

**RACHEL PAES DE ARAÚJO**

**IMPACTO DO PERFIL IMUNE NA PROGRESSÃO DA METÁSTASE CEREBRAL  
DO CÂNCER DE PULMÃO: ANÁLISE INTEGRATIVA DE SEQUENCIAMENTO  
DE CÉLULAS ÚNICAS**

Relatório de Pós-doutorado realizado na  
Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Faculdade de Medicina de Botucatu, Unidade  
Experimental de Pesquisa (UNIPEX),  
Botucatu, SP.

Supervisor(a):  
Prof. Dr. Patricia Pintor dos Reis

CAPES - 88887.691765/2022-00

Botucatu

2024

## **Resumo**

A metástase cerebral ocorre em 20-50% dos pacientes diagnosticados com o câncer de pulmão, sendo uma das complicações clínicas mais letais e o problema clínico mais grave neste tipo de câncer. A metástase cerebral é altamente prevalente no subtipo adenocarcinoma pulmonar, piorando significativamente a evolução clínica dos pacientes, com uma mediana de sobrevida de apenas 4 meses para pacientes tratados. Portanto, há uma necessidade urgente de desenvolver abordagens de diagnóstico molecular a partir do melhor entendimento dos mecanismos de progressão de doença, visando erradicar a metástase cerebral. Os objetivos deste projeto incluem análises integradas que abrangem a identificação do perfil global de expressão de genes de resposta imune associados à metástase cerebral, integradas à análise do transcrito codificador de células únicas. A metodologia proposta é o sequenciamento de alto desempenho de células únicas (single cell RNA-Seq). Para nosso conhecimento, tal metodologia é inédita na Unesp. Os resultados esperados incluem a determinação do perfil imune associado à progressão do câncer de pulmão para metástase cerebral. Os resultados devem impactar a sobrevida dos pacientes, pois implicam na identificação de alterações-chave responsivas às modalidades de imunoterapia, bem como geram dados inéditos e importantes para o desenvolvimento de terapêuticas mais avançadas.

## **Justificativa - Qualificação do problema**

O câncer de pulmão é a principal causa de mortalidade por câncer, com mais de 1,8 milhões de mortes no mundo (1) e 32 mil óbitos no Brasil em 2020 (2). Aproximadamente 80% dos pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) têm doença localmente avançada ou metástase a distância ao diagnóstico (3), sendo esta a principal causa de insucesso do tratamento e óbito dos pacientes. A metástase cerebral (MC) ocorre em 20-50% dos casos, sendo uma das complicações clínicas mais letais e o problema clínico mais grave neste câncer. A MC é altamente prevalente no adenocarcinoma pulmonar, piorando a evolução dos pacientes, com uma mediana de sobrevida de apenas 4 meses para os pacientes que receberam tratamento (4). Portanto, há uma necessidade urgente de desenvolver abordagens de diagnóstico molecular e erradicação da MC. Estas estratégias são o caminho ideal para reduzir a progressão da doença, impactando a melhorar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes. Ao determinarmos o perfil imune da MC, seremos capazes de entender os mecanismos complexos de progressão da doença e contribuir para o desenvolvimento de biomarcadores clinicamente aplicáveis para seleção de pacientes elegíveis a diferentes modalidades de tratamento. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que integra dados globais de resposta imune e do transcrito codificador de células únicas da metástase cerebral de adenocarcinoma de pulmão.

## **Objetivos e indicadores**

**Objetivo 1. Realizar o sequenciamento de células únicas em plataforma de alto desempenho (single-cell RNA-Seq).**

Neste objetivo, amostras de metástase cerebral de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, confirmado por análise histológica, serão coletadas prospectivamente (n=6) e utilizadas para: (1) isolamento de células únicas em equipamento

cell sorter adequado para single cell RNA-Seq; (2) preparo de bibliotecas a partir de células únicas isoladas; (3) amplificação, marcação das amostras – bibliotecas – com códigos de barra, para sequenciamento. Ressaltamos que, apesar do número de amostras ser n=6, serão isoladas e sequenciadas centenas de células a partir de uma única amostra de metástase cerebral.

**Indicadores:** Dados de single cell RNA-Seq gerados com sucesso e analisados por métodos de bioinformática.

**Objetivo 2: Identificação de fármacos direcionados a metástase cerebral de adenocarcinoma de pulmão usando os dados de expressão de genes de resposta imune e perfil do sequenciamento de células únicas.**

Neste objetivo serão mapeados os fármacos e combinações de fármacos com capacidade de bloquear a sinalização oncogênica da metástase cerebral. Indicador: drogas com alvos moleculares, incluindo imunoterápicos e combinações, serão identificados a partir dos dados de expressão de genes de resposta imune e perfis de sequenciamento de células únicas.

### **Declaração Ética**

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) (CAAE: 52624521.1.0000.5411).

### **Pacientes e Metodologia**

Desenho do estudo: será utilizada uma coorte prospectiva para análise de single-cell RNA-Seq.

População e amostra: pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos para diagnóstico ou tratamento de metástases cerebrais de foco primário pulmonar no serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) - UNESP.

Período de inclusão da coorte prospectiva: pacientes com MC removida cirurgicamente a partir de Março de 2023.

Critérios de inclusão:

- Registro de procedimento cirúrgico sob o código de “trepanação para biópsia”, “craniotomia para biópsia encefálica”, “craniotomia para retirada de tumor intracraniano” e “microcirurgia para tumor intracraniano”.
- Laudo anatomopatológico referente ao procedimento acima com descrição de: “adenocarcinoma metastático” ou “carcinoma metastático”, com seus diferentes subtipos.

Critério de exclusão:

- Descrição em laudo anatomopatológico de foco primário extra-pulmonar.

## **Metodologias utilizadas, Resultados e Discussão**

### ***Pacientes e Metodologia***

Neste projeto, coletamos amostras de pacientes com Metástase Cerebral de Câncer de Pulmão. Um desafio enfrentado para a coleta de amostras foi a confirmação do diagnóstico histopatológico da doença. A análise histopatológica da amostra é realizada após a cirurgia, sendo que no momento da coleta da amostra não foi possível ter certeza que o sítio do tumor primário seria pulmonar e, consequentemente, a metástase cerebral seria derivada de um carcinoma de pulmão. Houve também dificuldade em obter as amostras, devido à escassez de cirurgias no período do projeto. Inicialmente, planejamos obter 6 amostras de metástase

cerebral de pacientes com carcinoma de pulmão. Porém, foram coletadas no período de Março de 2023 a Maio de 2024 um n=3 amostras metastáticas. Além disso, as amostras coletadas não tiveram a patologia confirmada de tumor primário pulmonar, e como nosso tempo era limitado e não conseguiríamos estender mais o período de coleta de amostras, nós seguimos com o plano de sequenciamento com as amostras que estavam disponíveis, e assim, conseguir implementar os protocolos de cultura celular e sequenciamento de células únicas. De qualquer forma, o projeto foi bem sucedido pois foi realizado o desenvolvimento e a otimização de protocolos essenciais para o sequenciamento single cell de amostras biológicas. Consideramos que avançamos e desenvolvemos esta tecnologia na Unesp.

A seguir segue a **Tabela 1** que mostra o resultado da análise histopatológica das amostras de metástase cerebral coletadas:

| <b>Amostras</b> | <b>Patologia do tumor primário</b> |
|-----------------|------------------------------------|
| MCP01           | Melanoma                           |
| MCP02           | Gástrico ou urotelial (indefinido) |
| MCP03           | Linfoma                            |

Durante o período de coleta, para que as biópsias pudessem manter as células viáveis e como manutenção da integridade para o sequenciamento, foi implementado um protocolo pré-sequenciamento de células únicas. Com isso, as amostras foram acondicionadas em meio de cultura completa a 20%, levadas ao laboratório e maceradas para que as células pudessem crescer em meio de cultura, e assim serem isoladas . Segue abaixo o protocolo implementado:

### *Cultura celular das amostras metastáticas*

Nossa primeira amostra foi a MCP01, (coletada dia 11/10/2023) e com ela fizemos um teste para saber qual o melhor volume de meio e a melhor concentração para as células aderirem, crescerem e se estabilizarem neste primeiro momento. Com isso, dentro do fluxo laminar, a amostra foi colocada em 500µl de meio completo a 20% de soro bovino fetal (para um volume total de 50mL colocamos 39.5 de DMEM, 500 µl de antibiótico, e antifúngico e 10 mL de soro bovino fetal) e maceradas com bisturi estéril até criar uma “papinha” de tecido. Após, foi adicionado mais 500µl de meio completo, e com a ajuda de uma pasteur, foi feito um “up and down” para desagregação do tecido e diminuição de grumos teciduais. O total de 1 mL da amostra macerada foi dividido entre 2 garrafas pequenas e uma dish pequena com o meio completo a 20%. O meio a 20% ajuda na aderência das células, consequentemente por possuir mais nutrientes para a célula, e ajuda a estabilizar e no crescimento das mesmas. Cada garrafa foi colocada em um volume de meio diferente para ver se isso teria algum impacto no crescimento celular. Logo, ficamos com 3 garrafas com os seguintes volumes:

MCP01 com volume de 6 mL total (~333.33 µl de amostra macerada em cada garrafa + ~5.6 mL de meio completo a 20%. Essa amostra será chamada de MCP01-06

MCP01 com volume de 5 mL total (~333.33 µl de amostra macerada em cada garrafa + ~4.6 mL de meio completo a 20%. MCP01-05

MCP01 com volume de 3 mL total (~333.33 µl de amostra macerada em cada garrafa + ~2.6 mL de meio completo a 20%. MCP01-03

Após 2 dias as amostras foram observadas no microscópio, MCP01-06 possuía uma boa quantidade de células aderidas. A MCP01-05 também possuía uma boa quantidade de células aderidas, mas um pouco menos que MCP01-06 . MCP01-03, tinha pouquíssimas células aderidas. Como o meio ainda estava com uma coloração avermelhada, não retiramos o meio,

para ajudar na aderência das células com seus fatores de crescimento, e apenas adicionamos mais meio a 20%. 500µl na MCP01-06, 1 mL na MCP01-05 mL e 1 mL na MCP01 -03. Após 3 dias as células foram observadas novamente no microscópio e todas garrafas tinham células aderidas, porém a MCP01-06 e a MCP01-05 estavam bem igualadas em termos de números de células aderidas nas garrafas, enquanto a MCP01-03 possuiu um número bem inferior de células aderidas quando comparada com as demais. O meio da MCP01-06 e da MCP01-05 foram trocados para o meio completo a 10% (para um volume total de 50mL colocamos 44.5 de DMEM, 500 µl de antibiótico, e antifúngico e 5 mL de soro bovino fetal) pois as células estavam mais estabilizadas. Já a MCP01-03 foi mantido o meio completo a 20% na troca de meio. Todos os volumes foram trocados de acordo com o volume estabelecido no experimento, 6 mL, 5mL e 3 mL respectivamente.

Após 3 dias as células foram observadas novamente e vimos que quanto a MCP01-6, quanto a MCP01-05 estavam com células aderidas e com bom crescimento, já a MCP01-03 não estava crescendo como o esperado. O meio foi trocado e adicionado um novo meio completo a 10% com seus respectivos volumes de acordo com o experimento teste.

Após 3 dias, as células foram observadas novamente e vimos que a MCP01-06 e a MCP01-05 estavam com uma confluência de aproximadamente 80-90%. Com isso, essas duas amostras foram tripsinizadas e sofreram a passagem para uma garrafa maior de tamanho M. Primeiro, o meio foi retirado de cada garrafa e as células foram lavadas 2 vezes com 1 mL de PBS a 37 graus celsius. Essa lavagem é importante para retirar qualquer excesso de meio que possa ter ficado na garrafa e que venha interferir na ação da tripsina. Após as duas lavagens, 1 mL de tripsina a 37 graus celsius foram adicionados e passada por toda a superfície das garrafas para que as células pudessem se soltar do fundo das mesmas. As garrafas foram retiradas do fluxo e observadas no microscópio, e vendo que elas estavam voltando ao seu formato original, após uns 2 minutos, foram dados “tapas” nas garrafas para ajudar as células a se soltarem da

superfície. Confirmado no microscópio que as células não estavam mais aderidas, de volta ao fluxo, foi adicionado 3 mL de meio completo a 10% para inibir a ação da tripsina em cada garrafa. Com uma Pasteur, o volume de cada garrafa foi retirado e respectivamente colocado em um tubo falcon de 15 mL. Em seguida foi feita uma homogeneização no tubo falcon e uma alíquota de 50 µl da suspensão celular que foi retirada de cada tubo falcon para a contagem de células e adicionado em um tubo eppendorf. Após, 50 µl de tripan foi adicionado no mesmo tubo eppendorf com a células suspensas. A contagem foi feita na câmara de Neubauer e foram observadas 18 células vivas e 1 morta, tanto na MCP01-06 quanto na MCP01-05, de acordo com as contas  $18/4 \times 2.10^4 = 9 \times 10^4$  células por mL.

Com isso, foi feito um repique de 1:6 para uma garrafa M com um volume total de 15 mL.

Como a amostra MCP01-03 não havia crescido de acordo com o esperado, seu meio foi apenas trocado para um meio novo a 10%.

Após 3 dias as amostras foram novamente observadas no microscópio. A MCP01-06 e a MCP01-05 estavam aderidas e crescendo bem, o meio delas foi trocado por um novo meio a 10%. Já a MCP01-03 estava bem lenta. Como as 3 amostras na verdade fazem parte da mesma “linhagem celular” oriundas da mesma amostra, foram feitos apenas testes de volumes e concentração de meio diferentes para ver a aderência e crescimento. Por não ter crescido o suficiente a MCP01-03 não seguiu para repique. Quando as amostras chegaram na confluência MCP01-06 e MCP01-05 chegaram na confluência de 80-90% nas garrafas M, elas foram congeladas para esperar as próximas amostras e seguirmos para o sequenciamento. Para o congelamento, as amostras foram submetidas ao mesmo processo de tripsina descrito acima, porém para a garrafa M foram adicionados 3 mL de PBS para cada lavagem, 3 mL de tripsina e 6 mL de meio completo a 10% para inibir a tripsina. Após a tripsinização das amostras, foi feita a contagem de células de cada uma. Na câmara de Neubauer foram observadas 18 células vivas e 1 morta nas MCP01-06 e na MCP01-05. De acordo com as

contas,  $18/4 \times 2.10^4 = 9 \times 10^4$  células por mL de cada garrafa. Para saber o total de células no volume total após a tripsinização em cada garrafa, foi pego a concentração de células por mL,  $9 \times 10^4$  células e foi multiplicado por 9 (volume total de suspensão celular). Fechamos com um total de  $8.1 \times 10^5$  células por garrafa. Também foi observada a viabilidade, para isso, foi pego o número de vivas e dividido pelo número total de células (vivas e mortas) e multiplicado por 100. Ou seja,  $18/19 \times 100 = 94.74\%$  de viabilidade em cada garrafa.

Com isso, a suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos para a formação do pellet. Após, o sobrenadante vertido foi descartado e o pellet ressuspendido no volume remanescente. Para o congelamento de volume total de 1000 µl foi colocado em um criotubo, 225µl da suspensão celular, 725µl de soro bovino fetal e 50µl de DMSO. As amostras foram colocadas dentro de uma câmara de resfriamento lento e acondicionada no -80 por 24h e no dia seguinte colocada no nitrogênio líquido.

Observando a aderência e o crescimento celular, não foi observada uma diferença nas células que cresceram com 6mL e com 5mL. Assim, foi decidido manter um volume total de 5mL no primeiro momento. Foi observado que manter a concentração do meio a 20%, pelo menos na primeira semana, ajudou na aderência e no fator de crescimento celular, desta forma, os protocolos para a coleta, cultura celular, concentração celular, viabilidade e congelamento das amostras foram estabelecidos.

As demais amostras coletadas, MCP02 e MCP03 foram coletadas em datas diferentes, mas seguiram o protocolo que foi estabelecido acima e brevemente descrito abaixo.

As amostras foram colocadas e logo foi adicionado 500µl de meio completo a 20% e os tecidos foram macerados até criar uma “papinha”, mais 500µl foram adicionados em cada amostra, e com a pasteur, foi feita uma homogeneização. Após, 500µl da amostra macerada foi adicionada em cada garrafa Pequena (total de 2 garrafas para cada amostra), e completada com 4,5mL de meio completo a 20%. O meio de cultura das amostras foi trocado a cada 3

dias até que as células estivessem aderidas e com confluência de 80-90% da garrafa. Após estabelecidas, as amostras sofreram a primeira passagem para uma garrafa maior de tamanho M (total de 2 garrafas para cada amostra), onde foram mantidas com troca de meio completo a 10% a cada 2 dias até que atingissem a confluência de 80-90% e sofressem mais uma passagem de garrafa, mas agora para duas garrafas M (total de 2 garrafas para cada amostra), com volume celular de 1:6 no repique. Na segunda passagem (repique) as células foram mantidas em meio de cultura completa a 10%. As amostras sofreram pelo menos 2 passagens para novas garrafas de tamanho M. Foram feitas as contagens das células de cada amostra e sua viabilidade. Organizamos de forma que para o sequenciamento tivéssemos células o suficiente, com isso após a primeira contagem, geralmente congelamos uma parte e o restante mantivemos a cultura para o sequenciamento. Segue abaixo a contagem, viabilidade e concentração de células que foram congeladas de acordo com protocolo implementado. A MCP01-05 foi a amostra que foi descongelada, e que passou por novo processo de adesão e crescimento para que fosse enviada para o sequenciamento e passou a ser chamada de apenas MCP01.

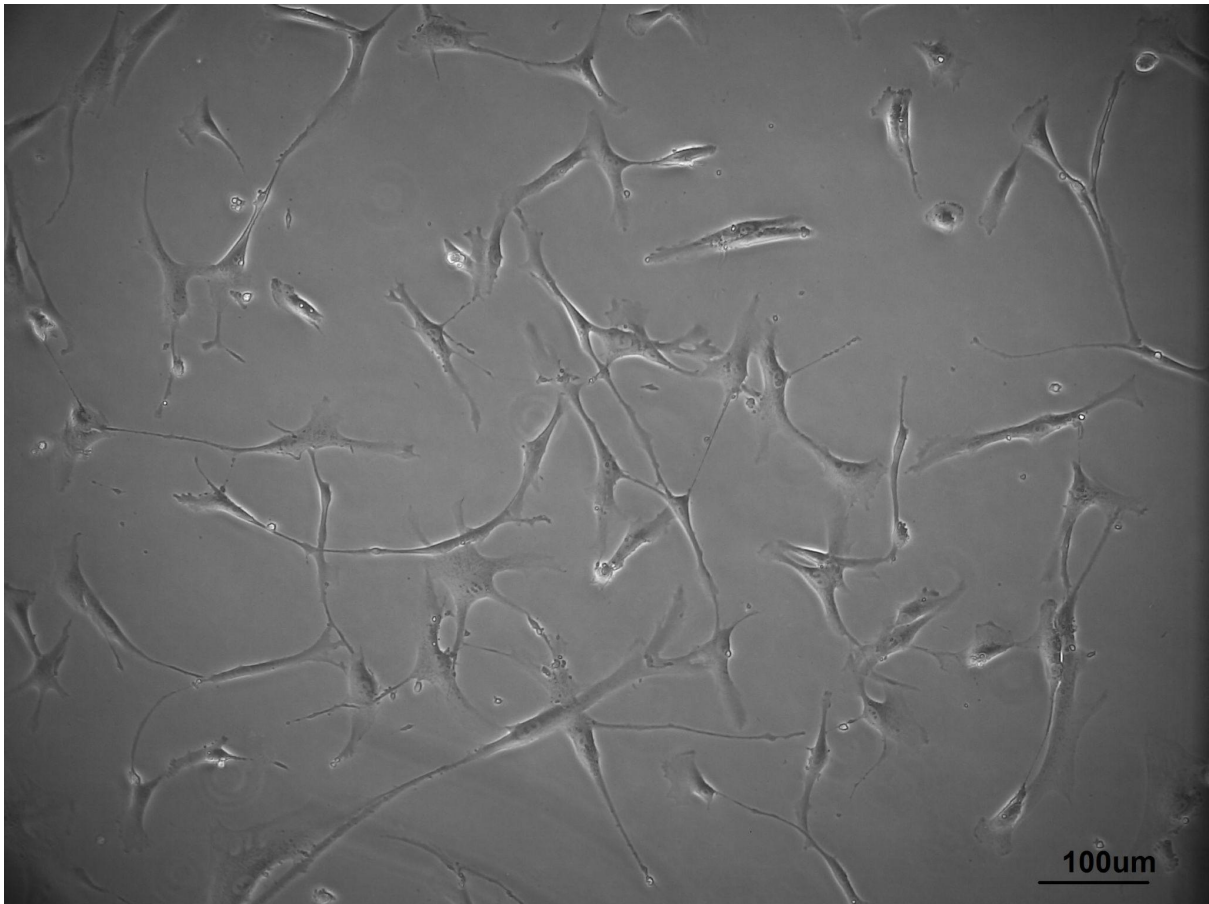
Para o sequenciamento foi feita a contagem das células e sua viabilidade.

MCP01 com um total de  $1.56 \times 10^6$  células por mL e com viabilidade de 97%.

MCP02 com um total de  $1,7 \times 10^6$  de células por mL com viabilidade de 95%

MCP03 com um total de  $1,1 \times 10^6$  de células por mL com viabilidade de 91%

Abaixo **Figura 1** mostra as células da amostra aderidas da amostra MCP01.



**Figura 1.** A figura mostra as células de metástase cerebral de tumor primário de melanoma aderidas e com uma confluência de aproximadamente 70%.

**Objetivo 1: Análise de sequenciamento de células únicas (single cell RNA-Seq) das metástases cerebrais.**

*Isolamento de células únicas, extração e sequenciamento de RNA (RNA-Seq):*

Para o sequenciamento de células únicas o input de células foi de 16.500 no total por amostra. O que seria necessário para ter um total de pelo menos 1000 células por  $\mu\text{l}$  de acordo com a contagem das células acima e a viabilidade estabelecida de no mínimo 90%. Nossas amostras atingiram o padrão necessário para o sequenciamento, tanto na viabilidade quanto na contagem de células. Além disso, nós também testamos com a MCP01, duas formas de diluir a concentração celular para chegar na concentração de 1000 células por  $\mu\text{l}$ , uma diluição foi feita com PBS e outra com PBS BSA. Observamos que não havia diferença na contagem

após o uso do PBS BSA e a viabilidade permaneceu a mesma, assim, prosseguimos utilizando o PBS nas demais amostras, mas decidimos sequenciar essa amostra com a diluição em PBS BSA para ver se há alguma diferença no sequenciamento em si. Para o isolamento das células, foi utilizada a Plataforma 10X Genomics®, dando seguimento ao protocolo padrão estabelecido pela empresa usando o Kit Chromium Next GEM Single Cell 3' reagent kit V3.1. Nosso experimento foi realizado na USP de Ribeirão Preto, no Laboratório Translacional em Oncologia com a ajuda da Especialista em Laboratório Sabrina Baroni que nos guiou e orientou durante o experimento.

O master mix foi preparado no gelo em um eppendorf, com um volume para 4 amostras (MCP01, MCP01\* (diluição em PBS BSA), MCP02 e MCP03) + 10% (µl). Utilizamos 82.7µl do reagente RT Reagente B, 10.6µl do Template Switch Oligo, 8.8µl do Reducing Agent B e 38.3 da RT Enzyme C. Foi adicionado 31.9 µl de master mix em cada tubo, 1 para cada amostra (MCP01, MCP01\*, MCP02, MCP03), mantido no gelo. Como usamos 1000 células por µl, adicionamos 16.5µl da suspensão celular e 26.7µl de água Nuclease-free em cada tubo de cada amostra com o Master Mix. Gentilmente, o Master Mix + a suspensão celular, foram misturados com a pipeta. Após, 70µl do Master Mix + suspensão celular foram adicionados na linha 1 do cartucho de acordo com a instrução do cartucho, de forma lenta e sem introduzir bolhas.

#### Preparação das Gel Beads:

As Gel Beads foram colocadas em um adaptador de vortex, e vortexadas por 30 segundos. Após, foram centrifugadas por 5 segundos e conferidas se não havia nenhuma bolha no fundo, e se o volume dos líquidos estavam uniformes. 50µl de Gel Beads foram lentamente aspirados e adicionados nos poços da linha 2 no cartucho de acordo com as instruções e sem introduzir bolhas. Aguardamos 30 segundos. Após, foi adicionado 45µl do Partitioning Oil nos poços da linha 3 de acordo com as instruções do cartucho. Com isso, o cartucho foi

colocado no instrumento Chromiun controller para o isolamento das células. Após a corrida no Chromiun controller, 100µl das GEMs foram vagarosamente removidas da linha 3 de acordo com as instruções do fabricante e cartucho. Logo após a retirada das GEMs, elas foram adicionadas nos tubos que estavam dispostos no gelo.

#### GEM-RT purificação e amplificação do cDNA:

Foram adicionados 125µl do Recovery Agent em cada amostra e esperamos 2 minutos. Podemos observar que o líquido ficou rosa fosco e em seguida bifásico. 125µl da parte rosa no fundo do tubo foi removida e descartada. O Mix para a purificação foi preparado com 801µl de Clenup Buffer, 35 µl de Dynabeads Myone SILANE, 22µl do Reducing Agent Be 22µl de Nuclease-free water, com um volume total de reação de 880µl. As amostras foram vortexadas e 200µl do Mix foi adicionado em cada amostra. Foi feito um “up and down” 10x com a pipeta marcando 200µl. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos com as tampas abertas, logo foram homogeneizadas com a pipeta e novamente incubadas por mais 5 minutos.

Nesse tempo de espera, a solução de Eluição I foi preparada com 392µl do Buffer EB, 4µl do 10% Tween 20 e 4µl do Reducing Agent B, resultando em um volume total de 400µl.

No minuto 10 da incubação, as amostras foram colocadas na raque magnética da 10x até que a solução ficou transparente. É normal que fique uma interfase branca entre a parte aquosa e o Recovery Agent. O sobrenadante (parte aquosa e Recovery Agente) foi removido. 300µl de etanol a 80% foi adicionado ao pellet branco na raque magnética, esperou-se 30 segundos e o etanol foi removido. 200µl de etanol foi adicionado novamente e esperou-se 30 segundos. O etanol foi removido e as amostras foram brevemente centrifugadas e colocadas na raque magnética. O etanol remanescente foi removido e as amostras foram deixadas por 1 minuto para secar ao ar. As amostras foram removidas da raque magnética e imediatamente 35.5µl de Elution solution I foi adicionado. A pipeta foi colocada a 30µl e as amostras foram

homogeneizadas sem introduzir bolhas. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos, e novamente colocadas na raque magnética até que a solução ficou transparente. 35µl da amostra foram transferidos para um novo tubo.

Para a preparação do Mix de amplificação do cDNA foram utilizados, 220µl do Amp Mix e 66 µl de cDNA Primers , com os tubos dispostos em gelo e após a mistura, foram brevemente vortexados. Em seguida, 65µl do mix foram adicionados aos 35µl da amostra purificada, e foram homogeneizados e brevemente vortexados. Após as amostras foram colocadas no termociclador com o seguinte protocolo:

| Temperatura da tampa | Volume da reação | Tempo de corrida |
|----------------------|------------------|------------------|
| 105°C                | 100µl            | ~30-45 minutos   |

| Passo | Temperatura                   | Tempo       |
|-------|-------------------------------|-------------|
| 1     | 98°C                          | 3 minutos   |
| 2     | 98°C                          | 15 segundos |
| 3     | 63°C                          | 20 segundos |
| 4     | 72°C                          | 1 minuto    |
| 5     | 11 ciclos nas condições acima |             |
| 6     | 72°C                          | 1 minuto    |
| 7     | 4°C                           | Hold        |

Após a amplificação, o reagente SPRIselect foi ressuspendido e foi adicionado 60µl do reagente em cada amostra e homogeneizado. Logo em seguida as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e colocadas na raque magnética até que a solução ficou clara, transparente. Em seguida, o sobrenadante foi removido e adicionado 200 µl de etanol

80% por 30 segundos. O etanol foi removido. O passo da lavagem com o etanol foi repetido por duas vezes. Após, as amostras foram brevemente vortexadas e colocadas novamente na raque magnética. Para remover o etanol remanescente, as amostras ficaram no máximo 2 minutos com a tampa aberta para secar, e foram removidas da raque magnética. 40µl do tampão EB foi adicionado, homogeneizado e mantido à temperatura ambiente por 2 minutos. Novamente as amostras foram colocadas na raque magnética até que a solução ficou clara, transparente. 40µl da amostra foi transferida para um novo tubo.

Os protocolos acima foram implementados e estabelecidos como os principais para o sequenciamento de células únicas. Além disso, a qualidade do cDNA foi analisada através do Qiubit com os seguintes resultados para cada amostra: MCP01 = 5.59 ng/µl; MCP01\* = 6.74ng/µl; MCP02 = 3.39ng/µl e MCP03 = 3.69ng/µl.

Foi dado seguimento ao protocolo de acordo com o protocolo padrão de construção de biblioteca para sequenciamento de células únicas, com os kits Fragmentation mix, Adaptor Ligation mix, seguindo o protocolo de acordo com o kit. Após a construção das bibliotecas, kit da Agilent Bioanalyzer High Sensitivity chip foi utilizado, conforme protocolo do fabricante, para checar a integridade das bibliotecas. . O resultado das amostras foram ~500pb por amostra, o que mostra que a qualidade da biblioteca estava ótima para prosseguir para o sequenciamento (padrão mínimo esperado 200pb)

Em seguida o sequenciamento foi realizado com as bibliotecas acima construídas, que consistem em construções padrão de extremidade pareada Illumina, que começam com P5 e terminam com P7. Códigos de barras de 16 bp da 10x foram codificados no início da Leitura 1 TruSeq, enquanto as sequências de índice de amostra de 10 bp i5 e i7 foram incorporadas como leituras de índice de amostra. As Leituras 1 e 2 TruSeq são locais de primers de sequenciamento padrão da Illumina usados no sequenciamento de extremidade pareada. A Leitura 1 TruSeq é usada para sequenciar os Códigos de Barras de 16 bp da 10x e o UMI de

12 bp. O sequenciamento dessas bibliotecas produz uma pasta de saída de dados BCL padrão da Illumina. O instrumento utilizado para o sequenciamento foi o Nextseq 500/550 com uma concentração de 1.8pM e com 1% de Phix.

O estabelecimento do protocolo de células únicas foi testado e descrito de forma minuciosa, o que foi de extrema importância para o sucesso do sequenciamento. Além disso, a implementação desses protocolos foi de extrema importância para entender a tecnologia e poder passar o conhecimento adiante.

#### *Análise de dados: Pré-processamento e controle de qualidade dos dados*

A estratégia escolhida para a análise de dados do sequenciamento células únicas das amostras de metástase cerebral foi o software Orange Data Mining que oferece uma série de módulos que suportam diversas etapas desse tipo de análise, desde o carregamento dos dados até a visualização e interpretação dos resultados.

O módulo Load Data foi o ponto de partida para a análise. Ele permite o carregamento de amostras de múltiplos datasets, preparando-os para análises subsequentes. A saída deste módulo é um dataset de single cell que pode ser utilizado em diversos outros módulos para filtragem, pré-processamento e análise.

O módulo Filter desempenha um papel crucial na preparação dos dados ao permitir a filtragem de células ou genes com base no número de medições positivas. A filtragem é essencial para eliminar células ou genes que são infrequentemente ou excessivamente expressos, assim como aqueles que não apresentam expressão (medições zero). Isso resulta em datasets mais enxutos, que são mais fáceis de analisar e que melhoram a eficiência computacional. É possível ajustar os limiares inferiores e superiores para a filtragem e optar por aplicar as mudanças automaticamente ou manualmente.

O módulo Single Cell Pre-process foi utilizado para pré-processar os dados de single cell. Esta etapa pode incluir normalização, transformação de dados e outras preparações que são

necessárias antes da análise principal. Outro passo fundamental para a análise é a remoção dos efeitos de lote ou batch, os efeitos de batch são variações técnicas introduzidas durante o processamento experimental que podem mascarar as verdadeiras variações biológicas. O módulo Batch Effect Removal normaliza esses efeitos, garantindo que as variações observadas nos dados sejam de natureza biológica e não técnica.

O módulo Align Datasets é essencial quando se trabalha com múltiplos datasets de single cell que precisam ser comparados ou combinados. Este módulo utiliza a análise de correlação canônica para alinhar os datasets, permitindo a visualização da correlação entre eles. A normalização por percentil e o warping dinâmico do tempo são utilizados para assegurar que os datasets sejam comparáveis.

Uma etapa importante para identificar os genes de interesse é atribuir uma pontuação para cada um. O módulo Score Genes avalia os genes com base em várias estatísticas de expressão, incluindo média, variância, dispersão e coeficiente de variação. Este processo é essencial para identificar subpopulações celulares dentro de um dataset maior. A pontuação é calculada individualmente para cada célula e reflete a expressão máxima dos genes marcadores. Isso permite a seleção dos genes mais relevantes para análises subsequentes.

O módulo Dot Matrix é utilizado para realizar análises de cluster, identificando agrupamentos de células com características semelhantes dentro do dataset de single cell. Esta abordagem é útil para compreender a heterogeneidade dentro de populações celulares e identificar novos subtipos celulares.

Por fim, uma das principais vantagens do sequenciamento single cell é a possibilidade de estudar a distribuição espacial das células nas amostras, a autocorrelação espacial é uma medida da correlação entre a expressão gênica e a localização espacial das células. O módulo Spatial Autocorrelation Scorer calcula o escore de autocorrelação espacial, como o Moran's I

ou Geary's C, para cada gene no dataset. Este módulo é crucial para a análise do microambiente tumoral.

**Objetivo 2: Identificação de fármacos direcionados a metástase cerebral de adenocarcinoma de pulmão usando os dados de expressão de genes de resposta imune e perfil do sequenciamento de células únicas.**

A assinatura de expressão gênica associada à metástase cerebral foi rastreada para alvos terapêuticos usando a ferramenta OCTAD . Esta plataforma combina assinaturas de expressão específicas de câncer para perfis de expressão gênica induzida por compostos (66.612 perfis de expressão gênica induzida por drogas derivados de 71 linhagens celulares e 12.442 drogas) da Biblioteca de Assinaturas Celulares baseadas em Rede Integrada (LINCS, do inglês, *Library of Network-Based Cellular Signatures*). A análise foi feita na priorização de pequenas moléculas com alta potência para reverter assinaturas de expressão gênica da doença. O OCTAD empregou um método de sumarização para reduzir o viés e calculou o sRGES (do inglês, *summarized Reversal Gene Expression Score*). O sRGES representou a potência de reversão de uma droga para uma assinatura específica de câncer. Foi selecionado os 100 principais candidatos a medicamentos com base nas pontuações sRGES (valores mais baixos  $< -0,25$  em mais de dois perfis de expressão gênica induzida por medicamentos) para os compostos LINCS (medicamentos em ensaios clínicos ou aprovados pela FDA).

Segue a abaixo a **Tabela 2** com os 100 resultados de maior escore que foram achados no estudo:

**Tabela 2: Alvos terapêuticos para metástase cerebral**

| Drug name    | Clinical Phase | Molecular Pathway                                 | Target Gene                                                                                                                                                      | sRGES    |
|--------------|----------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Dabrafenib   | Launched       | RAF inhibitor                                     | BRAF LIMK1 NEK11 <br>RAF1 SIK1                                                                                                                                   | -0.74351 |
| Teniposide   | Launched       | topoisomerase inhibitor                           | TOP2A TOP2B                                                                                                                                                      | -0.70479 |
| Peruvoside   | Phase 1        | cardiac glycoside                                 |                                                                                                                                                                  | -0.69883 |
| Sn-38        | Launched       | topoisomerase inhibitor                           | TOP1                                                                                                                                                             | -0.67422 |
| Triptolide   | Phase 3        | RNA polymerase<br>inhibitor                       | RELA                                                                                                                                                             | -0.66755 |
| Camptothecin | Phase 3        | topoisomerase inhibitor                           | TOP1                                                                                                                                                             | -0.66724 |
| Idarubicin   | Launched       | topoisomerase inhibitor                           | TOP2A                                                                                                                                                            | -0.66486 |
| Bortezomib   | Launched       | NFkB pathway<br>inhibitor proteasome<br>inhibitor | PSMA1 PSMA2 PSMA<br>3 PSMA4 PSMA5 PSM<br>A6 PSMA7 PSMA8 PS<br>MB1 PSMB10 PSMB1<br>1 PSMB2 PSMB3 PSM<br>B4 PSMB5 PSMB6 PS<br>MB7 PSMB8 PSMB9 P<br>SMD1 PSMD2 RELA | -0.66113 |

|              |             |                                                           |                                                          |          |
|--------------|-------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------|
| Bms-387032   | Phase 1     | CDK inhibitor cell cycle inhibitor MCL1 inhibitor         | CDK2 CDK7 CDK9                                           | -0.65849 |
| Hexetidine   | Launched    | local anesthetic                                          |                                                          | -0.65398 |
| Tolmetin     | Launched    | cyclooxygenase inhibitor                                  | PTGS1 PTGS2                                              | -0.65086 |
| Zm-39923     | Preclinical | JAK inhibitor                                             | JAK1 JAK3                                                | -0.64567 |
| Idazoxan     | Phase 3     | adrenergic receptor antagonist                            | ADRA2A                                                   | -0.63639 |
| Methotrexate | Launched    | dihydrofolate reductase inhibitor                         | DHFR                                                     | -0.63285 |
| Bimatoprost  | Launched    | prostanoid receptor agonist                               | AKR1C3 PTGER1 PTGER3 PTGFR                               | -0.62649 |
| Dyphylline   | Launched    | adenosine receptor antagonist phosphodiesterase inhibitor | ADORA1 ADORA2A PDE3A PDE4A PDE4B PDE4C PDE4D PDE7A PDE7B | -0.62566 |
| Targinine    | Phase 3     | nitric oxide synthase inhibitor                           | NOS3                                                     | -0.61937 |
| Etoposide    | Launched    | topoisomerase inhibitor                                   | TOP2A TOP2B                                              | -0.61737 |

|                   |             |                                             |                                                              |          |
|-------------------|-------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------|
| Mitoxantrone      | Launched    | topoisomerase inhibitor                     | TOP2A                                                        | -0.60897 |
| Panobinostat      | Launched    | HDAC inhibitor                              | HDAC1 HDAC2 HDAC3 HDAC4 HDAC6 HDAC7 HDAC8 HDAC9              | -0.60459 |
| Carbimazole       | Launched    | antithyroid agent                           | TPO                                                          | -0.6043  |
| Astemizole        | Withdrawn   | histamine receptor antagonist               | HRH1 KCNH1 KCNH2                                             | -0.60198 |
| Pyrvinium-pamoate | Launched    | androgen receptor antagonist                | AR                                                           | -0.60112 |
| Trichostatin-a    | Preclinical | HDAC inhibitor                              | HDAC1 HDAC10 HDAC2 HDAC3 HDAC4 HDAC5 HDAC6 HDAC7 HDAC8 HDAC9 | -0.60048 |
| Pik-75            | Preclinical | DNA protein kinase inhibitor PI3K inhibitor | PIK3CA PIK3CB PIK3CD PIK3CG PRKDC                            | -0.59717 |
| Imiloxan          | Phase 1     | adrenergic receptor antagonist              | ADRA2A ADRA2B                                                | -0.59717 |
| Actinomycin-d     | Launched    | RNA polymerase inhibitor                    |                                                              | -0.58659 |
| Gemcitabine       | Launched    | ribonucleotide                              | CMPK1 RRM1 RRM2                                              | -0.58642 |

|                    |             |                                         |                                                   |          |
|--------------------|-------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|----------|
|                    |             | reductase inhibitor                     | TYMS                                              |          |
| Tacrine            | Launched    | acetylcholinesterase inhibitor          | ACHE BCHE                                         | -0.57773 |
| Thonzonium         | Launched    | ATPase inhibitor                        |                                                   | -0.57538 |
| Etanidazole        | Phase 3     | bacterial cell wall synthesis inhibitor |                                                   | -0.57475 |
| Cd-437             | Preclinical | retinoid receptor agonist               | RARG                                              | -0.57313 |
| Alvocidib          | Phase 2     | CDK inhibitor                           | CDK1 CDK2 CDK4 CDK5 CDK6 CDK7 CDK8 CDK9 EGFR PYGM | -0.57243 |
| Thiomersal         | Launched    | other antibiotic                        | OXCT1                                             | -0.56574 |
| Doxorubicin        | Launched    | topoisomerase inhibitor                 | TOP2A                                             | -0.56529 |
| Dactinomycin       | Launched    | RNA polymerase inhibitor                | POLR2A                                            | -0.56454 |
| Trichlormethiazide | Launched    | chloride channel blocker                | ATP1A1 CA1 CA2 CA4 SLC12A1 SLC12A3                | -0.56123 |
| Nicorandil         | Launched    | nitric oxide donor potassium            | KCNJ11                                            | -0.55955 |

|              |             |                                                                  |                                                                                                    |          |
|--------------|-------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
|              |             | channel activator                                                |                                                                                                    |          |
| Miconazole   | Launched    | bacterial cell wall synthesis inhibitor                          | KCNH2 KCNH6 KCNH7 KCNMA1 KCNMB1 KCNMB2 KCNMB3 KCNMB4 KCNN1 KCNN2 KCNN3 KCNN4 NOS2 NOS3 TRPM2 TRPV5 | -0.55891 |
| Tigecycline  | Launched    | bacterial 30S ribosomal subunit inhibitor                        |                                                                                                    | -0.55681 |
| Tyloxapol    | Launched    | NFkB pathway inhibitor                                           | LPL NFKB2                                                                                          | -0.55464 |
| Saclofen     | Preclinical | GABA receptor antagonist                                         | GABBR1 GABBR2 KCTD12 KCTD16 KCTD8                                                                  | -0.54963 |
| Cladribine   | Launched    | adenosine deaminase inhibitor ribonucleotide reductase inhibitor | ADA PNP POLA1 POLE POLE2 POLE3 POLE4 RRM1 RRM2 RRM2B                                               | -0.54915 |
| Bethanechol  | Launched    | acetylcholine receptor agonist                                   | CHRM1 CHRM2 CHRM3 CHRM4                                                                            | -0.54709 |
| Daunorubicin | Launched    | RNA synthesis inhibitor topoisomerase inhibitor                  | TOP2A TOP2B                                                                                        | -0.54417 |

|                |             |                                                                        |                                         |          |
|----------------|-------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------|
| Levocetirizine | Launched    | histamine receptor antagonist                                          | HRH1                                    | -0.5439  |
| Pirarubicin    | Launched    | topoisomerase inhibitor                                                | TOP2A                                   | -0.54277 |
| Ciprofibrate   | Launched    | PPAR receptor agonist                                                  | PPARA                                   | -0.54172 |
| Purvalanol-a   | Preclinical | CDK inhibitor                                                          | CDK1 CDK2 CDK4 CDK5 CSNK1G3 RPS6KA1 SRC | -0.54169 |
| Lorglumide     | Phase 1     | CCK receptor antagonist                                                | CCKAR CCKBR                             | -0.53849 |
| Ym-155         | Phase 2     | survivin inhibitor                                                     | BIRC5                                   | -0.53683 |
| Vatalanib      | Phase 3     | KIT inhibitor PDGFR tyrosine kinase receptor inhibitor VEGFR inhibitor | EGFR FLT1 FLT4 KDR PDGFRB               | -0.53583 |
| Way-161503     | Preclinical | serotonin receptor agonist                                             | HTR2C                                   | -0.53435 |
| Pyrvinium      | Launched    | androgen receptor antagonist                                           |                                         | -0.53094 |
| Ki-16425       | Preclinical | lysophosphatidic acid receptor antagonist                              | LPAR1 LPAR3                             | -0.53019 |

|                                |             |                                           |                                                                                                 |          |
|--------------------------------|-------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Puromycin                      | Preclinical | protein synthesis inhibitor               | NHP2L1 RPL10L RPL11 RPL13A RPL15 RP<br>L19 RPL23 RPL23A R<br>PL26L1 RPL3 RPL37 R<br>PL8 RSL24D1 | -0.5301  |
| Luteolin                       | Phase 2     | glucosidase inhibitor                     | TOP1                                                                                            | -0.52896 |
| Dirithromycin                  | Launched    | bacterial 50S ribosomal subunit inhibitor |                                                                                                 | -0.52673 |
| Atpa                           | Preclinical | glutamate receptor agonist                | GRIA2 GRIK1                                                                                     | -0.52502 |
| Nsc-3852                       | Preclinical | HDAC inhibitor                            | HDAC1                                                                                           | -0.52397 |
| Dyclonine                      | Launched    | sodium channel blocker                    | SCN10A SCN5A                                                                                    | -0.52228 |
| Topotecan                      | Launched    | topoisomerase inhibitor                   | TOP1 TOP1MT                                                                                     | -0.52121 |
| Jnj-7706621                    | Preclinical | CDK inhibitor                             | AURKA AURKB CDK<br>1 CDK2                                                                       | -0.52113 |
| Guanethidine                   | Launched    | adrenergic inhibitor                      | SLC6A2                                                                                          | -0.51848 |
| Bisindolylmale<br>imide<br>-ix | Preclinical | PKC inhibitor                             | AKT1 GSK3B LCK M<br>APK1 MAPK11 MAPK<br>12 MAPK14 MAPK8 P<br>RKCA ROCK1 RPS6K                   | -0.51778 |

|             |             |                                           |                                                   |          |
|-------------|-------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------|
|             |             |                                           | B1 SIRT1                                          |          |
| Pha-793887  | Phase 1     | CDK inhibitor                             | CDK1 CDK2 CDK4 CDK5 CDK7 CDK9                     | -0.51775 |
| Cefepime    | Launched    | bacterial cell wall synthesis inhibitor   |                                                   | -0.51747 |
| Acemetacin  | Launched    | cyclooxygenase inhibitor                  | PTGS1 PTGS2                                       | -0.51586 |
| Bvt-948     | Preclinical | tyrosine phosphatase inhibitor            | PTPN1 PTPN11 PTPN2                                | -0.51474 |
| Ataluren    | Launched    | CFTR channel agonist dystrophin stimulant | DMD                                               | -0.51438 |
| Felbinac    | Launched    | cyclooxygenase inhibitor                  | CTSL                                              | -0.51294 |
| Amsacrine   | Launched    | topoisomerase inhibitor                   | KCNH2 TOP2A                                       | -0.51276 |
| Rebamipide  | Launched    | free radical scavenger                    | FPR1                                              | -0.50569 |
| Dequalinium | Launched    | PKC inhibitor                             | KCNN1 KCNN3                                       | -0.5056  |
| Belinostat  | Launched    | HDAC inhibitor                            | HDAC1 HDAC10 HDAC11 HDAC2 HDAC3 HDAC4 HDAC5 HDAC6 | -0.50228 |

|                 |             |                                           |                           |          |
|-----------------|-------------|-------------------------------------------|---------------------------|----------|
|                 |             |                                           | HDAC7 HDAC8 HDAC9         |          |
| Chlorphenamine  | Launched    | histamine receptor antagonist             | HRH1 SLC6A2 SLC6A3 SLC6A4 | -0.50225 |
| Streptozotocin  | Launched    | DNA alkylating agent                      | SLC2A2                    | -0.50005 |
| Haloprogin      | Launched    | other antifungal                          |                           | -0.49857 |
| Ampicillin      | Launched    | bacterial cell wall synthesis inhibitor   |                           | -0.49791 |
| Fadrozole       | Launched    | aromatase inhibitor                       | CYP11B1 CYP19A1           | -0.49777 |
| Tenatoprazole   | Phase 2     | ATPase inhibitor                          | IDO1                      | -0.4971  |
| Miglitol        | Launched    | glucosidase inhibitor                     | GAA GANAB GANC MGAM       | -0.49701 |
| Tiratricol      | Launched    | thyroid hormone stimulant                 | THRA THRB                 | -0.49677 |
| Cloxacillin     | Launched    | bacterial cell wall synthesis inhibitor   |                           | -0.49662 |
| Chloramphenicol | Launched    | bacterial 50S ribosomal subunit inhibitor | CD55                      | -0.4956  |
| Ryuvidine       | Preclinical | histone lysine methyltransferase          | CDK2 CDK4                 | -0.49484 |

|                |             |                                                                                      |                                                                                               |          |
|----------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
|                |             | inhibitor                                                                            |                                                                                               |          |
| Vorinostat     | Launched    | HDAC inhibitor                                                                       | HDAC1 HDAC10 HDAC11 HDAC2 HDAC3 HDAC5 HDAC6 HDAC8 HDAC9                                       | -0.49232 |
| Sertindole     | Withdrawn   | dopamine receptor antagonist serotonin receptor antagonist                           | ADRA1A ADRA1B ADRA1D DRD2 DRD3 DRD4 HRH1 HTR1A HTR1B HTR1D HTR1E HTR1F HTR2A HTR2C HTR6 KCNH2 | -0.49059 |
| Irbesartan     | Launched    | angiotensin receptor antagonist                                                      | AGTR1 JUN SLC10A1                                                                             | -0.48982 |
| Lofepramine    | Launched    | norepinephrine reuptake inhibitor serotonin±norepinephrine reuptake inhibitor (SNRI) | HTR1A SLC6A2 SLC6A4                                                                           | -0.48735 |
| Bifonazole     | Launched    | sterol demethylase inhibitor                                                         | CYP2B6                                                                                        | -0.48646 |
| Clarithromycin | Launched    | bacterial 50S ribosomal subunit inhibitor                                            | CYP3A4                                                                                        | -0.48466 |
| Mg-132         | Preclinical | proteasome inhibitor                                                                 | PSMB1                                                                                         | -0.48437 |

|                  |             |                                                  |                                   |          |
|------------------|-------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------|----------|
| Monastrol        | Preclinical | kinesin inhibitor                                | KIF11                             | -0.48426 |
| Closantel        | Launched    | chitinase<br>inhibitor NFkB pathway<br>inhibitor |                                   | -0.48378 |
| Cytarabine       | Launched    | ribonucleotide<br>reductase inhibitor            | POLA1 POLB POLD1 <br>POLE         | -0.4804  |
| Carmofur         | Launched    | thymidylate synthase<br>inhibitor                | TYMS                              | -0.47929 |
| At-7519          | Phase 2     | CDK inhibitor                                    | CDK1 CDK2 CDK4 C<br>DK5 CDK6 CDK9 | -0.47825 |
| Propylthiouracil | Launched    | thyroid peroxidase<br>inhibitor                  | DIO1 TPO                          | -0.47797 |

---

### **Outras atividades realizadas no período**

Particpei de duas edições do Research Day, realizado na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu. Na edição de 2023 apresentei o projeto de pesquisa de sequenciamento de células únicas de pacientes com metástase cerebral. Na edição de 2024, participei da organização do evento, como também da equipe científica que realizou perguntas para avaliar o trabalho dos alunos.

Além disso, participei do AACR On Campus Brazil, realizado em São Paulo, 20-23 de Fevereiro de 2024, no ICESP, onde foram discutidos os últimos avanços de pesquisa, diagnóstico e tratamento do câncer.

Também apresentei um pôster na 4th International Global Cancer Consortium Conference, que aconteceu em São Paulo, no ICESP nos dias 24 e 25 de maio de 2024.

Particpei da Comissão Organizadora e Comissão de Trabalho do Workshop CONNECT TB: Advancing Research and Treatment, realizado no dia 17 de abril de 2024, no Salão Nobre da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Ministrei a aula intitulada: “Laboratório de nível 3 de biossegurança” junto à disciplina de graduação “Tópicos de Biossegurança”, para alunos do terceiro ano do curso de Ciências Biomédicas do IBB - Unesp. Aos 23 de outubro de 2023. Carga horária: 2 horas.

Realizei duas visitas técnicas ao Laboratório de Translacional de Oncologia da USP de Ribeirão Preto para treinamento do preparo e isolamento de células únicas no sistema Chromium (10X Genomics) para o sequenciamento de células únicas.

Particpei como convidada do I Encontro de Usuários - 10x Genomics, realizado em 20 de junho de 2024, em São Paulo.

Também participei de duas bancas de exame geral de qualificação, ambas em 2023:

- Leonardo Oliveira Pimentel. Mestrado acadêmico, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Medicina Translacional - Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp. Orientador: Prof.

Winston Bonetti Yoshida. Título do trabalho de mestrado: Perfil de microRNA comparativo em pacientes com diferentes graus de doença venosa crônica.

- Bethina da Rocha Camargo. Doutorado acadêmico, Programa de Pós-Graduação em Biometria, Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp. Orientador: Rogério Antônio de Oliveira. Título do trabalho: Construção de árvores para avaliar o perfil de expressão de miRNAs no estágio inicial do carcinoma pulmonar de células não pequenas.

### **Considerações finais**

O trabalho desenvolvido durante o pós-doutorado foi de extrema importância para a implementação de protocolos e de novas tecnologias ao laboratório e à unidade de pesquisa experimental da FMB-Unesp. Foram feitos testes, além de visitas técnicas e a geração de dados científicos que serão posteriormente publicados em revistas científicas. Além disso, amostras coletadas também foram armazenadas para estudos futuros, além de protocolos que foram estabelecidos que poderão ser utilizados por outros pesquisadores. Também houve a troca de conhecimento através de participações em eventos científicos, aulas, reuniões científicas, participação como banca examinadora em exames de qualificação e como ouvinte em defesas de trabalhos de conclusão de cursos de pós-graduação de alunos do grupo.

### **Comentários da supervisora**

O relatório apresentado pela pós-doutoranda tem nível excelente de detalhamento, demonstrando claramente todas as etapas e resultados obtidos no período. Durante o pós-doutorado, a bolsista Rachel Paes de Araújo demonstrou comprometimento, organização do tempo e prioridades, as quais foram desempenhadas com competência e dedicação ao trabalho proposto, contribuindo para o avanço da pesquisa junto ao nosso grupo, bem como outros grupos da Unesp. A coleta de amostras cirúrgicas foi realizada de forma precisa e cuidadosa, com ótima interação com grupo clínico multidisciplinar, garantindo a qualidade necessária para estudos subsequentes. O desenvolvimento de protocolos inéditos, incluindo o isolamento e caracterização de células, foram marcos importantes que contribuíram para a robustez das análises realizadas. As habilidades técnicas e o compromisso da bolsista em seguir os padrões mais altos de qualidade foram fundamentais para o sucesso das culturas celulares, obtenção de amostras com qualidade e quantidade suficientes e preparo das bibliotecas de sequenciamento do transcrito de células únicas.

Além das atividades laboratoriais, Rachel teve uma atuação destacada na disseminação do conhecimento e na interação com a comunidade científica local e externa à Unesp. Participou de reuniões científicas do grupo, incluindo colaboradores internos e externos, internacionais e atuou na obtenção de dados e redação de artigos científicos, conforme mostrado no documento de publicações de manuscritos e registrado em seu CV lattes. A participação em eventos científicos e reuniões do grupo não só enriqueceu sua formação, mas também trouxe valiosas contribuições para os projetos em andamento. A capacidade da bolsista de integrar novas tecnologias ao ambiente de pesquisa, combinada com a sua atuação como examinadora e participante em bancas, demonstram sua maturidade acadêmica e seu papel central na promoção de um ambiente colaborativo e inovador na Unesp.

O impacto do trabalho desenvolvido durante esse período vai além dos resultados imediatos, com a criação de protocolos que serão essenciais para futuros projetos. Este pós-doutorado foi, sem dúvida, um período de grande contribuição para o progresso da pesquisa em nossa instituição.

### **Referências Bibliográficas**

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Sep 28];71(3):209–49. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660>
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro : INCA, 2019. [cited 2021 Sep 28]. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>
3. Araujo LH, Baldotto C, Castro G Jr, Katz A, Ferreira CG, Mathias C, Mascarenhas E, Lopes GL, Carvalho H, Tabacof J, Martínez-Mesa J, Viana LS, Cruz MS, Zukin M, Marchi P, Terra RM, Ribeiro RA, Lima VCC, Werutsky G, Barrios CH; Grupo Brasileiro de Oncologia Torácica. Lung cancer in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2018 Jan-Feb;44(1):55-64. doi: 10.1590/S1806-37562017000000135.
4. Ali A, Goffin JR, Arnold A, Ellis PM. Survival of patients with non-small-cell lung cancer after a diagnosis of brain metastases. *Curr Oncol*. 2013 Aug;20(4):e300-6. doi: 10.3747/co.20.1481. PMID: 23904768; PMCID: PMC3728058.