

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

VICTÓRIA MARIA TAVARES BETIOL

**ANÁLISE COMPUTACIONAL DA EXPRESSÃO DE CORRECEPTORES DE
SARS-CoV-2 EM CÉLULAS ESTROMAIS DO MICROAMBIENTE DO
MELANOMA MURINO B16F10**

Uberlândia-MG

2026

VICTÓRIA MARIA TAVARES BETIOL

**ANÁLISE COMPUTACIONAL DA EXPRESSÃO DE CORRECEPTORES DE
SARS-CoV-2 EM CÉLULAS ESTROMAIS DO MICROAMBIENTE DO
MELANOMA MURINO B16F10**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha
Júnior.

Uberlândia-MG

2026

VICTÓRIA MARIA TAVARES BETIOL

**ANÁLISE COMPUTACIONAL DA EXPRESSÃO DE CORRECEPTORES DE
SARS-CoV-2 EM CÉLULAS ESTROMAIS DO MICROAMBIENTE DO
MELANOMA MURINO B16F10**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Uberlândia, 2026

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Celene Maria de Oliveira Simões Alves – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro – FAMED /UFU

Dedico este trabalho aos meus pais com todo o
meu amor e gratidão. Obrigada por
acreditarem em mim e proporcionarem a
realização de um sonho. Essa conquista
também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wannie e Silvio, por serem os maiores apoiadores de todos os meus sonhos e minha maior fonte de amor, por me incentivarem a ir cada vez mais longe e jamais desistir quando tudo parece difícil. Sem vocês nada seria possível.

Aos meus amigos, por terem sido lar enquanto estive longe do meu e por terem criado memórias que carregarei comigo por toda a vida. Desejo muito sucesso a todos vocês e agradeço todos os dias por nossos caminhos terem se cruzado.

Ao meu companheiro, por todo amor, apoio e paciência durante essa etapa. Obrigada pela parceria, por me acolher nos momentos difíceis e por celebrar comigo cada pequena conquista ao longo do caminho. Que sorte a minha ter você.

À Universidade Federal de Uberlândia e a todos os docentes que contribuíram para a minha formação, por compartilharem de tanto conhecimento e principalmente, o amor pela ciência.

Ao Laboratório de Imunologia e ao meu orientador Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, por todo auxílio, incentivo e paciência durante a execução deste projeto.

“Carry on, oulast the ignorance
Movin’ on, survive the innocence
It won’t be long, won’t be long,
You know it’s gonna get better.”
(5 Seconds of Summer)

RESUMO

A pandemia de COVID-19, evidenciou a necessidade de compreender os mecanismos de entrada viral nas células hospedeiras, especialmente diante do impacto da infecção em pacientes oncológicos. Embora a entrada do vírus esteja associada principalmente à interação com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e serina-protease transmembranar 2 (TMPRSS2), estudos demonstram que correceptores celulares, moléculas que facilitam ou modulam a adesão, internalização e disseminação viral, também desempenham papéis relevantes nesse processo. No contexto do câncer, essas moléculas participam de processos como adesão celular, angiogênese, remodelação da matriz extracelular e progressão tumoral, especialmente no microambiente tumoral. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo analisar computacionalmente a expressão de receptores e correceptores do SARS-CoV-2 em células estromais do microambiente do melanoma murino B16F10, utilizando dados públicos de RNA-seq de célula única. Foram avaliados os genes *Eca2*, *Tmprss2*, *Itgb1*, *Itgb3*, *Dpp4*, *Axl*, *Hspa5*, *Bsg*, *Nrp1*, *Vim*, *Hspg2* e *Tlr4*, com normalização pelo gene *Actb*. Os dados foram obtidos da plataforma Murine Melanoma Atlas e analisados no software FIJI/ImageJ por meio de macros desenvolvidos para quantificar a intensidade relativa de expressão gênica em mapas de expressão, utilizando processamento de imagem com conversão para escala de cinza, aplicação de limiares de intensidade e quantificação da área marcada. Além da análise geral do microambiente tumoral, foi realizada uma análise segmentada, na qual fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e células endoteliais tumorais foram isolados e avaliados separadamente, permitindo comparar os perfis de expressão entre esses dois componentes estromais. Os resultados demonstraram baixa expressão de *Eca2* e *Tmprss2* no microambiente tumoral, enquanto os correceptores apresentaram distribuição heterogênea e dependente do tipo celular. Genes como *Hspa5*, *Bsg*, *Vim* e *Itgb1* exibiram expressão mais ampla, enquanto *Axl*, *Dpp4*, *Itgb3* e *Tlr4* apresentaram perfis mais restritos. Na análise segmentada, observou-se maior expressão de *Bsg*, *Vim*, *Hspa5*, *Itgb1* e *Axl* em CAFs, enquanto *Vim*, *Bsg*, *Itgb1*, *Hspa5* e *Nrp1* apresentaram maior expressão em células endoteliais tumorais. Adicionalmente, a análise comparativa da neuropilina-1 revelou elevado grau de conservação entre diferentes espécies. Assim, os achados indicam que os correceptores do SARS-CoV-2 apresentam perfis distintos de expressão no microambiente tumoral e estão associados a processos biológicos relacionados à ativação estromal, angiogênese, interação célula-matriz e progressão tumoral. A caracterização computacional dessas moléculas amplia a compreensão de sua distribuição no

microambiente do melanoma e fornece subsídios para futuras investigações experimentais sobre seu papel na biologia tumoral e seu potencial como alvos terapêuticos.

Palavras-chave: COVID-19; RNA-seq; FIJI/ImageJ.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic highlighted the need to better understand the mechanisms of viral entry into host cells, particularly given the impact of SARS-CoV-2 infection on cancer patients. Although viral entry is primarily associated with the interaction between angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2), studies have demonstrated that cellular coreceptors, molecules that facilitate or modulate viral adhesion, internalization, and dissemination, also play important roles in this process. In the context of cancer, these molecules are involved in biological processes such as cell adhesion, angiogenesis, extracellular matrix remodeling, and tumor progression, particularly within the tumor microenvironment. Therefore, the present study aimed to computationally analyze the expression of SARS-CoV-2 receptors and coreceptors in stromal cells of the murine B16F10 melanoma microenvironment using publicly available single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data. The genes *Eca2*, *Tmprss2*, *Itgb1*, *Itgb3*, *Dpp4*, *Axl*, *Hspa5*, *Bsg*, *Nrp1*, *Vim*, *Hspg2*, and *Tlr4* were evaluated and normalized to the *Actb* gene. Data were obtained from the Murine Melanoma Atlas platform and analyzed using FIJI/ImageJ software through custom-developed macros to quantify relative gene expression in expression maps by applying image processing techniques, including grayscale conversion, intensity thresholding, and quantification of the labeled area. In addition to the overall analysis of the tumor microenvironment, a segmented analysis was performed in which cancer-associated fibroblasts (CAFs) and tumor endothelial cells were isolated and analyzed separately, allowing comparison of expression profiles between these stromal cell populations. The results demonstrated low expression of *Eca2* and *Tmprss2* within the tumor microenvironment, whereas the coreceptors exhibited heterogeneous and cell type-dependent expression patterns. Genes such as *Hspa5*, *Bsg*, *Vim*, and *Itgb1* showed widespread expression, whereas *Axl*, *Dpp4*, *Itgb3*, and *Tlr4* displayed more restricted expression profiles. In the segmented analysis, *Bsg*, *Vim*, *Hspa5*, *Itgb1*, and *Axl* were more highly expressed in CAFs, whereas *Vim*, *Bsg*, *Itgb1*, *Hspa5*, and *Nrp1* were more highly expressed in tumor endothelial cells. Additionally, comparative analysis of neuropilin-1 revealed a high degree of conservation across different species. These findings indicate that SARS-CoV-2 coreceptors exhibit distinct expression patterns within the tumor microenvironment and are associated with biological processes related to stromal activation, angiogenesis, cell-matrix interactions, and tumor progression. The computational characterization of these molecules expands the understanding of their distribution within the

melanoma microenvironment and provides a foundation for future experimental investigations into their role in tumor biology and their potential as therapeutic targets.

Keywords: COVID-19; RNA-seq; FIJI/ImageJ.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Beta-actina
AXL	Receptor tirosina-quinase AXL
BSG	Basigina
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer
CD147	Cluster of differentiation 147
CD26	Cluster of differentiation 26
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
DPP4	Dipeptidil peptidase 4
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
EMBL-EBI	European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute
FIJI	Fiji Is Just ImageJ
HSPA5	Heat shock protein Family A (Hsp70) member 5
HSPG2	Heparan sulfate proteoglycan 2
ITGB1	Integrina beta 1
ITGB3	Integrina beta 3
MAIT	Mucosal-associated invariant T cells
MCT-1	Monocarboxylate transporter 1
MCT-4	<u>Monocarboxylate</u> transporter 4
MEC	Matriz extracelular
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRP1	Neuropilina-1
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
scRNA-seq	Sequenciamento de RNA de célula única
t-SNE	t-distributed stochastic neighbor embedding
TLR4	Toll-like receptor 4

TME	Microambiente tumoral
TMPRSS2	Transmembrane protease serine 2
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR2	Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
VIM	Vimentina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	METODOLOGIA.....	18
3.1	Pesquisa dos genes das moléculas de interesse.....	18
3.2	Captura de imagens e processamento das imagens	18
3.3	Segmentação celular e processamento de <i>clusters</i>	21
3.4	Utilização do gene ACTB para normalização e comparabilidade de dados	21
3.5	Análise estatística.....	22
3.6	Análise comparativa de sequencias de NRP-1 em diferentes espécies.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

No final de 2019, na China, foi descoberto um novo coronavírus denominado de SARS-CoV-2, que resultou em um surto de pneumonia viral. Por conta de sua alta transmissibilidade, esta nova doença, conhecida como COVID-19, foi caracterizada como uma pandemia (Hu *et al.*, 2021), resultando em 7,1 milhões de óbitos ao redor do mundo até dezembro de 2025 (Organização Mundial da Saúde, 2026). Com isso, tornou-se de extrema importância compreender os mecanismos de entrada do vírus na célula hospedeira.

A infecção pelo SARS-CoV-2 se dá principalmente pela interação da proteína Spike (S) do coronavírus, localizada na superfície viral, com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), considerada como o principal receptor celular. A subunidade S1 da proteína Spike tem como função o reconhecimento e ligação ao receptor, processo mediado principalmente pelo domínio de ligação ao receptor (RBD), enquanto a subunidade S2 faz parte do processo de fusão entre as membranas viral e celular. Para que essa função seja possível, a proteína Spike precisa ser ativada por proteases da célula hospedeira, como a serina-protease transmembranar TMPRSS2 (Hoffman *et al.*, 2020).

Entretanto, estudos demonstram que a entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira não depende exclusivamente da interação com ACE2 e TMPRSS2. Outras moléculas têm sido descritas como correceptores, proteínas de membrana que atuam juntamente com os receptores principais. Assim, podem contribuir para adesão, migração, proliferação, resposta inflamatória e sinalização intracelular. Entre estas moléculas destacam-se integrinas ($\beta 1$ e $\beta 3$), proteína regulada por glicose de 78 kDa (GRP78/HSPA5), dipeptidil peptidase 4 (DPP4/CD26), receptor tirosina-quinase AXL, neuropilina-1 (NRP1), vimentina (VIM), perlecano (HSPG2), basigina (CD147/BSG) e Receptor Toll-like 4 (TLR4) (Eslami *et al.*, 2022).

No contexto da infecção viral, estas moléculas podem facilitar a entrada do SARS-CoV-2, ampliar o tropismo viral e contribuir para a infecção de tecidos com baixa expressão de ACE2, o que evidencia a complexidade dos mecanismos de infecção (Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2020; Eslami *et al.*, 2022).

Em paralelo, a pandemia de COVID-19 afetou de forma significativa, pacientes oncológicos. Análises demonstram que pacientes com câncer podem estar mais suscetíveis a contrair COVID-19 e experienciar complicações severas, apresentando uma taxa de mortalidade duas vezes maior que a população geral (Jaiswal *et al.*, 2024). Este impacto na mortalidade é diretamente dependente do tipo e estágio do câncer, em que pacientes com cânceres hematológicos, de pulmão ou com tumores altamente metastáticos apresentam as

maiores taxas (Jaiswal *et al.*, 2024). Nesse sentido, torna-se pertinente avaliar como moléculas envolvidas na entrada do SARS-CoV-2 se conectam com processos biológicos relevantes para o microambiente tumoral, como angiogênese, metástase e resistência terapêutica.

Dentre diversos tipos de câncer, o melanoma maligno se destaca como um dos mais agressivos. Trata-se de uma neoplasia que se origina na transformação maligna de melanócitos, células produtoras de melanina. Além de seu alto potencial metastático, apresenta um perfil heterogêneo e resistente a tratamentos, devido a sua alta plasticidade fenotípica em relação a outros cânceres (Hossain *et al.*, 2023). Estudos oncológicos têm evidenciado que o microambiente tumoral (TME) tem um papel central em várias etapas da tumorigênese. O microambiente é caracterizado por condições ácidas e hipóxicas, além de ser composto por uma diversidade de tipos celulares, como células estromais, células imunes e componentes não celulares, como vasos sanguíneos e linfáticos e a matriz extracelular (MEC) (Sikorski *et al.*, 2025).

As células estromais, principalmente fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e células endoteliais tumorais (Endo Tumor), juntamente com a MEC, participam do desenvolvimento tumoral, metástase e resistência terapêutica. Assim, o direcionamento de terapias antitumorais para essas células vem sendo reconhecido, sobretudo após a identificação de pontos de controle imunológico como importantes moduladores da resposta imune tumoral (Zhao *et al.*, 2023).

Entre as moléculas de interesse do estudo, a basigina (CD147/BSG), uma glicoproteína transmembranar é fundamental para degradação e remodelação dos componentes da matriz extracelular. Possui funções fisiológicas importantes como proliferação celular, regeneração tecidual, apoptose, migração celular e adesão célula-célula (Asgari *et al.*, 2023). No melanoma, está associada à progressão e invasão tumoral por meio da indução das metaloproteinases da matriz pelos fibroblastos estromais (Kanekura, 2023).

As integrinas, são receptores transmembranares que atuam na interação entre as células e a matriz extracelular e normalmente atuam na adesão celular, migração, proliferação e sobrevivência (Pan *et al.*, 2017). No melanoma, alterações no perfil de expressão das integrinas podem estar relacionadas aos processos de invasão, metástase e angiogênese tumoral. A integrina $\beta 1$ é capaz de promover adesões entre as células cancerígenas e a matriz extracelular. Essa adesão serve como base para a sobrevivência das células cancerígenas e também influencia suas capacidades migratórias e metastáticas. Já a integrina $\beta 3$, é discutida pelo seu papel na angiogênese e progressão tumoral (Arias-mejias *et al.*, 2020).

O AXL, membro da família TAM de receptores de tirosina quinase, atua de forma crítica na proliferação, pluripotência, migração, invasão, angiogênese, resistência terapêutica e

prognóstico desfavorável no câncer, compondo uma via de sinalização associada a estados mais agressivos. (Yadav *et al.*, 2025).

Ademais, a chaperona GRP78/HSPA5, participa ativamente na resposta ao estresse do retículo endoplasmático. Mostra-se aumentada em múltiplos cânceres e está relacionada à adaptação tumoral ao estresse e sobrevivência, além da resistência a terapias (Li *et al.*, 2023).

Já a dipeptidil peptidase (DPP4/CD26), uma glicoproteína de membrana, atua principalmente como inativador fisiológico dos hormônios incretinas, como GLP-1 e do GIP. De maneira interessante, estudos sugerem que a CD26 pode apresentar um papel antioncogênico no melanoma (Enz *et al.*, 2019).

A vimentina, expressa em cânceres metastáticos, é reconhecida como um marcador de células mesenquimais e desempenha um papel na progressão tumoral, principalmente no contexto da transição epitélio-mesenquimal (Berr *et al.*, 2023).

Além disso, o perlecano (HSPG2), um componente da membrana basal, contribui para a arquitetura e sinalização por fatores heparina-ligantes na MEC. A superexpressão de HSPG2 pode estar relacionada com a invasividade das células de melanoma (Jiang *et al.*, 2003; Vigo-Díaz *et al.*, 2025).

O TLR4, se relaciona com o melanoma de maneira indireta, através da sua capacidade de ativação e fosforização da transcriptase 3 (STAT3), um fator importante para a progressão do melanoma (Fu *et al.*, 2020).

Por fim, a neuropilina-1, uma glicoproteína transmembranar, atua como correceptor de sinais angiogênicos, principalmente por potencializar a sinalização de VEGF nas células endoteliais. Esta sinalização contribui para a angiogênese e remodelação vascular no contexto do microambiente tumoral (Shalabi *et al.*, 2024).

Como estas moléculas estão intrinsicamente relacionadas a processos mediados por CAFs, endotélio tumoral e MEC, como adesão, angiogênese e inflamação, torna-se de extrema importância analisar suas distribuições dentro do microambiente tumoral e avaliar quais populações celulares concentram essa expressão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar computacionalmente a expressão de correceptores de SARS-CoV-2 em células estromais do microambiente do melanoma murino B16F10, utilizando um banco público de dados de mRNA de célula única, com a finalidade de compreender seu perfil de expressão no microambiente tumoral.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de transcritos de mRNA do receptor *Eca2* de SARS-CoV-2 e da enzima *Tmprss2* em células estromais do microambiente do melanoma murino B16F10;
- Investigar a expressão de transcritos de mRNA de correceptores de SARS-CoV-2 em células estromais do microambiente do melanoma murino B16F10;
- Comparar a expressão relativa dos transcritos de mRNA dos correceptores de SARS-CoV-2 com os transcritos de mRNA de beta-actina (*Actb*) em células estromais do microambiente do melanoma murino B16F10;
- Analisar comparativamente as sequências proteicas de neuropilina-1 (*Nrp1*), correceptor de SARS-CoV-2, entre diferentes espécies;

3 METODOLOGIA

3.1 Pesquisa dos genes das moléculas de interesse

Os genes dos receptores e correceptores de SARS-CoV-2 abordados neste estudo, foram: *Eca2* (Enzima Conversora de Angiotensina 2), *Tmprss2* (Serina Protease Transmembranar 2), *Itgb1* (Integrina β 1), *Itgb3* (Integrina β 3), *Dpp4/Cd26* (Dipeptidil Peptidase 4), *Axl* (Receptor tirosina quinase AXL), *Grp78/Hspa5* (proteína regulada por glicose de 78 kDa), *Bsg/Cd147* (Basigina), *Nrp1* (Neuropilina-1), *Vim* (Vimentina), *Hspg2* (Perlecano) e *Tlr4* (Receptor Toll-like 4), selecionados conforme a lista descrita anteriormente por Eslami e colaboradores (Eslami et al., 2022). O gene *Actb* (beta-actina) foi utilizado para a normalização dos dados.

A coleta de dados referente à expressão de correceptores de SARS-CoV-2 em melanoma murino foi realizada por meio de dados públicos baseados em análises de RNA-seq de Célula Única (scRNA-seq) da linhagem B16F10, conforme descrito por Davidson e colaboradores (Davidson et al., 2020). Este é um formato pesquisável disponível online em Atlas de Melanoma Murino B16F10, desenvolvido pelo Laboratório Teichmann (<https://www.teichlab.org/>). Esta plataforma é organizada de forma com que seja possível visualizar a expressão gênica de diversas moléculas em diferentes fases do tumor e em uma variedade de tipos celulares diferentes, como células imunes e células do estroma em formato de mapas, a partir de dados processados por meio da técnica de t-SNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding).

Entre essas células encontram-se as células B, fibroblastos associados ao câncer (CAF1, CAF2 e CAF3), células dendríticas convencionais (cDC1 e cDC2), células endoteliais do linfonodo (Endo LN), células endoteliais linfáticas (Endo Lymphatic), fibroblastos do linfonodo (Fibroblasts LN), Linfócitos T do linfonodo (LN T cells), macrófagos e monócitos (Macrophage/Monocyte), células T invariantes associadas à mucosa (MAIT), células dendríticas migratórias (migDC), células *natural-killer* (NK), células dendríticas plasmocitoides (pDC), linfócitos T associados ao tumor (Tumor T cells) e células estromais.

3.2 Captura de imagens e processamento

Os genes de interesse foram pesquisados na plataforma, e a partir dos mapas gerados foram feitas capturas de tela da imagem total das análises de *single-cell* (Davidson et al., 2020). A fim de estabelecer um padrão no tamanho das imagens para garantir a comparabilidade entre elas, foi utilizado o aplicativo ShareX (<https://getsharex.com>) que permite que várias capturas

de tela sejam feitas utilizando a mesma região pré-estabelecida. As imagens foram mantidas nas dimensões de 769 x 810 pixels e para cada gene estudado foram feitas oito capturas de tela, totalizando 104 imagens.

O processamento e análise das imagens foram realizados no software FIJI ImageJ (Schneider; Rasband; Eliceri, 2012). Com o intuito de automatizar o processo, foram desenvolvidos dois *macros*, garantindo a reprodutibilidade de cada etapa, descritos anteriormente por Santos (Santos, 2025). Os *macros* consistem em códigos desenvolvidos na linguagem de programação do software e são utilizados para automatizar sequências de processamento e análise de imagens. Isso permite a execução padronizada de múltiplas etapas, aumentando a reprodutibilidade das análises.

O primeiro *macro* utilizado, após aplicado, abriu uma janela para que as imagens originais a serem processadas fossem selecionadas da pasta desejada. Depois, criou uma pasta (*Processed*) dentro da pasta original, onde as imagens processadas foram armazenadas e criou-se uma lista com todos os arquivos presentes na pasta de entrada. Estes arquivos foram analisados um a um e na próxima etapa, o macro ignorou qualquer outro tipo de arquivo e garantiu que apenas arquivos de imagem fossem processados.

Figura 1 – *Macro* utilizado para o processamento das imagens.

```
inputDir = getDirectory("Choose the input folder");
outputDir = inputDir + "Processed/";
File.makeDirectory(outputDir);

list = getFileList(inputDir);

for (i = 0; i < list.length; i++) {
    if (endsWith(list[i], ".tif") || endsWith(list[i], ".jpg") || endsWith(list[i], ".png") || endsWith(list[i], ".bmp")) {
        open(inputDir + list[i]);
        run("8-bit");
        run("Invert");
        saveAs("Tiff", outputDir + list[i]);
        close();
    }
}
```

Fonte: Adaptado de Santos (2025).

As imagens, originalmente no formato RGB coloridas, foram submetidas a conversão para a escala de cinza 8 bits e, assim, padronizou-se a profundidade dos dados em 256 níveis de intensidade, assegurando que cada pixel fosse representado por um valor de 0-255. As imagens que originalmente apresentavam as partículas em tons de vermelho, agora ficaram em tons de cinza. Esta etapa do procedimento teve como finalidade permitir a aplicação de limiares

de intensidade (*thresholding*) e facilitar a binarização das imagens para a análise de partículas (*dots*) subsequente.

Por conseguinte, as figuras passaram por uma inversão de cores, de modo a evidenciar as regiões de interesse. A inversão é fundamental para a medição da área positiva das imagens, uma vez que o software interpreta pixels pretos como fundo (valor 0) e pixels claros como objeto.

Para a determinação dos valores dos limiares de intensidade (*threshold*), de maneira a isolar as regiões necessárias, foram examinadas as imagens de t-SNE correspondentes ao gene β -actina.

Para a aplicação dos diferentes *thresholds* e para quantificar a porcentagem da área das partículas em relação a área total das figuras, foi utilizado um segundo *macro*. Os valores mínimos de limiares definidos foram: 55, 60, 65 e 70 e o valor máximo foi mantido em 230 em todas as análises. A utilização de múltiplos limiares teve como objetivo minimizar as variações de intensidade entre as imagens, além de contribuir para a exclusão de marcações inespecíficas.

Figura 2 – *Macro* utilizado para a aplicação de diferentes *thresholds*.

```
thresholdsMin = newArray(55, 60, 65, 70);
thresholdMax = 230;

numImages = nImages();

run("Clear Results");

for (i = 0; i < numImages; i++) {
    selectImage(i + 1);

    thresholdIndex = floor(i / 2);
    thrMin = thresholdsMin[thresholdIndex];

    setThreshold(thrMin, thresholdMax);
    run("Convert to Mask");
    run("Select All");
    run("Measure");

    run("Undo");
}
```

Fonte: Adaptado de Santos (2025).

Desta forma, oito imagens de cada molécula foram abertas no software e o macro aplicado. As medidas foram feitas em duplicada para cada valor mínimo de limiar, na intenção de garantir a reprodutibilidade do procedimento.

Depois, o *macro* contou a quantidade de imagens e processou uma por vez, apagou medições anteriores na tabela de resultados e iniciou um loop de processamento. Em seguida, definiu os *thresholds* mínimos e os aplicou. Os pixels entre o limiar mínimo e máximo foram classificados como região de interesse e os que estão fora, classificados como fundo.

Após essa etapa, aconteceu a conversão para máscara binária. Os pixels dentro do intervalo de *threshold* foram representados pela cor branca, o que configura as áreas de interesse, e os que não, por preto.

Por fim, mediu os parâmetros pré-definidos em Analyze → Set measurements. Para este estudo, foram selecionados: área, desvio padrão, valor máximo e mínimo de cinza, valor médio de cinza, moda dos valores de cinza e a %área. A %área representa a proporção de pixels brancos em relação à área total da imagem. Os dados obtidos foram dispostos em tabelas utilizando o Microsoft Excel, onde foram calculadas as médias dos valores medidos das oito imagens por molécula.

3.3 Segmentação celular e processamento de *clusters*

Com o intuito de direcionar o estudo, foi realizado uma segmentação das imagens, de forma com que a análise se limitasse apenas a populações celulares específicas. Desta forma, foram realizadas capturas de tela de áreas pontuais nos mapas de expressão gênica relativa, utilizando os mesmos genes mencionados anteriormente. As populações celulares selecionadas neste processo de segmentação foram os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e as células tumorais endoteliais (Endo Tumor). As imagens referentes aos CAFs foram padronizadas no tamanho de 197 x 191 pixels e as referentes ao Endo tumor, em 145 x 185 pixels.

Após o processo de segmentação, as figuras resultantes foram processadas de acordo com o mesmo protocolo previamente definido (item 3.2), utilizando os mesmos dois macros citados.

3.4 Utilização do gene ACTB para normalização e comparabilidade de dados

Para que houvesse a comparação e a normalização dos dados obtidos, o gene da β -actina (*Actb*), foi utilizado. A seleção deste gene específico como controle foi baseada em seu perfil de expressão constitutivo e estável, uma vez que a beta actina está expressa de forma abrangente na maior parte das populações celulares. Assim, as médias das oito medições da %área de cada gene, foram divididas pela média dos oito valores da %área de β -actina.

3.5 Análise estatística

Com o intuito de verificar diferenças significativas entre os valores de expressão relativa entre o controle (β -actina) e os outros genes, os dados foram analisados estatisticamente no *software* GraphPad Prism v.10 (GraphPad Software, CA, EUA). Primeiro, foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados considerados como paramétricos foram analisados por meio do teste t ou ANOVA. Já os não paramétricos, pelo teste de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis ou pós teste de Dunn quando apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.6 Análise comparativa de sequencias de NRP-1 em diferentes espécies

As sequências proteicas de Neuropilina-1, correceptor de SARS-CoV-2, foram obtidas a partir do banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências das espécies selecionadas se referem a *Homo sapiens* (AAP80144.1), *Mus musculus* (AAH60129.1) e *Rattus norvergicus* (EDL96784.1). O alinhamento múltiplo das sequências de proteínas foi executado na plataforma *Clustal Omega* (versão 1.2.4), disponível online pela *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) (<https://www.ebi.ac.uk/>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

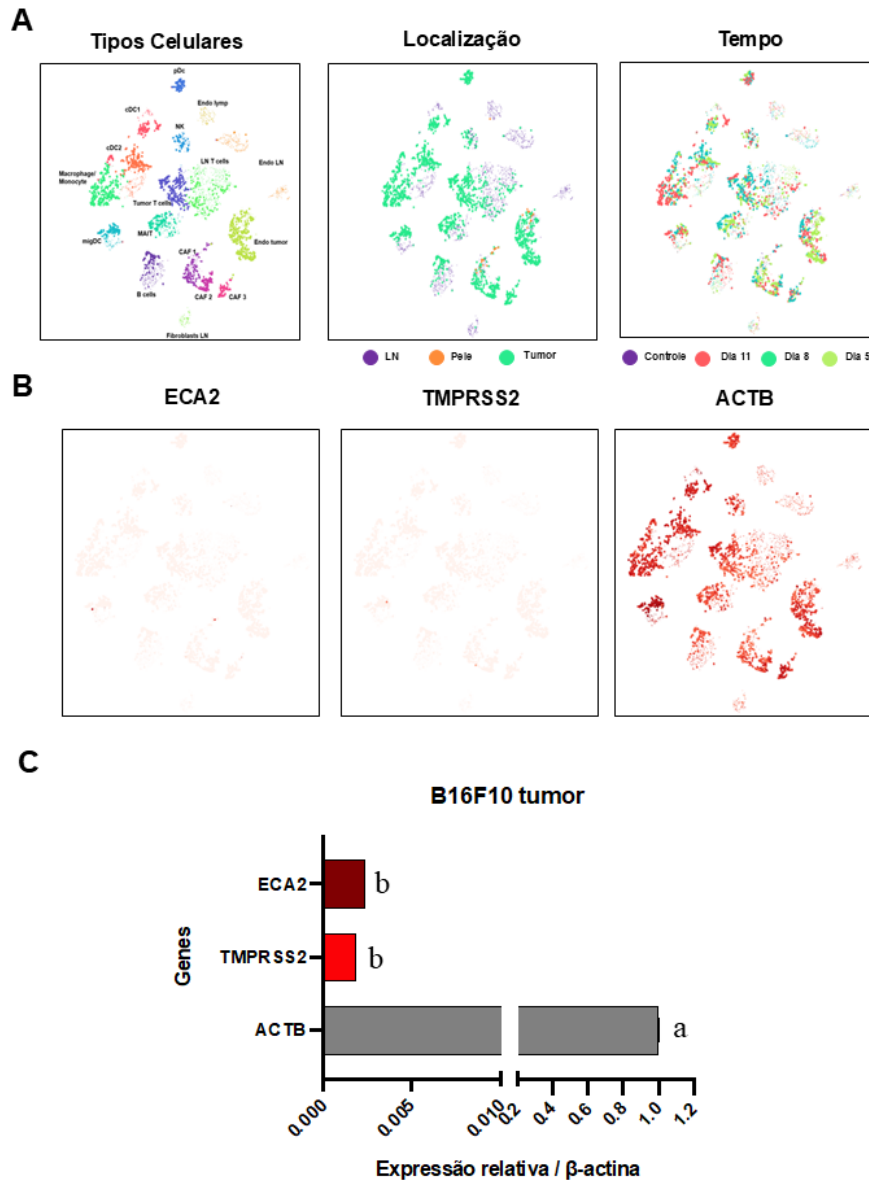
A análise dos resultados obtidos, a partir de dados públicos de RNA-seq de célula única, possibilitou demonstrar o perfil de expressão de receptores e correceptores de SARS-CoV-2 no microambiente de melanoma murino B16F10.

A figura 3A, evidencia a heterogeneidade celular presente no microambiente tumoral. Os diferentes agrupamentos correspondem aos diversos tipos celulares, localizações teciduais e tempos experimentais analisados. Essa segregação sugere que a localização e o estágio de desenvolvimento do tumor podem influenciar na composição celular observada.

A análise da expressão relativa dos genes *Eca2* e *Tmprss2* (figura 3B), demonstraram que estes genes são fracamente expressos entre os *clusters* celulares estromais do microambiente de melanoma. Essa baixa expressão pode estar relacionada à especificidade celular desses genes, descritos principalmente em subpopulações celulares específicas, como as células epiteliais respiratórias nas vias aéreas, alvéolos e fossas nasais (Muss *et al.*, 2021). Em contrapartida, o gene *Actb* é expresso de maneira constitutiva e elevada.

A quantificação da expressão relativa reforça esses achados (figura 3C). Os níveis de *Eca2* e *Tmprss2*, em comparação a *Actb*, são significativamente reduzidos. Considerando a expressão relativa de β -actina como valor de referência igual a 1, as médias de expressão de ECA2 e TMPRRS2 corresponderam a 0,0024 e 0,0019 respectivamente.

Figura 3 – Visualização das populações estromais e análise da expressão de *Eca2*, *Tmprss2* e *Actb* no microambiente tumoral do melanoma murino B16F10.



Fonte: (A e B) adaptado de Davidson *et al.* (2020); (C) própria.

(A) visualização em t-SNE das células estromais do microambiente tumoral, coloridas de acordo com os tipos celulares, a localização e tempo de desenvolvimento tumoral. (B) Mapas de expressão relativa dos genes *Eca2*, *Tmprss2* e *Actb* nas diferentes populações celulares. (C) Quantificação da expressão relativa de *Eca2* e *Tmprss2* no tumor B16F10, normalizada pela β -actina (*Actb*). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, demonstrando distribuição não normal entre os grupos. As comparações estatísticas foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Os resultados evidenciaram que os níveis de expressão relativa de *Eca2* e *Tmprss2* diferem significativamente em relação ao

gene controle *Actb*. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as moléculas analisadas.

Na figura 4(A), é possível identificar os perfis de expressão dos genes *Hspa5*, *Bsg*, *Vim*, *Itgb1*, *Itgb3*, *Dpp4/Cd26*, *Axl*, *Hspg2*, *Tlr4* e *Nrp1*, além do gene constitutivo *Actb*.

Os genes *Hspa5*, *Bsg*, *Vim* e *Itgb1*, apresentam uma distribuição ampla e intensa entre os variados tipos celulares. Esse achado é coerente com a literatura, uma vez que esses genes codificam proteínas que estão envolvidas em processos celulares fundamentais.

Entre esses genes, *Hspa5* atua em diferentes tipos de câncer como fator associado à sobrevivência celular no microambiente tumoral, uma vez que contribui para a manutenção da homeostase e para prevenir a apoptose em resposta a condições de estresses, como a hipóxia, característica proeminente desse ambiente (Yun *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2023). Assim, sua ampla distribuição sugere a necessidade compartilhada das células estromais de se adaptarem ao estresse constantemente causado por esse ambiente hostil.

Além disso, estudos demonstram que a *Bsg* (CD147), no contexto do melanoma maligno, atua na regulação metabólica tumoral por meio da modulação do metabolismo glicolítico, devido a sua interação com os transportadores de monocarboxilato MCT-1 e MCT-4, que são responsáveis pelo efluxo de lactato, decorrente da alta taxa glicolítica das células do microambiente tumoral. Nesse contexto, a *Bsg* atua facilitando a translocação desses transportadores para a membrana plasmática (Kanekura, 2023; Muramatsu, 2015). Dessa forma, a expressão aumentada de *Bsg* observada neste estudo, reforça sua possível participação não apenas na remodelação da matriz extracelular, mas também no favorecimento do fluxo glicolítico e na acidificação do microambiente tumoral.

No caso da vimentina, seu papel no câncer tem sido associado principalmente à transição epitélio-mesenquimal, processo biológico no qual as células epiteliais assumem características mesenquimais, incluindo maior capacidade migratória e invasiva. Estudos demonstram uma associação positiva entre a superexpressão de vimentina e o fenótipo invasivo (Satelli *et al.*, 2011). No microambiente tumoral, sua expressão aumentada pode refletir a contribuição ativa do estroma para a progressão e metástase do melanoma.

A *Itgb1*, por sua vez, atua como receptores transmembranares de adesão celular, conectando a matriz extracelular (MEC) e o citoesqueleto, transmite sinais bioquímicos e mecânicos entre as células e seu ambiente. No contexto tumoral, a ativação da ITGB1 tem sido associada à sinalização por FAK e a vias downstream como PI3K/AKT, favorecendo a motilidade, invasão e disseminação tumoral. Além disso, promovem a remodelação e a

deposição estromal, aumentando a rigidez do tecido tumoral. (Su *et al.*, 2024). Os resultados sugerem que sua expressão abundante pode indicar a intensificação da adesão célula-matriz, a ativação de mecanismos que favorecem o tumor e um microambiente mais propício para a progressão tumoral.

Em contraste com o grupo anterior, os genes *Itgb3*, *Dpp4*, *Axl* e *Tlr4*, apresentaram expressão mais restrita a populações celulares específicas, sugerindo papéis mais especializados dentro do microambiente tumoral.

A *Itgb3*, atua como um integrador de adesão célula-matriz e mecanotransdução através de vias de sinalização que sustentam a migração e invasão, plasticidade fenotípica, angiogênese e adaptação a estresses (Zhu *et al.*, 2019). Esse conjunto de funções, auxiliam a explicar o perfil de expressão mais localizado em populações estromais e vasculares, como CAFs e células endoteliais tumorais. No endotélio, sua expressão pode estar relacionada a processos que favorecem a angiogênese e a migração endotelial, enquanto em CAFs, está associada à reorganização de componentes da matriz, como a fibronectina (Zhu *et al.*, 2019).

Já a expressão da enzima *Cd26/Dpp4*, apresenta variações conforme o contexto tumoral. Em alguns tipos de câncer, essa molécula é superexpressa e representa um pior prognóstico. Entretanto, estudos demonstram que o *Cd26* é altamente expresso em melanócitos normais, mas sofre regulação negativa durante a transformação maligna. Além disso, a reintrodução de *Dpp4* foi associada a uma redução acentuada da invasão tumoral (Enz *et al.*, 2019), o que pode justificar sua baixa expressão observada neste estudo.

Nota-se que a expressão de *Axl* se concentra, em grande parte, nos fibroblastos associados ao câncer, sugerindo uma possível participação dessa população celular na ativação do eixo GAS6/AXL no microambiente tumoral. Esse perfil é biologicamente plausível, uma vez que os CAFs participam ativamente da comunicação parácrina com células tumorais e imunes, podendo contribuir para a manutenção de sinais associados à progressão tumoral. Nesse contexto, GAS6, um dos principais ligantes dos receptores da família TAM, é capaz de ativar AXL e desencadear vias intracelulares relacionadas à sobrevivência, proliferação, migração, invasão e transição epitélio-mesenquimal, além de favorecer mecanismos de modulação imune no microambiente tumoral (Zhai *et al.*, 2023). Assim, a maior expressão de *Axl* em CAFs pode indicar que essa população estromal contribui para a sustentação de um ambiente tumoral mais permissivo à progressão e à evasão imune.

A expressão de *Tlr4* concentrada em maior parte em macrófagos, revela os TLRs como fundamentais na iniciação e coordenação de respostas inflamatórias na pele. Estudos também demonstram que o *Tlr4* está associado à progressão e à metástase do melanoma induzidas por

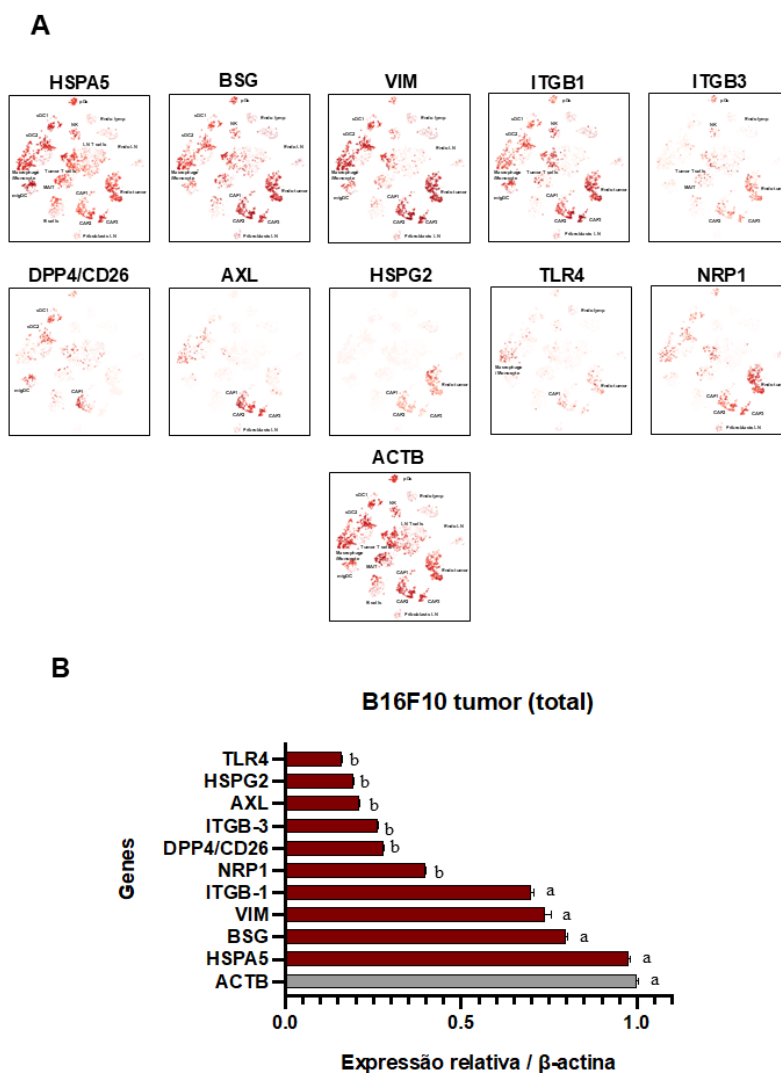
radiação UV solar, por promover um ambiente inflamatório favorável ao angiotropismo e à invasão perivascular (Dickinson; Wondrak, 2019).

Nesse contexto, a *Nrp1* apresenta um perfil de expressão mais localizado em compartimentos associados ao estroma tumoral e ao endotélio. Esse achado é coerente com o papel descrito para a neuropilina-1 na angiogênese, uma vez que essa molécula modula esse processo por meio da ligação ao VEGF e ao seu receptor VEGFR2 (Koch *et al.*, 2014). Além disso, estudos indicam que a *Nrp1* também participa da vascularização e do crescimento tumoral, sugerindo sua relevância em processos associados à progressão do câncer (Pan *et al.*, 2007). Dessa forma, a expressão de *Nrp1* observada principalmente em CAFs e células endoteliais tumorais pode indicar sua participação em processos relacionados à angiogênese, comunicação estroma-endotélio e remodelação vascular no melanoma B16F10.

Já a *Hspg2*, apresenta relevância por sua associação com a matriz extracelular e com a membrana basal. O perlecano é capaz de se ligar a moléculas da matriz extracelular, citocinas e fatores de crescimento (Jiang; Couchman, 2003). Essa capacidade de interação permite que essa molécula atue como modulador de fatores envolvidos na proliferação celular e na angiogênese tumoral (Jiang; Couchman, 2003). A redução da expressão de *HSPG2* foi associada à diminuição do crescimento tumoral e da angiogênese em modelos tumorais, reforçando sua participação em processos pró-tumorais (Kalscheuer *et al.*, 2019). Assim, a expressão de *Hspg2* observada em populações estromais e vasculares pode estar relacionada à organização da matriz extracelular, à disponibilidade de fatores de crescimento e à sustentação de um microambiente favorável a progressão tumoral.

O gráfico (figura 4B), que demonstra quantificação da expressão relativa normalizada pela β -actina, reforça os achados visualizados nas figuras. Os genes mais expressos de maneira geral foram *Hspa5*, *Bsg*, *Vim* e *Itgb1*, com suas médias de 0,977, 0,798, 0,737 e 0,697 respectivamente. Já os menos expressos, *Nrp1*, *Dpp4*, *Itgb3*, *Axl*, *Hspg2* e *Tlr4* apresentam valores de 0,399, 0,279, 0,263, 0,209, 0,193 e 0,160. Os genes *Hspa5*, *Bsg*, *Vim* e *Itgb1* não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao controle *Actb*.

Figura 4 – Perfil de expressão dos genes *Hspa5*, *Bsg*, *Vim*, *Itgb1*, *Itgb3*, *Dpp4/Cd26*, *AXL*, *HSPG2*, *TLR4*, *NRP1* e *ACTB* no microambiente tumoral do melanoma murino B16F10 obtidos a partir de dados de RNA-seq de célula única (scRNA-seq).



Fonte: (A) Adaptado de Davidson et al. (2020); (B) própria.

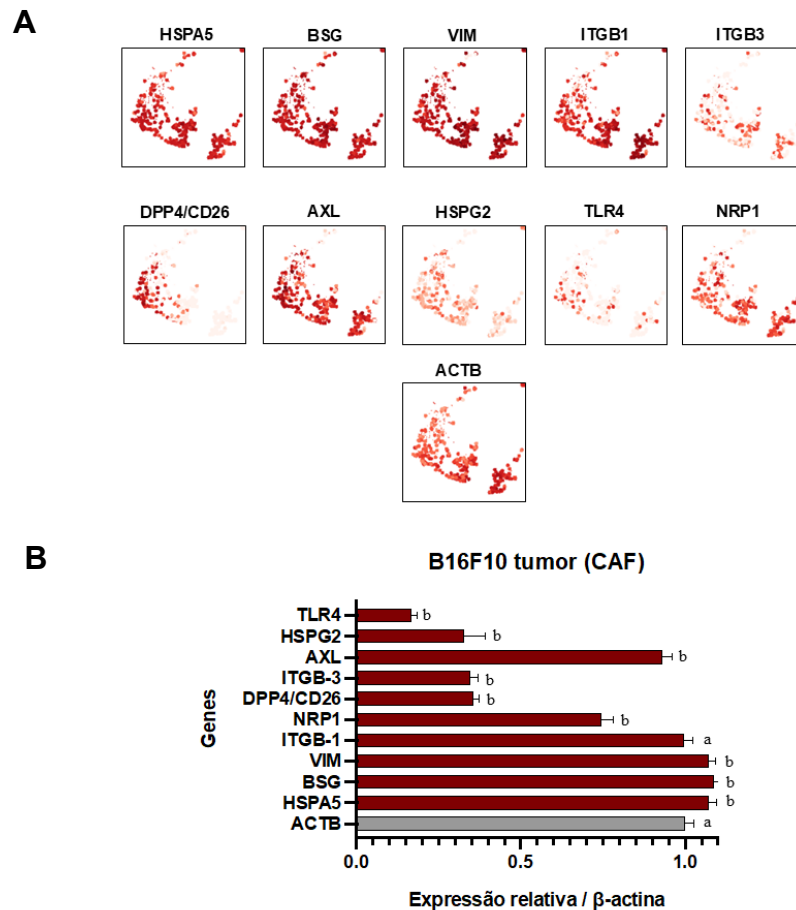
(A) visualização de t-SNE referente à expressão relativa dos genes avaliados nas diferentes populações celulares. (B) Quantificação da expressão relativa dos genes no tumor B16F10, normalizada pela β -actina (*Actb*). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, demonstrando distribuição não normal entre os grupos. As comparações estatísticas foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as moléculas analisadas. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

Por conta da importância dos fibroblastos associados ao câncer e das células endoteliais tumorais para o microambiente tumoral, o presente estudo realizou uma análise segmentada da expressão dos correceptores nesses grupos celulares de forma isolada no modelo murino.

Segundo Zhao *et al.* (2023), os CAFs contribuem para processos fundamentais como a metástase, invasão, tumorigênese e resistência terapêutica por meio da proliferação de células tumorais, produção de MEC e secreção de citocinas e fatores de crescimento como SDF-1, VEGF e HGF. Já de acordo com Leone *et al.* (2024) as células endoteliais tumorais apresentam fenótipos anormais, como uma estrutura irregular, frágil e uma rede endotelial desorganizada. Essas características favorecem o crescimento tumoral e a metástase. Além disso, essas células podem adquirir características mesenquimais por meio da transição endotelial-mesenquimal.

Após a aplicação do protocolo anteriormente descrito, concluiu-se que os genes que apresentaram maiores níveis de expressão em CAFs foram *Bsg*, *Vim*, *Hspa5*, *Itgb1* e *Axl*, com valores de 1,089, 1,072, 1,071, 0,996 e 0,932 respectivamente. Enquanto os menos expressos foram *Nrp1*, *Hspg2*, *Dpp4*, *Itgb3* e *Tlr4*, com valores de 0,747, 0,327, 0,355, 0,345 e 0,167 respectivamente (figuras 5A e 5B). Apenas o gene *Itgb1* não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle *Actb*.

Figura 5 – Perfil de expressão dos genes *Hspa5*, *Bsg*, *Vim*, *Itgb1*, *Itgb3*, *Dpp4/Cd26*, *AXL*, *HSPG2*, *TLR4*, *NRP1* e *ACTB* no compartimento de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) no melanoma murino B16F10 obtidos a partir de dados de RNA-seq de célula única (scRNA-seq).



Fonte: (A) Adaptado de Davidson et al. (2020); (B) própria.

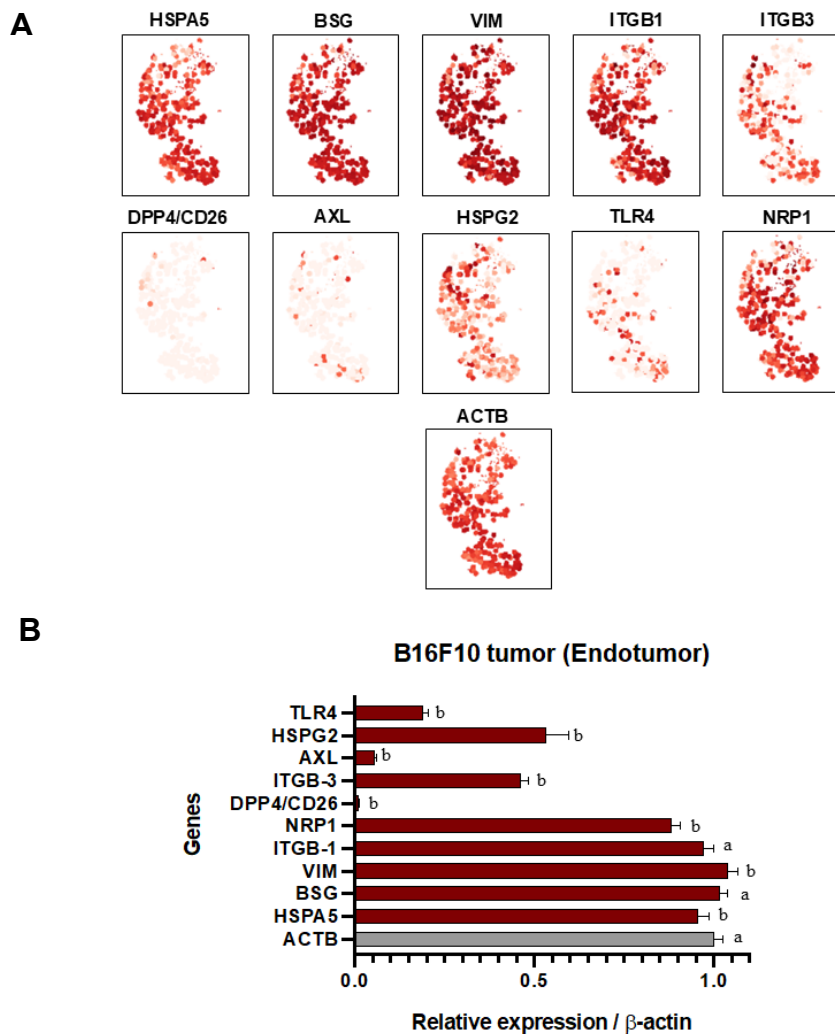
(A) visualização de t-SNE referente à expressão relativa dos genes avaliados no compartimento de fibroblastos associados ao câncer (CAFs). (B) Quantificação da expressão relativa dos genes em CAFs, normalizada pela β -actina (*Actb*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as moléculas analisadas.

A expressão elevada de *Bsg* pode estar relacionada ao papel dessa molécula na remodelação do estroma tumoral, especialmente por sua capacidade de induzir os fibroblastos a secretarem metaloproteinases da matriz, o que contribui para a degradação da matriz extracelular e facilita a invasão e metástase (Colella *et al.*, 2025). Além disso, a expressão de vimentina reforça seu perfil pró-tumoral por meio da sua participação na transição epitélio-mesenquimal e proliferação e migração de fibroblastos, modulando a dinâmica do citoesqueleto e aumentando o potencial migratório das células tumorais. (Parvanian *et al.*, 2025). De maneira

complementar, a *Hspa5*, também amplamente expressa, pode refletir a capacidade de adaptação dos fibroblastos associados ao câncer às condições de estresse do microambiente tumoral (Wang *et al.*, 2024). A expressão de *Itgb1*, também é plausível neste compartimento, considerando sua participação nas interações célula-matriz e em vias de sinalização importantes para adesão, sobrevivência e reorganização da matriz extracelular (Mo *et al.*, 2025). Por fim, a expressão de *Axl* pode estar relacionada a ativação do eixo GAS6/AXL, associado à comunicação parácrina e à progressão tumoral (Zhai *et al.*, 2023).

No compartimento das células endoteliais tumorais, os genes mais expressos foram *Vim*, *Bsg*, *Itgb1*, *Hspa5* e *Nrpl*, com valores de 1,046, 1,020, 0,975, 0,957 e 0,883 respectivamente. Em contraste, os menos expressos foram *Hspg2*, *Itgb3*, *Tlr4*, *Axl* e *Dpp4* com valores de 0,523, 0,459, 0,190, 0,056 e 0,010, respectivamente (figuras 6A e 6B). Os genes *Bsg* e *Itgb1* não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados com o controle *Actb*.

Figura 6 – Perfil de expressão dos genes *Hspa5*, *Bsg*, *Vim*, *Itgb1*, *Itgb3*, *Dpp4/Cd26*, *AXL*, *HSPG2*, *TLR4*, *NRPI* e *ACTB* no compartimento de células endoteliais tumorais (Endo Tumor) no melanoma murino B16F10 obtidos a partir de dados de RNA-seq de célula única (scRNA-seq).



Fonte: (A) Adaptado de Davidson et al. (2020); (B) própria.

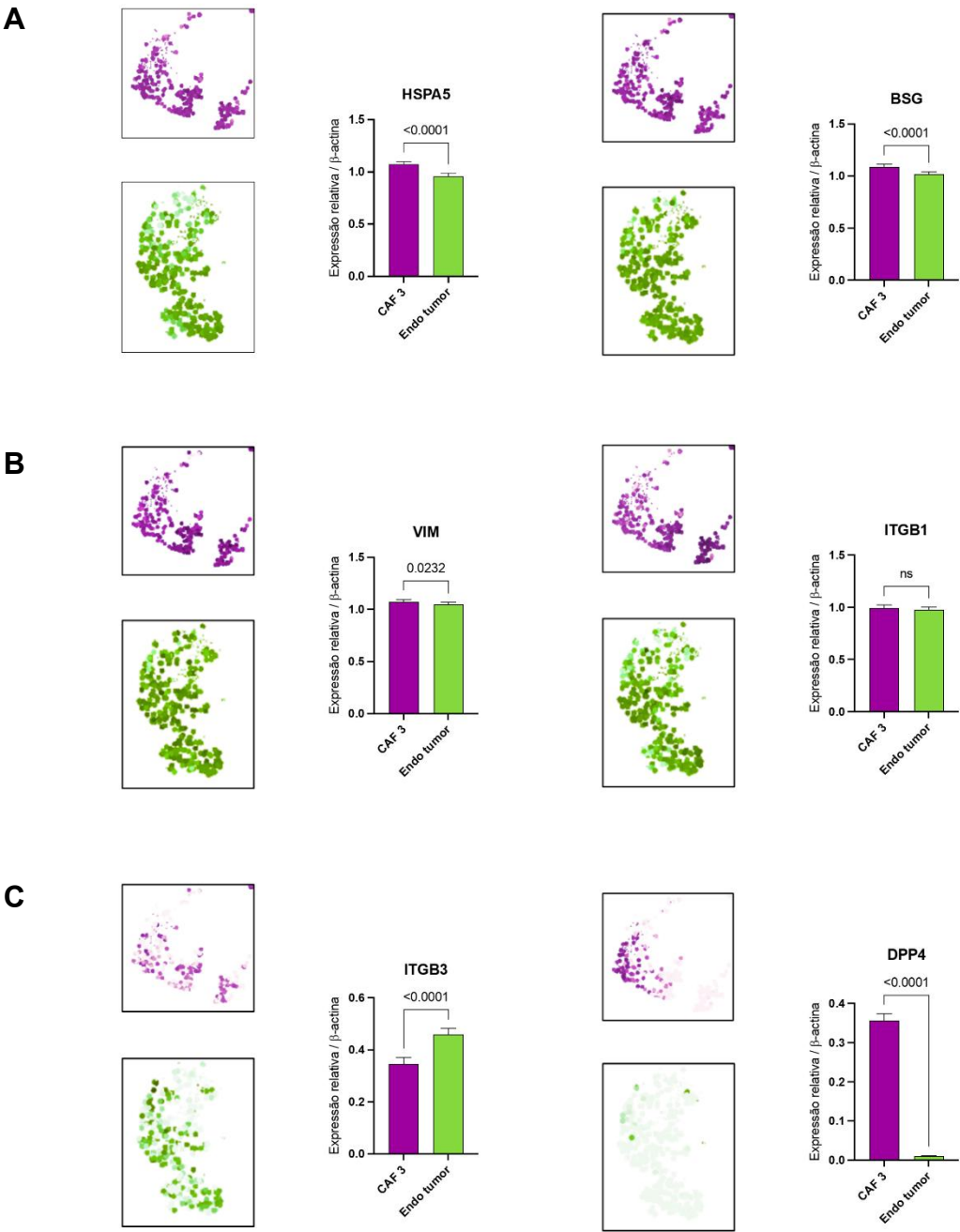
(A) visualização de t-SNE referente à expressão relativa dos genes avaliados no compartimento de células endoteliais tumorais (Endo Tumor). (B) Quantificação da expressão relativa dos genes em Endo Tumor, normalizada pela β -actina (*Actb*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as moléculas analisadas.

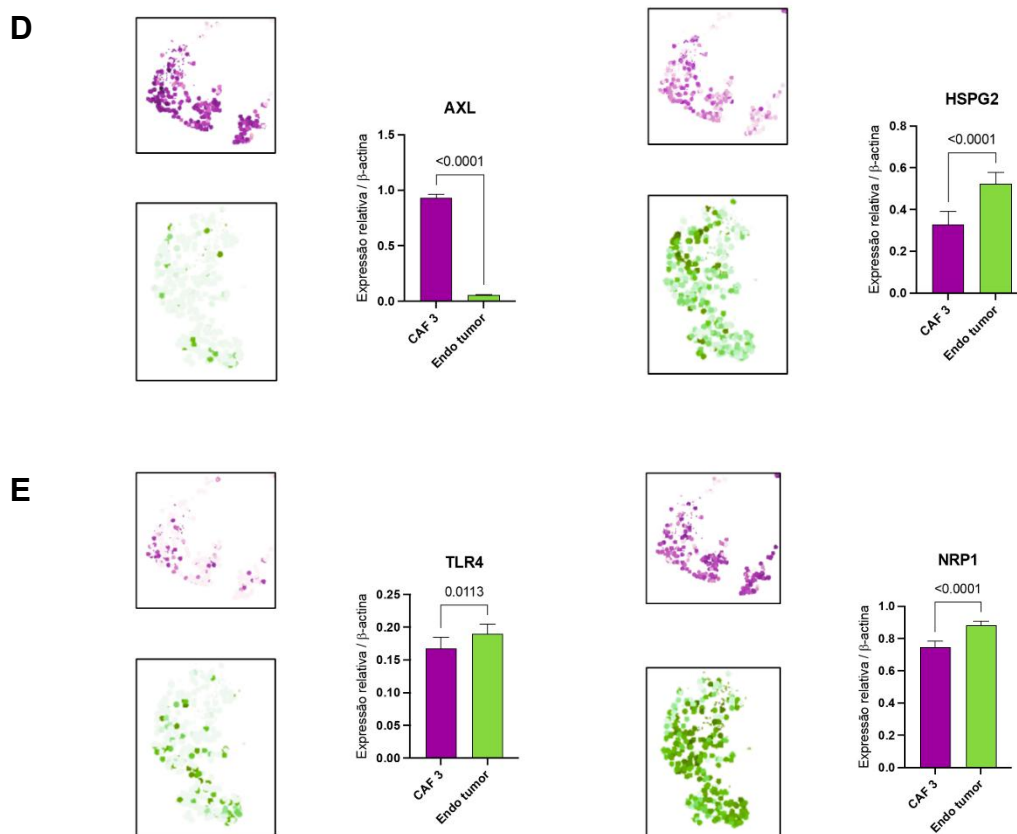
A elevada expressão desses correceptores, pode ser explicada principalmente por seus papéis contribuintes para a angiogênese. O estudo de Van Beijnum *et al.* (2022) demonstra que as células endoteliais expressam vimentina como um esforço para promover a angiogênese e como uma tentativa de escapar da imunidade, de maneira a proteger a vasculatura da interação

com leucócitos. Landras *et al.* (2019), expõe que o *Cd147* também participa da angiogênese tumoral. Demonstram que essa molécula pode estimular a angiogênese por meio do aumento dos níveis de expressão de VEGF e MMP, no tumor e no estroma. Nas células endoteliais, aumentou a produção de isoformas solúveis de VEGF e também pode promover a formação de estruturas semelhantes aos capilares. Lugano *et al.* (2018) discute que a ativação da integrina $\beta 1$ é dependente do eixo CD93/MMRN2, que está envolvido na formação da fibrillogênese da fibronectina, fosforilação de FAK e formação de filopódios durante a angiogênese. Sua elevada expressão nas células endoteliais pode indicar que essa molécula sustenta a migração e adesão à matriz dos vasos em formação. O estudo de Virrey *et al.* (2008), demonstra que *Hspa5/Grp78* é altamente expressa no endotélio associado ao tumor devido à quimiorresistência dessas células sob condições de estresse, característico do microambiente tumoral. Por fim, o papel da neuropilina nas células endoteliais é discutida por Sharma *et al.* (2024). Os pesquisadores afirmam que a *Nrp1*, um correceptor de VEGFR2, também se liga a VEGF-A, um indutor da angiogênese e é capaz de modular a sinalização do VEGFR2, promovendo o brotamento em células endoteliais.

De maneira complementar as análises de CAFs e Endo Tumor, foi realizado um estudo comparativo a respeito da expressão relativa dos genes de correceptores de SARS-CoV-2 nestes dois compartimentos (figuras 7A, 7B, 7C, 7D e 7E).

Figura 7 - Análise comparativa da expressão relativa de correceptores de SARS-CoV-2 entre os compartimentos de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e células endoteliais tumorais (Endo Tumor) no microambiente tumoral de melanoma murino B16F10.





Fonte: própria.

(A) *Hspa5* e *Bsg*; (B) *Vim* e *Itgb1*; (C) *Itgb3* e *Dpp4*; (D) *Axl* e *Hspg2*; (E) *Tlr4* e *Nrp1*. Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os valores de p indicam a significância estatística entre os grupos, determinada pelo teste de Welch, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo; ns = não significativo.

A análise comparativa demonstrou diferenças estatisticamente significativas para a maior parte dos genes avaliados. Observou-se que *Itgb3*, *Hspg2*, *Tlr4* e *Nrp1* apresentam expressão mais elevada no compartimento de Endo Tumor em relação às CAFs. Entre estes genes, destacam-se *Nrp1* e *Hspg2*, que exibem um aumento mais evidente do endotélio tumoral.

Em contraste, *Dpp4*, *Axl*, *Hspa5*, *Bsg* e *Vim*, apresentaram expressão mais elevada em CAFs quando comparados com Endo Tumor. Entre essas moléculas, *Axl* e *Dpp4* mostraram uma diferença mais acentuada, com expressão bastante superior em CAFs e extremamente reduzida em Endo Tumor. *Hspa5* e *Bsg*, embora exibiram maior expressão em CAFs, também permanecem relativamente elevados nos dois compartimentos. Já *Vim*, apesar de apresentar diferença estatisticamente significativa, demonstrou expressão relativa próxima entre os grupos.

Por outro lado, *Itgb1* exclusivamente não apresentou diferença estatisticamente significativa entre CAFs e Endo Tumor, apresentando um perfil de expressão semelhantes entre os dois grupos celulares.

Em relação ao teste de normalidade de Kruskal-Wallis, todas as moléculas apresentaram distribuição normal, com exceção de *Dpp4*.

Dessa forma, pode-se concluir que os correceptores não apresentam expressão homogênea no microambiente tumoral, participando de maneiras distintas, porém complementares na manutenção do microambiente tumoral de melanoma B16F10. Enquanto as células endoteliais tumorais apresentaram maior expressão de genes associados à angiogênese, os CAFs apresentaram maior expressão de genes relacionados a remodelação tumoral e ativação estromal, conforme discutido anteriormente.

Por apresentar expressão relativa praticamente concentrada em CAFs e Endo Tumor, o gene *Nrp1* foi selecionado para análise comparativa entre suas sequências de proteínas entre diferentes espécies. Essa comparação tem como objetivo observar a similaridade das moléculas e a relevância translacional do modelo murino utilizado.

Figura 8 – Alinhamento múltiplo das sequências proteicas de neuropilina-1 (*Nrp1*) de *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, obtido por meio da plataforma Clustal Omega.

[Homo]	MERGLPLLCVALLALVAPAGAFNRDKCGDTIKIESPGYLTSPGYPHSYHPSEKCEWLIQA	60
[Mus]	MERGLPLLCATLALALAGAFRSDKCGGTIKIENPGYLTSPGYPHSYHPSEKCEWLIQA	60
[Rattus]	MERGLPLLCATLALALAGAFRSDKCGGTIKIENPGYLTSPGYPHSYHPSEKCEWLIQA *****	60
[Homo]	PDYQYRIMINPNPHFDLEDRDKCYDYVEVDGENENHGRFGKFCGIAPPPVSSGPFLL	120
[Mus]	PEPYQYRIMINPNPHFDLEDRDKCYDYVEVDGENENHGRWGKFCGIAPSPVSSGPFLL	120
[Rattus]	PEPYQYRIMINPNPHFDLEDRDKCYDYVEVDGENENHGRWGKFCGIAPSPVSSGPFLL *,*****	120
[Homo]	IKFVSDYETHGAGFSIRYEIFKRGPESQNYTTPSGVIKSPGFEKYPNSLECTYIVFAP	180
[Mus]	IKFVSDYETHGAGFSIRYEIFKRGPESQNYTAPTGVIKSPGFEKYPNSLECTYIVFAP	180
[Rattus]	IKFVSDYETHGAGFSIRYEIFKRGPESQNYTAPTGVIKSPGFEKYPNSLECTYIVFAP *****	180
[Homo]	KMSEIILEFESFDLEPDSNPPGGMFCRYDRLEIWDGFPDVGPHIGRYCGKTPGRIRSSS	240
[Mus]	KMSEIILEFESFDLEQDSNPPGGMFCRYDRLEIWDGFPDVGPHIGRYCGKTPGRIRSSS	240
[Rattus]	KMSEIILEFESFDLEQDSNPPGGMFCRYDRLEIWDGFPDVGPHIGRYCGKTPGRIRSSS *****	240
[Homo]	GILSMVFYDTSIAIAKEGFSANYSVLQSSVSEDFKCEALGMESGEIHSQDITASSQYSTN	300
[Mus]	GVLSMVFYDTSIAIAKEGFSANYSVLQSSVSEDFKCEALGMESGEIHSQDITASSQYGTN	300
[Rattus]	GILSMVFYDTSIAIAKEGFSANYSVLQSSVSEDFKCEALGMESGEIHSQDITASSQYGTN *****	300
[Homo]	WSAERSRLNYPENGWTPGEDSYREIQQVLDGLLRFVTAVGTQGAISKETKKKYVVKTYKI	360
[Mus]	WSVERSRLNYPENGWTPGEDSYKEIQQVLDGLLRFVTAVGTQGAISKETKKKYVVKTYRV	360
[Rattus]	WSVERSRLNYPENGWTPGEDSYREIQQVLDGLLRFVTAVGTQGAISKETKKKYVVKTYKI *****	360
[Homo]	DVSSNGEDWITIKEGNKPVLFQGNTPNTPDVVAVFKPLITRFVRIKPATWETGISMRFE	420
[Mus]	DISSNGEDWISLKEGNAKAIIFQGNTPNTPDVLGVFSKPLITRFVRIKPVSWETGISMRFE	420
[Rattus]	DISSNGEDWITLKEGNAKAIIFQGNTPNTPDVVGVFPKPLITRFVRIKPVSWETGISMRFE *****	420
[Homo]	VYGCKITDYPSCGMLGMVSLISDSQITSSNQDRNMPENIRLVTSRSGWALPPAPHSY	480
[Mus]	VYGCKITDYPSCGMLGMVSLISDSQITASNQDRNMPENIRLVTSRGWALPPSPHPY	480
[Rattus]	VYGCKITDYPSCGMLGMVSLISDSQITASNQDRNMPENIRLVTSRGWALPPSPHPY *****	480
[Homo]	INEWLQIDLGEKIVRGIIQGGKHRENKVFMRKFKIGYSNNGSDWKHMDDSKRKAASF	540
[Mus]	TNEWLQVDLGEKIVRGVIITQGGKHRENKVFMRKFKIAYSNNGSDWKIMDDSKRKAASF	540
[Rattus]	INEWLQVDLGEKIVRGVIITQGGKHRENKVFMRKFKIAYSNNGSDWKHMDDSKRKAASF *****	540
[Homo]	EGNNYDTPELRTPALSTRFIRIYPERATHGGLGRMELLGCEVEAPTAGTTPNGNLV	600
[Mus]	EGNNYDTPELRTPSPSTRFIRIYPERATHSGLGRMELLGCEVEAPTAGTTPNGNPV	600
[Rattus]	EGNNYDTPELRAFTPLSTRFIRIYPERATHSGLGRMELLGCEVEAPTAGTTPNGNPV *****	600
[Homo]	DECDDQDQANCHSGTGDDFQLTGGTTLVLAKEPTVIDSTIQSEFPTYGFCFEGWGSHTF	660
[Mus]	DECDDQDQANCHSGTGDDFQLTGGTTLVLAKEPTIIDSTIQSEFPTYGFCFEGWGSHTF	660
[Rattus]	DECDDQDQANCHSGTGDDFQLTGGTTLVLAKEPTIIDSTIQSEFPTYGFCFEGWGSHTF *****	660
[Homo]	CHWEHDNHQVLKWSVLTSKTGPIQDHTGDGNIYSQADENQKGKVARLVSPVYVSQNSAH	720
[Mus]	CHWEHDSHAQLRWSVLTSKTGPIQDHTGDGNIYSQADENQKGKVARLVSPVYVSQSSAH	720
[Rattus]	CHWEHDSHAQLRWRLVTSKTGPIQDHTGDGNIYSQADENQKGKVARLVSPVYVSQSSAH *****	720
[Homo]	CMTFWYHMSGSHVGLTRVLKLRYPKEEYHQLVWMAIGHQGDHMKEGRVLHLSKLKYQVI	780
[Mus]	CMTFWYHMSGSHVGLTRVLKLRYPKEEYDQLVWVWVGHQGDHMKEGRVLHLSKLKYQVI	780
[Rattus]	CMTFWYHMSGSHVGLTRVLKLRYPKEEYDQLVWVWVGHQGDHMKEGRVLHLSKLKYQVI *****	780
[Homo]	FEGEIGKGNLGGIAVDDISINNHSIQEDCAR-----STPGYEGEGEGD	823
[Mus]	FEGEIGKGNLGGIAVDDISINNHSIQEDCAKPTLDKKNTEIKIDE TSTPGYEGEGEGD	840
[Rattus]	FEGEIGKGNLGGIAVDDISINNHSIQEDCAKPTLDKKNTEIKIDE TSTPGYEGEGEGD *****	839
[Homo]	KNISRKPGNVLKTLDPILITIIAMSA LGVLLGAVCGVLYACACWHNGMSERNLSALENYN	883
[Mus]	KNISRKPGNVLKTLDPILITIIAMSA LGVLLGAVCGVLYACACWHNGMSERNLSALENYN	900
[Rattus]	KNISRKPGNVLKTLDPILITIIAMSA LGVLLGAVCGVLYACACWHNGMSERNLSALENYN *****	899
[Homo]	FELVDGVLKKDKLNTQSTYSEA	906
[Mus]	FELVDGVLKKDKLNPQSNYSEA	923
[Rattus]	FELVDGVLKKDKLNPQSNYSEA *****	922

Fonte: própria.

Os símbolos (*) representam aminoácidos totalmente conservados, (:) substituições conservativas e (.) substituições semiconservativas.

O alinhamento múltiplo das sequências de *Nrp1* de *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* demonstra um grau elevado de conservação entre as espécies, evidenciado pela preservação de aminoácidos idênticos ao longo das sequências proteicas. As diferenças pontuais observadas se referem a substituições conservativas, que pode sugerir preservação estrutural e funcional da proteína. Além disso, por conta da similaridade evolutiva entre *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, observou-se maior similaridade.

Esse achado pode indicar que a alta conservação dessa molécula entre espécies reforça que, por exercer funções biológicas importantes, como sinalização celular e angiogênese, teve sua estrutura preservada ao longo da evolução. O resultado também se torna relevante para o estudo por demonstrar a similaridade da proteína em *Mus musculus* e *Homo sapiens*, demonstrando a relevância da utilização do modelo murino para a investigação da *Nrp1*.

Portanto, a análise comparativa das sequências de NRP1 complementa os dados de expressão obtidos nesse estudo ao demonstrar que essa molécula apresenta elevado grau de conservação entre espécies. Considerando que a NRP1 apresentou expressão em compartimentos estromais estratégicos, como células endoteliais tumorais e CAFs, sua conservação entre *Mus musculus* e *Homo sapiens* amplia a importância translacional dos achados. Ainda assim, é importante ressaltar que a conservação da sequência não substitui análises funcionais, sendo necessários estudos complementares.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que os genes dos principais receptores do SARS-CoV-2, *Eca2* e *Tmprss2*, apresentam baixa expressão no microambiente do melanoma murino B16F10. Em contraste, os correceptores exibem expressão ampla, porém heterogênea e dependente do tipo celular. Entre eles, *Hspa5*, *Bsg*, *Vim*, *Itgb1* e *Itgb3* apresentaram os maiores níveis de expressão no microambiente tumoral como um todo, enquanto *Dpp4*, *Axl*, *Hspg2*, *Tlr4* e *Nrp1* apresentaram expressão mais restrita. A análise segmentada revelou que *Bsg*, *Vim*, *Hspa5*, *Itgb1* e *Axl* foram mais expressos em fibroblastos associados ao câncer (CAFs), enquanto *Vim*, *Bsg*, *Itgb1*, *Hspa5* e *Nrp1* se destacaram em células endoteliais tumorais. Além disso, a análise comparativa das sequências de neuropilina-1 demonstrou elevado grau de conservação entre diferentes espécies, reforçando o potencial translacional do modelo murino para estudos relacionados a essa molécula.

Esses resultados demonstram que os correceptores do SARS-CoV-2 apresentam perfis específicos de expressão nos diferentes compartimentos do microambiente tumoral, sugerindo sua participação em processos biológicos como ativação estromal, angiogênese, interação célula-matriz e progressão tumoral. Dessa forma, este estudo contribui para ampliar o conhecimento sobre a distribuição dessas moléculas no microambiente de melanoma murino B16F10 e fornece subsídios para futuras investigações experimentais que busquem esclarecer suas funções biológicas e avaliar seu potencial como alvos para estratégias terapêuticas direcionadas ao câncer.

REFERÊNCIAS

- ASGARI, R. et al. CD147 and MMPs as key factors in physiological and pathological processes. v. 157, p. 113983–113983, 1 jan. 2023.
- ARIAS-MEJIAS, S. M. et al. The Role of Integrins in Melanoma: A Review. **International journal of dermatology**, v. 59, n. 5, p. 525–534, 1 maio 2020.
- BERR, A. L. et al. Vimentin is required for tumor progression and metastasis in a mouse model of non–small cell lung cancer. **Oncogene**, v. 42, n. 25, p. 2074–2087, 1 jun. 2023.
- CANTUTI-CASTELVETRI, L. et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. **Science**, v. 370, n. 6518, 20 out. 2020.
- COLELLA, F. et al. CD147 Mediates the Metabolic Reprogramming of Cancer Associated Fibroblasts Induced by EVs Released by Differentiating Cancer Stem Cells. **Journal of Extracellular Biology**, v. 4, n. 3, mar. 2025.
- DAVIDSON, Sarah et al. Single-cell RNA sequencing reveals a dynamic stromal niche that supports tumor growth. **Cell reports**, v. 31, n. 7, 2020.
- DICKINSON, S. E.; WONDRAK, G. T. TLR4 in skin cancer: From molecular mechanisms to clinical interventions. **Molecular Carcinogenesis**, 24 abr. 2019.
- ENZ, N. et al. CD26/DPP4 - a potential biomarker and target for câncer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 198, p. 135–159, jun. 2019.
- ELGUNDI, Z. et al. Cancer Metastasis: The Role of the Extracellular Matrix and the Heparan Sulfate Proteoglycan Perlecan. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 1482, 17 jan. 2020.
- ESLAMI, N. et al. SARS-CoV-2: Receptor and Co-receptor Tropism Probability. **Current Microbiology**, v. 79, n. 5, 16 mar. 2022.

FU, X.-Q. et al. Activation of STAT3 is a key event in TLR4 signaling-mediated melanoma progression. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 4, p. 1–15, 20 abr. 2020.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280, mar. 2020.

HOSSAIN, S. M.; ECCLES, M. R. Phenotype Switching and the Melanoma Microenvironment; Impact on Immunotherapy and Drug Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1601, 13 jan. 2023.

JAISWAL, A. et al. Oncogenic potential of SARS-CoV-2—targeting hallmarks of cancer pathways. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, 26 set. 2024.

JIANG, X.; COUCHMAN, J. R. Perlecan and Tumor Angiogenesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1393–1410, 1 nov. 2003.

KANEKURA, T.; CHEN, X. CD147/basigin promotes progression of malignant melanoma and other cancers. **Journal of Dermatological Science**, v. 57, n. 3, p. 149–154, mar. 2010.

KOCH, S. et al. NRP1 Presented in trans to the Endothelium Arrests VEGFR2 Endocytosis, Preventing Angiogenic Signaling and Tumor Initiation. **Developmental Cell**, v. 28, n. 6, p. 633–646, 31 mar. 2014.

LANDRAS, A. et al. CD147 Is a Promising Target of Tumor Progression and a Prognostic Biomarker. **Cancers**, v. 11, n. 11, p. 1803, 16 nov. 2019.

LEONE, P. et al. Endothelial cells in tumor microenvironment: insights and perspectives. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1367875, 2024.

LI, F. et al. CD147 promotes breast cancer migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition via the MAPK/ERK signaling pathway. **BMC cancer**, v. 23, n. 1, 8 dez. 2023.

LI, T. et al. New progresses on cell surface protein HSPA5/BiP/GRP78 in cancers and COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 14, 18 maio 2023.

LUGANO, R. et al. CD93 promotes β 1 integrin activation and fibronectin fibrillogenesis during tumor angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 8, p. 3280–3297, 25 jun. 2018.

MO, X. **A Bioinformatic Investigation into the Role of ITGB1 in Cancer Prognosis and Therapeutic Resistance.** Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.04.06.647487v2.full>>.

MUUS, C. et al. Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. **Nature Medicine**, 2 mar. 2021.

MURAMATSU, T. Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. **Journal of Biochemistry**, v. 159, n. 5, p. 481–490, 18 dez. 2015.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). National Center for Biotechnology Information. Bethesda: U.S. National Library of Medicine, [s.d.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

PAN, B. et al. β 1 and β 3 integrins in breast, prostate and pancreatic cancer: A novel implication. **Oncology Letters**, v. 15, n. 4, p. 5412–5416, 1 abr. 2018.

PAN, Q. et al. Blocking Neuropilin-1 Function Has an Additive Effect with Anti-VEGF to Inhibit Tumor Growth. **Cancer Cell**, v. 11, n. 1, p. 53–67, jan. 2007.

PARVANIAN, S.; ERIKSSON, J. E. Vimentin in the tumor microenvironment: orchestrating invasion, immunity, and metabolism. **European Journal of Cell Biology**, v. 104, n. 4, p. 151523, 21 nov. 2025.

SATELLI, A.; LI, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 18, p. 3033–3046, 3 jun. 2011.

SCHINDELIN, Johannes et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 676-682, 2012.

SANTOS, Rafael Lima. Investigação da expressão e distribuição de moléculas de adesão celular no microambiente tumoral de melanoma. 2025. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2025.

SHALABI, S.; BELAYACHI, A.; LARRIVÉE, B. Involvement of neuronal factors in tumor angiogenesis and the shaping of the cancer microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1284629, 2024.

SHARMA, S. et al. NRP1 interacts with endoglin and VEGFR2 to modulate VEGF signaling and endothelial cell sprouting. **Communications Biology**, v. 7, n. 1, 19 jan. 2024.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539–539, 16 abr. 2014.

SIKORSKI, H.; MICHAŁ ALEKSANDER ŻMIJEWSKI; PIOTROWSKA, A. Tumor Microenvironment in Melanoma—Characteristic and Clinical Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 14, p. 6778–6778, 15 jul. 2025.

SU, C. et al. Integrin β -1 in disorders and cancers: molecular mechanisms and therapeutic targets. **Cell communication and signaling: CCS**, v. 22, n. 1, p. 71, 26 jan. 2024.

VAN BEIJNUM, J. R. et al. Extracellular vimentin mimics VEGF and is a target for anti-angiogenic immunotherapy. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 2842, 23 maio 2022.

VIGO-DÍAZ, N. et al. Proteoglycans in Breast Cancer: Friends and Foes. **Biomolecules**, v. 15, n. 12, p. 1688, 3 dez. 2025.

VIRREY, J. J. et al. Stress Chaperone GRP78/BiP Confers Chemoresistance to Tumor-Associated Endothelial Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 8, p. 1268–1275, ago. 2008.

WANG, Q. et al. HSPA5 Promotes the Proliferation, Metastasis and Regulates Ferroptosis of Bladder Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5144, 7 mar. 2023.

WANG, Y. et al. Multidimensional pan-cancer analysis of HSPA5 and its validation in the prognostic value of bladder cancer. **Heliyon**, v. 10, n. 6, p. e27184–e27184, 28 fev. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Coronavirus Disease (COVID-19)**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1>.

YADAV, M. et al. AXL signaling in cancer: from molecular insights to targeted therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 10, n. 1, 9 fev. 2025.

YUN, C. W. et al. Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 60, 24 dez. 2019.

ZHAI, X. et al. Gas6/AXL pathway: immunological landscape and therapeutic potential. v. 13, 10 maio 2023.

ZHAO, Y. et al. Stromal cells in the tumor microenvironment: accomplices of tumor progression? **Cell Death and Disease**, v. 14, n. 9, 4 set. 2023.

ZHU, C. et al. ITGB3/CD61: a hub modulator and target in the tumor microenvironment. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 12, p. 7195, 15 dez. 2019.

