



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

CELINE BEATRIZ SWOLLON PEGADO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CISPLATINA E MELATONINA
NA EXPRESSÃO DE GENES REGULADORES NO
PROCESSO DE MORTE CELULAR EM CÂNCER DE
PULMÃO**

Recife,
2022

CELINE BEATRIZ SWOLLON PEGADO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CISPLATINA E MELATONINA
NA EXPRESSÃO DE GENES REGULADORES NO
PROCESSO DE MORTE CELULAR EM CÂNCER DE
PULMÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof^a Dr^a Michelly Cristiny
Pereira

Coorientador: Dr^a Bárbara de Oliveira Silva

Recife,
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Pegado, Celine Beatriz.

Avaliação do efeito da cisplatina e melatonina na expressão de genes reguladores no processo de morte celular em câncer de pulmão / Celine Beatriz Pegado. - Recife, 2022.

48 : il., tab.

Orientador(a): Michelly Pereira

Cooorientador(a): Bárbara Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

1. Terapia combinada. 2. Câncer de pulmão. 3. Melatonina. 4. Morte celular.
5. Genes. I. Pereira, Michelly . (Orientação). II. Silva, Bárbara. (Coorientação).
III. Título.

610 CDD (22.ed.)

CELINE BEATRIZ SWOLLON PEGADO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CISPLATINA E MELATONINA NA
EXPRESSÃO DE GENES REGULADORES NO PROCESSO DE
MORTE CELULAR EM CÂNCER DE PULMÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: 22/11/2022

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr^a. Michelly Cristiny Pereira
UFPE/ Departamento de Fisiologia e farmacologia

Prof. Dr^a. Neide Santos
UFPE/ Departamento de genética

Dr^a Erika da Silva Bezerra de Menezes
UFPE/ Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino (NUPIT-SG)

Dedico este trabalho aos meus pais,
Elson e Mariângela, que lutaram
comigo até aqui e me proporcionaram
todo amor, incentivo e forças durante
minha caminhada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que em sua infinita bondade e amor me deu forças e sabedoria para perseverar e chegar até aqui. O Senhor me sustentou em tudo o que precisava, foi o meu amigo, o meu refúgio nas noites mais escuras e meu guia nos momentos de dúvidas, medos e incertezas. A Ele toda Honra e Glória.

Agradeço especialmente a minha orientadora Prof^a Dr^a Michelly Cristiny Pereira, por sua dedicação, disponibilidade e companheirismo ao me lecionar. É nítido ver sua devoção ao ensino nos fazendo aprender em amor, carinho e responsabilidade. Sou grata por compartilhar sua sabedoria e experiência comigo, por seu cuidado especial em cada carona à universidade e seu favor. Obrigada por me ensinar a crescer como profissional em compromisso, responsabilidade e maturidade a cada tarefa da qual muitas vezes não me sentia capaz de realizar. Levarei comigo sempre essa gratidão e admiração.

À minha coorientadora Bárbara de Oliveira Silva pela sua dedicação, disponibilidade, alegria e motivação. Obrigada por cada incentivo, por estar sempre pronta a ajudar e me ensinar a praticamente qualquer hora do dia. Por cada café da manhã compartilhado no laboratório, sua alegria, disposição e correções.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino (NUPIT-SG), por me proporcionarem o ambiente, a estrutura e os materiais para realização da minha graduação e para conclusão deste estudo, respectivamente. Sou grata pelas diversas oportunidades oferecidas que contribuíram para o meu crescimento e formação.

Ao órgão de fomento CNPq e Facepe por tornar este estudo possível e viável.

Como papel importante e fundamental na minha trajetória acadêmica, gostaria de agradecer aos meus pais, Elson José e Mariângela Pegado por todo apoio emocional, amor, carinho, força e dedicação sem fim. Ao meu pai, por estar sempre vigilante à minha espera na ida e volta da universidade; sou grata pelo zelo, cuidado e proteção por mim. À minha mãe pelas inúmeras orações, pelas palavras de sabedoria, conselhos, cuidado, carinho e dedicação. Por renunciar ao seu ensino superior para que eu pudesse ter uma educação completa e de qualidade. Pela paciência ao suportarem o processo, chorarem e se alegrarem junto comigo. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Por fim, gostaria de agradecer também aos meus pastores que foram fundamentais no início da minha graduação. Sou grata por serem canais da benção de Deus em minha vida e por proferirem palavras de força, incentivo e coragem para que eu não desistisse e chegasse até aqui.

Melhor é o fim das coisas do que o princípio
delas;

Eclesiastes 7

PEGADO, Celine. **Avaliação do efeito da cisplatina e melatonina na expressão de genes reguladores no processo de morte celular em câncer de pulmão.** 2022. 50 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

A cisplatina é um agente quimioterápico altamente eficaz no tratamento do câncer de pulmão. No entanto, seus efeitos colaterais graves permanecem como uma limitação para sua ampla utilização, em particular, a ototoxicidade e genotoxicidade. A melatonina vem se destacando pela capacidade antioxidante de reduzir esses efeitos adversos induzidos pela cisplatina, e por aumentar a eficácia da quimioterapia devido a mecanismos citotóxicos que levam a apoptose das células neoplásicas. Porém, os possíveis alvos envolvidos nesse processo ainda são desconhecidos. Diante disso, o objetivo do presente estudo é investigar o efeito da cisplatina associada à melatonina na modulação dos principais genes envolvidos no processo de morte celular em câncer de pulmão. Para isso, foi realizado o cultivo das linhagens de adenocarcinoma pulmonar H1299 e A549, onde foram submetidas ao tratamento com cisplatina e melatonina isoladas e em associação por um período de 6 horas. A extração de RNA total da cultura de células foi feita pelo Trizol® (Invitrogen, UK). O DNA complementar (cDNA) foi utilizado para avaliar a expressão dos genes: *TP53*, *BAX*, *BID*, *BCL-2* e *Caspases 3 e 7* por reação da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) pelo método TaqMan. A análise dos dados foi realizada pelo GraphPad Prism 5 e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados mostraram que o tratamento com cisplatina foi capaz de modular a expressão dos genes *BAX*, *BID*, *CASP3* e *CASP7* e o supressor tumoral *TP53*, na linhagem H1299. Em paralelo, foi possível observar um efeito sinérgico no tratamento concomitante à melatonina na expressão dos genes *BID* e *CASP3*, na mesma linhagem. A linhagem A549 foi mais susceptível à associação da cisplatina e melatonina, sendo possível observar, com a expressão dos genes envolvidos na via intrínseca da apoptose. Contudo, o tratamento com a melatonina isolada aumentou apenas a expressão de *CASP7* em ambas as linhagens tumorais. Em contrapartida, nenhuma modulação foi observada no gene *TP53* quando tratada com a melatonina isolada ou associada ao quimioterápico cisplatina. Com os resultados obtidos, foi concluído que a associação da cisplatina e melatonina pode potencializar o efeito de morte celular no adenocarcinoma pulmonar,

modulando as vias de apoptose e supressão tumoral. Portanto, o uso da melatonina associada a este fármaco potencializa a expressão de moléculas presentes na via da apoptose e conseqüentemente, em ensaio clínicos futuros, poderá ser utilizada como coadjuvante na tentativa de reduzir os efeitos tóxicos dos fármacos derivados de platina, permitindo um melhor prognóstico e qualidade de vida aos pacientes.

Palavras-chave: Adenocarcinoma pulmonar. Terapia combinada. Citotoxicidade. Apoptose. Expressão gênica.

PEGADO, Celine. **Evaluation of the effect of cisplatin and melatonin on the expression of regulatory genes in the process of cell death in lung câncer.** 2022. 50 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

Cisplatin is a highly effective chemotherapeutic agent for the treatment of lung cancer. However, its serious side effects remain a limitation for its widespread use, in particular ototoxicity and genotoxicity. Melatonin has been highlighted for its antioxidant capacity to reduce these adverse effects induced by cisplatin, and for increasing the efficacy of chemotherapy due to cytotoxic mechanisms that lead to apoptosis of neoplastic cells. However, the possible targets involved in this process are still unknown. Therefore, the objective of this study is to investigate the effect of cisplatin associated with melatonin on the modulation of the main genes involved in the cell death process in lung cancer. To this end, the lung adenocarcinoma lines H1299 and A549 were cultured and submitted to treatment with cisplatin and melatonin alone and in association for a period of 6 hours. Total RNA extraction from the cell culture was performed by Trizol® (Invitrogen, UK). The complementary DNA (cDNA) was used to assess the expression of genes: *TP53*, *BAX*, *BID*, *BCL-2* and *Caspases 3* and *7* by real-time reverse transcription polymerase reaction (RT-PCR) using the TaqMan method. Data analysis was performed by GraphPad Prism 5 and p-values <0.05 were considered significant. The results showed that cisplatin treatment was able to modulate the expression of *BAX*, *BID*, *CASP3* and *CASP7* genes and the tumor suppressor *TP53*, in the H1299 strain. In parallel, it was possible to observe a synergistic effect in concomitant treatment with melatonin on the expression of *BID* and *CASP3* genes, in the same lineage. The A549 strain was more susceptible to the association of cisplatin and melatonin, and it was possible to observe with the expression of genes involved in the intrinsic pathway of apoptosis. However, treatment with melatonin alone increased only the expression of *CASP7* in both tumor lines. In contrast, no modulation was observed in the *TP53* gene when treated with melatonin alone or associated with the chemotherapeutic agent cisplatin. With the results obtained, it was concluded that the association of cisplatin and melatonin can potentiate the cell death effect in lung adenocarcinoma, modulating the apoptosis and tumor suppression pathways. Therefore, the use of melatonin associated with this drug potentiates the expression of

molecules present in the apoptosis pathway and consequently, in future clinical trials, may be used as an adjuvant in an attempt to reduce the toxic effects of platinum-derived drugs, allowing a better prognosis and quality of life for patients.

Key words: Lung adenocarcinoma. Combined therapy. Cytotoxicity. Apoptosis. Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Págs.
Tabela 1 Mortalidade mundial estimada para ambos os sexos em todas as faixas etárias	15
Tabela 2 Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo	16
Tabela 3 Esquema terapêutico de pacientes com câncer de pulmão de acordo com o estadiamento TMN	20
Tabela 4 Estrutura química (A) e molecular (B) da cisplatina	21
Tabela 5 Esquema da via intrínseca e extrínseca da apoptose	25
Tabela 6 Efeito da cisplatina e melatonina na expressão de genes relacionados a apoptose (Bax, Bid e caspases 3 e 7) em comparação com o gene endógeno 18S, determinados por qRT-PCR na linhagem H1299	34
Tabela 7 Efeito da cisplatina e melatonina na expressão de genes relacionados a apoptose (P53 e Bcl-2) em comparação com o gene endógeno 18S, determinados por qRT-PCR na linhagem H1299	35
Tabela 8 Efeito da cisplatina e melatonina na expressão de genes relacionados a apoptose (Bax, Bid e caspases 3 e 7) em comparação com o gene endógeno 18S, determinados por qRT-PCR na linhagem A549	37
Tabela 9 Efeito da cisplatina e melatonina na expressão de genes relacionados a apoptose (P53 e Bcl-2) em comparação com o gene endógeno 18S, determinados por qRT-PCR na linhagem A459.....	38
Tabela 10 Representação esquemática da via de ativação de morte em células tumorais pulmonares a partir do tratamento com cisplatina e melatonina.....	39

LISTA DE TABELAS

	Págs.
Tabela 1 Métodos de detecção precoce do câncer de pulmão.....	19
Tabela 2 Doses determinadas para a linhagem H1299 e A549 utilizadas no estudo.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALK	Anaplastic lymphoma kinase
APAF-1	Apoptotic protease- activating factor -1
ATCC	American type culture collection
BAK	BCL-2 antagonist killer 1
BAX	BCL-2 associated X protein
BCL-2	B-cell CLL/Lymphoma
BH	BCL-2 homology domain
BID	BH3-interacting domain death agonist
BRAF	Serine/threonine-specific protein kinase
CP	Câncer de pulmão
CPPC	Câncer de pulmão de pequenas células
CPNPC	Câncer de pulmão de não pequenas células
CASPASE	Cysteine-aspartic acid protease
CXR	Radiografia torácica
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Kinase signal-regulated
JNK	C-Jun N-terminal kinase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
P38	Mitogen activated protein kinase
TP53	Gene encodes a tumor suppressor protein
p53	Tumor suppressor protein
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
PTP	Poro de transição de permeabilidade
ROS	proto-oncogene tirosina/proteína-quinase
RTq-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
TC	Tomografia computadorizada
TNF	Tumor necrosis factor
VOC's	Corpos orgânicos voláteis

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PULMÃO	15
1.2 Tipos de Câncer de Pulmão	16
1.3 Manifestações Clínicas e Diagnóstico	18
1.4 Tratamentos	19
1.5 Cisplatina	21
1.6 Melatonina.....	23
1.7 Morte Celular Programada – Apoptose	24
1.8 GENES REGULADORES DE MORTE	25
1.8.1 Família BCL-2 (Bcl-2, Bax e Bid)	25
1.8.2 <i>Caspases 3 e 7</i>	26
1.8.3 <i>TP53</i>	26
2 OBJETIVOS	28
3 METODOLOGIA	29
3.1 TIPO DE LOCAL DO ESTUDO	29
3.2 Cultura celular	29
3.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA	30
3.4 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR	30
3.5 Análise Estatística	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Regulação dos genes apoptóticos e anti-apoptóticos pós-tratamento com quimioterápico cisplatina e a melatonina na linhagem H1299	32
4.2 Regulação dos genes apoptóticos e anti-apoptóticos pós-tratamento com quimioterápico cisplatina e a melatonina na linhagem A549	36
5 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão (CP) é o primeiro em todo o mundo em incidência entre os homens e o terceiro entre as mulheres, sendo uma das principais causas de mortes evitáveis devido à associação em maior número, com a exposição excessiva e prolongada do tabaco (ARAUJO et al., 2018; SILVA et al., 2019). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil foi estimado cerca de 30.200 novos casos de câncer de pulmão para cada ano do triênio 2020-2022. Desses, 17.760 em homens e 12.440 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,99 e 11,56 novos casos para cada 100 mil homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2020).

De acordo com as características das células neoplásicas, o CP é classificado em dois grandes grupos histológicos: o carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPCs) e o carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPCs). O CPNPC é constituído por três subtipos: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de células grandes que representam cerca de 85% dos casos, sendo considerados uma das principais causas de mortalidade no Brasil, com taxa de sobrevida em 5 anos de 15% (ALTORKI et al., 2018; ARAUJO et al., 2018; DE ALENCAR; FORMIGA; DE LIMA, 2020). A maioria dos casos de CPNPC são tratados com radioterapia, quimioterapia, cirurgia e terapias combinadas. No entanto, o tratamento também pode ser utilizado de forma individual dependendo do estadiamento e nível de evolução da doença (JORGE et al., 2021; MOTTÉ et al., 2021). O esquema terapêutico padrão utilizado no tratamento de primeira linha do CP possui derivados de platina (cisplatina ou carboplatina) em conjunto com etoposídeo. Sua ação é baseada na inibição da transcrição, replicação, produção de radicais livres, redução dos mecanismos de defesa antioxidantes e ativação da cascata das caspases 3 e 7, determinando a apoptose celular (ALDOSSARY, 2019; GHOSH, 2019).

Esse tratamento permite uma maior taxa de sobrevida aos pacientes com doença localizada ou até mesmo localmente avançada, porém resulta numa sobrevida mediana e sem perspectiva de cura para pacientes metastáticos, devido à resistência aos quimioterápicos (HOLOHAN et al., 2013). Isso contribuiu para o aumento de doses de cisplatina nos protocolos de tratamento mais recentes (GHOSH, 2019). No entanto, seus efeitos colaterais graves permanecem como uma limitação para sua ampla

utilização, especificamente a ototoxicidade e a genotoxicidade que tendem a agravar os efeitos adversos do medicamento (PERES; JÚNIOR, 2013; CALLEJO et al., 2015;ALDOSSARY, 2019).

A melatonina é um hormônio derivado do triptofano, que tem sido utilizado no tratamento de doenças inflamatórias, crônicas e vários tipos de câncer, incluindo o CP, devido a sua capacidade antioxidante de reduzir a toxicidade da cisplatina. Estudos destacam os efeitos antitumorais da melatonina em diversos tipos de câncer, reduzindo a proliferação de células cancerosas em baixas concentrações, ou seja, a melatonina pode aumentar a eficácia da quimioterapia alvo devido aos efeitos citotóxicos que levam à apoptose das células neoplásicas (TORDJMAN et al., 2017; CHAO et al., 2019).

Este hormônio possui uma ação antimitótica oriunda da diminuição da expressão gênica intracelular, inibição da liberação e da atividade dos fatores de crescimento, atuando como molécula antiproliferativa (TORDJMAN et al., 2017; AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018; ARENDT, 2019), além de aumentar a expressão de *TP53* e *BAX* (FARHOOD et al., 2019; RUBIO-GONZÁLEZ et al., 2020) e diminuir a expressão de *BCL-2* regulando a razão *BAX/BCL-2* e modulando o ciclo celular (MOHSENI et al., 2012; RUBIO-GONZÁLEZ et al., 2020).

As proteínas pró-apoptóticas (Bax, BID, caspase 3 e 7), antiapoptótica (Bcl-2) e p53 (gene supressor tumoral) são importantes para a regulação da morte celular programada. Essas proteínas podem ser inibidas ou silenciadas pelas células tumorais. Logo, ter medicamentos que aumentem a expressão delas é de suma importância, pois a desregulação da expressão dessas proteínas pode promover a resistência das células a apoptose, estabelecendo a neoplasia (HONGMEI, 2012; YANG et al., 2017; SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019;OBENG, 2021).

Diante do efeito antioxidante da melatonina, espera-se avaliar o efeito da cisplatina associada à melatonina na modulação desses genes de morte celular, visando estabelecer novas perspectivas para a prevenção dos efeitos citotóxicos durante o tratamento quimioterápico com cisplatina, com vistas a futuras aplicações biomédicas e biotecnológicas. Considerando que embora a adoção dessas medidas já seja bem estabelecida na literatura para minimizar os efeitos nefrotóxicos e gastrointestinais, a ototoxicidade e a genotoxicidade ainda carece de estratégias eficazes para prevenção. Logo, estudos específicos que visam a ampliação de alternativas eficazes para o tratamento do câncer de pulmão, são necessários para

direcionar a terapia de precisão e aumentar a sobrevida desses pacientes.

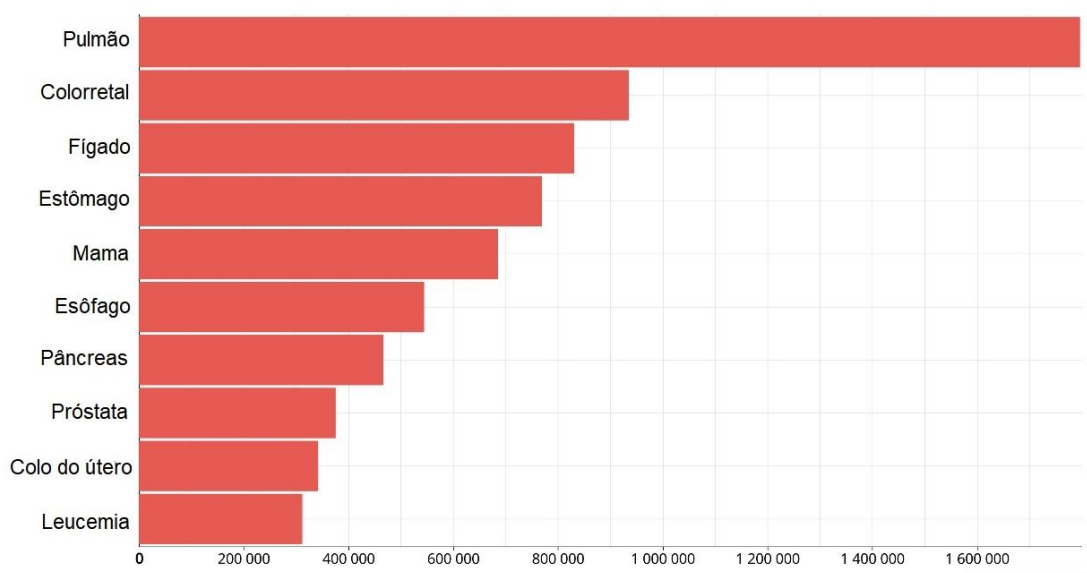
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PULMÃO

O câncer de pulmão (CP) é um tumor caracterizado pelas alterações dos mecanismos celulares naturais do pulmão, a partir de estímulos carcinogênicos que levam ao crescimento anormal e desordenado das células malignas (SIEGEL et al., 2022). O CP é o segundo mais comum no mundo com cerca de 2,21 milhões de casos (WHO, 2022). Entre as mulheres, ele é o terceiro mais comumente observado ficando abaixo apenas do câncer de mama e colorretal. Entretanto, é o primeiro mais frequente entre os homens, representando quase um terço de todos os outros tipos de neoplasias. As maiores taxas de incidência foram observadas na Micronésia, Polinésia, em países do Leste Europeu e na América do Norte (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2018).

Com base nas estimativas do Globocan, este tipo de câncer é responsável por mais de 1.700.000 mortes por ano, sendo considerado umas das principais causas de morte por câncer em 2020 (Figura 1) (IARC,2022).

Figura 1: Mortalidade mundial estimada para ambos os sexos em todas as faixas etárias.



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN (2020).

Para cada ano do triênio 2020-2022 foram estimados cerca de 30.200 novos casos de CP no Brasil. Desses, 17.760 em homens e 12.440 em mulheres (INCA

2020) (Figura 2). As regiões brasileiras com maior incidência de casos são as regiões Sul e Sudeste. No entanto as regiões Centro-Oeste e Nordeste também vêm apresentando número crescente de casos nos últimos anos. A estimativa para cada 100 mil habitantes no estado de Pernambuco é de aproximadamente 1.120 novos casos de CP (INCA, 2020). No índice mortalidade, no Brasil são registradas cerca de 30 mil mortes anuais por câncer de pulmão. É a neoplasia que mais mata no país com taxa de mortalidade de 82% (INCA, 2020).

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

. Fonte: INCA (2020).

Embora o tabagismo esteja comumente associado ao risco principal de desenvolvimento da neoplasia pulmonar, apenas 15% dos fumantes desenvolvem a doença, pois a proporcionalidade entre os casos pode estar relacionada à intensidade do fumo. Outros fatores de riscos incluem dieta inadequada, consumo de álcool, histórico familiar com outras neoplasias, doença pulmonar obstrutiva crônica, tuberculose, exposição ao amianto e radônio, mutações e exposição ambiental que podem estar associados às taxas mais altas dessa neoplasia (NASIM et al., 2019).

1.2 Tipos de Câncer de Pulmão

Histologicamente o câncer de pulmão é classificado em dois grandes grupos: o carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC), com 15%-20% dos casos, e o carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC), que representa cerca de 80-85% dos casos, e engloba vários subtipos: adenocarcinoma, carcinoma epidermóide (células escamosas) e o carcinoma de grandes células (LORTET-TIEULENT et al., 2014; PIRKER; FILIPITS, 2016).

A maioria dos adenocarcinomas são histologicamente heterogêneos, consistindo em dois ou mais subtipos histológicos representando cerca de 30 a 50%

do câncer de pulmão de não pequenas células. O carcinoma de células escamosas representa cerca de 20% dos casos. Este localiza-se na porção mais central do pulmão, e sua incidência diminuiu nas últimas décadas, provavelmente devido a mudanças no comportamento em relação ao tabagismo. Já o carcinoma de grandes células é o menos frequente com cerca de 3% dos casos. Este subtipo não possui diferenciações histológicas específicas e localiza-se periféricamente com características volumosas de aparência necrótica (ZHENG, 2016).

Em um estudo realizado por Okamoto. e colaboradores (2006) foi observado que a sobrevida global em 5 anos para pacientes com adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes foi de 54,2%,40,2% e 52,6%, respectivamente. Também foi observado nesse estudo que pacientes com adenocarcinoma tinha sobrevida significativamente melhor do que pacientes com carcinoma escamoso no estágio I, enquanto que os com carcinoma de células escamosas obtinham sobrevida melhor no estágio II.

Pacientes com carcinoma de pequenas células (CPPC) possuem características clínicas distintas, apresentando quadro clínico agressivo com frequentes metástases. Pacientes metastáticos possuem uma taxa de sobrevida em dois anos inferior a 10% e com recorrentes recidivas. Pacientes com CPPC não tratados em estágio limitado e estágio extenso têm uma sobrevida mediana de 3 e 1,5 meses, respectivamente. Com quimioterapia combinada e radioterapia torácica, a sobrevida média é melhorada para 10 a 16 meses para pacientes com doença em estágio limitado, e 6 a 11 meses para aqueles com estágio avançado da doença (TRAVIS, 2002).

Diante das características apresentadas por esses subtipos histológicos de pulmão, às vezes a distinção entre eles pode ser difícil, principalmente nos casos pouco diferenciados e naqueles em que histologias diferentes podem ser evidenciadas na mesma lesão (NOVAES et al., 2008). Por isso, a precisão na classificação desses grupos é importante para definir o prognóstico, estadiamento e tratamento.

1.3 Manifestações Clínicas e Diagnóstico

Em relação às manifestações clínicas, os tumores localizados na região central do pulmão produzem tosse, ruído ventilatório, hemoptise e sinais relacionados à obstrução de vias aéreas como pneumonite pós-obstrutiva, dispnéia, febre e tosse produtiva. Já os tumores pequenos e confinados na região periférica, têm maiores chance de serem assintomáticas ocasionalmente, tosses e dor pleurítica podem ser evidenciadas. Com o desenvolvimento de metástase, o comprometimento pleural pode ocorrer em aproximadamente 15% dos pacientes no estágio inicial, e 50% dos pacientes com neoplasia disseminada, desenvolvendo derrame pleural durante o curso da doença (MINAMI et al., 2001).

O diagnóstico do câncer de pulmão é estabelecido em conformidade com os critérios de classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), uma vez que a maioria das opções de tratamento disponíveis é baseada nas características histológicas (RECK; RABE, 2017). Na maioria dos casos, o diagnóstico ocorre nos estágios avançados da doença, o que reduz a possibilidade de cura dos pacientes.

Por se tratar de uma patologia de crescimento acelerado e associada ao desenvolvimento de metástases, o diagnóstico deve ser realizado o mais precocemente possível, visando o aumento da sobrevida desses pacientes. O diagnóstico pode ser feito através de raio-X de tórax ou tomografia por emissão de pósitrons (PET), para visualização de alterações pulmonares. Análise citológica do escarro, punção aspirativa por agulha fina ou biópsia e coleta de material para análise microscópica também podem ser realizados (THAKUR; SINGH; CHOUDHARY, 2020). Além disso, técnicas de rastreamento através de compostos orgânicos voláteis (VOC'S) presentes no soro, sangue e urina que podem ser utilizadas na detecção de biomarcadores de diversos tipos de neoplasias, incluindo o câncer de pulmão (Tabela 1) (THAKUR; SINGH; CHOUDHARY, 2020; HARÐARDOTTIR, 2022).

Apesar do avanço dessas técnicas de rastreamento, pequenas limitações em relação à detecção do CP ainda podem ser observadas devido à heterogeneidade da doença, as diferenças entre os subtipos histológicos e estadiamento da doença (GROOME et al., 2007). Por isso, a detecção de novos biomarcadores é fundamental para auxiliar no diagnóstico precoce, preciso, e menos invasivo, para determinar o, prognóstico e a escolha da terapia.

Tabela 1: Métodos de detecção precoce do câncer de pulmão.

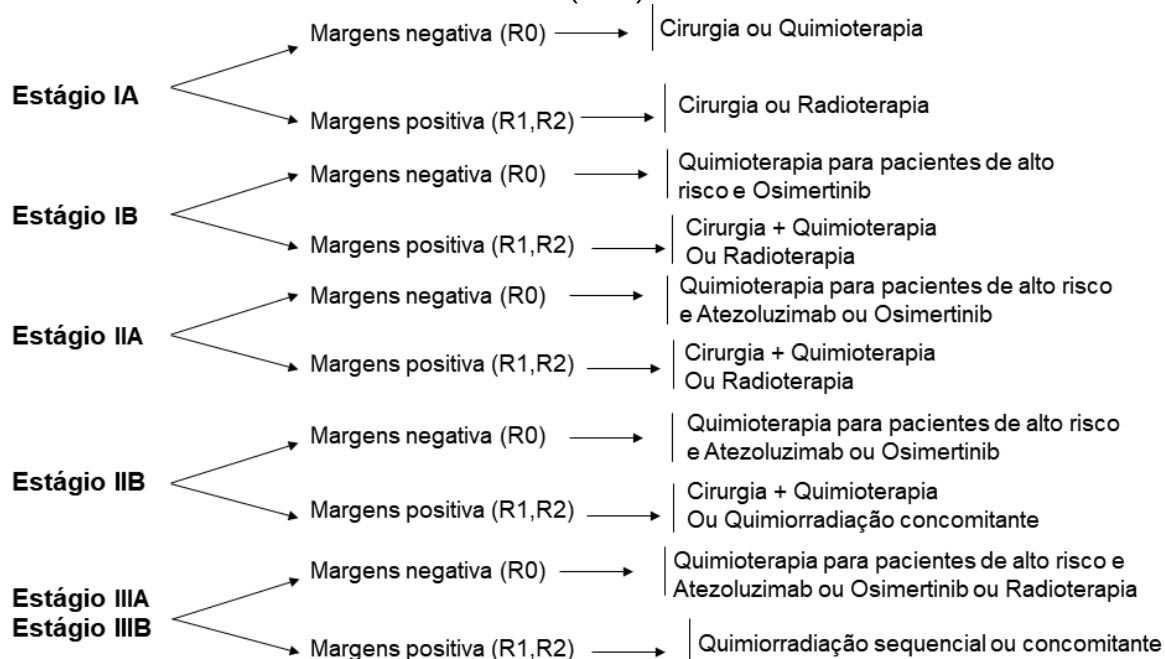
Método	Nível de detecção	Marcadores
Análise da respiração	Molecular	Compostos orgânicos voláteis e não voláteis
TC's	Tecidual	Tecido neoplásico
CXR's	Tecidual	Tecido neoplásico
PET	Tecidual	Tecido neoplásico
Teste do escarro	Celular ou Molecular	Células anormais e metilações de genes promotores
Teste de Urina	Molecular	VOC's
Teste de Soro	Celular ou Molecular	Células tumorais circulantes, DNA circulante, Proteínas plasmáticas;

***TCs**: tomografia computadorizada; **CXR'S**: radiografia de tórax; **PET**: tomografia por emissão de pósitrons; **VOC's**: compostos orgânicos voláteis.

1.4 Tratamento

A conduta terapêutica deve ser definida pelo médico juntamente com uma equipe multiprofissional para analisar o histórico do paciente. O tratamento é definido de acordo com o diagnóstico, estadiamento da doença e o estado geral de saúde do paciente, e geralmente pode incluir mais de uma opção de terapia. Dentre as opções de tratamento para o câncer de pulmão temos cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo e/ou uma combinação dessas opções (Figura 3) (ROSENBERG, 2011; TAN & TAN, 2022).

Figura 3: Esquema terapêutico de pacientes com câncer de pulmão de acordo com o estadiamento(TMN).



***Atezolumib** : Anticorpo monoclonal, inibidor de checkpoint de morte celular programada 1 (PD-1);

***Osimertinib** : Inibidor de tirosina quinase do EGFR.

Fonte : Adaptado de ETTINGER et al., 2020.

Quando a doença é localizada, o tratamento consiste em cirurgia e/ou quimioterapia, acompanhado ou não de radioterapia. Casos onde há comprometimento dos pulmões e linfonodos, o tratamento combinado (quimioterapia e radioterapia) é preconizado. Já os pacientes com doença avançada ou metastática o tratamento é baseado em quimioterapia associada à radioterapia, e em alguns casos terapia-alvo (HARÐARDOTTIR, 2022; INCA, 2021).

A cirurgia é o principal tratamento para o CP nos estágios iniciais I e II. Elas podem ser de três formas, segmentectomia e ressecação em cunha (quando uma pequena parte do pulmão é removida), lobectomia (todo o lobo pulmonar afetado pelo tumor é removido) e pneumectomia (remoção completa do pulmão) (ETTINGER et al., 2020).

Para o tratamento sistêmico com terapias adjuvantes e neoadjuvantes, o esquema terapêutico a base de cisplatina ou carboplatina e o etoposido, e as terapias alvo são a primeira linha de escolha para pacientes com carcinoma pulmonar de não pequenas células avançado e localmente avançado. Pacientes com tumores avançados, metastáticos ou recorrentes sem mutações identificáveis, as opções quimioterápicas de segunda linha incluem drogas antiangiogênicas e imunoterápicas

(MARY V. GRAHAM; ROGER W. BYHARDT; WILLIAM T. SAUSE; WALTER J. CURRAN, 2017).

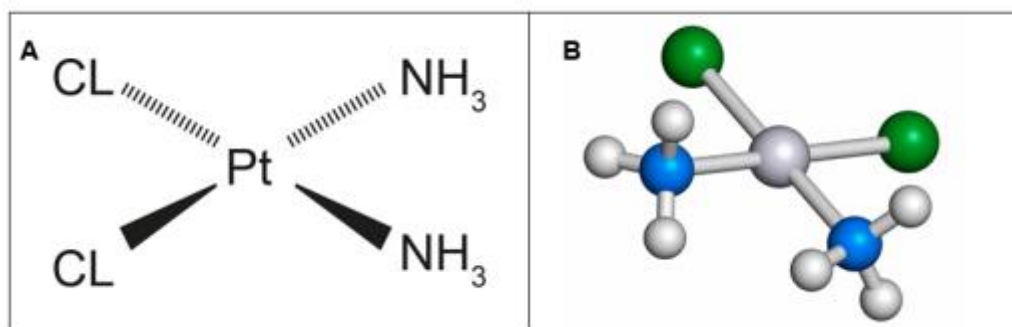
Pacientes que apresentam alterações genéticas em genes específicos a terapia-alvo pode ser a melhor opção terapêutica para esses casos. Esse é um tipo de tratamento que usa drogas para atacar especificamente as células neoplásicas, minimizando os danos às células normais. A principais terapia-alvo relacionadas ao CP incluem mutação no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), translocação da quinase de linfoma anaplásico (ALK), translocação do proto-oncogene tirosina-proteína quinase (Ros1) e mutações no gene BRAF (LOPES; VATTIMO; DE CASTRO JUNIOR, 2015).

A categoria mais nova de tratamento no câncer de pulmão é a imunoterapia. Ela utiliza medicamentos que estimulam o sistema imune do paciente a reconhecer as células neoplásicas e destruí-las de forma mais eficaz, prolongando a vida dos pacientes e reduzindo os efeitos colaterais provenientes dos demais tratamentos (HARÐARDOTTIR, 2022). Identificar as particularidades de cada tipo de câncer de pulmão é crucial para compreender as estratégias terapêuticas mais adequadas e reduzir os efeitos de toxicidade desse tipo de tratamento e melhorar a qualidade de vida desses pacientes (INCA, 2021).

1.5 CISPLATINA

A cisplatina ou cis-diaminedichloroplatinum (II) é um composto inorgânico simples que possui íons de platina duplamente carregados e cercados por quatro ligantes. Esses ligantes de amina formam interações mais fortes com o íon de platina, e os ligantes de cloreto ou compostos carboxilatos deixam os grupos de platina para formar laços com bases de DNA (Figura 4) (PABLA; DONG, 2008).

Figura 4: Estrutura química (A) e molecular (B) da cisplatina.



Fonte : Adaptado de DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014

A cisplatina foi o primeiro composto de platina aprovado pela FDA para tratamento de câncer em 1978 (KELLAND, 2007). Desde então tem sido clinicamente aprovada por apresentar eficácia na atividade anticancerígena em diversos tipos de tumores como carcinoma pulmonar de não pequenas células, de ovário, testículos e tumores sólidos de cabeça e pescoço (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014).

A atividade antineoplásica da cisplatina consiste basicamente na sua ligação ao centro reativo N7 de resíduos de purina, levando a formações de ligações cruzadas, causando danos ao DNA das células cancerosas e bloqueando a síntese de proteínas e divisão celular. Como consequência, as células podem iniciar um sistema de autodefesa ativando ou silenciando uma variedade de genes diferentes, que podem resultar em alterações epigenéticas e/ou genéticas levando a apoptose (PABLA; DONG, 2008).

O efeito citotóxico da cisplatina é resultado de sua ligação ao DNA, com formação de adutos, originando ligações intra e intercadeias que induzem alterações estruturais. O mecanismo de ação do fármaco é, portanto, relacionado à inibição da transcrição e replicação, induzindo a apoptose das células tumorais. Sua atuação envolve ainda a produção de radicais livres, a redução dos mecanismos de defesa antioxidantes e a ativação da cascata das caspases, determinando apoptose celular

Ao longo dos anos vem sendo observado o aumento da resistência dos tumores a esse quimioterápico, tornando necessário o aumento da dosagem usualmente aplicada para garantir um efeito terapêutico adequado, o que tende a agravar os efeitos adversos da cisplatina (JORDAN; CARMO-FONSECA, 2000; REBILLARD; LAGADIC-GOSSMANN; DIMANCHE-BOITREL, 2008). Dentre os principais efeitos adversos desencadeados pelo uso da cisplatina temos a ototoxicidade, genotoxicidade e nefrotoxicidade que por muitas vezes limita a sua utilização (CEPEDA et al., 2007).

Diante desses efeitos colaterais apresentados pelo uso desse quimioterápico, a terapia combinada da cisplatina com outras moléculas contra o câncer vem sendo considerada como uma alternativa estratégica nos esquemas terapêuticos, a fim de reduzir a resistência e a toxicidade aumentando a eficácia clínica (LV et al., 2021).

1.6 MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio derivado do triptofano, produzido naturalmente pelo organismo que desempenha papel importante na regulação do ciclo circadiano, além de promover o bom funcionamento do corpo devido ao seu efeito modulador e sua ação antioxidante (TALIB, 2018; WANG et. al., 2018).

Devido a essa capacidade, ela é capaz de reduzir os efeitos adversos induzidos pela cisplatina, aumentando a eficiência do tratamento através de mecanismos citotóxicos que levam a apoptose das células neoplásicas. A melatonina apresenta ação antimitótica resultante da redução da expressão gênica intranuclear e da inibição da liberação da atividade dos fatores de crescimento, atuando como molécula antiproliferativa (REITER; TAN; GALANO, 2014).

A melatonina pode regular a apoptose em vários tipos de câncer, por múltiplos mecanismos. A via das caspases possui papel essencial na regulação da iniciação, transdução e promoção de sinais apoptóticos. Evidências sugerem que o tratamento com melatonina é capaz de induzir a apoptose, pela expressão elevada do gene p53, resultando numa parada no ciclo celular na fase G2 (PAN et al., 2015). Outros membros importantes de genes relacionados à apoptose são BCL-2 e BAX (PAN et al., 2014). A melatonina aumenta a expressão de Bax e diminui a de BCL-2 (ALONSO-GONZALEZ et al., 2017; XU et al., 2014), regulando a razão BAX/BCL-2 (SANCHEZ et al., 2018).

Estudos apontam o papel positivo da melatonina na prevenção e no tratamento de diversos tipos de câncer como mama, próstata, rim e pulmão, onde foi observada uma redução das taxas de remissão de tumor, na sobrevida e nos efeitos colaterais específicos do tratamento de pacientes que usaram melatonina durante a quimioterapia ou radioterapia (LOTTI, 2008).

Em modelos animais a melatonina foi capaz de exercer efeito protetor da função renal, reduzindo a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina, além de atuar na prevenção da toxicidade e na ototoxicidade induzidas por esse composto (CUTANDO et al., 2012). Essas características demonstram que a melatonina pode ser usada como tratamento adjuvante para alguns tipos de neoplasias pela capacidade de minimizar os efeitos de toxicidade induzidos durante o tratamento quimioterápico, aumentando a eficácia do esquema terapêutico e melhorando a qualidade de vida desses pacientes (CUTANDO et al., 2012).

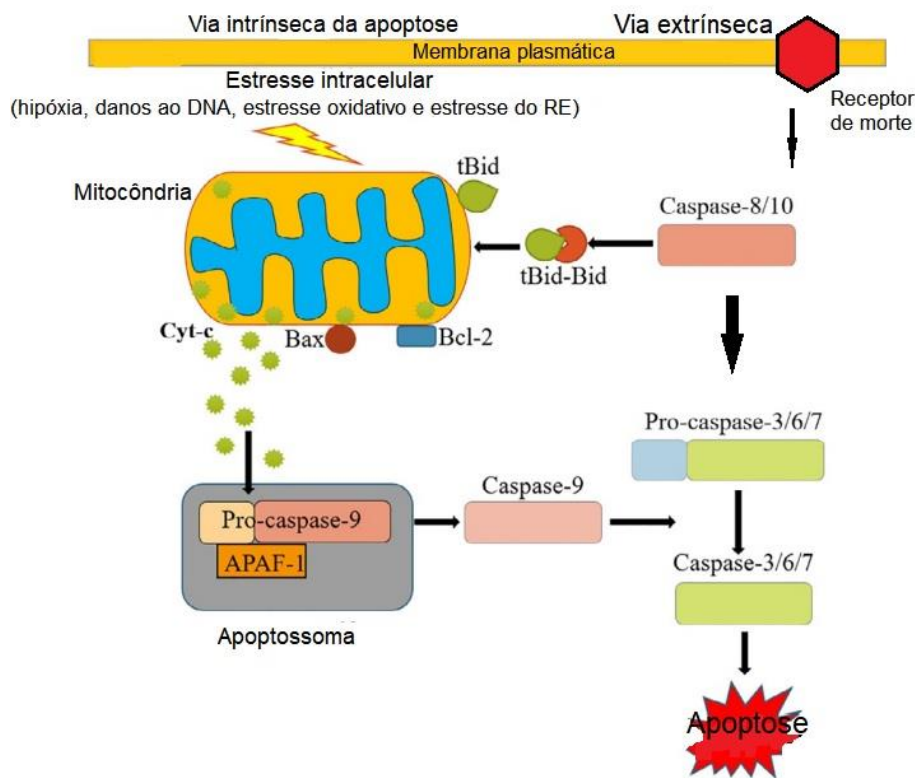
1.7 MORTE PROGRAMADA – APOPTOSE

A apoptose é um processo biológico natural de morte celular programada em que as células se destroem para manter o bom funcionamento do corpo. Ela desempenha funções importantes em diversos processos fisiológicos normais como embriogênese, homeostase do tecido adulto, condições fisiopatológicas e no câncer. Para que esse mecanismo ocorra, é necessária a ativação de vias de sinalização distintas, via extrínseca (via dos receptores de morte) e intrínseca (via mitocondrial) (MORANA; WOOD; GREGORY, 2022).

A via extrínseca é mediada por estímulos externos. A sequência de eventos começa quando sinais de morte ligam-se aos receptores presentes na membrana da célula denominados como TNF tipo 1 e os receptores Fas. O complexo formado pelo ligante/receptor de morte leva à ativação das caspases iniciadoras -8 e -10 que estimula a ativação da caspase -3 (Figura 5) (JOHN; WALSH, 2008; KASHYAP; GARG; GOEL, 2021;)

A via intrínseca ou via mitocondrial é iniciada por estímulos internos que podem induzir perda do potencial de membrana mitocondrial (PMM) tornando-a mais permeável, para que haja a liberação para o citoplasma de moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo C. A liberação desses fatores, acarreta a ativação de um complexo chamado apoptossoma. Neste complexo, irá conter o fator ativador de protease apoptótica 1 (APAF1) e a pró-caspase 9. Este último, será clivado em caspase 9 que ativará as caspases de via executora, como caspase 3, 6 e 7 induzindo a apoptose (ELMORE, 2007; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007).

Figura 5: Esquema da via intrínseca e extrínseca da apoptose.



Fonte: Adaptado de KASHYAP; GARG; GOEL, 2021.

Os membros da família BCL-2 se dividem em pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim e Hrk) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1) (BORUTAITE, 2010). Essas proteínas são os principais mediadores para ativação dessa via, pois desempenham papel crítico na regulação da apoptose em condições fisiológicas ou patológicas (ELMORE, 2007).

1.8 GENES REGULADORES DE MORTE

1.8.1 Família BCL-2 (Bcl-2, Bax e Bid)

A família BCL-2 é dividida em três grupos com base na sua função primária: proteínas com atividade anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1, BFL-1/A1), as pró-apoptóticas (BAX, BAK, BOK) e proteínas pro-apoptóticas somente com domínio de homologia BH3 (BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA, PUMA, etc.) (KALE; OSTERLUND; ANDREWS, 2018). Evidências sugeriram que todas as vias principais de morte celular por apoptose estão interconectadas, e neste contexto, proteínas da família Bcl-2 desempenham um papel regulador nesse processo (SIDDIQUI; AHAD; AHSAN, 2015).

As proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas previnem a apoptose bloqueando etapas importantes na ativação de caspases. Duas hipóteses parecem estar relacionadas a

essa capacidade: a primeira propõe que após os sinais de morte, as moléculas pró-apoptóticas iriam se translocar para regiões da mitocôndria onde anteriormente moléculas anti-apoptóticas já residiam. A segunda seria relacionada à redução da diferença no potencial da membrana mitocondrial, promovendo o efluxo de íons H^+ e impedindo a ruptura da membrana externa. Além disso, um estudo revela que a proteína Bcl-2 anti-apoptótica se liga ao complexo apoptossoma e sequestra caspases inibindo a via de ativação intrínseca (SIDDIQUI; AHAD; AHSAN, 2015)

A indução de estímulos internos permite que a proteína Bax forme um complexo multiproteico denominado poro de transição de permeabilidade (PTP) com a finalidade de criar uma abertura que atravessasse ambas as membranas mitocondriais até que a membrana externa se rompa. Esse processo ativa uma cascata de reações induzindo a morte celular por apoptose (SIDDIQUI; AHAD; AHSAN, 2015).

A proteína Bid contém o domínio BH3, que confere a ela forte afinidade pela multirregião de proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak. Portanto, essas proteínas são chamadas de ativadoras e permitem que o organismo induza a apoptose de forma seletiva. Por outro lado, as demais proteínas com domínio BH3 são chamadas de sensibilizadoras e podem se ligar tanto a proteínas pró-apoptóticas quanto anti-apoptóticas, sequestrando Bax e Bak acopladas à membrana (SIDDIQUI; AHAD; AHSAN, 2015).

1.8.2 Caspases 3 e 7

As Caspases são uma família de endoproteases dependentes de cisteína, responsáveis por hidrolisar seus substratos. O processo de autoativação é induzido pela proximidade e impulsionado por alterações conformacionais desencadeadas por dimerização que levam à excisão proteolítica das regiões flexíveis (VAN OPDENBOSCH; LAMKANFI, 2019). As caspases 3 e 7 são homólogas e além de serem a forma ativa da pro-caspase 3 e 7, respectivamente. Constituem um papel chave na cascata de ativação da apoptose (FAN et al., 2005).

1.8.3 Gene Tp53

TP53 é um gene responsável por codificar a proteína supressora de tumor p53, comumente denominada de "Guardião do Genoma". A proteína p53 é um fator de transcrição que controla processos biológicos importantes de acordo com o tipo de entrada de sinal de estresse celular, de danos ao DNA e estresse de replicação. Em

resposta a esses estresses, a p53 sofre modificações que promovem a transcrição de genes envolvidos em respostas celulares específicas de acordo com o tipo de estresse. Geralmente ela está envolvida em processos de prisão do ciclo celular, senescência, reparo de DNA e apoptose (HERNÁNDEZ BORRERO; EL-DEIRY, 2021). O gene que codifica essa proteína é frequentemente mais mutado em diferentes tipos de neoplasias, representando cerca de mais de 50% de todos os cânceres humanos (LIU et al., 2019). Além disso, 34% dos pacientes com CPNPC possuem mutação do *TP53*, incluindo a “mutação de ganho de função” pró-oncogênica, causando a desregulação de múltiplas cascatas de sinalização, como as das vias apoptóticas (KRYCZKA et al., 2021).

Nesse contexto, estratégias vêm sendo buscadas para otimizar esquemas terapêuticos. Nessa perspectiva, a melatonina vem se destacando no tratamento de alguns tipos de câncer devido a seu efeito antioxidante, capaz de reduzir a ototoxicidade e a genotoxicidade causada pela cisplatina. No entanto, a capacidade de interferência do efeito combinado das drogas sobre a regulação da expressão de genes relacionados às vias de morte celular ainda não foi esclarecida.

Partindo dessa premissa, a pesquisa emerge visando estabelecer novas perspectivas para a prevenção dos efeitos citotóxicos durante o tratamento quimioterápico com cisplatina, com vistas a futuras aplicações biomédicas e biotecnológicas, considerando que embora a adoção destas medidas, já bem estabelecidas na literatura, consiga minimizar os efeitos nefrotóxicos e gastrointestinais, a ototoxicidade e a genotoxicidade ainda carecem de estratégias comprovadamente eficazes para prevenção.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da cisplatina e melatonina isoladas e associadas na modulação de genes de morte celular em câncer de pulmão.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da cisplatina isolada e associada à melatonina em linhagem de adenocarcinoma pulmonar metastático H1299 contendo deleção parcial do gene *TP53*;
2. Investigar o efeito da cisplatina isolada e associada à melatonina em linhagem de adenocarcinoma pulmonar A549;
3. Analisar o efeito do tratamento combinado na expressão dos genes da via pró e anti apoptóticas.

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO E LOCAL DO ESTUDO

Esse é um estudo do tipo experimental e analítico. As linhagens tumorais H1299 e A549 (adenocarcinoma de pulmão) foram utilizadas, obtidas do banco de células do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêutica (NUPIT-SG) da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

3.2 Cultura celular

As linhagens de carcinoma pulmonar de não pequenas células H1299 e A549, foram cultivadas respectivamente em meio RPMI 1640, DMEN-F12 suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal – a depender das especificações da linhagem, 10 mM de HEPES e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina em estufa de CO₂ 5% a 37°C. As células foram semeadas em placas de 6 poços (3x10⁵ /poço) e após atingirem uma confluência de 70%, foram submetidas por 6 horas às concentrações de cisplatina (Accord®), melatonina (Sigma-Aldrich®) e cisplatina associada a melatonina. Para melhor entendimento e avaliação do comportamento de ambas as linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar, foi realizado previamente no projeto de iniciação científica, o ensaio de viabilidade através do método colorimétrico MTT. Os valores obtidos a partir do IC₅₀ da cisplatina foram de 40µM ± 4,89 para linhagem H1299 e 33µM ± 2,97 para A549. Para a melatonina, foi escolhida a dose de 100µM em ambas as linhagens (Tabela 2).

Tabela 2: Doses determinadas para a linhagem H1299 e A549 utilizadas no estudo.

Linhagem	Cisplatina	Melatonina
H1299	40µl	100µl
A549	33µl	100µl

O Trizol® (Invitrogen, UK) foi adicionado às células pós-tratamento com cisplatina e melatonina e logo em seguida, armazenadas em freezer a -80°C até a realização da extração do RNA.

3.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA

Para iniciar a etapa de extração, as amostras foram expostas a temperatura ambiente durante 5 minutos para promover a completa dissociação do complexo de proteínas do núcleo. Após o degelo, foi adicionado as amostras 150ul de clorofórmio e em seguida foram homogeneizadas e submetidas a uma centrifugação de 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a primeira centrifugação, a solução aquosa localizada no sobrenadante (onde encontra-se o RNA) foi transferida para um novo eppendorf no qual foi adicionado 375uL de isopropanol a 100%. A amostras foram incubadas em freezer a -80°C por 2 horas. Em seguida as amostras foram descongeladas por 10min a temperatura ambiente e depois centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C para a precipitação do pellet. Depois o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado com 750uL de etanol a 75%, e centrifugado a 7500rpm durante 5min a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado, e os tubos colocados para secar durante pelo menos 3 horas. Depois as amostras foram ressuspensas com 30uL de água RNase free e incubadas em banho seco por 10-15 min a 55°C. O material obtido foi quantificado no Nanodrop® (ThermoFisher) e armazenado a -80°C.

Para a síntese do cDNA, foi realizada a 500ng de RNA utilizando o kit de transcrição reversa cDNA Hight Capacity (AppliedBiosystems) seguindo as recomendações do fabricante.

3.4 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

A expressão genética foi realizada pela reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizando o método TaqMan (AppliedBiosystems) em um termociclador QuantStudio™ 5 (AppliedBiosystems). As condições de ciclagem foram de 95°C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C a 3 seg e 60°C por 20 seg. O gene 18S (Hs03003631_g1) foi usado como controle endógeno. A expressão relativa do RNA foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os genes *BAX* (Hs00180269_m1), *BID* (Hs00609632_m1), *BCL2* (Hs00608023_m1), *TP53* (Hs01034249_m1), *CASP3* (Hs00234387_m1) e *CASP7* (Hs00169152_m1) foram avaliados.

3.5 Análise Estatística

A expressão dos resultados das variáveis contínuas foi realizada por média e desvio-padrão. Para verificar possíveis diferenças entre os meios, foi utilizado o teste "t" do Student para amostras independentes, quando a distribuição foi gaussiana. Nos casos em que o conjunto amostral não passou no teste de normalidade, foi utilizado o teste t não paramétrico de Mann-Whitney. O software utilizado para essas análises foi o GraphPad Prism 5.

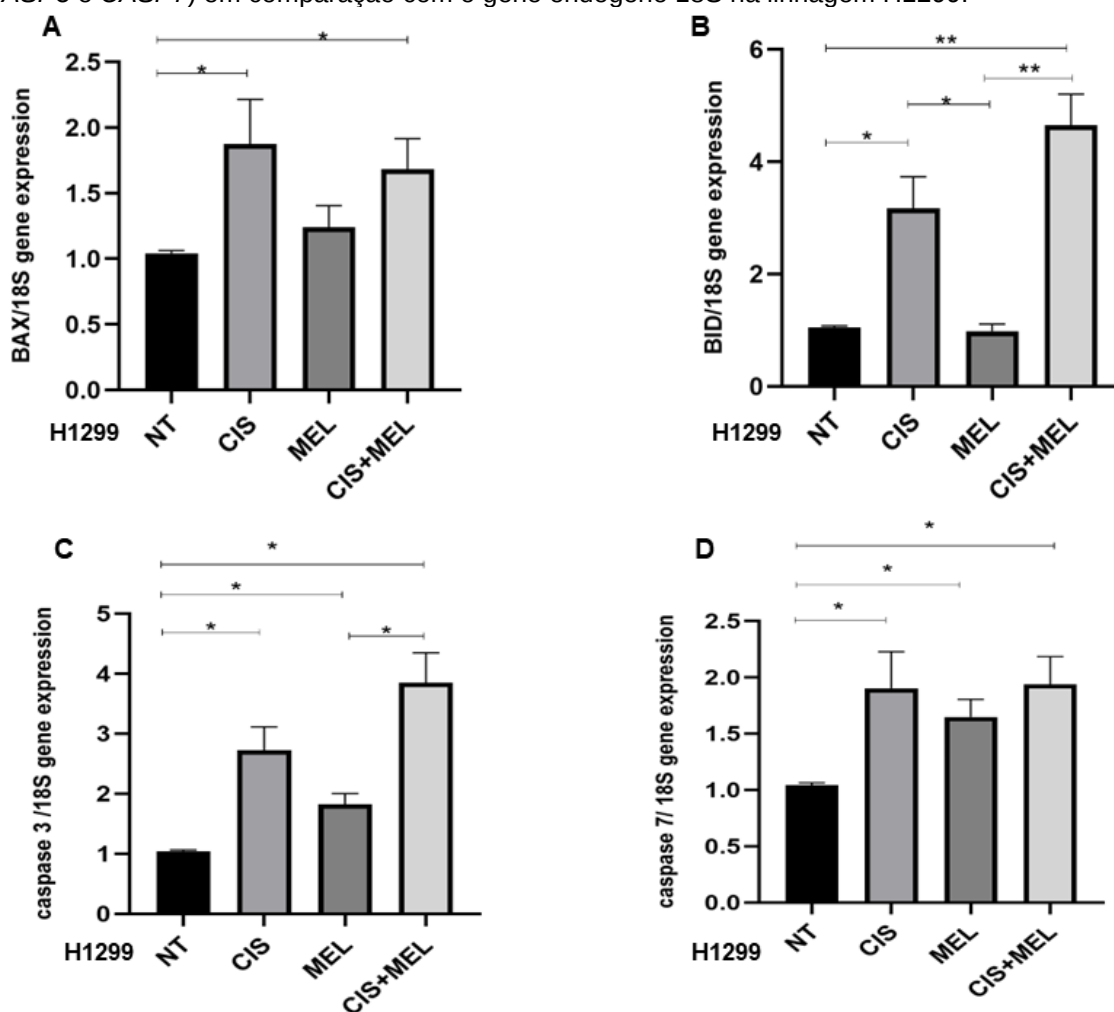
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Regulação dos genes apoptóticos e anti-apoptóticos pós-tratamento com quimioterápico cisplatina e a melatonina na linhagem H1299

Para confirmar se o tratamento feito com cisplatina e melatonina modulam a via de sinalização da apoptose no carcinoma pulmonar, foi realizado ensaios de RTq-PCR e feita a análise dessas expressões. Na figura 6 (A, B, C e D), é possível observar que tanto o tratamento com cisplatina, como cisplatina associada a melatonina, modulam positivamente a expressão dos genes *BAX*, *BID* e *CASP3* e *CASP7* em relação às células não tratadas ($p^* < 0,05$; $^{**}p < 0,01$). Portanto, pode-se observar um aumento sinérgico tanto para *BID*, quanto *CASP3* após associação da melatonina ao quimioterápico cisplatina. Contudo, no tratamento com a melatonina isolada, não houve diferença significativa na expressão de *BAX*, *BID* e *CASP3*.

A quimioterapia baseada na cisplatina é comumente utilizada no tratamento padrão de carcinoma pulmonar de pequenas e não pequenas células. Entretanto, Dasari e Tchounwou (2014) relataram que o estresse genotóxico gerado por este fármaco, ativa múltiplas vias de transdução de sinal, o que pode contribuir não só para apoptose, mas também para toxicidade sistêmica ou resistência ao tratamento. Em paralelo, foi revelado que a melatonina reduz os danos oxidativos liberados aos componentes celulares ao mesmo tempo em que ela também provoca a apoptose mediada por mitocôndrias em células de carcinoma colorretal, resultando no aprimoramento da apoptose pela produção de superóxido e consequentemente indução do estresse oxidativo, ativando diretamente proteínas da via intrínseca da apoptose. Plaimée e colaboradores (2015), avaliaram a combinação do tratamento da melatonina com cisplatina em células SK-LU-1, uma linhagem de adenocarcinoma pulmonar sensível à cisplatina com semelhanças morfológicas a H1299 além de apresentar o gene K-Ras mutante. Neste estudo, foi possível avaliar o aumento da atividade das *caspases* 3 e 7 em comparação ao uso da cisplatina isolada, indicando uma ativação aprimorada da via apoptótica. Esse resultado foi semelhante ao encontrado na figura 6, confirmando assim, o aumento do envolvimento de *caspases* e consequentemente, das demais moléculas envolvidas na cascata de ativação da apoptose quando submetidas ao tratamento concomitante de melatonina e cisplatina.

Figura 6: Efeito da cisplatina e melatonina na expressão de genes relacionados a apoptose (*BAX*, *BID* e *CASP3* e *CASP7*) em comparação com o gene endógeno 18S na linhagem H1299.



Os dados dos gráficos são da média $\pm$ o desvio padrão da duplicata de dois experimentos independentes (*P < 0,05; **P < 0,01); NT: Não tratado.

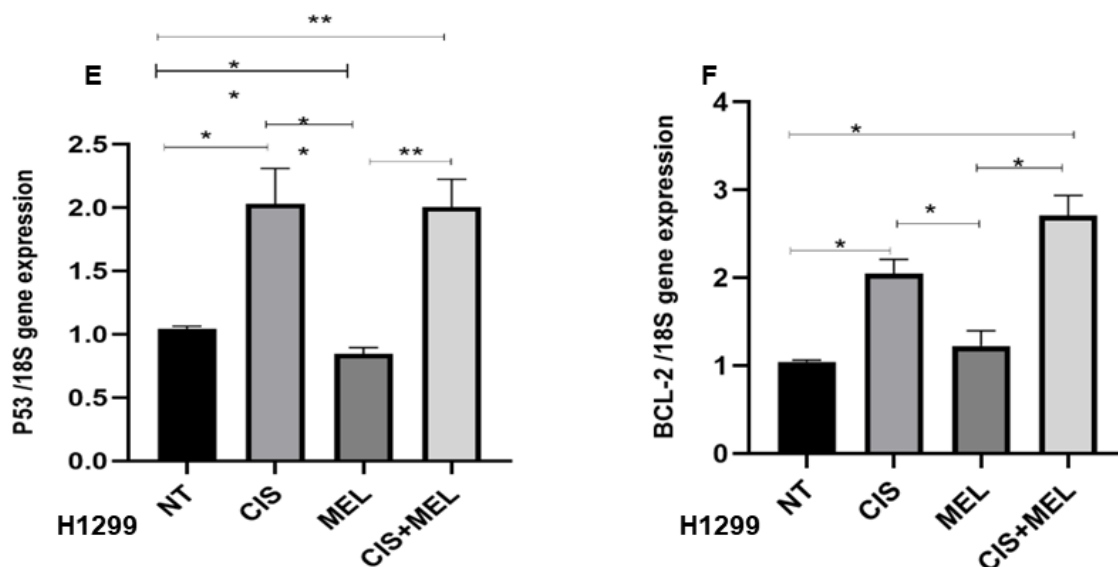
É importante destacar que a melatonina isolada modulou significativamente apenas a expressão da *CASP7* (figura 6D). A caspase-3 e a caspase-7 são ambas ativadas universalmente durante a apoptose, independentemente do estímulo específico de iniciação de morte celular, e ambas as proteases são responsáveis por clivar uma gama de substratos proteicos. Contudo, um estudo elaborado por Brentnall e colaboradores (2013), sugeriu que a *CASP3* e *CASP7* poderiam ter funções distintas, pois camundongos com deficiência nessas proteases obtinham fenótipos distintos e atividade diferencial. Em conjunto, no estudo *in vitro* em fibroblastos embrionários de camundongo, identificaram que a retirada da *CASP7* no soro não influenciou na morte celular, ao contrário da *CASP3*. Em contraste, observaram que a *CASP7* estava intimamente ligada ao desprendimento celular durante a morte

intrínseca, sugerindo que a *CASP3* é a caspase executora dominante da via intrínseca de morte celular programada, enquanto a caspase-7 pelo desprendimento celular. Em semelhança, outro estudo realizado por Oroz-Parra e colaboradores (2016), eles observaram que a ativação das caspases 3 e 7 dependiam do tipo de célula, do estímulo usado e do tempo de tratamento para induzir a apoptose. Nesse mesmo estudo, as células H1299 apresentaram um tempo de ativação dessas proteases entre 6 e 12h após o tratamento com um peptídeo sintético.

Um dos mecanismos pelo qual a melatonina pode levar a indução da apoptose, é através da inibição da expressão da proteína MDM2 (ligase de ubiquitina E3), um importante regulador negativo do supressor de tumor *TP53*. Essa inibição confere à melatonina uma efetividade na via de morte celular, pela regulação positiva das caspases-3 e 7 e na p53 em células de câncer gástrico (MEHRZADI et al., 2021). Em contraste, apesar deste mecanismo, a figura 7E mostra que não houve modulação significativamente positiva da expressão de *TP3* nas células H1299 quando tratadas apenas com melatonina. Adicionalmente, vale destacar que esta linhagem celular contém uma deleção parcial homozigótica do gene *TP53* e consequente deficiência de sua expressão proteica total, prejudicando interações na sua via de morte celular (ATCC). O estudo feito por Feng e colaboradores (2020) identificou a correlação entre pacientes com adenocarcinoma pulmonar que tinham mutação do *TP53* e a apresentação de piores desfechos clínicos e mau prognóstico.

Na figura 7 é possível observar a diferença significativa da expressão positiva do gene *TP53* no tratamento com cisplatina e cisplatina combinada a melatonina, em relação ao controle (não-tratado). Possivelmente, a modulação da cisplatina à molécula p53 não foi prejudicada por causa de diversos mecanismos, em conjunto a ela, responsáveis pela indução da apoptose, como a ativação da quinase extracelular (ERK), da via JNK, e da proteína p38 MAPK (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014).

Figura 7: Efeito da cisplatina e melatonina na expressão de genes relacionados a apoptose (*TP53* e *BCL-2*) em comparação com o gene endógeno 18S na linhagem H1299.



Os dados dos gráficos são da média $\pm$ o desvio padrão da duplicata de dois experimentos independentes (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$); NT: Não tratado.

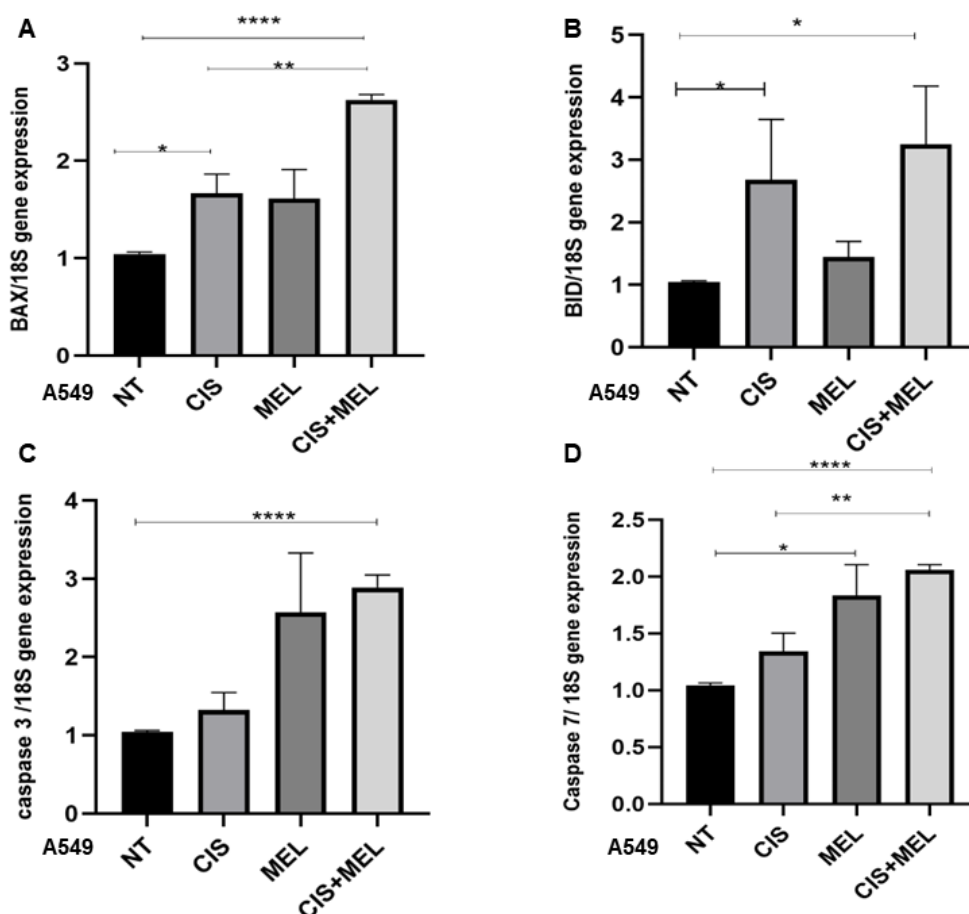
Na figura 7F, é possível observar um curioso aumento significativo da proteína anti-apoptótica Bcl-2 no tratamento com cisplatina isolada e concomitante à melatonina em relação a células não tratadas. Verificar se essa proteína é modulada no tratamento com quimioterápico cisplatina e cisplatina+melatonina, foi importante neste estudo, pois, na literatura, a ativação de membros da família pró-apoptótica Bax/Bak é essencial para a terapia do câncer. Entretanto, a elevação das proteínas familiares anti-apoptóticas Bcl-2 inibe a apoptose em células cancerosas através da heterodimerização com Bax/Bak impedindo a liberação de fatores pró-apoptóticos das mitocôndrias; isso poderia resultar na resistência das células cancerígenas à vigilância imunológica. Adicionalmente, condições como a hipóxia podem contribuir para esta regulação positiva anti-apoptótica em células tumorais além de reduzir a expressão de genes pró-apoptóticos (MEHRZADI et al., 2021).

Ensaio para avaliação da expressão proteica de Bcl-2 pelo método de western blotting, será crucial na avaliação final de sua modulação através do tratamento concomitante do quimioterápico à melatonina.

4.2 Regulação dos genes apoptóticos e anti-apoptóticos pós-tratamento com quimioterápico cisplatina e a melatonina na linhagem A549

Curiosamente, a linhagem A549 assumiu neste estudo um perfil mais sensível ao tratamento em relação à linhagem H1299. No ensaio de viabilidade celular, a concentração inibitória média (IC_{50}) da cisplatina apresentou menor valor para linhagem A549 do que para H1299, por exemplo. Da mesma forma, a figura 8 demonstrou que houve um aumento bastante significativo da expressão dos genes *BAX*, *BID* e *CASP3* e *CASP7* quando tratados com tratamento concomitante de cisplatina e melatonina (* $p < 0.05$; **** $p < 0,0001$). Adicionalmente, houve diferença significativa do aumento da expressão dos genes *Bax* e *CASP7*, quando tratado com melatonina e cisplatina, em relação ao quimioterápico isolado. Vale destacar que a melatonina, quando tratada de forma isolada, parece realmente modular apenas a *CASP7*, assim como ocorreu na linhagem H1299. Confirmando que seu efeito passa por ativação desta caspase.

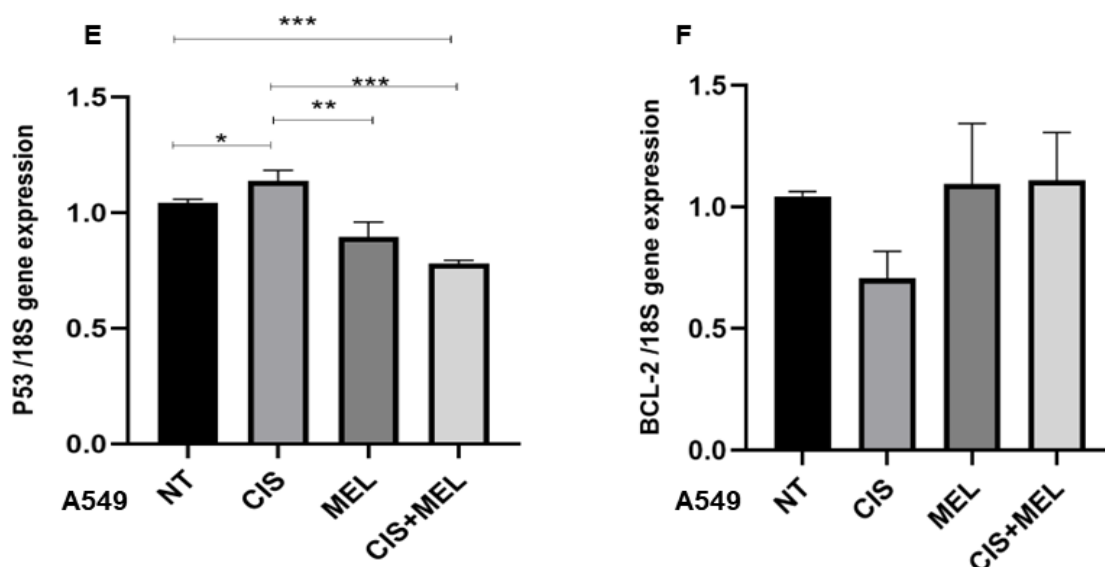
Figura 8: Efeito da cisplatina e melatonina na expressão de genes relacionados a apoptose (*BAX*, *BID* e *CASP 3* e *7*) em comparação com o gene endógeno 18S na linhagem A549.



Os dados dos gráficos são da média $\pm$ o desvio padrão da duplicata de dois experimentos independentes (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0001$); NT: Não tratado.

Os resultados demonstrados na figura 9 revelaram que houve maior expressão do gene *TP53* quando tratadas apenas com cisplatina. Em contrapartida, a melatonina e a associação deste hormônio com cisplatina reduziu significativamente a expressão de *TP53*. Contudo, não houve diferenças significativas entre nenhum grupo de tratamento em relação ao não tratado na expressão do gene *Bcl-2* nesta linhagem.

Figura 9: Efeito da cisplatina e melatonina na expressão de genes relacionados a apoptose (*TP53* e *BCL-2*) em comparação com o gene endógeno 18S na linhagem A549.



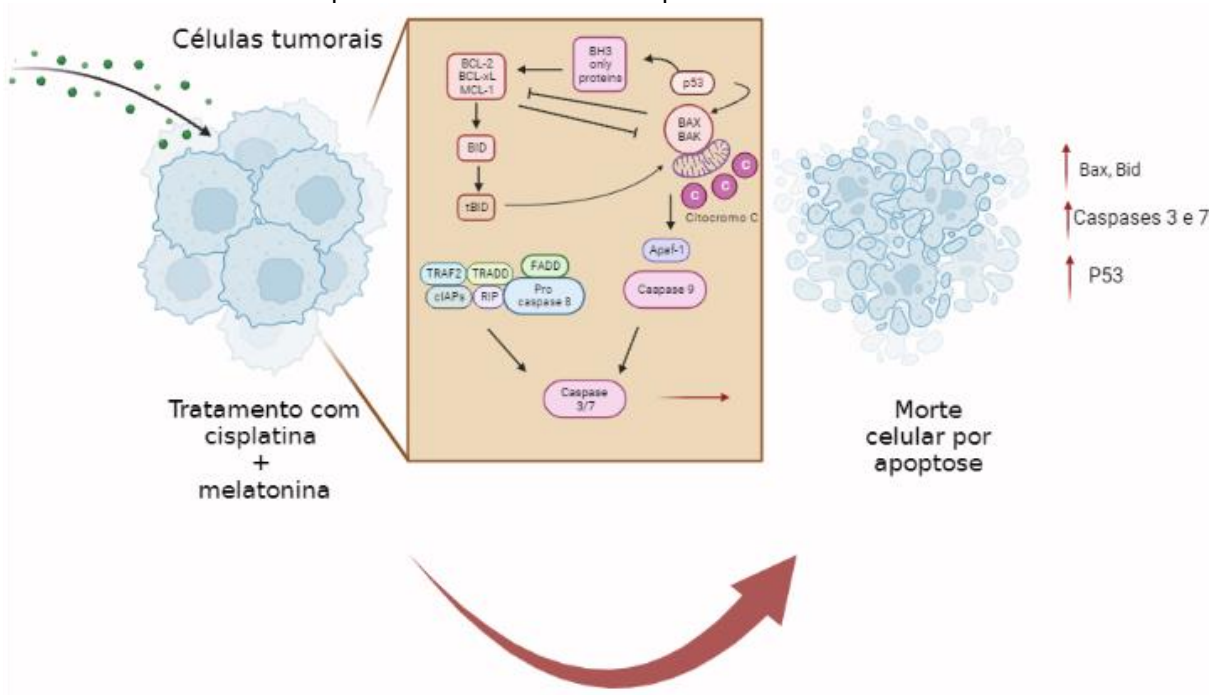
Os dados dos gráficos são da média $\pm$ o desvio padrão da duplicata de dois experimentos independentes (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$); NT: Não tratado.

Diante disso, as análises da expressão de genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos na linhagem A549 reforçam que o mecanismo principal de via de morte celular, envolve as moléculas efetoras da via intrínseca da apoptose, pelo aumento significativo de genes *Bax*, *Bid* e *CASP3* e *CASP7*, quando tratadas em combinação do quimioterápico cisplatina + melatonina. Além disso, o perfil de sensibilidade a estes tratamentos, deixam ainda mais claro esse mecanismo presente.

A realidade epidemiológica atual demanda que com o aumento da incidência de doenças neoplásicas, pesquisas que permitam a melhora da sobrevida e menor morbidade pós-tratamento sejam desenvolvidas para garantir melhor qualidade de

vida para esses pacientes. Entender os mecanismos presentes na via de morte celular e de resistência é essencial para uma resposta mais eficiente do tratamento. Neste estudo, foi discutido o papel das seis moléculas envolvidas na via de morte celular, além disso, foi destacado como seus produtos biológicos podem induzir a atividade apoptótica da célula através de agentes quimioterápicos como a cisplatina e sua associação ao hormônio melatonina como ilustra a figura 10. Sendo assim, faz-se necessário um estudo posterior para avaliação da modulação dessas proteínas envolvidas nessa via de morte celular regulada, para um melhor direcionamento do tratamento e consequente prognóstico favorável aos pacientes com diferentes subtipos de carcinoma pulmonar.

Figura 10 : Representação esquemática da via de ativação de morte em células tumorais pulmonares a partir do tratamento com cisplatina e melatonina.



Fonte: Adaptado de “apoptosis extrinsic and intrinsic pathways”, *BioRender.com* (2022).

5 CONCLUSÃO

O tratamento com cisplatina modulou a expressão de genes na via de morte celular tanto diretamente pela via intrínseca da apoptose, quanto pelo aumento do gene *TP53* na linhagem H1299. A associação do quimioterápico cisplatina com o hormônio endógeno melatonina potencializou a expressão dos genes *BID* e *CASP3* presentes na via de morte celular. Em paralelo, o efeito sinérgico da melatonina e cisplatina na modulação dos genes envolvidos na via intrínseca da apoptose, só foi possível ser identificado na linhagem A549.

Ainda assim, os dados encontrados na literatura corroboram com os nossos resultados, sendo evidenciado que a associação entre cisplatina e melatonina potencializa a expressão de moléculas presentes na via da apoptose e consequentemente, em ensaio clínicos futuros, poderá ser utilizada como coadjuvante na tentativa de reduzir os efeitos tóxicos dos fármacos derivados de platina, permitindo um melhor prognóstico e qualidade de vida aos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ALDOSSARY, S. A. Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 12, n. 1, p. 7–15, 2019.
- ALTORKI, N. K. et al. Perioperative mortality and morbidity after sublobar versus lobar resection for early-stage non-small-cell lung cancer: post-hoc analysis of an international, randomised, phase 3 trial (CALGB/Alliance 140503). **The Lancet Respiratory Medicine**, v.6, n. 12, p. 915–924, 2018.
- AMARAL, F. G. DO; CIPOLLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, 2018.
- ARAUJO, L. H. et al. Câncer de pulmão no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 2018.
- ARENDT, J. Melatonin: Countering Chaotic Time Cues. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 2019.
- CALLEJO, A. et al. Cisplatin-induced ototoxicity: Effects, mechanisms and protection. **StrategiesToxics**, 2015.
- CEPEDA, V. et al. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. Role of Melatonin in Cancer Treatment. 2012.
- CHAO, C. C. et al. Melatonin suppresses lung cancer metastasis by inhibition of epithelial-mesenchymal transition through targeting to Twist. **Clinical Science**, v. 133, n. 5, p. 709–722, 2019.
- DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. **Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action**. **European Journal of Pharmacology** Elsevier, , 5 out. 2014.
- DE ALENCAR, V. T. L.; FORMIGA, M. N.; DE LIMA, V. C. C. Inherited lung cancer: **A review câncer medical science**, 2020.
- ELMORE, S. **Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death**, 2007.

ETTINGER, D. S. et al. **Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures NCCN Guidelines Version 3.2020 Non-Small Cell Lung Cancer**. [s.l: s.n.].

FARHOOD, B. et al. Melatonin and cancer: From the promotion of genomic stability to use in cancer treatment. **Journal of Cellular Physiology**, 2019.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, 2019.

GROOME, P. A. et al. The IASLC lung cancer staging project: Validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 2, n. 8, p. 694–705, ago. 2007.

HARÐARDOTTIR, et al. Nýjungar í greiningu og meðferð lungnakrabbameins. **Laeknabladid**, v. 1, 2022.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, 2013.

HONGMEI, Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. In: **Apoptosis and Medicine**. [s.l.] InTech, 2012.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer**.

JORDAN, P.; CARMO-FONSECA, M. Review Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci**, 2000.

JORGE, A. L. et al. MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer MicroRNAs: **understanding their role in gene expression**. p. 1–7, 2021.

KASHYAP, D.; GARG, V. K.; GOEL, N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. Em: **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2021. v. 125p. 73–120.

KELLAND, L. **The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy**. **Nature Reviews Cancer**, 19 ago. 2007.

LOPES, G. L.; VATTIMO, E. F. DE Q.; DE CASTRO JUNIOR, G. Identifying activating mutations in the EGFR gene: Prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, , 1 jul. 2015.

LORTET-TIEULENT, J. et al. International trends in lung cancer incidence by histological subtype: Adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. **Lung Cancer**, v. 84, n. 1, p. 13–22, abr. 2014.

LV, P. et al. Pathogenesis and therapeutic strategy in platinum resistance lung cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**. Elsevier B.V., , 1 ago. 2021.

MARY V. GRAHAM; ROGER W. BYHARDT; WILLIAM T. SAUSE; WALTER J. CURRAN, JR. ; D. F. B. K. R. K. H. W. L. R. K. S. A. LEIBEL. Terapia não agressiva, não cirúrgica, de câncer de pulmão de célula não pequena inoperável. 2017.

MOHSENI, M. et al. Melatonin may play a role in modulation of bax and bcl-2 expression levels to protect rat peripheral blood lymphocytes from gamma irradiation-induced apoptosis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 738–739, n. 1, p. 19–27, 2012.

MORANA, O.; WOOD, W.; GREGORY, C. D. **The Apoptosis Paradox in Cancer**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 fev. 2022.

MOTTÉ, C. DE P. et al. Perspectivas da imunoterapia em pacientes com câncer de pulmão metastático. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, p. 62–83, 2021.

NOVAES, F. T. et al. Câncer de pulmão: histologia, estágio, tratamento e sobrevida. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 8, p. 3815–7615, 2008.

OBENG, E. Apoptosis (Programmed cell death) and its signals-a. **review Brazilian Journal of Biology**, 2021.

OKAMOTO, T. et al. Prognostic value of the histological subtype in completely resected non-small cell lung cancer. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, v. 5, n. 4, p. 362–366, 1 ago. 2006.

OROZ-PARRA, I. et al. Apoptosis activation in human lung cancer cell lines by a novel synthetic peptide derived from Conus californicus venom. **Toxins**, v. 8, n. 2, 5 fev. 2016.

PABLA, N.; DONG, Z. **Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. Kidney International** Nature Publishing Group, , 2008.

PAN, W. et al. Functional BCL-2 regulatory genetic variants contribute to susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma. **Scientific Reports**, v. 5, 1 jul. 2015.

PERES, L. A. B.; JÚNIOR, A. D. DA C. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: Mecanismos moleculares. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 332–340, 2013.

PIRKER, R.; FILIPITS, M. Personalized treatment of advanced non-small-cell lung cancer in routine clinical practice. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 35, n. 1, p. 141–150, 1 mar. 2016.

REBILLARD, A.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; DIMANCHE-BOITREL, M.-T. Cisplatin Cytotoxicity: DNA and Plasma Membrane Targets. **Current Medicinal Chemistry**, 2008.

RECK, M.; RABE, K. F. Precision Diagnosis and Treatment for Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 9, p. 849–861, 31 ago. 2017.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; GALANO, A. **Melatonin: Exceeding expectations. Physiology**American Physiological Society, , 1 set. 2014.

RUBIO-GONZÁLEZ, A. et al. Pleiotropic role of melatonin in brain mitochondria of obese mice. **Melatonin Research**, v. 3, n. 4, p. 538–557, 2020.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 1, p. 7–33, jan. 2022.

SILVA, N. B. N. C. DA et al. Tabagismo como fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 19, p. e313, 2019.

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2019.

TALIB, W. H. **Melatonin and cancer hallmarks. Molecules**MDPI AG, , 2018.

THAKUR, S. K.; SINGH, D. P.; CHOUDHARY, J. **Lung cancer identification: a review on detection and classification. Cancer and Metastasis Reviews**Springer, , 1 set. 2020.

TAN, A. C., & TAN, D. S. Targeted Therapies for Lung Cancer Patients With Oncogenic Driver Molecular Alterations. **J Clin Oncol**. 2022 Feb 20;40(6):611-625

TRAVIS, W. D. PATHOLOGY OF LUNG CANCER. Em: **CLINICS IN CHEST MEDICINE**. 1. ed. Washington, D.C.: [s.n.]. v. 23p. 65–81.

TORDJMAN, S. et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. **Current Neuropharmacology**, v. 15, n. 3, p. 434–443, 2017.

World Health Organization, WHO. **Lung Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 19 out. 2022.

XU, F. et al. A TP53-associated gene signature for prediction of prognosis and therapeutic responses in lung squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 9, n. 1, 1 jan. 2020.

Xu, Y., Liang, Y. & Yin, G. Detecting the expression of HRs and BCL2 via IHC can help identify luminal A-like subtypes of triple-positive breast cancers. ***Clin Transl Oncol*** (2022). P. 14 -11,2022.

YANG, N. et al. Propofol inhibits lung cancer cell viability and induces cell apoptosis by upregulating microRNA-486 expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 1–7, 2017.

ZHENG, M. **Classification and Pathology of Lung Cancer**. **Surgical Oncology Clinics of North America**W.B. Saunders, , 2016.