delta f_i = 0.01062$); HER-2 ($\Delta f_i = 0.00872$); Src ($\Delta f_i = -0.00839$).

Gráfico 4. Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto) e para a rede KO de VEGF (em vermelho)

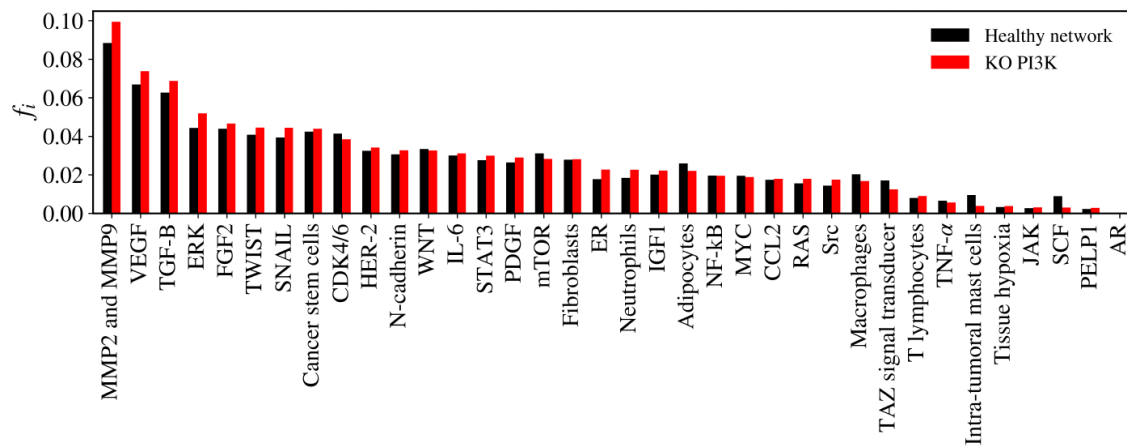


Fonte: o autor

Knockout de PI3K

O knockout de PI3K resultou em uma alteração sem significância estatística na estrutura da rede ($Z = -1.8774$; $p = 0.0601$). Os cinco vértices com a maior diferença após o knockout foram MMP2 e MMP9 ($\Delta f_i = 0.01095$); ERK ($\Delta f_i = 0.00764$); VEGF ($\Delta f_i = 0.00692$); TGF-B ($\Delta f_i = 0,00601$); SCF ($\Delta f_i = - 0.00592$), como verificado no gráfico 5.

Gráfico 5. Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto) e para a rede KO de PI3K (em vermelho)

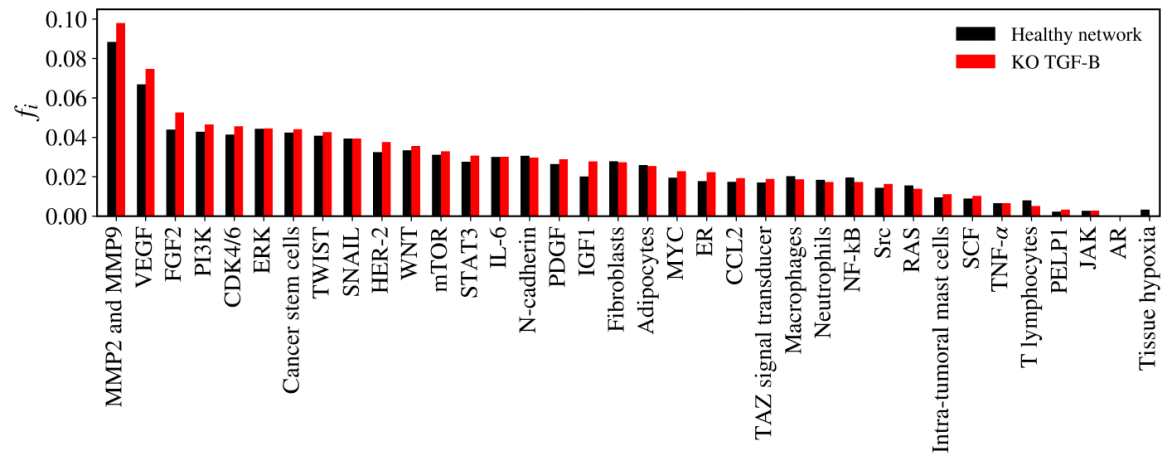


Fonte: o autor

Knockout de TGF-B

O knockout de TGF-B resultou em uma alteração estatisticamente significativa na rede complexa ($Z = -2.981$; $p = 0.00288$), conforme demonstrado no gráfico 6. Os cinco vértices com a maior diferença após o knockout de TGF-B foram MMP2 e MMP9 ($\Delta f_i = 0.00955$); FGF-2 ($\Delta f_i = 0.00872$); VEGF ($\Delta f_i = 0.00787$); IGF-1 ($\Delta f_i = 0.00765$); HER-2 ($\Delta f_i = 0.00513$).

Gráfico 6. Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto) e para a rede KO de TGF-B (em vermelho)

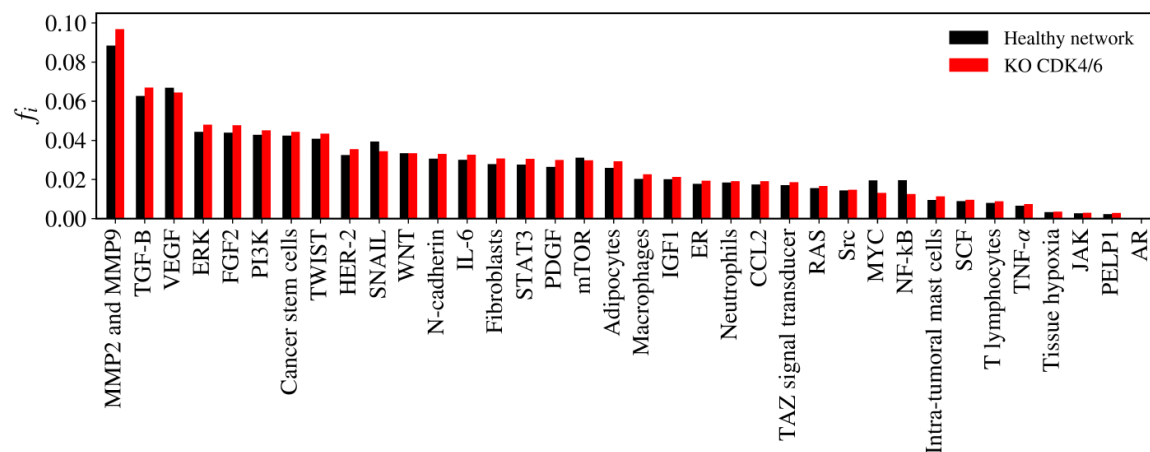


Fonte: o autor

Knockout de CDK4/6

O knockout de CDK4/6 resultou em uma alteração estatisticamente significativa na rede complexa ($Z = -3.1028$; $p = 0.00194$) como demonstrado no gráfico 7. Os cinco vértices com a maior diferença após o knockout de CDK4/6 foram MMP2 e MMP9 ($\Delta f_i = 0.00845$); NF-kB ($\Delta f_i = -0.00707$); MYC ($\Delta f_i = -0.00643$); SNAIL ($\Delta f_i = -0.00499$); FGF2 ($\Delta f_i = 0.00389$).

Gráfico 7. Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto) e para a rede KO de CDK4/6 (em vermelho)

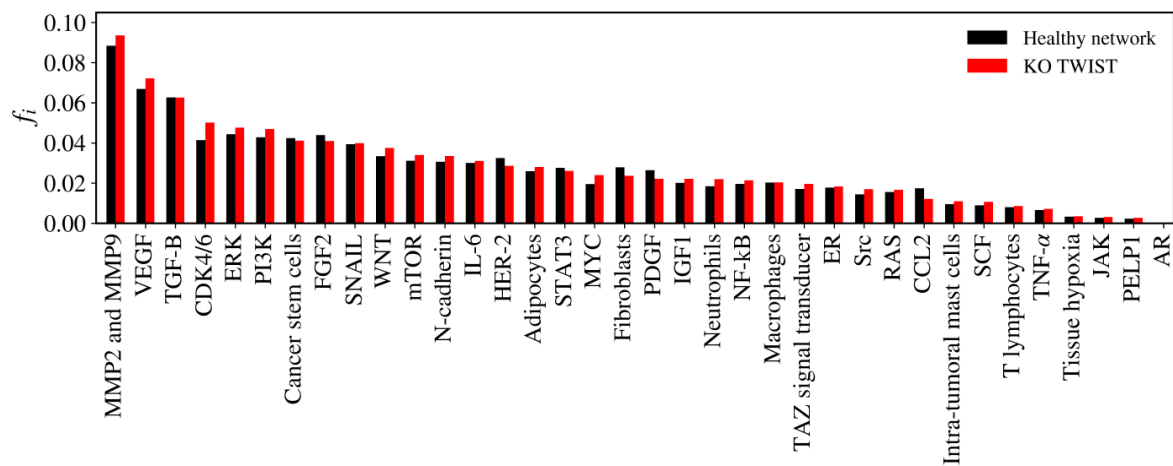


Fonte: o autor

Knockout de TWIST

O knockout de TWIST resultou em uma alteração estaticamente significativa na rede complexa ($Z = -2.4508$; $p = 0.01428$) conforme demonstrado no gráfico 8. Os cinco vértices com as maiores diferenças após o knockout de TWIST foram CDK4/6 ($\Delta f_i = 0.00868$); VEGF ($\Delta f_i = 0.00541$); CCL2 ($\Delta f_i = -0.00533$); MMP2 and MMP9 ($\Delta f_i = 0.00513$); MYC ($\Delta f_i = 0.00446$).

Gráfico 8. Fluxo médio de caminhantes, $f(i)$, para a rede saudável (em preto) e para a rede KO de TWIST (em vermelho)



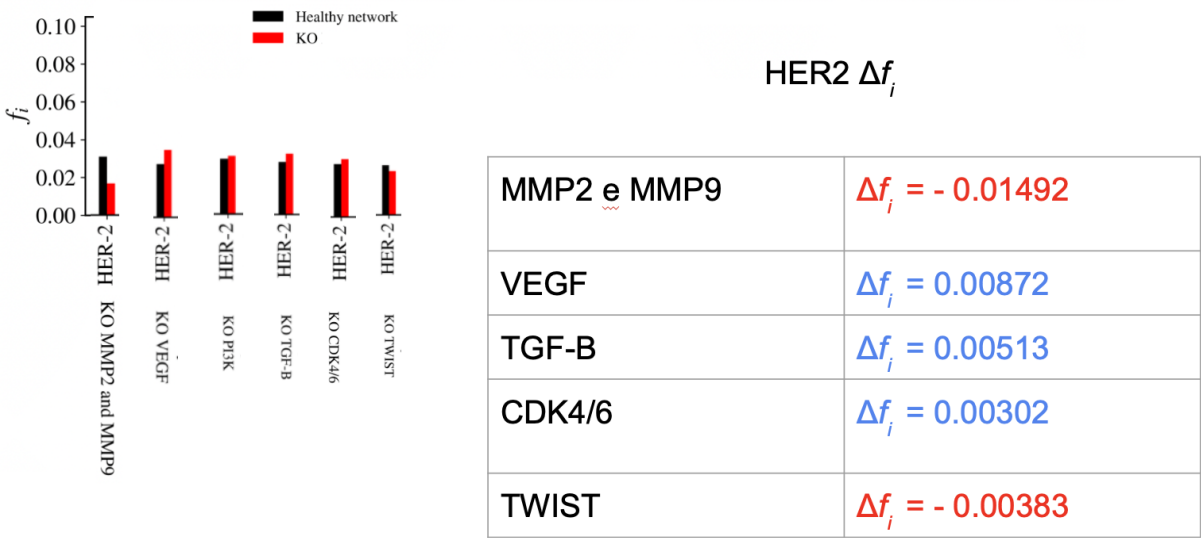
Fonte: o autor

6 DISCUSSÃO

Nosso modelo de rede complexa envolvendo possíveis fatores moleculares e celulares na patogênese do câncer de mama indicou que o fator que mais impactou a rede como um todo foi MMP2 e MMP9 de maneira estatisticamente significativa ($p = .01468$). Estudos indicam o papel dessas moléculas no câncer de mama, apontando para uma maior expressão de MMP2 e MMP9 na matriz extracelular do microambiente em comparação com o tecido normal adjacente. Ao mesmo tempo, uma maior expressão de MMP2 e MMP9 está associada a um pior prognóstico, maior disseminação para os linfonodos e agressividade tumoral (LI, 2017; JIANG, 2021). Quando associamos esses dados com a principal descoberta de nosso modelo matemático, nos voltamos para a discussão sobre a potencial aplicação de MMP2 e MMP9 como alvos terapêuticos no câncer de mama.

As Metaloproteinases da Matriz são endopeptidases dependentes de zinco produzidas por células tumorais e células não tumorais que compõem o microambiente tumoral, com as metaloproteinases da matriz 2 e 9 sendo consideradas gelatinases (Kwon, 2023). MMP2 e MMP9 atuam remodelando e degradando a matriz extracelular, contribuindo para a progressão do tumor, produção de fatores pró-tumorais, angiogênese e metástase (Conlon, 2019). Em nosso modelo, o knockout de MMP2 e MMP9 alterou significativamente a estrutura da rede e também mostrou uma redução no fluxo de caminhantes passando pelo vértice HER-2 (o início da rede), conforme mostrado na figura 8. Em contrapartida a estes dados, verificamos que o knockout de VEGF, TGF- β , CDK4/6 e PI3K resultou em um aumento no influxo de caminhantes passando por HER-2, gerando a hipótese de que seus knockouts poderiam estimular ainda mais esse vértice inicial. Essa descoberta reforçou a hipótese do possível impacto da inibição de MMP2 e MMP9 na biologia tumoral do câncer de mama com superexpressão de HER2.

Figura 8. Variação na média de fluxo de caminhantes pelo vértice HER-2 mediante análise dos principais knockouts.



Fonte: o autor

Até agora, várias moléculas foram desenvolvidas em laboratório com potenciais efeitos inibitórios sobre as metaloproteinases de matriz. Alguns medicamentos inibidores de MMP 9 foram testados em vários tipos de câncer em ensaios clínicos de fase I-III, demonstrando atividade antitumoral, mas não conseguiram mostrar superioridade ou tiveram seus testes interrompidos devido a problemas como a biodisponibilidade oral do medicamento e efeitos adversos significativos (Rashid, 2023).

Especificamente no contexto do câncer de mama, o Marimastat foi testado em um ensaio clínico de fase III em pacientes com câncer de mama metastático. Como resultado deste ensaio clínico, foi verificada uma resposta clínica ou estabilidade da doença após o tratamento de primeira linha com quimioterapia. Porém não houve diferença na sobrevida livre de progressão em comparação com o placebo, ao mesmo tempo em que foi detectado um aumento nas taxas de eventos adversos (Sparano, 2004). É importante notar que, neste estudo, as pacientes com câncer de mama não foram discriminadas com base na expressão de HER-2. Outro medicamento chamado BMS-275291 foi testado, no cenário adjuvante (após cirurgia com intenção curativa), para pacientes com câncer de mama nos estágios clínicos I-III. Entretanto, este ensaio clínico foi interrompido prematuramente devido à incidência de efeitos colaterais (Winer, 2018). Ensaios e testes com esses medicamentos foram então suspensos, e vários métodos para alterar a composição molecular para aumentar a seletividade estão sendo propostos (Krop, 2014).

Os resultados deste modelo de rede complexa demonstram a importância de buscar outras maneiras de alterar a ação enzimática das MMP2 e MMP9 tumorais. Um mecanismo que poderia ser utilizado para aumentar a eficácia dessa terapia, reduzindo os efeitos colaterais sistêmicos, seria a combinação de um inibidor enzimático de MMP com um anticorpo direcionado a HER-2. A justificativa para essa hipótese vem das evidências do impacto mais recente no tratamento do câncer de mama positivo para HER2. Que ocorreu com os medicamentos Trastuzumab-Emtansina e mais recentemente com Trastuzumab-Deruxtecan. Ambos compostos conjugados de quimioterápico-anticorpo e com impacto significativo nas taxas de resposta tumoral e ganhos de sobrevida global (Cortes, 2022 e Krop, 2014). Vários estudos e métodos podem ser utilizados para ligar anticorpos monoclonais a moléculas com potencial terapêutico a partir de uma variedade de mecanismos, como agentes quimioterápicos citotóxicos e agentes enzimáticos específicos de alvo (Fu, 2022 e Riccardi, 2023).

Portanto, mediante o resultado de nosso modelo de rede complexa do câncer de mama com superexpressão de HER2 e a possibilidade atual de fármacos imunoconjugados, aventamos um potencial terapêutico para a inibição de MMP2 e MMP9 como uma maneira de atacar este tumor. Este estudo gera como resultado a hipótese de um possível novo modo de ação através do desenvolvimento de um conjugado entre anticorpos anti-HER2 associados a uma enzima inibitória de MMP2/MMP9. Ao entrar nas células tumorais através de HER-2 e liberar o inibidor de MMP2/MMP9 em um local específico dentro do tumor, poderíamos obter menos eventos adversos e alcançar um possível impacto terapêutico, dado o peso das metaloproteinases na fisiopatologia deste câncer. Especificamente, no cenário com superexpressão de HER2, poderíamos encontrar um efeito intensificado na inibição das metaloproteinases, já que o silenciamento de MMP2 e MMP9 resultou em um menor fluxo de caminhantes em direção ao vértice HER2, algo que poderia ser interpretado como uma regulação negativa dessa via. Trazendo um potencial sinergismo de ação.

Apesar dos resultados gerados trazerem extrapolações e potenciais hipóteses translacionais deste estudo, devemos ter em mente que este trata de um modelo experimental teórico, que levanta hipóteses. No caso deste estudo, a revisão e seleção dos vértices da rede complexa foram baseadas em uma revisão narrativa da literatura e não em uma revisão sistemática da literatura. Para confirmação da hipótese gerada, devemos aguardar o desenvolvimento farmacológico de um composto similar e a aplicação em ensaios pré-clínicos e clínicos.

7 CONCLUSÕES

- O modelo de rede complexa é uma ferramenta matemática que permite o estudo das interações entre vértices dentro de uma matriz, possibilitando a abstração e a teorização sobre o funcionamento de um sistema complexo.
- O câncer de mama é a neoplasia mais prevalente entre as mulheres no mundo todo, e esforços crescentes devem ser associados para o desenvolvimento de novos tratamentos. No cenário do câncer de mama HER-2 positivo, múltiplos fatores tumorais parecem estar envolvidos.
- Nosso modelo de rede nos permitiu verificar que o maior impacto estrutural foi gerado pela eliminação das metaloproteinases da matriz, MMP-2 e MMP-9. Este impacto na rede foi simultaneamente associado a uma redução no fluxo de caminhantes em direção ao vértice HER-2. Não podemos confirmar se isso se deve ao acaso dentro de um modelo teórico gerado pela teoria de redes complexas, mas os dados na literatura sobre o papel das metaloproteinases na carcinogênese e sobre o papel da via HER2 no câncer de mama nos levam a acreditar no potencial deste resultado obtido e suas possíveis implicações terapêuticas.
- A combinação terapêutica tendo como alvos HER2 e MMP poderia ser alcançada através das tecnologias farmacêuticas disponíveis para conjugar um anticorpo ligante de HER-2 a uma enzima inibidora de MMP. Aguardamos estudos moleculares adicionais e testes farmacêuticos para confirmação desta hipótese.

REFERÊNCIAS

- ABAUURREA, A.; Araujo, A.M.; Caffarel, M.M. The Role of the IL-6 Cytokine Family in Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression. **Int J Mol Sci.** 2021 Aug 3;22(15):8334.
- ALEXANDER, N.R.; Tran, N.L.; Rekapally, H. et al. N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. **Cancer Res.** 2006 Apr 1;66(7):3365-9.
- ALLAM, A.; Yakou, M.; Pang, L. et al. Exploiting the STAT3 Nexus in Cancer-Associated Fibroblasts to Improve Cancer Therapy. **Front Immunol.** 2021 Nov 11;12:767939.
- ALBERT, R.; Jeong, H.; Barabasi, A.L. Attack and error tolerance of complex networks. **Nature** 2000, 406, 378–382.
- ALROY, I.; Yarden, Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: Signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. **FEBS Lett** 1997; 410: 83-6.
- AMISHA, F.; Malik, P.; Saluja, P. et al. A Comprehensive Review on the Role of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) as a Biomarker in Extra-Mammary and Extra-Gastric Cancers. **Onco** 2023, 3, 96-124.
- AMIN, M.B.; Edge, S.B.; Greene, F.L. et al. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual; 8th edition, 3rd printing. **Springer, Chicago**, 2018.
- ANDRAE, J.; Gallini, R.; Betsholtz, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. **Genes Dev.** 2008 May 15;22(10):1276-312.
- AYOB, A.Z.; Ramasamy, T.S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. **J Biomed Sci.** 2018 Mar 6;25(1):20.
- BABA, A.B.; Rah, B.; Bhat, G.R. et al. Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) Signaling in Cancer-A Betrayal Within. **Front Pharmacol.** 2022 Feb 28;13:791272.
- BALASENTHIL, S.; Vadlamudi, R.K. Functional interactions between the estrogen receptor coactivator PELP1/MNAR and retinoblastoma protein. **J Biol Chem.** 2003 Jun 13;278(24):22119-27.
- BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer** 2009, 9, 361–371.
- BAUDINO, T.A.; McKay, C.; Pendeville-Samain, H. et al. c-Myc is essential for

vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. **Genes Dev.** 2002 Oct 1;16(19):2530-43.

BARABASI, A.L.; Albert, R. Emergence of scaling in random networks. **Science** 1999, 286, 509.

BHATTACHARYA, R.; Fan, F.; Wang, R. et al. Intracrine VEGF signalling mediates colorectal cancer cell migration and invasion. **Br J Cancer** 2017, 117, 848–855.

BAULIDA, J.; Kraus, M.H.; Alimandi, M. et al. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. **J Biol Chem** 1996; 271: 5251-7.

BERGERS, G.; Brekken, R.; McMahon, G.; et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nat Cell Biol.** 2000 Oct;2(10):737-44.

BISWAS, S.K.; Allavena, P.; Mantovani, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. **Semin Immunopathol** 2013, 35, 585–600.

BISWAS, S.K.; Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol** 2010, 11, 889–896.

BISWAS, S.K.; Sica, A.; Lewis, C.E. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. **J Immunol.** 2008 Feb 15;180(4):2011-7.

BOCCALETTI, S.; Latora, V.; Moreno, Y. et al. Complex networks: Structure and dynamics. **Physics Reports** 2006, 424(4-5), 175–308.

BOURNE, H.R.; Sanders, D.A.; McCormick, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. **Nature** 1990, 348, 125–132.

BRANN, D.W.; Zhang, Q.G.; Wang, R.M. et al. PELP1--a novel estrogen receptor-interacting protein. **Mol Cell Endocrinol.** 2008 Aug 13;290(1-2):2-7.

BRIUKHOVETSKA, D.; Dörr, J.; Endres, S. et al. Interleukins in cancer: from biology to therapy. **Nat Rev Cancer** 2021, 21, 481–499.

BROOKS, A.J.; Putoczki, T. JAK-STAT Signalling Pathway in Cancer. **Cancers (Basel).** 2020 Jul 20;12(7):1971.

BUCHANAN, M. Nexus - small world and the groundbreaking science of network. **W. W. Norton Company**, 2002.

BURKHOLDER, B.; Huang, R.Y.; Burgess, R. et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochim Biophys Acta**. 2014 Apr;1845(2):182-201.

BUSS, H.; Handschick, K.; Jurrmann, N. et al. Cyclin-dependent kinase 6 phosphorylates NF- κ B P65 at serine 536 and contributes to the regulation of inflammatory gene expression. **PLoS One**. 2012;7(12).

CALVO, F.; Ege, N.; Grande-Garcia, A. et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. **Nat Cell Biol**. 2013 Jun;15(6):637-46.

CARMELIET, P.; Dor, Y.; Herbert, J.M. et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. **Nature** 394, 485–490 (1998).

CARPENCO, E.; Ceașu, R.A.; Cimpean, A.M. et al. Mast Cells as an Indicator and Prognostic Marker in Molecular Subtypes of Breast Cancer. **In Vivo**. 2019 May-Jun;33(3):743-748.

CARVER, B.S.; Chapinski, C.; Wongvipat, J. et al. Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. **Cancer Cell**. 2011 May 17;19(5):575-86.

CASTELLANO, E.; Downward, J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. **Genes Cancer**. 2011;2(3):261-274.

CAVALLARO, U.; Dejana, E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2011 Mar;12(3):189-97.

CHAKRABORTY, D.; Šumová, B.; Mallano, T. et al. Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis. **Nat Commun** 8, 1130 (2017).

CHEN, J.; Zeng, F.; Forrester, S.J. et al. Expression and function of the Epidermal Growth Factor Receptor in Physiology and Disease. **Physiological Reviews** 2016 96:3, 1025-1069.

CHEN, Y.; Zhao, X.; Sun, J. et al. YAP1/Twist promotes fibroblast activation and lung fibrosis that conferred by miR-15a-5p/RBM47 axis. **Cell Death Differ**. 2019 Aug;26(8):1658-1673.

CHENG, N.; Chytil, A.; Shyr, Y. et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol Cancer Res**. 2008 Oct;6(10):1521-33.

CHOU, T.C.; Talalay, P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old

problem. **Trends Pharmacol Sci.** 1983 Feb;4:450-4.

CHOI, H.J.; Jin, S.; Cho, H. et al. CDK12 drives breast tumor initiation and trastuzumab resistance via WNT and IRS1-ErbB-PI3K signaling. **EMBO Rep.** 2019, 20, e48058.

CIOŁCZYK-WIERZBICKA, D.; Gil, D.; Zarzycka, M. et al. mTOR inhibitor everolimus reduces invasiveness of melanoma cells. **Human Cell** 33, 88–97 (2020).

CLEVERS, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell.** 2006 Nov 3;127(3):469-80.

CLEVERS, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. **Nat Med.** 2011 Mar;17(3):313-9.

COFFELT, S.; Wellenstein, M.; De Visser, K. Neutrophils in cancer: neutral no more. **Nat Rev Cancer** 16, 431–446 (2016).

COMSTOCK, C.E.; Augello, M.A.; Goodwin, J.F. et al. Targeting cell cycle and hormone receptor pathways in cancer. **Oncogene.** 2013 Nov 28;32(48):5481-91.

CONLON, G.A.; Murray, G.I. Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. **J Pathol** (2019) 247(5):629–40.

CORDANI, N.; Mologni, L.; Piazza, R. et al. TWIST1 Upregulation Is a Potential Target for Reversing Resistance to the CDK4/6 Inhibitor in Metastatic Luminal Breast Cancer Cells. **Int J Mol Sci.** 2023 Nov 14;24(22):16294.

CORNICE, J.; VerZella, D.; Arboretto, P. et al. NF-κB: Governing Macrophages in Cancer. **Genes (Basel).** 2024 Jan 31;15(2):197.

CORTÉS, J.; Kim, S.B.; Chung, W.P. et al. DESTINY-Breast03 Trial Investigators. Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. **N Engl J Med.** 2022 Mar 24;386(12):1143-1154.

DEHBASHI, M.; Kamali, E.; Vallian, S. Comparative genomics of human stem cell factor (SCF). **Mol Biol Res Commun.** 2017 Mar;6(1):1-11.

DENG, Y.; Lu, J.; Li, W. et al. Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF-κB regulates osteoarthritic cartilage degradation. **Nat Commun** 9, 4564 (2018).

DERYNCK, R.; Turley, S.J.; Akhurst, R.J. TGFβ biology in cancer progression and immunotherapy. **Nat Rev Clin Oncol** 18, 9–34 (2021).

DE VISSER, K.E.; Joyce, J.A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. **Cancer Cell.** 2023 Mar 13;41(3):374-403.

DIGIACOMO, J.W.; Godet, I.; Trautmann-Rodriguez, M. et al. Extracellular Matrix-Bound FGF2 Mediates Estrogen Receptor Signaling and Therapeutic Response in Breast Cancer. **Mol Cancer Res.** 2021 Jan;19(1):136-149.

DIRAT, B.; Bochet, L.; Dabek, M. et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. **Cancer Res.** 2011 Apr 1;71(7):2455-65.

EICKELBERG, O.; Pansky, A.; Mussmann, R. et al. Transforming growth factor-beta1 induces interleukin-6 expression via activating protein-1 consisting of JunD homodimers in primary human lung fibroblasts. **J Biol Chem.** 1999.

EMENS, L.A.; Esteva, F.J.; Beresford, M. et al. Trastuzumab emtansine plus atezolizumab versus trastuzumab emtansine plus placebo in previously treated, HER2-positive advanced breast cancer (KATE2): a phase 2, multicentre, randomized, double-blind trial. **Lancet Oncol.** 2020 Oct;21(10):1283-1295.

EWEN, M.E. Relationship between Ras pathways and cell cycle control. **Prog Cell Cycle Res.** 2000;4:1–17.

FAN, Q.; Qiu, M.T.; Zhu, Z. et al. Twist induces epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinogenesis by regulating the TGF- β /Smad3 signaling pathway. **Oncol Rep.** 2015 Oct;34(4):1787-94.

FARES, J.; Fares, M.Y.; Khachfe, H.H. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduct Target Ther.** 2020 Mar 12;5(1):28.

FERNÁNDEZ-NOGUEIRA, P.; Mancino, M.; Fuster, G. et al. Tumor-Associated Fibroblasts Promote HER2-Targeted Therapy Resistance through FGFR2 Activation. **Clin Cancer Res.** 2020 Mar 15;26(6):1432-1448.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr Rev.** 2004 Aug;25(4):581-611.

FRAME, M.C. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. **Biochim Biophys Acta.** 2002 Jun 21;1602(2):114-30.

FRANOVIC, A.; Gunaratnam, L.; Smith, K. et al. Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2007 Aug 7;104(32):13092-7.

FRIDMAN, W.; Pagès, F.; Sautès-Fridman, C. et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nat Rev Cancer** 12, 298–306 (2012).

FRUMAN, D.A.; Chiu, H.; Hopkins, B.D. et al. The PI3K pathway in human disease. **Cell.**

2017.

GALDIERO, M.R.; Bonavita, E.; Barajon, I. et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. **Immunobiology** 2013 Nov;218(11):1402-10.

GALOGRE, M.; Rodin, D.; Pyatnitskiy, M. et al. A review of HER2 overexpression and somatic mutations in cancers. **Crit Rev Oncol Hematol** 2023 Jun;186:103997.

GEILER, C.; Andrade, I.; Greenwald, D. Exogenous c-Myc Blocks Differentiation and Improves Expansion of Human Erythroblasts In vitro. **Int J Stem Cells** 2014 Nov;7(2):153-7.

GENER, P.; Rafael, D.; Seras-Franzoso, J. et al. Pivotal Role of AKT2 during Dynamic Phenotypic Change of Breast Cancer Stem Cells. **Cancers** 2019, 11, 1058.

GESTA, S.; Tseng, Y.H.; Kahn, C.R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell** 2007 Oct 19;131(2):242-56.

GIOELI, D.; Black, B.; Gordon, V. et al. Stress Kinase Signaling Regulates Androgen Receptor Phosphorylation, Transcription, and Localization. **Molecular Endocrinology** 2006 Mar;20(3):503-15.

GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data. Available at: <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data> (Accessed on June 08, 2022).

GONUGUNTA, V.K.; Miao, L.; Sareddu, G.R. et al. The social network of PELP1 and its implications in breast and prostate cancers. **Endocr Relat Cancer** 2014 Aug;21(4).

GOULET, C.R.; Champagne, A.; Bernard, G. et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling. **BMC Cancer** 2019 Feb 11;19(1):137.

GRIVENNIKOV, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell** 2010 Mar 19;140(6):883-99.

GUO, T.; Xu, J. Cancer-associated fibroblasts: a versatile mediator in tumor progression, metastasis, and targeted therapy. **Cancer Metastasis Rev** 2024.

HAN, R.; Gu, S.; Zhang, Y. et al. Estrogen promotes progression of hormone-dependent breast cancer through CCL2-CCR2 axis by upregulation of Twist via PI3K/AKT/NF- κ B signaling. **Sci Rep** 2018;8:9575.

HAN, Z.B.; Ren, H.; Zhao, H. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha directly enhances the transcriptional activity of stem cell factor (SCF) in response to hypoxia and epidermal growth factor (EGF). **Carcinogenesis** 2008 Oct;29(10):1853-61.

HANAHAHAN, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011 Mar 4;144(5):646-74.

HANAHAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov** 2022 Jan;12(1):31-

46.

HARBECK, N.; Penault-Llorca, F.; Cortes, J. et al. Breast cancer. **Nat Rev Dis Primers** 2019;5:66.

HEDDLESTON, J.; Li, Z.; Lathia, J. et al. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. **Br J Cancer** 2010;102:789–795.

HICKLIN, D.J.; Ellis, L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol** 2005 Feb 10;23(5):1011-27.

HINES, S.J.; Litz, J.S.; Krystal, G.W. Coexpression of c-kit and stem cell factor in breast cancer results in enhanced sensitivity to members of the EGF family of growth factors. **Breast Cancer Res Treat** 1999 Nov;58(1):1-10.

HIRANO, T.; Saito, D.; Yamada, H. et al. TGF- β 1 induces N-cadherin expression by upregulating Sox9 expression and promoting its nuclear translocation in human oral squamous cell carcinoma cells. **Oncol Lett** 2020 Jul;20(1):474-482.

HODGE, D.R.; Hurt, E.M.; Farrar, W.L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. **Eur J Cancer** 2005 Nov;41(16):2502-12.

HOLMES, K.; Roberts, O.L.; Thomas, A.M. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. **Cell Signal** 2007 Oct;19(10):2003-12.

HOUGHTON, A.M.; Rzymkiewicz, D.M.; Ji, H. et al. Neutrophil elastase mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. **Nat Med** 2010;16:219–23.

HOWE, L.R.; Watanabe, O.; Leonard, J. et al. Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. **Cancer Res** 2003 Apr 15;63(8):1906-13.

HUANG, B.; Lei, Z.; Zhang, G.M. et al. SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment. **Blood** 2008 Aug 15;112(4):1269-79.

HUANG, F.; Shi, Q.; Li, Y. et al. HER2/EGFR-AKT Signaling Switches TGF β from Inhibiting Cell Proliferation to Promoting Cell Migration in Breast Cancer. **Cancer Res** 2018 Nov 1;78(21):6073-6085.

HUANG, Y.H.; Yang, H.Y.; Huang, S.W. et al. Interleukin-6 Induces Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression via Src-FAK-STAT3 Signaling in Lymphatic Endothelial Cells. **PLoS One** 2016 Jul 6;11(7).

HUOBER, J.; Barrios, C.H.; Niikura, N. et al. IMpassion050 Trial Investigators. Atezolizumab With Neoadjuvant Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Therapy and Chemotherapy in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Early Breast Cancer: Primary Results of the Randomized Phase III IMpassion050 Trial. **J Clin Oncol** 2022 Sep 1;40(25):2946-2956.

HWANG, K.T.; Kim, J.; Jung, J. et al. Impact of Breast Cancer Subtypes on Prognosis of

Women with Operable Invasive Breast Cancer: A Population-based Study Using SEER Database. **Clin Cancer Res** 2019 Mar 15;25(6):1970-1979.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. –Rio de Janeiro: INCA, 2022.

JENSEN, F.; woudwyk, M.; teles, A. et al. Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. **PLoS One**. 2010 Dec 22;5(12)

JIANG, H.; li, H. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer** 21, 149 (2021).

JIN, J.; lin, J.; xu, A. et al. CCL2: An Important Mediator Between Tumor Cells and Host Cells in Tumor Microenvironment. **Front Oncol**. 2021 Jul 27;11:722916.

JOECHLE, K.; jumaa, H.; thiene, K. et al. Dual Inhibition of mTORC1/2 Reduces Migration of Cholangiocarcinoma Cells by Regulation of Matrixmetalloproteinases. **Front. Cell Dev. Biol** 2022. 9:785979.

JOHNSTON, S. et al. MONARCH 3 Final PFS: A Randomized Study of Abemaciclib as Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. **NPJ Breast Cancer** 2019, 5, 5.

JONES, J.E.C.; rabhi, N.; orofino, J. et al. The Adipocyte Acquires a Fibroblast-Like Transcriptional Signature in Response to a High Fat Diet. **Sci Rep** 10, 2380 (2020).

JUN, J.C.; rathore, A.; younas, H. et al. Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. **Curr Sleep Med Rep**. 2017 Mar;3(1):1-10.

KADOMOTO, S.; izumi, K.; mizokami, A. Roles of CCL2-CCR2 Axis in the Tumor Microenvironment. **Int J Mol Sci**. 2021 Aug 8;22(16):8530.

KALAFATI, L.; mitroulis, I.; verginis, P. et al. Neutrophils as Orchestrators in Tumor Development and Metastasis Formation. **Front Oncol**. 2020 Dec 10;10:581457.

KALLURI, R.; weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest** 2009; 119: 1420-1428.

KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**. 2016 Aug 23;16(9):582-98.

KALLURI, R.; zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer** 6, 392–401 (2006).

KARAR, J.; maity, A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. **Front Mol Neurosci**. 2011 Dec 2;4:51.

KARIN, M.; cao, Y.; greten, F. et al. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nat Rev Cancer** 2, 301–310 (2002).

KARNOU, A.E.; weinberg, R.A. Ras oncogenes: split personalities. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol** (2008). 9:517–531.

- KESSENBROCK, K.; plaks, V.; Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**. 2010 Apr 2;141(1):52-67.
- KHAN, D.; ansar ahmed, S. The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases. **Front Immunol**. 2016 Jan 6;6:635.
- KIM, A.R.; park, J.I.; oh, H.T. et al. TAZ stimulates liver regeneration through interleukin-6-induced hepatocyte proliferation and inhibition of cell death after liver injury. **FASEB J**. 2019 May;33(5):5914-5923.
- KING, C.R.; kraus, M.H.; aaronson, S.A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. **Science**. 1985;229(4717):974.
- KLEIN, S.; flanagan, K. Sex differences in immune responses. **Nat Rev Immunol** 16, 626–638 (2016).
- KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Front. Biosci. (Landmark Ed)** 2008, 13(7), 2400–2407.
- KOMI, D.E.A.; redegeld, F.A. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment. **Clin Rev Allergy Immunol**. 2020 Jun;58(3):313-325.
- KORKAYA, H.; wicha, M.S. HER-2, notch, and breast cancer stem cells: targeting an axis of evil. **Clin Cancer Res**. 2009 Mar 15;15(6):1845-7.
- KOUNDOUROUROS, N.; poulogiannis, G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. **Br J Cancer** 122, 4–22 (2020).
- KROP, I.E.; kim, S.B.; gonzález-martín, A. et al. TH3RESA study collaborators. Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): a randomized, open-label, phase 3 trial. **Lancet Oncol**. 2014 Jun;15(7):689-99.
- KUMAR, M.; allison, D.F.; baranova, N.N. et al. NF- κ B regulates mesenchymal transition for the induction of non-small cell lung cancer initiating cells. **PLoS One**. 2013 Jul 30;8(7).
- KWOK, W.K.; ling, M.T.; lee, T.W. et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. **Cancer Res**. 2005 Jun 15;65(12):5153-62.
- KWON, M.J. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in breast cancer. **Front Oncol** 12:1108695. (2023)
- KUZNETSOVA, A.B.; kolesova, E.P.; parodi, A. Reprogramming Tumor-Associated Macrophage Using Nanocarriers: New Perspectives to Halt Cancer Progression. **Pharmaceutics** 2024, 16, 636.
- KYO, S.; sakaguchi, J.; ohno, S. et al. High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. **Hum Pathol**. 2006 Apr;37(4):431-8.
- LAINÉ, A.; labiad, O.; hernandez-vargas, H. et al. Regulatory T cells promote cancer

immune-escape through integrin $\alpha\beta 8$ -mediated TGF- β activation. **Nat Commun.** 2021 Oct 28;12(1):6228.

LAMOUILLE, S.; xu, J.; derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol** 15, 178–196 (2014).

LEE, A.V.; cui, X.; oesterreich, S. Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor signaling in breast cancer. **Clin Cancer Res.** 2001 Dec;7(12 Suppl):4429s-4435s; discussion 4411s-4412s.

LEE, J.S.; lero, M.W.; mercado-matos, J. et al. The insulin and IGF signaling pathway sustains breast cancer stem cells by IRS2/PI3K-mediated regulation of MYC. **Cell Rep.** 2022 Dec 6;41(10):111759.

LI, D.; ji, H.; niu, X. et al. Tumor-associated macrophages secrete CC-chemokine ligand 2 and induce tamoxifen resistance by activating PI3K/Akt/mTOR in breast cancer. **Cancer Sci.** 2020 Jan;111(1):47-58.

LI, H.; qiu, Z.; li, F. et al. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. **Oncol Lett.** 2017 Nov;14(5):5865-5870.

LIEU, C.; kopetz, S. The SRC family of protein tyrosine kinases: a new and promising target for colorectal cancer therapy. **Clin Colorectal Cancer.** 2010 Apr;9(2):89-94.

LIM, S.Y.; yuzhalin, A.E.; gordon-weeks, A.N.; et al. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. **Oncotarget.**

LIU, C.; LI, Y.; SEMENOV, M. et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. **Cell** 2002 Mar 22;108(6):837-47.

LIU, Y. Crosstalk between the PI3K/Akt and ERK signaling pathways promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation. **Molecular Medicine Reports** 2014;9(3):1661-1666.

LIU, N.; TOLBERT, E.; PONNUSAMY, M. et al. Delayed treatment with rapamycin attenuates the progression of renal fibrosis in obstructive nephropathy. **International Journal of Molecular Sciences** 2014;15(5):7874-7891.

LIU, J.; CAO, L.; FINKEL, T. Oxidants, metabolism, and stem cell biology. **Free Radic. Biol. Med.** 2011;51:2158–2162.

LIU, J.F.; CRÉPIN, M.; LIU, J.M. et al. FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. **Biochem Biophys Res Commun** 2002 May 17;293(4):1174-82.

LIU, W.; LU, X.; SHI, P. et al. TNF- α increases breast cancer stem-like cells through up-regulating TAZ expression via the non-canonical NF- κ B pathway. **Sci Rep** 2020;10:1804.

LIU, X.; YE, Y.; ZHU, L. et al. Niche stiffness sustains cancer stemness via TAZ and NANOG phase separation. **Nat Commun** 2023;14:238.

- LOH, C.Y.; CHAI, J.Y.; TANG, T.F. et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. **Cells** 2019 Sep 20;8(10):1118.
- MAJORINI, M.T.; CANCELILA, V.; RIGONI, A. et al. Infiltrating Mast Cell-Mediated Stimulation of Estrogen Receptor Activity in Breast Cancer Cells Promotes the Luminal Phenotype. **Cancer Res** 2020 Jun 1;80(11):2311-2324.
- MÄKINEN, T.; VEIKKOLA, T.; MUSTJOKI, S. et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. **EMBO J** 2001 Sep 3;20(17):4762-73.
- MAMER, S.B.; CHEN, S.; WEDDELL, J.C. et al. Discovery of High-Affinity PDGF-VEGFR Interactions: Redefining RTK Dynamics. **Sci Rep** 2017;7:16439.
- MANI, S.A.; GUO, W.; LIAO, M.J. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell** 2008 May 16;133(4):704-15.
- MANNING, B.D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell** 2017 Apr 20;169(3):381-405.
- MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol** 2002 Nov;23(11):549-55.
- MAO, Y.; SU, C.; YANG, H. et al. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway Regulates MMP9 Gene Activation via Transcription Factor NF- κ B in Mammary Epithelial Cells of Dairy Cows. **Research Square** 2021.
- MARICHAL, T.; TSAI, M.; GALLI, S.J. Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. **Cancer Immunol Res** 2013 Nov;1(5):269-79.
- MARSHALL, C.J. Small GTPases and cell cycle regulation. **Biochem Soc Trans** 1999;27:363-70.
- MASSAGUÉ, J. TGF β in Cancer. **Cell** 2008 Jul 25;134(2):215-30.
- MASSARWEH, S.; SCHIFF, R. Unraveling the mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: New therapeutic opportunities. **Clinical Cancer Research** 2007;13(7):1950-1954.
- MATSUDA, T.; YAMAMOTO, T.; MURAGUCHI, A. et al. Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3. **J Biol Chem** 2001 Nov 16;276(46):42908-14.
- MCNEILL, H.; WOODGETT, J.R. When pathways collide: collaboration and connivance among signalling proteins in development. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2010 Jun;11(6):404-13.
- MENDOZA, M.C.; ER, E.E.; BLENIS, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. **Trends Biochem Sci** 2011;36(6):320-328.
- MEŠKYTĖ, E.M.; KESKAS, S.; CIRIBILLI, Y. MYC as a Multifaceted Regulator of Tumor

Microenvironment Leading to Metastasis. **Int. J. Mol. Sci** 2020;21:7710.

METZ, J.; CALVO, R.; SENO, E.R.M. et al. Redes complexas: conceitos e aplicações. **São Carlos: ICMC-USP**. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/directbitstream/30f00c12-d53f-4c46-911f-a84b360575a3/Relat%C3%B3rio%20T%C3%A9cnico%202007.pdf>.

Acesso em: 26 maio 2024.

MEYER, N.; PENN, L. Reflecting on 25 years with MYC. **Nat Rev Cancer** 2008;8:976–990.

MICHALOGLOU, C.; CRAFTER, C.; SIERSBAEK, R. et al. Combined Inhibition of mTOR and CDK4/6 Is Required for Optimal Blockade of E2F Function and Long-term Growth Inhibition in Estrogen Receptor–positive Breast Cancer. **Mol Cancer Ther** 2018 May;17(5):908–920.

MICHMERHUIZEN, A.R.; SPRATT, D.E.; PIERCE, L.J. et al. Are we there yet? Understanding androgen receptor signaling in breast cancer. **npj Breast Cancer** 2020;6:47.

MILLS, J.R.; HIPPO, Y.; ROBERT, F. et al. mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 2008;105(31):10853-10858.

MIYOSHI, A.; KITAJIMA, Y.; SUMI, K. et al. Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. **Br J Cancer** 2004 Mar 22;90(6):1265-73.

MONTEMURRO, F.; DI COSIMO, S.; ARPINO, G. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive and hormone receptor-positive breast cancer: new insights into molecular interactions and clinical implications. **Ann Oncol** 2013 Nov;24(11):2715-24.

MONTERAN, L.; EREZ, N. The dark side of fibroblasts: Cancer-associated fibroblasts as mediators of immunosuppression in the tumor microenvironment. **Front Immunol** 2019;10:1835.

MOORE-SMITH, L.D.; ISAYEVA, T.; LEE, J.H. Silencing of TGF- β 1 in tumor cells impacts MMP-9 in tumor microenvironment. **Sci Rep** 2017 Aug 17;7(1):8678.

MU, D.; CAMBIER, S.; FJELLBIRKELAND, L. et al. The integrin α (v) β 8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- β 1. **J Cell Biol** 2002 Apr 29;157(3):493-507.

MURRAY, P.J.; ALLEN, J.E.; BISWAS, S.K. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity** 2014 Jul 17;41(1):14-20.

MUSGROVE, E.A. Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. **Growth Factors** 2006;24, 13-19.

MUSGROVE, E.A.; CALDON, C.E.; BARRACLOUGH, J. et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. **Nat Rev Cancer** 2011 Jul 7;11(8):558-72.

- NA, H.; song, y.; lee, h.w. Emphasis on adipocyte transformation: anti-inflammatory agents to prevent the development of cancer-associated adipocytes. **Cancers (Basel)** 2023 Jan 13;15(2):502.
- NA, Y.R.; lee, j.s.; lee, s.j. et al. Interleukin-6-induced Twist and N-cadherin enhance melanoma cell metastasis. **Melanoma Res.** 2013 Dec;23(6):434-43.
- NAIR, B.C.; nair, s.; chakravarty, d. et al. PELP1/MNAR: A novel CDKs substrate and regulator of pRb/E2F pathway. **Proc. Am. Assn. Cancer Res.** 2008;2008:4222.
- NAKAJIMA, S.; doi, r.; toyoda, e. et al. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. **Clin Cancer Res.** 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):4125-33.
- NILSSON, S.; mäkälä, s.; treuter, e. Mechanisms of estrogen action. **Physiol Rev.** 2001 Oct;81(4):1535-65.
- NILSSON, U.W.; garvin, s.; dabrosin, c. MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat** 2007;102:253–261.
- OBAYA, A.J.; kotenko, i.; cole, m.d. et al. The proto-oncogene c-myc acts through the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27(Kip1) to facilitate the activation of Cdk4/6 and early G(1) phase progression. **J Biol Chem.** 2002 Aug 23;277(34):31263-9.
- ORNITZ, D.M.; itoh, n. The fibroblast growth factor signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.** 2015 May-Jun;4(3):215-66.
- ORTMANN, B.M. Hypoxia-inducible factor in cancer: from pathway regulation to therapeutic opportunity. **BMJ Oncology** 2024;3.
- O'SHAUGHNESSY, J.; petrakova, k.; sonke, g.s. et al. Ribociclib plus Letrozole versus Letrozole Alone in Patients with de Novo HR+, HER2– Advanced Breast Cancer in the Randomized MONALEESA-2 Trial. **Breast Cancer Res. Treat.** 2018;168:127–134.
- OSBORNE, C.K.; schiff, r. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. **Journal of Clinical Oncology** 2005;23(8):1616–1622.
- OTTO, T.; sicinski, p. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nat Rev Cancer.** 2017 Jan 27;17(2):93-115.
- OZEL, I.; duerig, i.; domnich, m. et al. The good, the bad, and the ugly: neutrophils, angiogenesis, and cancer. **Cancers (Basel)** 2022 Jan 21;14(3):536.
- PAN, S.; hu, y.; hu, m. et al. Platelet-derived PDGF promotes the invasion and metastasis of cholangiocarcinoma by upregulating MMP2/MMP9 expression and inducing EMT via the p38/MAPK signalling pathway. **Am J Transl Res.** 2020 Jul 15;12(7):3577-3595.
- PANCIERA, T.; citron, a.; di biagio, d. et al. Reprogramming normal cells into tumour precursors requires ECM stiffness and oncogene-mediated changes of cell mechanical properties. **Nat Mater.** 2020;19:797–806.

- PANDEY, K.; an, h.j.; kim, s.k. et al. Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review. **Int J Cancer**. 2019 Sep 1;145(5):1179-1188.
- PARK, J.H.; shin, j.e.; park, h.w. The role of Hippo pathway in cancer stem cell biology. **Mol Cells**. 2018 Feb 28;41(2):83-92.
- PEINADO, H.; quintanilla, m.; cano, a. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. **J Biol Chem**. 2003 Jun 6;278(23):21113-23.
- PELLO, O.M.; chevre, r.; laoui, d. et al. In vivo inhibition of C-Myc in myeloid cells impairs tumor-associated macrophage maturation and pro-tumoral activities. **PLoS ONE** 2012;7
- PETRASHEN, A.P.; verdesca, a.d.; kreiling, j.a. et al. Regulation of the somatotrophic axis by MYC-mediated miRNA repression. **Front. Cell Dev. Biol**. 2023;11:1269860.
- PETROVA, V.; annicchiarico-petruzzelli, m.; melino, g. et al. The hypoxic tumour microenvironment. **Oncogenesis** 2018;7:10.
- PHAM, C.G.; bubici, c.; zazzaroni, f. et al. Upregulation of Twist-1 by NF-kappaB blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs. **Mol Cell Biol**. 2007 Jun;27(11):3920-35.
- PICCART-GEBHART, M.J.; procter, m.; leyland-jones, b. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N. Engl. J. Med**. 2005;353:1659–1672.
- PIETRAS, K.; pahler, j.; bergers, g. et al. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. **PLoS Med**. 2008 Jan 29;5(1)
- PRESTI, D.; quaquarini, e. The PI3K/AKT/mTOR and CDK4/6 pathways in endocrine resistant HR+/HER2- metastatic breast cancer: biological mechanisms and new treatments. **Cancers (Basel)** 2019 Aug 24;11(9):1242.
- QIAN, B.Z.; pollard, j.w. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**. 2010 Apr 2;141(1):39-51.
- QIAN, X.; anzovino, a.; kim, s. et al. N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. **Oncogene** 2014;33:3411–3421.
- RADHARANI, N.N.V.; yadav, a.s.; nimma, r. et al. Tumor-associated macrophage derived IL-6 enriches cancer stem cell population and promotes breast tumor progression via Stat-3 pathway. **Cancer Cell Int**. 2022 Mar 17;22(1):122.
- RAMÍREZ-MORENO, I.G.; ibarra-sánchez, a.; castillo-arellano, j.i. et al. Mast Cells Localize in Hypoxic Zones of Tumors and Secrete CCL-2 under Hypoxia through Activation of L-Type Calcium Channels. **J Immunol**. 2020 Feb 15;204(4):1056-1068.
- RASHID, Z.A.; bardaweel, s.k. Novel Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Inhibitors in Cancer Treatment. **Int. J. Mol. Sci**. 2023, 24, 12133.

- RAVINDRANATHAN, P.; lee, t.k.; yang, l. et al. Peptidomimetic targeting of critical androgen receptor-coregulator interactions in prostate cancer. **Nat Commun.** 2013;4:1923.
- RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA nº 37/2018 - Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- REYA, T.; clevers, h. Wnt signalling in stem cells and cancer. **Nature** 434, 843–850 (2005).
- RIBATTI, D.; crivellato, e. Mast cells, angiogenesis and cancer. **Adv Exp Med Biol.** 2011;716:270-88.
- RICCARDI, F.; dal bo, m.; macor, p. et al. A comprehensive overview on antibody-drug conjugates: from the conceptualization to cancer therapy. **Front. Pharmacol.** 2023;14:1274088.
- RINKENBAUGH, A.L.; baldwin, a.s. The NF- κ B Pathway and Cancer Stem Cells. **Cells.** 2016 Apr 6;5(2):16.
- RODRIGUEZ, M.J.; perrone, m.c.; riggio, m. et al. Targeting mTOR to overcome resistance to hormone and CDK4/6 inhibitors in ER-positive breast cancer models. **Sci Rep** 13, 2710 (2023).
- ROJAS, A.M.; fuentes, g.; rausell, a. et al. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. **J Cell Biol.** 2012;196:189–201.
- ROMASHKOVA, J.; makarov, s. NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. **Nature** 401, 86–90 (1999).
- ROMOND, E.H.; perez, e.a.; bryant, j. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 353, 1673–1684 (2005).
- ROSE-JOHN, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. **Int J Biol Sci.** 2012;8(9):1237-47.
- ROSKOSKI JR, R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. **Pharmacol Res.** 2012 Aug;66(2):105-43.
- ROY, R.; yang, j.; moses, m.a. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **J Clin Oncol.** 2009 Nov 1;27(31):5287-97.
- ROWLEY, M.; van ness, b. Activation of N-ras and K-ras induced by interleukin-6 in a myeloma cell line: implications for disease progression and therapeutic response. **Oncogene.** 2002 Dec 12;21(57):8769-75.
- RUGO, H.S.; finn, r.s.; diéras, v. et al. Palbociclib plus Letrozole as First-Line Therapy in Estrogen Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer with Extended Follow-Up. **Breast Cancer Res. Treat.** 2019, 174, 719–729.
- RYBINSKA, I.; mangano, n.; tagliabue, e. et al. Cancer-Associated Adipocytes in Breast Cancer: Causes and Consequences. **Int J Mol Sci.** 2021 Apr 6;22(7):3775.
- SAITOH, M.; endo, k.; furuya, s. et al. STAT3 integrates cooperative Ras and TGF- β signals

that induce Snail expression. **Oncogene** 35, 1049–1057 (2016).

SÁNCHEZ-TILLÓ, E.; liu, y.; de barrios, o. et al. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. **Cell Mol Life Sci.** 2012 Oct;69(20):3429-56.

SANKOFI, B.M.; valencia-rincón, e.; sekhri, m. et al. The impact of poor metabolic health on aggressive breast cancer: adipose tissue and tumor metabolism. **Front Endocrinol (Lausanne).** 2023 Sep 20;14:1217875.

SANSONE, P.; storci, g.; tavolar, s. et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. **J. Clin. Investig.** 2007, 117, 3988–4002.

SAXTON, R.A.; sabatini, d.m. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell.** 2017 Mar 9;168(6):960-976.

SCHAPER, F.; rose-john, s. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2015 Oct;26(5):475-87.

SCOTT, J. **Social Network Analysis: A Handbook**, 2nd ed., Sage, London, 2000.

SELMÍ, A.; de saint-jean, m.; jallas, a.c. et al. TWIST1 is a direct transcriptional target of MYCN and MYC in neuroblastoma. **Cancer Lett.** 2015 Feb 1;357(1):412-418.

SENGUPTA, S.; hein, l.e.; parent, c.a. The Recruitment of Neutrophils to the Tumor Microenvironment Is Regulated by Multiple Mediators. **Front Immunol.** 2021 Sep 10;12:734188.

SHAO, Z.; pang, d.; yang, h. et al. Efficacy, Safety, and Tolerability of Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel for Patients With Early or Locally Advanced ERBB2-Positive Breast Cancer in Asia: The PEONY Phase 3 Randomized Clinical Trial. **JAMA Oncol.** 2020 Mar 1;6(3)

SHARAF, B.; abu-fares, h.; tamimi, f. et al. Differences in Treatment Outcomes Between Patients with HER2-Low versus HER2-Zero, Hormone Receptor-Positive Advanced-Stage Breast Cancer Treated with Ribociclib. **Breast Cancer (Dove Med Press).** 2023 Jul 28;15:541-548.

SHOU, J.; massarwe, s.; osborneo, c. k. et al. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, 96(12), 926-935.

SIDDLE, K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. **J Mol Endocrinol.** 2011 Jun 17;47(1)

SIONOV, R.V.; fridlander, z.g.; granot, z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. **Cancer Microenviron.** 2015 Dec;8(3):125-58.

SLAMON, D.J.; leyland-jones, b.; shak, s. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **N. Engl. J. Med.** 344, 783-792 (2001).

- SLAMON, D.; Eiermann, W.; Robert, N. et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 2005 Sep 8;353(10):1659-72.
- SMITH, J.K.; Marshall, C.J. Regulation of MMP-9 by the ERK signaling pathway in human cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry** 2010, 111(3), 670-679.
- SMITH, B.N.; Bhowmick, N.A. Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. **J Clin Med.** 2016 Jan 27;5(2):17.
- SMITH, B.N.; Burton, L.J.; Henderson, V. et al. Snail promotes epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells in part via activation of nuclear ERK2. **PLoS One.** 2014 Aug 14;9(8)
- SOLINAS, G.; Becattini, B. The role of PI3K γ in metabolism and macrophage activation. **Oncotarget.** 2017 Oct 25;8(63):106145-106146.
- SON, D.; Na, Y.R.; Hwang, E.S. et al. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) induces anti-apoptotic effects on macrophages through Akt and Bad phosphorylation. **J Biol Chem.** 2014 Feb 28;289(9):6225-35.
- ŠOŠIĆ, D.; Richardson, J.A.; Yu, K. et al. Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. **Cell.** 2003 Jan 24;112(2):169-80.
- SPARANO, J.A.; Bernardo, P.; Stephenson, P. et al. Randomized Phase III Trial of Marimastat Versus Placebo in Patients With Metastatic Breast Cancer Who Have Responding or Stable Disease After First-Line Chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2196. **JCO** 2004, 22, 4683-4690.
- STEMMER, V.; De Craene, B.; Berx, G. et al. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin. **Oncogene.** 2008 Aug 28;27(37):5075-80.
- SUDIPA, R.; Dimple, C.; Cortez, V. et al. Significance of PELP1 in ER-Negative Breast Cancer Metastasis. **Mol Cancer Res** 2012 Jan;10(1):25–33.
- SUH, J.; Kim, D.H.; Lee, Y.H. et al. Fibroblast growth factor-2, derived from cancer-associated fibroblasts, stimulates growth and progression of human breast cancer cells via FGFR1 signaling. **Mol Carcinog.** 2020 Sep;59(9):1028-1040.
- SULLIVAN, N.J.; Sasser, A.K.; Axel, A.E. et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. **Oncogene.** 2009 Aug 20;28(33):2940-7.
- SUMMY, J.M.; Trevino, J.G.; Baker, C.H. et al. c-Src regulates constitutive and EGF-mediated VEGF expression in pancreatic tumor cells through activation of phosphatidylinositol-3 kinase and p38 MAPK. **Pancreas.** 2005 Oct;31(3):263-274.
- SUN, Q.; Zhao, X.; Li, R. et al. STAT3 regulates CD8⁺ T cell differentiation and functions in cancer and acute infection. **J Exp Med.** 2023 Apr 3;220(4)
- STROGATZ, S.H. Exploring complex networks. **Nature** 2001, 410, 268.

SWAIN, S.M.; baseLGA, j.; kim, s.b. et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 2015, 372, 724-734.

SWAIN, S.M.; shastry, m.; hamilton, e. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. **Nat Rev Drug Discov** 2023, 22, 101–126.

TAU, K.R.; hefferan, t.e.; waters, k.m. et al. Estrogen Regulation of a Transforming Growth Factor- β Inducible Early Gene That Inhibits Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Human Osteoblasts. **Endocrinology** 1998, 139(3), 1346–1353.

TAYLOR, B.S.; schultz, n.; hieronymus, h. et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. **Cancer Cell.** 2010 Jul 13;18(1):11-22.

THIERY, J.P.; acloque, h.; huang, r.y. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell.** 2009 Nov 25;139(5):871-90.

TOLANEY, S.M.; wardley, a.m.; zambelli, s. et al. Abemaciclib plus trastuzumab with or without fulvestrant versus trastuzumab plus standard-of-care chemotherapy in women with hormone receptor-positive, HER2-positive advanced breast cancer (monarcHER): a randomized, open-label, phase 2 trial. **Lancet Oncol.** 2020;21(6):763-775.

TOKUMARU, Y.; lan, l.; oshi, m. et al. Association of Th2 high tumors with aggressive features of breast cancer. **JCO** 2020, 38, e12584.

TRIULZI, T.; forte, l.; regondi, v. et al. HER2 signaling regulates the tumor immune microenvironment and trastuzumab efficacy. **Oncoimmunology.** 2018 Sep 21;8(1)

TRUICA, C.I.; byers, s.; gelmann, e.p. Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. **Cancer Res.** 2000 Sep 1;60(17):4709-13.

TU, M.; klein, l.; espinet, e. et al. TNF- α -producing macrophages determine subtype identity and prognosis via AP1 enhancer reprogramming in pancreatic cancer. **Nat Cancer** 2021, 2, 1185–1203.

TURNER, N.; grose, r. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nat Rev Cancer.** 2010 Feb;10(2):116-29.

TZAHAR, E.; waterman, h.; chen, x. et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. **Mol Cell Biol** 1996;16:5276-87.

TZAHAR, E.; guarino, b.c.; waterman, h. et al. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. **EMBO J** 1998;17:5948-63.

VADLAMUDI, R.K.; manavathi, b.; balasenthil, s. et al. Functional Implications of Altered Subcellular Localization of PELP1 in Breast Cancer Cells. **Cancer Res** 2005 Sep 1;65(17):7724–7732.

VAN DE GEER, P.; hunter, t.; lindberg, r.a. Receptor protein-kinases and their signal transduction pathways. **Annu Rev Cell Biol** 1994;10:251-337.

- VEGA, S.; morales, a.v.; ocaña, o.h. et al. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. **Genes & Development** 2004;18(10), 1131-1143.
- VERGADI, E.; ieronymaki, e.; lyroni, k. et al. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. **J Immunol** 2017 Feb 1;198(3):1006–1014.
- VERMEULEN, L.; todaro, m.; de sousa mello, f. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008 Sep 9;105(36):13427-32.
- WALSH, L.A.; damjanovski, s. IGF-1R signalling and the progression of breast cancer. **J. Clin. Invest.** 2021, 131(12), e139485.
- WANG, X.; cao, r.; he, s. et al. Transcriptional Activation of the Mesodermal Gene Nodal by the Embryonic Transcription Factor Oct4 in Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**. 2005 Jun;23(6):850-9.
- WANG, Z.; wang, x.; kim, s.k. et al. Interactions between macrophages and breast cancer cells in the premetastatic niche. **J Exp Med**. 2022 Jan 3;219(1)
- WANG, H.; yang, l.; zhu, y. et al. PTEN deficiency promotes breast cancer progression by enhancing nuclear EGFR signaling. **Mol Cancer Res**. 2020 Mar;18(3):453-463.
- WEI, Y.; xu, d.; wang, j. et al. Novel Mechanisms of TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. **J Clin Med**. 2022 Apr 6;11(8):2064.
- WHEATLEY, E.; carnicER, J.; chesterman, s.; riley, c.; perrin, s.; carnicER, m.j. Regulation of the NF- κ B pathway by the receptor-interacting protein RIP. **FEBS Lett**. 2004 Aug 9;568(1-3):104-8.
- WISNIEWSKA-KNYPL, J.; kulawik, j.; kasprzak, j.d. et al. Effects of Preoperative Trastuzumab on Tumor Microenvironment in HER2-Positive Breast Cancer. **Cancers (Basel)**. 2021 May;13(9):2331.
- XU, Y.; wang, r.; cai, z. et al. miR-155 suppresses the development of breast cancer by targeting HER2. **J. Clin. Invest.** 2014, 124(2), 597-610.
- YANG, M.; zhang, h.; lin, c.; yu, z. et al. Modulation of the Tumor Immune Microenvironment by Targeting HER2 in HER2-positive Breast Cancer. **Cancer Immunol Immunother** 2022, 71, 357-367.
- YANG, J.; qi, x.; he, y. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and HER2/neu in Breast Cancer: Therapeutic Implications. **Int J Mol Sci** 2020 May;21(10):3697.
- YANG, T.; chang, m.; li, h. et al. Targeting CXCL12/CXCR4 Axis in Cancer Therapy: A Review of Current Knowledge. **Cell** 2023, 12, 511.
- YAO, C.; li, q.; cui, y. et al. Targeting VEGF for Cancer Therapy: Current Applications and Future Directions. **Cancer Lett**. 2020 Aug 10;489:71-78.
- YAO, X.; jin, s.; zhang, l. et al. The role of cancer-associated fibroblasts in cancer progression

and metastasis. **Cancer Metastasis Rev.** 2021 Dec;40(4):751-764.

YOO, H.; Kim, d.; lee, c.s. et al. Modulation of the Tumor Immune Microenvironment by TGF- β in Breast Cancer. **Cancers (Basel).** 2020 May;12(5):1236.

YOUNG, C.M.; mattos, m.c.; prado, s.d. et al. The role of CXCR4 in breast cancer progression and metastasis. **Br J Cancer.** 2017 Mar 7;116(5):637-644.

ZENG, C.; Zhao, w.; zhang, y. et al. Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and its role in cancer metastasis. **Mol Med Rep.** 2016 Jul;14(1):1229-33.

ZHAI, Y.; |Liu, x.; zhou, s. et al. The role of macrophages in tumor immune microenvironment. **Cancer Biol Med.** 2020 Dec;17(4):893-909.

ZHAO, J.; Wang, z.; qiu, h. et al. Tumor-associated macrophages promote breast cancer metastasis through modulation of cancer cell migration and invasion. **Cancer Res.** 2022 Aug 1;82(15):2954-2965.

ZHAO, Y.; Yang, z.; liu, z. et al. Regulatory T cells and their role in cancer immunotherapy. **J Exp Clin Cancer Res.** 2021 Jun 14;40(1):209.