



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

MARÍLLYA MORAIS DA SILVA

**Avaliação de um microambiente pró-inflamatório na resposta
terapêutica em células de câncer de pulmão**

Recife
2025

MARÍLLYA MORAIS DA SILVA

Avaliação de um microambiente pró-inflamatório na resposta terapêutica em células de câncer de pulmão

Tese de dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientador (a): Dra. Michelly Cristiny Pereira

Coorientador (a): Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego

Coorientador (a): Dr. Erika da Silva Bezerra de Menezes

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Maríllya Moraes da.

Avaliação de um microambiente pró-inflamatório na resposta terapêutica em células de câncer de pulmão / Maríllya Moraes da Silva. - Recife, 2025.

78f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, 2025.

Orientação: Michelly Cristiny Pereira.

Coorientação: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego.

Coorientação: Erika da Silva Bezerra de Menezes.

Inclui Referências.

1. Inflamação; 2. Câncer de Pulmão; 3. Macrófagos; 4. Cisplatina. I. Pereira, Michelly Cristiny. II. Rego, Moacyr Jesus Barreto de Melo. III. Menezes, Erika da Silva Bezerra de. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

MARÍLLYA MORAIS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE UM MICROAMBIENTE PRÓ-INFLAMATÓRIO NA RESPOSTA
TERAPÊUTICA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde

Aprovado em: 01/08/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^a. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Paulo Euzebio Cabral Filho
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Anderson Rodrigues de Almeida
Centro Universitário do Maranhão - CEUMA

RESUMO

O câncer de pulmão é uma das neoplasias mais incidentes e letais em todo o mundo, sendo o tipo de câncer que mais causa óbitos. O microambiente tumoral desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão da doença. No Brasil, o tratamento padrão para o câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) inclui a combinação de cisplatina e etoposídeo. No entanto, a resistência aos derivados de platina e seus efeitos colaterais limitam a eficácia do tratamento. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos de um meio condicionado (MC) por macrófagos M1, isoladamente e em combinação com quimioterápicos, como uma estratégia para modular o microambiente tumoral e potencializar a terapia convencional. Macrófagos foram diferenciados para o fenótipo M1 usando PMA e LPS, com confirmação por citometria de fluxo (expressão de CD86) e quantificação de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-6) por Cytometric Bead Array (CBA). A linhagem de CPNPC NCI-H1299 foi exposta ao MC sozinho ou em combinação com cisplatina e etoposídeo em concentrações correspondentes ao IC25 e IC50. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, mostrando que o MC reduziu significativamente a viabilidade das células tumorais ($p < 0,0001$) e potencializou o efeito dos quimioterápicos. A análise do ciclo celular por citometria de fluxo (iodeto de propídeo) revelou que a combinação do MC com cisplatina aumentou a porcentagem de células na fase S (33,7%), enquanto a associação com etoposídeo aumentou as células em G1 (32,18%) ($p < 0,05$). Além disso, o MC aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), avaliada por marcação com DHE, e potencializou esse efeito quando combinado com doses abaixo do IC50 de etoposídeo. A expressão gênica de marcadores de morte celular (CASP3, NLRP3, GSDMD e RIPK1) foi analisada por PCR em tempo real, demonstrando tendências de modulação, que precisam ser confirmadas por ensaios subsequentes. Ensaios clonogênicos mostraram que o MC inibiu a formação de colônias, e culturas 3D de esferoides confirmaram seu efeito na redução do tamanho dos esferoides, além de potencializar a ação da cisplatina nesses modelos mais complexos. Por fim, foi observado que o meio condicionado derivado de macrófagos M1 induziu uma redução de aproximadamente 20% na fluorescência de Ki67 na linhagem NCI-H1299, sugerindo um possível efeito antiproliferativo. Os resultados observados sugerem que o MC possui efeitos antiproliferativos e pode modular a resposta aos quimioterápicos. Esses resultados fornecem uma base para investigações futuras que possam explorar novas estratégias combinatórias no tratamento do câncer de pulmão, integrando a modulação do microambiente tumoral à quimioterapia convencional.

Palavras-chave: Inflamação. Câncer de Pulmão. Macrófagos. Cisplatina.

ABSTRACT

Lung cancer is among the most prevalent and lethal neoplasms worldwide and remains the leading cause of cancer-related deaths. The tumor microenvironment plays a critical role in the development and progression of the disease. In Brazil, the standard treatment for non-small cell lung cancer (NSCLC) includes a combination of cisplatin and etoposide. However, resistance to platinum-based agents and their associated side effects limit treatment efficacy. This study aimed to investigate the effects of macrophage M1-conditioned medium (CM), alone and in combination with chemotherapeutic agents, as a strategy to modulate the tumor microenvironment and enhance conventional therapy. Macrophages were differentiated into the M1 phenotype using PMA and LPS, with confirmation by flow cytometry (CD86 expression) and quantification of pro-inflammatory cytokines (TNF and IL-6) using Cytometric Bead Array (CBA). The NCI-H1299 NSCLC cell line was exposed to the CM alone or combined with cisplatin and etoposide at concentrations corresponding to the IC₂₅ and IC₅₀. Cell viability was assessed by the MTT assay, which showed that the CM significantly reduced tumor cell viability ($p < 0.0001$) and enhanced the effects of the chemotherapeutic agents. Cell cycle analysis by flow cytometry (propidium iodide) revealed that CM combined with cisplatin increased the percentage of cells in the S phase (33.7%), whereas its association with etoposide increased the proportion of cells in G1 (32.18%) ($p < 0.05$). In addition, CM increased the production of reactive oxygen species (ROS), assessed by DHE staining, and intensified this effect when combined with etoposide at concentrations below the IC₅₀. Gene expression of cell death markers (CASP3, NLRP3, GSDMD, and RIPK1) was analyzed by real-time PCR, revealing modulatory trends that require confirmation by subsequent assays. Clonogenic assays demonstrated that CM inhibited colony formation, and 3D spheroid cultures confirmed its effect in reducing spheroid size, as well as enhancing cisplatin activity in these more complex models. Finally, CM derived from M1 macrophages induced an approximate 20% reduction in Ki67 fluorescence in NCI-H1299 cells, suggesting a potential antiproliferative effect. The findings suggest that M1 macrophage-derived CM exhibits antiproliferative properties and can modulate the response to chemotherapeutic agents. These results provide a foundation for future investigations aimed at exploring new combinatorial strategies for lung cancer treatment, integrating modulation of the tumor microenvironment with conventional chemotherapy.

Keywords: Inflammation. Lung Cancer. Macrophages. Cisplatin.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Representação dos principais subtipos moleculares de CPPC | 15 |
| Figura 2 - Capacidades adquiridas das células tumorais na progressão do câncer | 18 |
| Figura 3 - Mecanismos anônicos e não-canônicos de ativação dos inflamassomas e indução da piroptose | 24 |
| Figura 4 - Imagem representativa da marcação de monócitos U937 e de macrófagos expostos ao LPS para os marcadores CD80, CD86, CD200R e CD206 | 40 |
| Figura 5 - Expressão dos marcadores CD80, CD86, CD200R e CD206 após estímulo com LPS | 41 |
| Figura 6 - Dosagem dos níveis de citocinas presentes no meio condicionado dos macrófagos derivados da linhagem U937 após estímulo ao LPS | 42 |
| Figura 7 - Efeitos do meio condicionado na viabilidade celular das linhagem de carcinoma pulmonar NCI-H1299 | 44 |
| Figura 8 - Avaliação dos efeitos do MC e sua associação ao quimioterápico cisplatina no ciclo celular da linhagem NCI-H1299 | 46 |
| Figura 9 - Avaliação dos efeitos do MC e sua associação aos quimioterápicos cisplatina e etoposideo no ciclo celular da linhagem NCI-H1299 | 48 |
| Figura 10 - Média de intensidade de fluorescência (MFI) da linhagem NCI-H1299 em diferentes grupos de tratamento após marcação com DHE . | 50 |
| Figura 11 -Expressão do gene <i>CASP3</i> na linhagem NCI-H1299 após exposição por 48h a diferentes grupos de tratamento | 53 |
| Figura 12: Expressão do gene <i>NLRP3</i> na linhagem NCI-H1299 após exposição por 48h a diferentes grupos de tratamento | 55 |

| | |
|---|----|
| Figura 13: Expressão do gene GSMD na linhagem NCI-H1299 após exposição por 48h a diferentes grupos de tratamento | 56 |
| Figura 14: Expressão do gene RIPK1 na linhagem NCI-H1299 após exposição por 48h a diferentes grupos de tratamento | 58 |
| Figura 15: Impacto do meio condicionado na formação de colônias na linhagem NCI-H1299 | 59 |
| Figura 16: Porcentagem de redução da área dos esferoides após exposição ao meio condicionado e cisplatina em diferentes concentrações nos tempos de 24, 48 e 72h | 60 |
| Figura 17: Esferóides NCI-H1299 após exposição ao meio condicionado e a cisplatina em diferentes concentrações por 0, 24, 48 e 72h. | 62 |
| Figura 18: Porcentagem de redução da área dos esferoides após exposição ao meio condicionado e etoposídeo em diferentes concentrações nos tempos de 24, 48 e 72h. | 64 |
| Figura 19: Esferóides NCI-H1299 após exposição ao meio condicionado e ao etoposídeo em diferentes concentrações por 0, 24, 48 e 72h | 65 |
| Figura 20: Média da intensidade de fluorescência do KI67 após exposição ao meio condicionado e a cisplatina em diferentes concentrações | 67 |
| Figura 21: Fluorescência do KI67 após exposição ao meio condicionado e a cisplatina em diferentes concentrações | 68 |
| Figura 22: Média da intensidade de fluorescência do KI67 após exposição ao meio condicionado e ao etoposídeo em diferentes concentrações | 69 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 11 |
| 2.1 Câncer de Pulmão | 11 |
| 2.2. Hallmarks do câncer | 16 |
| 2.3 Inflamação Associada ao Câncer | 19 |
| 2.4 Atuais terapias para o câncer de pulmão | 27 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 31 |
| 4. OBJETIVOS | |
| 4.1 Objetivo Geral | 32 |
| 4.2 Objetivos específicos | 32 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS | |
| 5.1 Comitê de Ética | 33 |
| 5.2 Obtenção das Linhagens Celulares | 33 |
| 5.3 Cultura Celular | 33 |
| 5.4 Diferenciação celular da linhagem U937 e preparação dos meios condicionados (MC) | 33 |
| 5.5 Análise do fenótipo dos macrófagos por citometria de fluxo | 34 |
| 5.6 Dosagem das citocinas e quimiocinas por <i>Citometryc Bead Array</i> (CBA) | 34 |
| 5.7 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT) | 34 |
| 5.8 Análise do Ciclo Celular | 35 |
| 5.9 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio | 35 |
| 5.10 Análise da expressão de genes de morte por PCR em tempo real | 36 |
| 5.11 Avaliação do meio condicionado na formação de colônias na linhagem NCI-H1299 de carcinoma pulmonar | 37 |
| 5.12 Avaliação do meio condicionado associado aos quimioterápicos em esferóides de células de câncer de pulmão | 37 |
| 5.13 Análises estatísticas | 38 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | |
| 6.1 Caracterização do meio condicionado por macrófagos diferenciados com PMA e LPS | 39 |

| | |
|---|----|
| 6.2 A exposição ao meio condicionado reduziu significativamente a viabilidade da linhagem NCI-H1299 | 43 |
| 6.3 O meio condicionado em associação a cisplatina leva a um aumento de células estacionadas na fase S do ciclo celular na linhagem H1299 | 45 |
| 6.4 O meio condicionado em associação ao etoposídeo leva a um aumento de células estacionadas na fase G1 do ciclo celular na linhagem H1299 | 47 |
| 6.5 O meio condicionado potencializa a produção de espécies reativas na linhagem NCI-H1299 de carcinoma pulmonar | 49 |
| 6.6 Avaliação da regulação de genes de morte celular após exposição ao meio condicionado e sua associação aos quimioterápicos | 51 |
| 6.7 O meio condicionado inibe a formação de colônias na linhagem celular NCI-H1299 de carcinoma pulmonar | 59 |
| 6.8 O meio condicionado induz uma redução da área de culturas 3D, além de potencializar a ação dos quimioterápicos nesse processo | 60 |
| 6.9 Redução da expressão de Ki67 na presença do meio condicionado e sua associação com a cisplatina em modelo 3D | 65 |
| 7. CONCLUSÃO | 68 |

1. INTRODUÇÃO

O câncer representa um dos principais desafios de saúde pública a ser enfrentado globalmente. As mais recentes estatísticas globais, demonstram que o câncer de pulmão é o responsável pelo maior número de mortes por câncer em homens e a terceira principal causa de morte em mulheres (SUNG et al., 2021). Segundo estimativas do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), projeta-se para 2025 a ocorrência de aproximadamente 21 milhões de novos casos de câncer, dos quais 2,5 milhões correspondem ao câncer de pulmão (IARC, 2022). No Brasil, conforme dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2023), a previsão para cada ano do triênio 2023-2025 é de aproximadamente 704 mil novos casos de câncer, dentre estes, 32 mil casos de câncer de pulmão, correspondendo a um risco estimado de 15,06 casos por 100 mil habitantes. (INCA 2022).

O câncer de pulmão origina-se de células do epitélio respiratório e pode ser classificado histologicamente em dois subtipos: (1) Carcinoma Pulmonar de pequenas células (CPPC), um tumor altamente agressivo derivado de células com características neuroendócrinas, responsável por 15% dos casos de câncer de pulmão; e (2) carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP), que corresponde a 85% dos casos e é subdividido em três categorias patológicas: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células. O câncer de pulmão é uma doença heterogênea, caracterizada por uma variedade de alterações genéticas e epigenéticas, e para compreender a fisiopatologia da neoplasia exige a análise não apenas dessas alterações moleculares, mas também o papel do microambiente tumoral e da resposta imune do paciente, uma vez que todos esses fatores estão interconectados durante cada etapa da tumorigênese (SALEHI-RAD et al., 2020).

O tumor se desenvolve em um microambiente altamente complexo, composto por diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais, fibroblastos e células do sistema imune. Além dessas células, estão presentes componentes extracelulares que circundam as células tumorais, bem como uma rede vascular essencial para fornecer nutrientes ao tumor (ANDERSON; SIMON, 2020). Dependendo da composição celular e fatores presentes, o microambiente tumoral pode exercer

funções tanto pró quanto anti-tumorais. Como descrito por Duan (2020), o tumor pode apresentar um perfil mais frio ou quente. Os tumores quentes são caracterizados pela infiltração de células T e ativação do sistema imune, com liberação de citocinas pró-inflamatórias, enquanto os tumores frios são marcados pela ausência ou exclusão dessa resposta inflamatória, o que favorece a progressão tumoral. (DUAN et al., 2020) Entre as células do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral, destacam-se os macrófagos associados ao tumor (TAM) (MANSOURI et al., 2022).

De acordo com diferentes características fenotípicas, funcionais e de seus papéis frente a diferentes respostas imunológicas, os macrófagos associados ao tumor podem ser divididos em M1 e M2. Os macrófagos M1, em geral, possuem funções antitumorais, incluindo a citotoxicidade direta ou a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos, resultando na morte de células tumorais. Por outro lado, os macrófagos M2 são aqueles predominantes em fases mais avançadas do tumor, contribuem para a progressão tumoral, ao promover metástase, angiogênese e inibir a resposta imune anti tumoral mediada por células T (PAN et., 2020)

No Brasil, o esquema quimioterápico padrão para o câncer de pulmão, tanto de CPCC quanto de CPCNP, consiste na associação de derivados da platina (cisplatina e carboplatina) e etoposido. Outros quimioterápicos derivados da platina, bem como outras associações diferentes também podem ser utilizados (BRASIL, 2014). A cisplatina atua principalmente no DNA de células tumorais. Após penetrar na célula, a cisplatina possui a capacidade de substituir duas de suas moléculas de cloro por H_2O , induzindo diferentes tipos de lesões irreversíveis no DNA, levando à formação de adutos. Essas alterações levam a inibição da transcrição e replicação, que resultam na ativação da apoptose dependente ou independente de p53 em células tumorais (ALI et al., 2022). No entanto, o uso de terapias com altas doses de cisplatina estão relacionadas a diversos efeitos colaterais, incluindo a toxicidade renal, cardíaca, gástrica, neurológica e mielodepressão, o que limita sua aplicação terapêutica (DUGBARTEY; PEPPONE; GRAAF, 2016).

Novas opções terapêuticas para pacientes com câncer de pulmão já estão disponíveis, e outras estão em fase de pesquisa. Nos últimos anos, com os avanços dos estudos sobre o microambiente tumoral, a imunoterapia vem ganhando destaque. Ao contrário da terapia tradicional, onde o alvo terapêutico deixa de ser diretamente, as células tumorais, a imunoterapia foca na rede de células e moléculas do sistema imune que fornecem suporte ao tumor (CARTER; et al., 2017). Os meios condicionados, produzidos pelo cultivo de macrófagos são utilizados para estabelecer um ambiente pró ou anti-inflamatório, e, dependendo do estímulo aplicado, podem secretar diferentes citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Isso permite o estudo, in vitro, dos efeitos dessas células em diversos tipos de tumores

Os TAMs, principalmente aqueles com o fenótipo M2, têm a capacidade de influenciar negativamente a eficácia terapêutica de estratégias como a quimioterapia, radioterapia, agentes antiangiogênicos e imunoterapias. No entanto, os macrófagos apresentam uma grande plasticidade, e a reprogramação de TAMs em um fenótipo antitumoral é uma estratégia de tratamento promissora (MANTOVANI; ALLAVENA, 2015).

Assim, o presente estudo avaliou o efeito da associação de um meio condicionado pró-inflamatório produzido por macrófagos M1 aos principais quimioterápicos utilizados no SUS para pacientes de CPCNP, a cisplatina e o etoposídeo, em células neoplásicas de pulmão.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Câncer de Pulmão

2.1.1 Epidemiologia do câncer de pulmão

Entre os desafios globais de saúde pública, o câncer é o principal. Além dos impactos na saúde, o câncer causa impactos sociais e econômicos significativos, constituindo uma das três principais causas de mortes prematuras causadas por

doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) mundialmente (BRAY et al., 2021). As mais recentes estatísticas globais sobre o câncer, baseadas nas estimativas fornecidas pelo GLOBOCAN de incidência e mortalidade por câncer, produzida pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o câncer, mostram que o câncer de pulmão apresentou as maiores taxas de incidência e mortalidade, com 2.480.301 novos casos de câncer de pulmão e 1.817.172 de mortes registradas no ano de 2022 (BRAY, 2024).

Para o ano de 2025, ainda conforme dados do GLOBOCAN, estima-se mais de 21 milhões novos casos e 11 milhões de mortes por câncer, destes, sendo 2,5 milhões de casos de câncer de pulmão e 2 milhões de mortes, continuando com os maiores números entre os diversos tipos de câncer analisados. O continente asiático e a América do norte devem apresentar as maiores taxas de incidência (IARC, 2023). Esses números são parcialmente associados ao hábito de fumar, que é elevado nestas regiões. Embora, o tabagismo não seja o único fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão, continua sendo o principal (WEBER, 2023).

No Brasil, conforme a estimativa mais recente do Instituto Nacional do Câncer (INCA), publicada no ano de 2022, para cada ano do triênio 2023-2025 são esperados 31.560 novos casos de câncer de traqueia, brônquios e pulmão, sendo 1.320 destes no estado de Pernambuco. Semelhante a outros países, os principais fatores de risco são o tabagismo e a exposição passiva ao tabaco, que são responsáveis por até 85% dos casos. Outros fatores de risco incluem as exposições ocupacionais e ambientais (INCA,2022).

2.1.2 Subtipos de câncer de pulmão;

O câncer de pulmão pode ser histologicamente classificado em dois grandes grupos, o carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC) e o carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP). O CPCNP, responsável por 85% dos casos de câncer de pulmão, pode ainda ser classificado em diferentes subtipos após exames de biopsia guiada por tomografia computadorizada e análise histopatológica

pós-cirúrgica, sendo os principais subtipos o adenocarcinoma (ADC), carcinoma de células escamosas (CCE) e carcinoma de grandes células (CGC) (SALEHI-RAD et al., 2020, NICHOLSON et al., 2021);

2.1.2.1 Carcinoma pulmonar de pequenas células

O CPPC representa 15% dos casos de câncer de pulmão e está altamente relacionado à exposição contínua ao tabaco, com apenas 2% dos casos ocorrendo em não-fumantes (JIN et al., 2023). Este tumor origina-se predominantemente de células neuroendócrinas e apresenta prognóstico desfavorável em comparação com outros tipos de câncer de pulmão. O CPPC se desenvolve de forma rápida e é frequentemente diagnosticado quando já ocorreu metástase, resultando em uma taxa de sobrevida de menos de um ano para os pacientes diagnosticados (ZHANG et al., 2024). Estudos também demonstram que os pacientes com CPPC apresentam mais comumente mutações nos genes TP53 e RB1, que estão envolvidos no controle do ciclo celular (SALLER; BOYLE, 2021).

2.1.2.2 Carcinoma pulmonar de células não pequenas

O CPCNP corresponde a um grupo de neoplasias pulmonares que possuem uma grande heterogeneidade. O adenocarcinoma é o principal subtipo de CPCNP, representando cerca de 50% dos casos, seguido pelo carcinoma de células escamosas que corresponde a 40%, e por último o carcinoma de grandes células que constitui os 10% dos casos restantes. O ADC é histologicamente caracterizado por sua diferenciação glandular ou produção de mucina, além da expressão de biomarcadores que se encontram na porção distal do pulmão (CHEN et al., 2014). Já o CCE possui uma diferenciação escamosa, geralmente encontrada no epitélio colunar pseudoestratificado que reveste a traqueia e as vias aéreas superiores (RELLI et al., 2019). O CGC, por sua vez, refere-se a casos de CPCNP que não apresentam diferenciação específica de linhagem e não exibem características morfológicas ou imuno-histoquímicas que indiquem adenocarcinoma, SCC ou carcinoma neuroendócrino. Frequentemente, os CGC localizam-se na periferia, são

volumosos e apresentam um aspecto necrótico (MUKHOPADHYAY; KATZENSTEIN, 2011).

Além disso, embora todos os principais tipos de câncer de pulmão estejam relacionados ao tabagismo, o carcinoma de células escamosas é mais comumente associado ao tabagismo dentro dos casos de CPCNP. O adenocarcinoma é o tipo mais comum em não fumantes, embora também possa ocorrer em pacientes fumantes (RELLI et al., 2019).

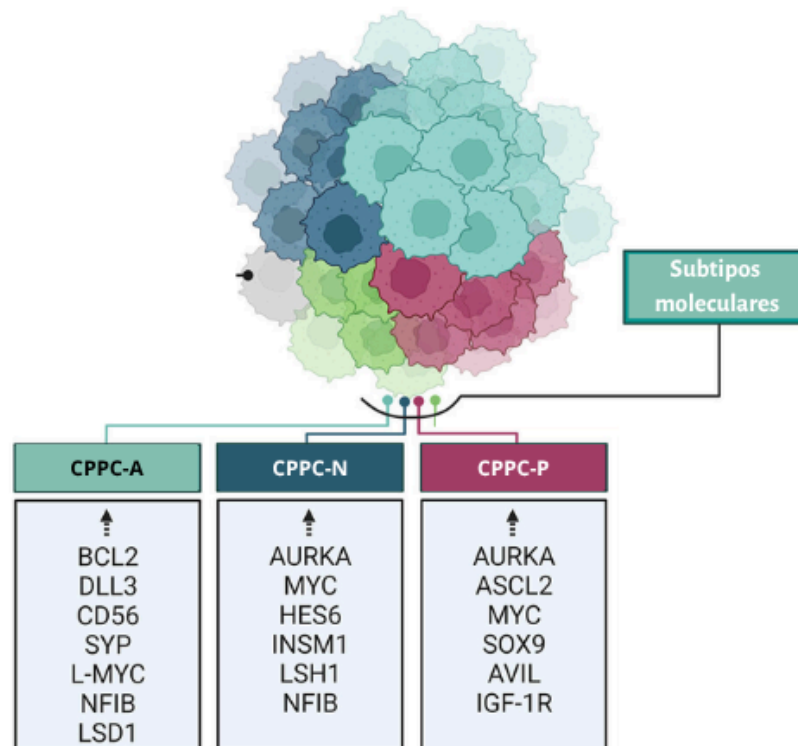
2.1.3 Biologia do Câncer de Pulmão

Além das diferenças histológicas, os diferentes tipos de carcinoma pulmonar apresentam heterogeneidade em relação à suas mutações genéticas, à expressão de biomarcadores e às características do microambiente tumoral.

No CPCP o processo de carcinogênese ainda é pouco conhecido. No entanto, acredita-se que a inativação simultânea das proteínas supressoras tumorais p53 e RB (codificadas por *TP53* e *RB1*, respectivamente) seja essencial para o desenvolvimento do tumor na maioria dos pacientes. Estudos indicam que a perda de *Tp53* e *RB1* resulta na transformação de células neuroendócrinas e células alveolares tipo 2 em CPCP, embora a transformação das células alveolares ocorra com uma eficiência significativamente menor (MEGYESFALVI et al., 2023). Adicionalmente, até 15% dos adenocarcinomas que possuem mutação no gene EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) podem sofrer diferenciação histologicamente para CPPC, na maioria dos casos como consequência da resistência adquirida aos inibidores de tirosina quinase (OSER et al., 2015).

O CPPC apresenta ainda diferentes subtipos, classificados em diferentes tipos moleculares de acordo com perfis de expressão, são eles a expressão dos fatores homólogo achaete-scute 1 (*ASCL1*), um gene que codifica um fator de transcrição da família de proteínas bHLH (basic helix-loop-helix), chamado de CPPC-A, a expressão do fator de diferenciação neurogênica 1 (*NEUROD1*), resultando no subtipo CPPC-N e a expressão de POU class 2 homeobox 3 (*POU2F3*), gene que codifica um fator de transcrição da família POU, configura o subtipo CPPC-P, além de características inflamatórias (Figura 1) (MEGYESFALVI et al., 2022, SCHWENDENWEIN et al., 2021, HUANG et al., 2018)

Figura 1: Representação dos principais subtipos moleculares de CPPC



A figura ilustra os três principais subtipos moleculares do: CPPC-A (associado a ASCL1), CPPC-N (associado a NEUROD1) e CPPC-P (associado a POU2F3), com a expressão gênica característica de cada subtipo. No subtipo SCLC-A, há alta expressão de genes como *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*), *DLL3* (*Delta-like protein 3*), *CD56* (*Neural cell adhesion molecule 1*), *SYP* (*Synaptophysin*), *L-MYC* (*L-myelocytomatosis viral oncogene homolog*), *NFIB* (*Nuclear factor I B*), e *LSD1* (*Lysine-specific histone demethylase 1A*). No subtipo SCLC-N, os genes *AURKA* (*Aurora kinase A*), *MYC* (*Myelocytomatosis viral oncogene homolog*), *HES6* (*Hes family bHLH transcription factor 6*), *INSM1* (*Insulinoma-associated 1*), *LSH1* (*Lymphoid-specific helicase*), e *NFIB* (*Nuclear factor I B*) estão mais expressos. O subtipo SCLC-P, por sua vez, é caracterizado pela expressão de genes como *AURKA*, *ASCL2* (*Achaete-scute family bHLH transcription factor 2*), *MYC*, *SOX9* (*SRY-box transcription factor 9*), *AVIL* (*Advillin*), e *IGF-1R* (*Insulin-like growth factor 1 receptor*).

Adaptado de MEGYESFALVI et al., 2022.

No CPCNP, além da origem celular, os tipos de oncogenes mutados influenciam a definição do subtipo tumoral, assim como a agressividade e o potencial metastático do tumor. No adenocarcinoma, os principais genes mutados são *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (KRAS)* e *EGFR*, além dos genes supressores tumorais *TP53*, *Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)*, *Serine/Threonine Kinase 11 (STK11)* e *Neurofibromin 1 (NF1)*. Já no carcinoma de células escamosas, os genes mais comumente mutados são o *TP53* e *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)*. Embora, alguns pacientes possam apresentar mutação do gene *EGFR*, ao contrário do que se observa no adenocarcinoma, mutações acionáveis em receptores de tirosina quinase são raramente identificadas no CEC (HERBST; MORGENSZTERN; BOSHOF, 2018, RELI et al., 2019).

Foi identificado que mutações presentes nos genes *KRAS* e *EGFR* geralmente estão associadas à fase de iniciação tumoral, sendo, na maioria dos casos mutuamente exclusivas. Porém, quando coexistem, mutações em *KRAS* podem conferir resistência aos inibidores de *EGFR*. Por outro lado, as mutações no gene *TP53* são frequentemente observadas durante o desenvolvimento do tumor, sugerindo um papel na progressão do câncer. Diferentemente das mutações em *KRAS* estão constantemente presentes no tumor, o que indica um papel na iniciação tumoral ou na tumorigênese precoce (HERBST; MORGENSZTERN; BOSHOF, 2018).

2.2 Marcos do câncer;

O desenvolvimento do câncer resulta de diversos fatores. No entanto, na busca por determinar os pontos de convergência entre os diversos tipos de tumores, Hanahan e Weinberg, propuseram um conjunto de alterações funcionais que promovem a malignidade, estabelecendo, assim, os chamados “*hallmarks*” do câncer, ou seja, características registradas presentes no câncer (figura 2). Inicialmente foram identificadas seis distintas das células cancerígenas que

posteriormente foram atualizadas para oito capacidades essenciais e a adição de duas características capacitadoras (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Mais recentemente, Hanahan sugeriu a inclusão de novos quatro “*hallmarks*” (HANAHAN, 2022).

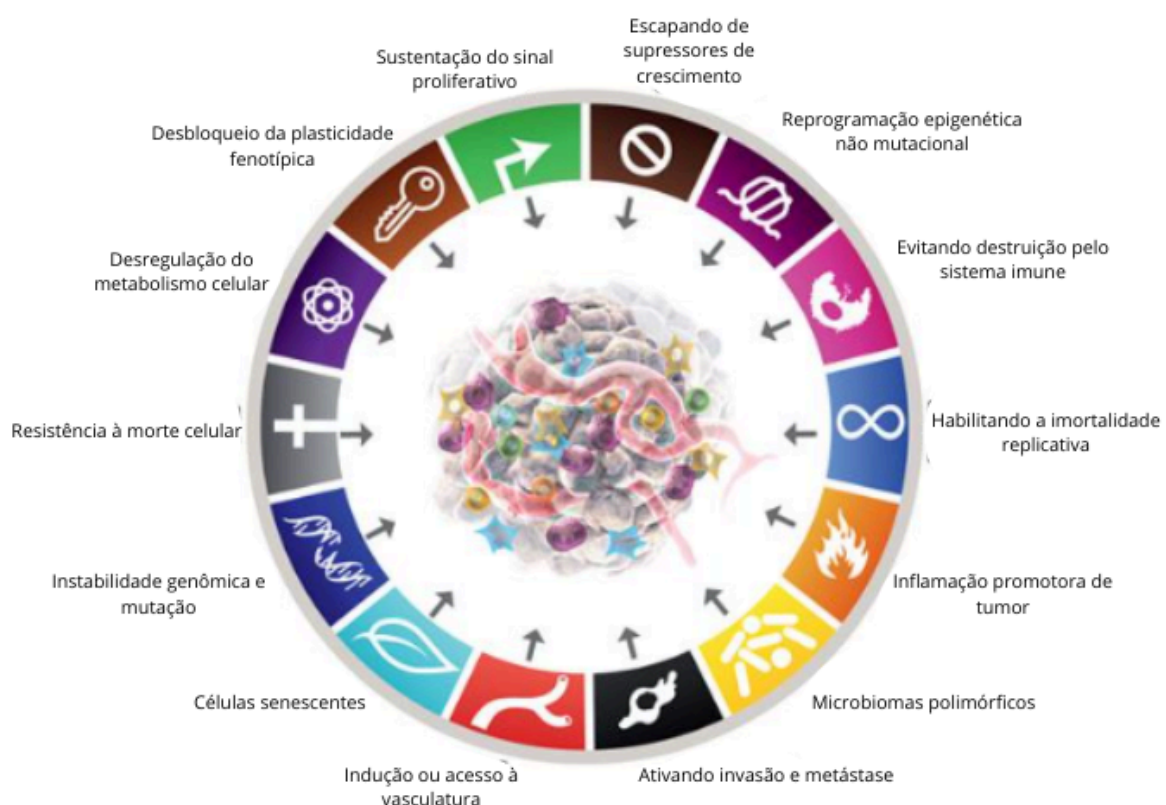
Os “*hallmarks*” do câncer já consolidados, incluem: (i) Instabilidade e mutação do genoma; (ii) resistência a morte celular; (iii) desregulação do metabolismo celular; (iv) sustentação da sinalização proliferativa; ativação da invasão e metástase; (v) evasão dos supressores de tumor; evasão imunológica; habilitação da imortalidade replicativa; (vi) indução ou acesso a vascularização; e (vii) inflamações promotoras de tumor. Em 2022, foram propostas quatro novas características em potencial: (viii) desbloqueio da plasticidade fenotípica; (ix) reprogramação epigenética não-mutacional; (x) presença de microbiomas polimórficos; e (xii) a presença de células senescentes (HANAHAN, 2022).

Uma das principais capacidades das células cancerosas é a sua capacidade de proliferação contínua, ou seja, o “*hallmark*” definido como sustentação da sinalização proliferativa. Em tecidos normais, a sinalização proliferativa é rigorosamente controlada, instruindo a entrada e progressão das células no ciclo celular, garantindo assim a homeostase tecidual. As células cancerosas, por sua vez, possui a capacidade de desregular essa sinalização, afetando não apenas o crescimento, mas também impactando a sobrevivência celular e o metabolismo energético (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Outra característica fundamental das células cancerígenas é sua capacidade de resistência à morte celular. A morte celular programada por apoptose serve como uma barreira natural ao desenvolvimento do câncer. A apoptose é ativada em resposta a vários estresses fisiológicos, no qual as células cancerosas experimentam durante o curso da tumorigênese, como por exemplo, níveis elevados de oncogenes resulta num desequilíbrio da sinalização celular, além dos danos ao DNA que ocorrem em resposta à hiperproliferação. As células tumorais desenvolvem diversas estratégias para escapar o processo de apoptose, incluindo a perda da função do supressor tumoral TP53 e o aumento da expressão de reguladores antiapoptóticos, como Bcl-2 e Bcl-xL (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Outro ponto importante de ser destacado é uma das características capacitadoras já estabelecidas, a inflamação promotora de tumores. Embora a inflamação seja uma resposta normal do corpo a infecções e lesões, no contexto tumoral ela pode ser subvertida para favorecer o crescimento e a sobrevivência das células cancerosas. Muitos tumores são densamente infiltrados por células do sistema imune inato e adaptativo. O processo no microambiente tumoral libera moléculas que promovem várias características do câncer, incluindo fatores de crescimento que promovem a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que reduzem a morte celular, fatores que estimulam a angiogênese, invasão e metástase, além de sinais que induzem a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e outros processos que favorecem as características malignas do câncer (HANAHA; WEINBERG, 2011).

Figura 2: Capacidades adquiridas das células tumorais na progressão do câncer



A figura ilustra as principais características adquiridas pelas células tumorais ao longo da progressão do câncer, conhecidas como "marcos" da oncogênese. Essas

incluem: a sustentação do sinal proliferativo, evasão de supressores de crescimento, reprogramação epigenética não mutacional, evasão da destruição imunológica, habilitação da imortalidade replicativa, promoção de inflamação tumoral, presença de microbiomas polimórficos, ativação da invasão e metástase, indução ou acesso à vasculatura, resistência à morte celular, desregulação do metabolismo celular, desbloqueio da plasticidade fenotípica, instabilidade genômica e o acúmulo de células senescentes.

Adaptado de HANAHAN, 2022.

2.3 Inflamação Associada ao Câncer

A inflamação é um processo fisiológico desencadeado em resposta a infecções, lesões e diversos estímulos potencialmente nocivos, envolvendo o recrutamento e ativação de células do sistema imune inato e adaptativo, com o objetivo de manter a homeostase. No entanto, quando não regulada, a inflamação pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o câncer (ZETHI et al., 2011).

A inflamação crônica desempenha um papel fundamental na mediação do início do câncer, proliferação celular, invasão, angiogênese e metástase, constituindo uma característica importante dos tumores malignos. (QIAN; GOLUBNITSCHAJA; ZHAN, 2019). Quando a inflamação aguda não é resolvida e se torna crônica, estabelece-se um microambiente imunossupressor, caracterizado pela presença de células imunossupressoras e citocinas. Esse microambiente favorece a ativação de oncogenes, provoca danos ao DNA e a proteínas, promove a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e afeta diversas vias de sinalização, incluindo NF- κ B, K-RAS e P53 (ZHAO et al., 2021).

2.3.1 Inflamação promotora de tumores e o câncer de pulmão;

Estima-se que até 25% dos casos de câncer estejam relacionados a doenças inflamatórias crônicas. No caso do câncer de pulmão, por exemplo, tem como fator de risco a presença da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), caracterizada

por danos aos pulmões, frequentemente associados ao tabagismo, que resulta em inflamação e pode levar a danos ao DNA (MURATA, 2018).

A inflamação pró-tumoral é caracterizada pela presença de citocinas e quimiocinas, infiltração de leucócitos, ROS e oncogenes. A inflamação pode ainda ser intrínseca, desencadeada pelo tumor, ou extrínseca, resultante de condições inflamatórias ou infecciosas que aumentam o risco de desenvolver câncer. Independente da origem, ambas as vias, no entanto, convergem para a ativação de importantes fatores de transcrição, como NF- κ B (fator nuclear κ B) e STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), AP-1 (proteína ativadora 1) e HIF-1 α (fator induzível por hipóxia 1 α) (SETHI et al., 2011, ZHAO et al., 2021).

A estrutura fisiológica e a função pelo pulmão, torna o órgão mais suscetível à ação de patógenos, poluentes, oxidantes e outras partículas nocivas. A DPOC, por exemplo, é uma bronquite crônica associada a inflamação e está associada a reações inflamatórias que resultam da exposição a gases e partículas nocivas. Apesar na redução da prevalência do tabagismo, o fumo de tabaco segue sendo o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, incluindo o câncer de pulmão. A fumaça do cigarro contém carcinógenos que contribuem tanto na produção de ROS, quanto para a inflamação tecidual (SOHAL; WALTERS, 2017, QIAN; GOLUBNITSCHAJA; ZHAN, 2019).

2.3.2 Espécies reativas de oxigênio e o câncer

Inicialmente as espécies reativas de oxigênio (ROS) eram consideradas apenas moléculas prejudiciais, capazes de gerar dano celular. Hoje sabe-se que essas moléculas altamente reativas possuem papéis essenciais para a manutenção de todos os organismos vivos, como transdução de sinal e defesa contra patógenos. Os níveis de ROS são regulados por mecanismos moleculares complexos buscando sempre um equilíbrio entre os níveis gerados e eliminados, sendo este equilíbrio chamado de homeostase redox (HALLIWELL, 2022, GLORIEUX et al., 2024).

Há diferentes tipos de espécies reativas de oxigênio, espécies radicais como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) não conseguem atravessar membranas, enquanto espécies não carregadas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO) possuem a capacidade de atravessar membranas, agindo como mensageiros transportando

sinais redox, seja entre célula-célula ou entre compartimentos dentro de uma mesma célula, regulando assim diferentes vias de sinalização (GLORIEUX et al., 2024).

No câncer, o papel de ROS vem sendo descrito por diferentes pesquisadores de forma conflitante, onde podem apresentar funções pró ou anti-tumorais, essa dualidade é dependente de fatores como a concentração de ROS, a fase do tumor e o tipo de ROS gerado.

De um lado, ROS participa de uma comunicação de “mão dupla” com os fibroblastos associados ao câncer (CAF), H_2O_2 é capaz de ativar os CAFs através da regulação positiva da HIF1 α , por outro lado os CAFs levam ao aumento dos níveis de ROS no câncer (PERILLO et al., 2020). Do outro lado, concentrações elevadas de ROS causam dano oxidativo ao DNA e proteínas, levando à morte celular programada de células tumorais ou pré-cancerosas. ROS tem a capacidade de causar diferentes tipos de morte celular programada, como apoptose, autofagia, necroptose e, estudos mostram que a proteína p53 induz as células a morte celular por ferroptose, que é induzida por ROS e depende dos níveis intracelulares de ferro (JIANG et al., 2015).

Nos últimos anos, estudos demonstram que utilizar ROS como alvo é uma estratégia promissora para combater o câncer. Ao desregular a produção de ROS em células cancerígenas as células podem morrer devido a danos irreparáveis causados por estresse oxidativo, ou ainda terem seus níveis reduzidos ao ponto de suprimir vias de sinalização necessárias para a proliferação celular (GLORIEUX et al., 2024).

2.3.3 Microambiente Tumoral

O desenvolvimento tumoral não depende exclusivamente das células tumorais, mas também de um microambiente complexo e favorável ao seu crescimento. O microambiente tumoral (MT) é composto pelas células tumorais, células do sistema imune, fibroblastos associados ao tumor e células endoteliais, além dos componentes não celulares que são a matriz extracelular, suas enzimas e fatores de crescimento (ZHANG, VEERAMACHANENI, 2022).

Entre as células que compõem o MT, destacam-se os fibroblastos associados ao câncer e as células do sistema imunológico. Os fibroblastos associados ao câncer derivam de diferentes tipos celulares e possuem um papel importante nos processos de proliferação, migração, angiogênese e remodelação da matriz extracelular. Além disso, esses fibroblastos contribuem com a manutenção de um microambiente imunossupressor (BAGHBAN et al., 2020).

As células do sistema imunológico presentes no MT são essenciais para o desenvolvimento do tumor, desempenhando diferentes funções de acordo com a fase do tumor. As principais células do sistema imunológico encontradas no MT são os macrófagos, linfócitos, células dendríticas e células supressoras derivadas de linhagem mieloide (MDSCs) (HINSHAW; SHEVDE, 2019).

A atividade do MT pode ser anti ou pró-tumoral, dependendo da composição da população de células presentes no MT. Os tumores onde há infiltração de células T e ativação do sistema imune com liberação de citocinas pró-inflamatórias tem seu MT apresentando uma atividade anti-tumoral, no entanto, quando há falta ou exclusão dessa inflamação, o tumor apenas se beneficia desse MT (DUAN et al., 2020).

2.3.3.1 Macrófagos Associados ao Tumor

Assim como outras células do sistema imune, os macrófagos associados ao tumor demonstram uma significativa plasticidade, e isso depende do estímulo presente no MT, os macrófagos podem ser polarizados em M1 ou M2. Os macrófagos M1, também chamados de macrófagos pró-inflamatórios, desempenham funções, como apresentação eficiente de antígenos, eliminação de microrganismos infecciosos e até de destruir células tumorais (TAN et al., 2021). No entanto, nas fases iniciais do tumor, os macrófagos M1, podem, através da produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, contribuir para a transformação neoplásica (RAJASEGARAN et al., 2023).

Em estágios mais avançados, o MT possui uma maior população de macrófagos M2, sugerindo um processo de repolarização dos macrófagos M1. Os macrófagos M2, conhecidos como macrófagos anti-inflamatórios, em uma resposta

normal, como por exemplo na inflamação crônica. Os mediadores anti-inflamatórios liberados pelos macrófagos M2 defendem o organismo de um processo inflamatório exacerbado, no câncer, isso é benéfico para o tumor (ZOU et al., 2023). Os macrófagos M2, além de promover uma evasão ou inibição do sistema imune, também estão diretamente relacionados a processos como a remodelação da matriz extracelular, angiogênese, migração e invasão (AKTAR et al., 2024).

2.3.4 Mediadores Inflamatórios e seu papel no câncer de pulmão

Os mediadores inflamatórios desempenham um papel crucial na interconexão entre a inflamação e o tumor, sendo ativados tanto nas células inflamatórias, quanto nas células tumorais. Dentre os principais mediadores inflamatórios presentes no MT de pulmão, destacar as interleucinas: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-11, IL-12; o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); a proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF)- β (TAN et al., 2021).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória liberada por diversas células inflamatórias, desempenhando um papel crucial na ativação de células do sistema imune inato, como por exemplo as células apresentadoras de antígenos, além de auxiliar a polarização dos linfócitos TCD4⁺ em células T auxiliares Th1 e Th17. No contexto do câncer, no entanto, possui um papel ambíguo, altos níveis de IL-1 β , juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias em um caso de uma inflamação crônica não resolvida, como em pacientes com DPOC e asma, podem promover o desenvolvimento do tumor, tendo um papel na atividade do NF- κ B e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (BENT et al., 2018, RAJASEGARAN et al., 2023).

Em contrapartida, a IL-1 β também possui um importante papel anti-tumoral, mediado principalmente pela indução das células Th1 e Th17, que resulta na ativação de vias de morte celular (BENT et al., 2018). Estudos demonstram que camundongos com deficiência na ativação do inflamassoma NLRP3 e sinalização de IL-1 e IL-17 não responderam adequadamente à quimioterapia com indutores de morte celular imunogênica, como as antraciclinas (MATTAROLLO et al., 2011).

Outra importante citocina pró-inflamatória é a IL-6. A liberação em excesso de IL-6 em resposta a um estímulo inflamatório é capaz de ativar o transdutor de sinal da janus quinase 2 (JAK2) e o ativador da via de sinalização da transcrição 3 (STAT3), essa via é uma das principais vias de transdução de sinal nas células, sendo essencial na proliferação e diferenciação celular (HUANG; LANG; LI, 2022). Diversos estudos reportaram a inibição da IL-6 e de outras vias de sinalização em câncer de pulmão. Caetano et al. descobriram que IL-6 está superexpresso em um modelo murino de câncer de pulmão mutante K-ras e em câncer de pulmão humano. Nesse estudo, o uso de anticorpos monoclonais anti-IL-6 conseguiu reduzir o efeito da inflamação no câncer de pulmão (CAETANO et al., 2016).

A IL-6 está elevada no soro de pacientes com adenocarcinoma de pulmão, e níveis séricos elevados estão relacionados a um prognóstico ruim. Além disso, foi demonstrado que após tratamento quimioterápico, os níveis séricos de IL-6 de pacientes com CPNPC diminuem significativamente, o que está relacionado a diminuição de recorrência e prolongamento da sobrevida dos pacientes (HUANG; LANG; LI, 2022). Yamaji e colaboradores ainda observou que oito de 15 linhagens celulares de câncer de pulmão expressam mRNA de IL-6, sugerindo que sua elevada expressão pode interromper o equilíbrio de citocinas e enfraquecer a imunidade antitumoral de pacientes com câncer de pulmão (YAMAJI et al., 2004).

O fator de necrose tumoral, também conhecida como TNF- α , é uma das citocinas inflamatórias mais importantes, identificada inicialmente pela sua capacidade de induzir necrose em células tumorais (BALKWILL, 2009). Atualmente, sabe-se que o TNF- α possui papéis contraditórios no câncer de pulmão. O TNF- α pode atuar tanto como supressor quanto como promotor tumoral. Estudos mostram que como supressor tumoral o TNF- α está relacionado intrinsecamente à morte de células tumorais mediada por células T CD8 (LEE; LEE; CHANG, 2022). Durante a inflamação crônica, níveis desregulados de TNF- α podem promover a carcinogênese. Luo e colaboradores demonstrou que o TNF- α estimula o crescimento tumoral e a metástase em camundongos portadores de câncer de pulmão, e a ação do TNF- α dependeu da atividade do NF- κ B de induzir proteínas anti-apoptóticas (LUO et al., 2004).

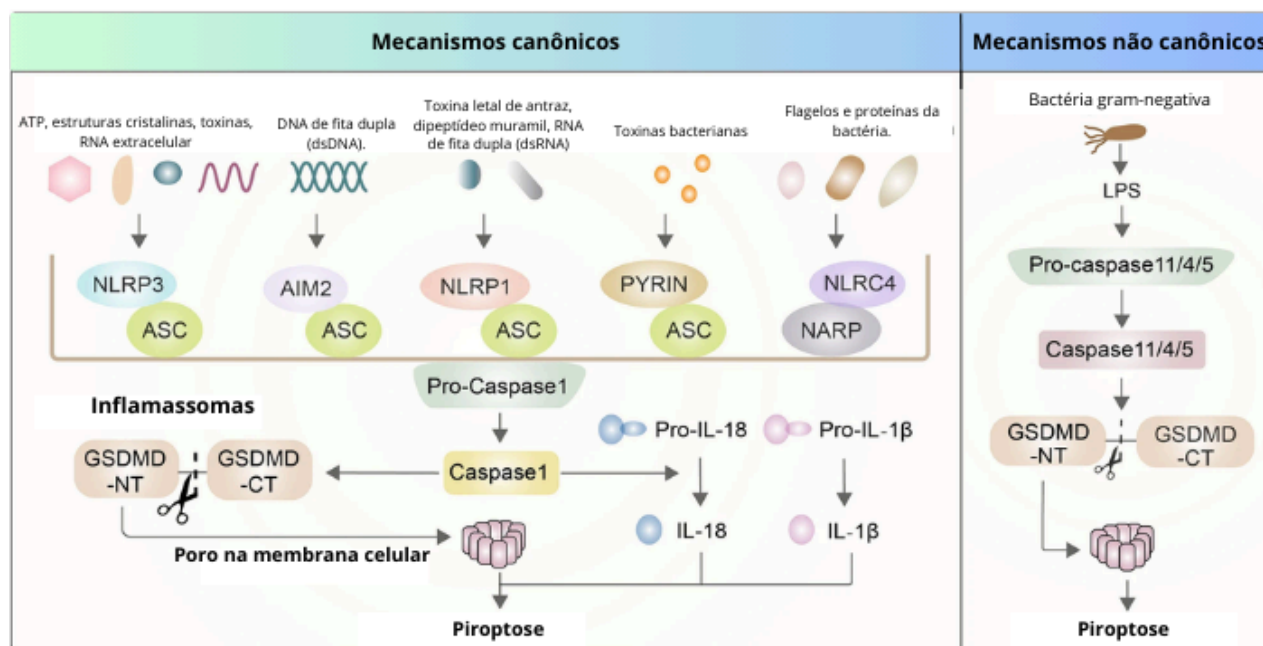
Outro importante fator inflamatório no câncer é o Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- β), que está envolvido em diversos processos biológicos, como na resposta imune, reparação tecidual e a tumorigênese. Níveis aumentados de TGF- β é comum no carcinoma pulmonar de não pequenas células e está associado a um mau prognóstico, estando relacionado a metástase linfonodal e angiogênese (TAN et al., 2021). Além disso, o TGF- β influencia na polarização de células imune no MAT e é capaz de mediar a transição epitélio-mesenquimal (TEM) em células cancerígenas. Essa transição contribui para quadros mais invasivos e com características mais agressivas como resistência a apoptose e quimiorresistência (SAITO; HORIE; NAGASE, 2018).

2.3.5 Piroptose e inflamação no câncer

A piroptose é uma forma de morte celular programada que compartilha algumas características com a apoptose, como a picnose celular e a fragmentação do DNA. No entanto, a piroptose apresenta ainda algumas características visualizadas no processo de necrose, como tumefação celular, formação de poros e ruptura de membrana. Quando ocorre a ruptura da membrana e conseqüentemente liberação do conteúdo celular, isso pode desencadear respostas inflamatórias e imunológicas (FENG et al., 2022).

Esse processo é mediado por caspases inflamatórias e executados pela proteína gasdermina D (GSDMD). Estas caspases são ativadas principalmente por inflamassomas, que são complexos multiméricos que protegem as células hospedeiras contra sinais de perigo endógenos e alguns patógenos. Os mecanismos de ativação dos inflamassomas que levam a piroptose geralmente são classificadas em vias canônicas, envolvendo a ativação da caspase-1, ou vias não canônicas, que incluem a ativação da caspase-11 em camundongos ou das caspases-4/5 em humanos (Figura 3) (WEI et al., 2022).

Figura 3: Mecanismos anônicos e não-canônicos de ativação dos inflamassomas e indução da piroptose



Mecanismos de ativação dos inflamassomas, divididos entre vias canônicas e não-canônicas. Nos mecanismos canônicos, diferentes sensores como NLRP3, AIM2, NLRP1, PYRIN, e NLRC4 detectam sinais de perigo (como ATP, DNA de fita dupla, toxinas bacterianas e flagelos) e ativam a proteína adaptadora ASC, que promove a ativação da Pro-Caspase-1 em Caspase-1 ativa. Esta, por sua vez, cliva Pro-IL-1β e Pro-IL-18, liberando as citocinas inflamatórias IL-1β e IL-18 e levando à clivagem de Gasdermina D (GSDMD), resultando em piroptose. Nos mecanismos não-canônicos, o LPS das bactérias Gram-negativas ativa diretamente Pro-Caspase-11/4/5, que cliva GSDMD, desencadeando também a piroptose. Assim, a figura destaca os diferentes caminhos moleculares que culminam na inflamação e morte celular.

No que se refere ao câncer, a piroptose atua como uma via de mão dupla, influenciando tanto em processos tumorigênicos quanto antitumorais. Como citado anteriormente, a inflamação crônica tem um papel importante na tumorigênese de diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de pulmão. Os inflamassomas desempenham um papel crítico na resposta inflamatória, e estudos mostram que células de câncer de pulmão apresentam expressão aumentada dos inflamassomas NLRP3 e AIM2, bem como caspase-1, IL-1β e IL-18, sugerindo que a piroptose

contribui para a progressão tumoral, ao promover um MT inflamatório (FENG et al., 2022).

Por outro lado, a piroptose pode induzir a morte das células cancerígenas. Teng (2020) relatou que a piroptose mediada por NLRP3/caspase-1/GSDMD foi elevada em células de CPCNP tratadas com polifilina VI, resultando na eliminação de células tumorais. Outro composto capaz de induzir piroptose em células de câncer de pulmão é a cucurbitacina B, por meio da ativação de TLR4/NLRP3/caspase-1/GSDMD (YUAN et al., 2021). Além disso, Peng (2020) demonstrou que o aumento da expressão de gasdermina E (GSDME) reduziu a resistência à cisplatina em células de CPCNP, promovendo a infiltração de imunócitos antitumorais através da indução de piroptose.

Apesar das ações pró-tumorais estejam amplamente estudadas, a compreensão da relação entre a piroptose e a inflamação anticâncer ainda não está totalmente elucidada, sendo um ponto promissor a ser explorado, incluindo como alvo terapêutico para câncer de pulmão.

2.4 Atuais terapias para o câncer de pulmão;

O câncer de pulmão envolve diferentes abordagens, como a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, e mais recentemente a imunoterapia. Em alguns casos, uma única opção pode ser insuficiente, sendo então necessário, fazer o uso de terapia combinada de duas ou mais opções. O principal tratamento para casos de CPCNP em estágio I e II é a cirurgia. Nos casos em que a doença está localmente avançada, a cirurgia não é viável, sendo então empregada a radioterapia em combinação com a quimioterapia (American Cancer Society, 2020).

Em estágios avançados de CPCNP, quando o tratamento localizado não é mais suficiente e se requer uma abordagem sistêmica, se faz uso de terapias complementares à cirurgia. O esquema terapêutico a base de cisplatina ou carboplatina e o etoposídeo, são a primeira linha de escolha, assim como para o tratamento de CPPC (GRAHAM et al., 2017).

A cisplatina, apesar de ser um dos primeiros quimioterápicos produzidos, atualmente segue tendo atividade anti-tumoral em diversos tipos de tumores sólidos, incluindo câncer de testículo, de bexiga, pulmão e ovários. A ação da cisplatina se dá

pela interação direta com o DNA das células tumorais. Após penetrar na célula, a cisplatina tem a capacidade de trocar duas de suas moléculas de cloro por H₂O causando diferentes tipos de lesões irreversíveis no DNA, levando à formação de adutos. Essas alterações levam a inibição da transcrição e replicação, que culminam na ativação da apoptose dependente ou independente de p53 em células tumorais (ALI et al., 2022).

Apesar de ainda ser a primeira linha de tratamento em casos mais avançados de câncer de pulmão, os casos de tumores resistentes à cisplatina vem aumentando nos últimos anos (ALI et al., 2022). Além disso, terapias com altas doses de cisplatina estão relacionadas a diversos efeitos colaterais, como a toxicidade renal, cardíaca, gástrica, neurológica e mielodepressão, o que resulta em uma limitação para o uso do quimioterápico (DUGBARTEY; PEPPONE; GRAAF, 2016).

O etoposideo, outro quimioterápico amplamente utilizado, é empregado não apenas para o tratamento do câncer de pulmão, mas também em outros tipos de câncer, como linfoma e leucemias. A ação do etoposideo se dá devido a inibição da enzima topoisomerase II, enzima essencial no processo de desenrolamento da fita de DNA durante a replicação. Essa inibição resulta em quebras na fita de DNA e consequentemente a morte celular programada, nesse caso a apoptose. Assim como a cisplatina, o etoposideo ainda é a primeira linha de tratamento, principalmente em casos de CPPC. No entanto, os casos de resistência e efeitos colaterais limitam o uso do quimioterápico (WANG et al., 2020).

Atualmente, uma abordagem mais personalizada, ou seja, uma terapia alvo que é baseada em características histológicas e marcadores moleculares, também já é possível. Em 60% dos adenocarcinomas pulmonares e em 50 a 80% dos carcinomas pulmonares de células escamosas, encontram-se mutações genéticas em receptores ou proteínas quinase, que levam ao crescimento descontrolado, proliferação e sobrevivência do tumor. As principais terapias alvo para pacientes com câncer de pulmão estão relacionadas a mutações nos genes alvos, como o EGFR, linfoma anaplásico quinase (ALK), e do receptor de tirosina quinase codificado pelo gene ROS1 (SHROFF et al., 2018).

Outra opção terapêutica que vem sendo estudada nos últimos anos é a imunoterapia. Com o avanço nos estudos sobre a atividade antitumoral do sistema

imune, a imunoterapia vem com a premissa de estimular o sistema imunológico a desenvolver respostas mais eficazes contra as células cancerígenas.

A imunoterapia pode agir de maneira ativa ou passiva, dependendo da interação com o sistema imune e das respostas geradas. A imunoterapia ativa está relacionada com a modulação do sistema imune por meio de agentes imunoterápicos, como citocinas recombinantes, vacinas e anticorpos monoclonais imunomoduladores. Já a imunoterapia passiva não requer a ativação do sistema imunológico, utilizando-se de uma atividade antitumoral temporária. Esse efeito é alcançado através de anticorpos monoclonais alvo-específicos que se ligam a antígenos associados ao tumor, promovendo a eliminação de células cancerígenas pelo sistema imune (CARTER; et al., 2017).

Os anticorpos monoclonais imunomodulatórios podem atuar diretamente sobre alguns alvos específicos, como o receptor de morte celular programada 1 (PD-1) e a proteína ligante de morte programada-1 (PDL-1). No tocante ao câncer de pulmão, os anticorpos monoclonais imunomodulatórios Nivolumabe e pembrolizumabe, agem justamente nesses alvos. Estes agentes imunoterápicos já são aprovados como um tratamento para pacientes com CPCNP avançado. Eles atuam na ligação entre o PD-1 dos linfócitos e o PDL-1 das células tumorais, impedindo o bloqueio da atividade citotóxica da célula T (SHROFF et al., 2018). Além disso, também já é possível ser realizada a associação de inibidores de PD-L1 a quimioterapia convencional com etoposídeo e uma platina, resultando em um aumento da sobrevida de pacientes com CPPC (HORN et al., 2018).

Atualmente inúmeras pesquisas estão voltadas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que têm como alvo os componentes do microambiente tumoral. Sabe-se que o microambiente tumoral é extremamente complexo e heterogêneo, assim diversas estratégias, visando diferentes alvos estão sendo desenvolvidas.

Dentre esses alvos, destacam-se os estudos voltados aos macrófagos associados ao tumor. Para os TAMs, as estratégias estão focadas na inibição do recrutamento e diferenciação de macrófagos. As células supressoras derivadas de mielóide (MDSCs) são células mieloides imaturas, que possuem um papel importante na resposta imune contra tumores. As MDSCs são precursoras de

células dendríticas, macrófagos e granulócitos, e podem se diferenciar em TAMs em condições hipóxicas (GAO et al., 2023).

As quimiocinas são os principais agentes que atraem macrófagos para os tumores. A inibição da proteína quimiotática de monócitos MCP-1 (CCL2) com bindarit, um agente anti-inflamatório capaz de inibir citocinas específicas, resultou na redução do crescimento tumoral em xenoinxertos de melanoma humano (LIU et al., 2017). Além disso, esse mesmo composto, aumentou a expressão do inibidor de NF- κ B, modulando a proliferação de células cancerígenas in vitro, o que culminou no comprometimento do crescimento tumoral de metástases com redução na infiltração de células mielóides, em modelos animais de câncer de próstata e mama (ZOLLO et al., 2012).

O fator estimulador de colônias de macrófagos M-CSF (CSF-1) é um potente fator de crescimento de monócitos/macrófagos. ZHU et. al mostrou que bloqueio da sinalização CSF1/CSF1R pelos inibidores GW2850 e PLX3397 CSF1R ou por anti-CSF-1 bloqueou o recrutamento de TAM e MDSC, além disso também induziu a morte de TAMs M2 e reprogramou os TAMs restantes para um fenótipo mais antitumoral, em murinos com adenocarcinoma ductal pancreático. O tratamento anti-CSF1 quando combinado com imunoterapia anti-PD-1/anti-CTLA4 e gencitabina, mostrou regressão completa do tumor em 30% dos camundongos e uma regressão média do tumor de 85% (ZHU et al., 2014).

Outra estratégia é a remoção de macrófagos alternativamente ativados indesejados e células mielóides imaturas. O tratamento com anticorpo monoclonal anti-CD115 reduziu com sucesso o crescimento tumoral e prolongou a sobrevivência de camundongos devido à depleção de TAMs em um modelo de câncer de mama murino (FEND et al., 2013). O Ácido zoledrônico reduziu o número de TAMs e reverteu sua polarização de M2 para M1 através da inibição do sítio ativo da enzima farnesil pirofosfato (FPP) sintase na via do mevalonato (RIETKÖTTER et al., 2013).

A repolarização de macrófagos M2 em macrófagos M1 também é uma opção de terapia anti-tumoral. A partir da repolarização, há uma redução de fatores imunossupressores no microambiente tumoral, o que antagoniza o tumor (SZE BENI et al., 2016). O tratamento in vivo com IL-12 alterou o perfil dos TAMs, mudando seu fenótipo que apresentava altos níveis de IL-10 e TGF- β , para um fenótipo com alta

liberação de TNF- α em um modelo murino de câncer de pulmão (WATKINS et al., 2007). O composto hidrazinocurcumina alcançou resultados similares através da inibição de STAT3, o que resultou na repolarização de TAMs para um fenótipo que expressa altas quantidades de IL-12 e baixas de IL-10 e TGF- β (ZHANG et al., 2013).

Diferentes mecanismos como imunossupressão, angiogênese e metástase, responsáveis pela progressão do câncer estão relacionados à inflamação. Nesse contexto, é de extrema importância compreender de forma mais aprofundada os efeitos da interação dos mediadores inflamatórios liberados pelos macrófagos no câncer de pulmão, visando não só a pesquisa de novas abordagens, mas também buscar o aperfeiçoamento das terapias já estabelecidas.

3. JUSTIFICATIVA

O carcinoma pulmonar é a principal causa de morte por câncer em todo mundo. No Brasil, segundo dados do último levantamento do INCA, apenas no ano de 2020, ocorreram mais de 28.000 mortes por câncer de pulmão (INCA, 2022). As terapias convencionais para o câncer de pulmão ainda apresentam inúmeras limitações, como o aparecimento de resistência e a toxicidade causada por altas doses. Essa resistência pode ser causada por diversos fatores intrínsecos ao paciente, incluindo a composição do microambiente tumoral que dá suporte para o tumor. Pacientes com uma maior população de macrófagos M1 apresentam uma maior sobrevida, além disso, imunoterapias voltadas à repolarização de macrófagos estão sendo estudadas (JACKUTE et al., 2018).

No entanto, é necessário aprofundar o entendimento sobre os efeitos da interação entre os mediadores inflamatórios liberados pelos macrófagos M1 e as abordagens terapêuticas convencionais. Esse conhecimento é essencial não só para a pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, mas também para o aperfeiçoamento das já existentes, visando aumentar a eficácia dos tratamentos e, consequentemente, melhorar os resultados clínicos e a qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, o presente projeto propõe avaliar o impacto de um meio

condicionado por macrófagos M1 em linhagens de carcinoma pulmonar expostas aos principais fármacos quimioterápicos utilizados na prática clínica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do meio condicionado pró-inflamatório na resposta terapêutica aos quimioterápicos cisplatina, etoposido em células de câncer de pulmão

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as biomoléculas presentes no meio condicionado produzido por macrófagos M1;
- Verificar o impacto do meio condicionado pró-inflamatório na citotoxicidade nas linhagens NCI-H1299 e A549 expostas a quimioterápicos;
- Verificar o impacto do meio condicionado pró-inflamatório no ciclo celular nas linhagens NCI-H1299 e A549 expostas a quimioterápicos;
- Verificar o impacto do meio condicionado pró-inflamatório na produção de espécies reativas de oxigênio nas linhagens NCI-H1299 e A549 expostas a quimioterápicos;
- Investigar o efeito do meio condicionado pró-inflamatório na expressão de genes de morte celular nas linhagens NCI-H1299 e A549 expostas a quimioterápicos;
- Verificar o impacto do meio condicionado pró-inflamatório na formação de colônias na linhagem NCI-H1299 de carcinoma pulmonar
- Avaliar o efeito do meio condicionado e dos quimioterápicos no tamanho e proliferação dos esferóides nas linhagens NCI-H1299 e A549.

5. METODOLOGIA

5.1 Comitê de Ética

Para o presente projeto, não se aplicou a submissão ao comitê de ética, tendo em vista que não houve o uso de amostras humanas ou animais, foram utilizadas apenas células imortalizadas.

5.2 Obtenção das Linhagens Celulares

As linhagem celular de câncer de pulmão de células não pequenas NCI-H1299, assim como a linhagem U937 de monócitos humanos imortalizados foram adquiridas do Banco de Células do Nupit-SG/UFPE.

5.3 Cultura Celular

Foi utilizada a linhagem celular de câncer de pulmão de células não pequenas NCI-H1299, assim como a linhagem U937 de monócitos humanos imortalizados. As células NCI-H1299 foram cultivadas (10^6 células/mL) em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal, 10 mM de HEPES e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina, formando o meio de cultura completo, e foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. As células U937 foram semeadas ($2,5 \times 10^5$ células/ml) em suspensão, cultivadas em meio RPMI completo e incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingiu a confluência necessária (entre 70% e 80%).

5.4 Diferenciação celular da linhagem U937 e preparação dos meios condicionados (MC)

As células U937 foram semeadas em placas de 6 poços, na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/ml em meio RPMI completo por 24 horas, sendo o volume final de 2mL por poço. Após as 24h, para induzir a diferenciação em macrófagos, as células foram tratadas com 100nM de PMA e 100ng/ml de LPS, e incubadas por 48h (adaptado de THABET et al., 2019). Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, semeadas em meio isento de soro e incubadas por mais 24h. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C

para ser usado posteriormente como meio condicionado para linhagens de câncer de pulmão. Além disso, o sobrenadante também foi utilizado para dosagem de citocinas por *cytometric bead array* (CBA).

5.5 Análise do fenótipo dos macrófagos por citometria de fluxo

Para identificar o fenótipo de macrófagos diferenciados com PMA em associação ao LPS, as células foram coletadas da placa de cultura, foi utilizada a tripsina para promover a desagregação das células do fundo da placa, em seguida a tripsina foi inativada com meio RPMI completo, e as células foram lavadas com PBS (*phosphate-buffered saline* - salina tamponada com fosfato) e então centrifugadas. As células foram então marcadas com anticorpos para CD80 e CD86, marcadores de macrófagos M1; os anticorpos CD200 e CD206 marcadores de macrófagos M2 por 30 min a 4°C no escuro e depois lavadas duas vezes e ressuspensas em 500 µL de PBS. As células foram analisadas no citômetro BD FACSAria II (BDbiosciences) e analisadas usando o software BD FACSDiva (BDbiosciences).

5.6 Dosagem das citocinas e quimiocinas por *Cytometryc Bead Array* (CBA)

Os níveis de citocinas no meio condicionado foram dosados utilizando os Kits de CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit da BD biosciences, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram processadas no citometro BD FACSAria II (BDbiosciences) e analisadas usando o software FCAP Array (BDbiosciences).

5.7 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico baseado na conversão do sal MTT em cristais de formazan. As células neoplásicas NCI-H1299, foram semeadas na concentração de 5×10^3 células/100µl em placas de 96 poços. Após 24h as células foram tratadas com os quimioterápicos (cisplatina e etoposídeo) e expostas ao meio condicionado por 72h. Após o tempo de incubação, o sal MTT foi adicionado no escuro e a placa levada novamente para a estufa por mais 3 horas, para então ser adicionado o SDS (sodium dodecyl sulfate). As leituras foram feitas após 24h em espectrofotômetro de placa, a 570 nm.

5.8 Análise do Ciclo Celular

Para a análise do ciclo celular, as células NCI-H1299 foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10^4 células/ml. Após 24h, houve os seguintes grupos de tratamento:

- NT: Células não tratadas por 48h;
- MC: Células expostas ao meio condicionado por 48h;
- CIS IC25: Cisplatina na dose do IC25 por 48h;
- MC CIS IC25: Exposição ao meio condicionado + cisplatina na dose do IC25 por 48h;
- ETP IC25: Etoposídeo na dose do IC25 por 48h;
- MC ETP IC25: Exposição ao meio condicionado + cisplatina na dose do IC25 por 48h;
- CIS + ETP IC25: Cisplatina + Etoposídeo na dose do IC25 por 48h;
- MC CIS+ETP IC25: Exposição ao meio condicionado + Cisplatina + Etoposídeo na dose do IC25 por 48h.

Após o tratamento as células foram fixadas no etanol 70% por 4 dias. Após o tempo de fixação, as células foram lavadas com PBS e marcadas com Iodeto de Propídeo (eBioscience) por 30 minutos a 37°C, de acordo com as especificações do fabricante e utilizando-se o equipamento Attune (Applied Biosystems). A análise dos resultados foi realizada pelo software FlowJoo-V10.

5.9 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

Para a análise da produção de espécies reativas de oxigênio, as células NCI-H1299 foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de $7,5 \times 10^4$ células/ml. Após 24h, as células foram tratadas com os quimioterápicos, onde houve os seguintes grupos de tratamento:

- NT: Células não tratadas por 48h;
- MC: Células expostas ao meio condicionado por 48h;
- CIS IC25: Cisplatina na dose do IC25 por 48h;

- MC CIS IC25: Exposição ao meio condicionado + cisplatina na dose do IC25 por 48h;
- ETP IC25: Etoposídeo na dose do IC25 por 48h;
- MC ETP IC25: Exposição ao meio condicionado + etoposídeo na dose do IC25 por 48h;
- CIS + ETP IC25: Cisplatina + Etoposídeo na dose do IC25 por 48h;
- MC CIS+ETP IC25: Exposição ao meio condicionado + Cisplatina + Etoposídeo na dose do IC25 por 48h.

Após o tratamento as células foram marcadas com com dihydroethidium (DHE - 4 μ M) (CHEM CRUZ), por 30 minutos protegidos da luz, de acordo com as especificações do fabricante e utilizando-se o equipamento Attune (Applied Biosystems) A análise dos resultados foi realizada pelo software FlowJoo-V10.

5.10 Análise da expressão de genes de morte por PCR em tempo real

A linhagem NCI-H1299 foi semeada em placas de 12 poços, na densidade de 5x10⁴ células por poço em 500uL de meio RPMI completo por 24 horas. Após as células aderirem e atingirem a confluência de 70 a 80%, foram tratadas com os quimioterápicos (cisplatina e etoposídeo) e expostas ao meio condicionado por 24h.

Para a extração de RNA, as amostras foram suspensas em 500 uL de Trizol (Invitrogen, UK), em seguida a extração foi feita seguindo as instruções do fabricante. Após a extração foi feita a quantificação utilizando o nanodrop, o NanoDrop mede a absorbância a 260 nm (para quantificação de ácidos nucleicos) e 280 nm (para a avaliação da pureza da amostra). A razão de pureza (260/280) foi monitorada, sendo aceitas amostras com valores entre 1,8 e 2,0, indicativos de uma boa qualidade do RNA.

Após a quantificação, cada amostra foi submetida à obtenção de DNA complementar (cDNA), a partir de 500ng de RNA, utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi armazenado a – 80°C para posterior utilização na detecção e quantificação dos genes pela técnica de PCR em tempo real.

Os ensaios para se obter a expressão dos genes Caspases 3, NLRP3, GSMD, RIPK1 e GAPDH, foram feitos de acordo com as instruções do fabricante. Os experimentos foram realizados usando o QuantStudio Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific).

A expressão de cada gene por amostra foi determinada através de duplicatas. Expressões quantitativas relativas foram calculadas seguindo o método Fold Change (FC), sugerido por Schmittgen e Livak (Schmittgen e Livak 2008) para os ensaios $FC = 2^{-\Delta\Delta Cq}$ ou $FC = 2^{-[(\text{gene } Cq \text{ de interesse} - \text{controle interno } Cq) \text{ amostra A} - (\text{Gene } Cq \text{ de interesse} - \text{controle interno } Cq) \text{ amostra B}]}$.

5.11 Avaliação do meio condicionado na formação de colônias na linhagem NCI-H1299 de carcinoma pulmonar

Para avaliar o impacto do meio condicionado na formação de colônias na linhagem NCI-H1299, foram plaqueadas 1000 células por poço em placas de 6 poços. Após 24h as células foram expostas ao meio condicionado obtidos de macrófagos M1 ou ao meio de cultura RPMI por 72h. Após o tempo de tratamento as células foram lavadas 1x com PBS e o tratamento foi substituído por meio RPMI completo por mais 6 dias. Em seguida o meio foi descartado, as colônias foram lavadas 3x e então fixadas com 1mL de paraformaldeído 4% diluído em água por 10 minutos. Após os 10 minutos as colônias foram lavadas 3x com PBS e então adicionado o cristal violeta 0,1% por 20 minutos. Em seguida as colônias foram lavadas novamente 3x e a placa foi deixada secando por pelo menos 24h, para por fim as fotos serem tiradas. As colônias foram contadas, onde >50 células correspondeu a uma colônia.

5.12 Avaliação do meio condicionado associado aos quimioterápicos em esferóides de células de câncer de pulmão

Para a produção dos esferóides, as células NCI-H1299 foram plaqueadas (2×10^4) em placa de 96 poços contendo 60uL de agarose por 4 dias para a formação dos esferóides. Em seguida os esferóides foram expostos ao meio condicionado, a cisplatina nas concentrações do IC25 (6,635 μM) e IC50 (13,27 μM) e também a

cisplatina nas mesmas concentrações ao meio condicionado. Já nos grupos tratados com o etoposídeo, as células foram expostas ao quimioterápico nas concentrações de IC₂₅ (1,6 µM) e IC₅₀ (3,2 µM) isoladamente ou em associação ao meio condicionado.

Para avaliar o impacto dos grupos de tratamento no tamanho dos esferóides, foram realizadas fotos e medições da área dos esferóides nos tempos de 0, 24h, 48h e 72h, utilizando o ImageJ. Onde após definir a escala das fotos (300µm) os esferóides foram selecionados utilizando a ferramenta de varinha mágica e sua área foi calculada pelo software.

Além disso, para avaliação dos marcador Ki67, os esferóides foram fixados com glutaraldeído (SIGMA) (2,5%), em seguida lavado com PBS e realizada uma desidratação graduada com etanol (100%). Os esferóides então foram lavados novamente com PBS e foi adicionado 0,1% de TRITON X-100 em PBS nos esferóides por 5 min para torná-los permeáveis ao anticorpo. Em seguida foi realizado um bloqueio com BSA (albumina sérica bovina) por 20 minutos. Após o bloqueio os esferóides foram marcados com Ki67 por 1h (adaptado de SIAHMAZGI et al., 2023). As análises foram realizadas por microscopia de fluorescência.

Para medir a intensidade média de fluorescência foi utilizado o software imageJ, utilizando a ferramenta foram obtidos os valores da densidade integrada, a área e o background dos esferóides. Em seguida foi realizado o cálculo de intensidade corrigida, que corresponde aos dados de intensidade integrada - background x área dos esferóides.

5.13 Análises estatísticas

O software GraphPadPrism versão 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado para o tratamento estatístico dos dados. Para os resultados que obedecerem a distribuição normal, foi utilizado o teste paramétrico t (Student). Já para os resultados não-paramétricos, o teste utilizado foi o Kruskal-Wallis (múltiplas comparações). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização do meio condicionado por macrófagos diferenciados com PMA e LPS

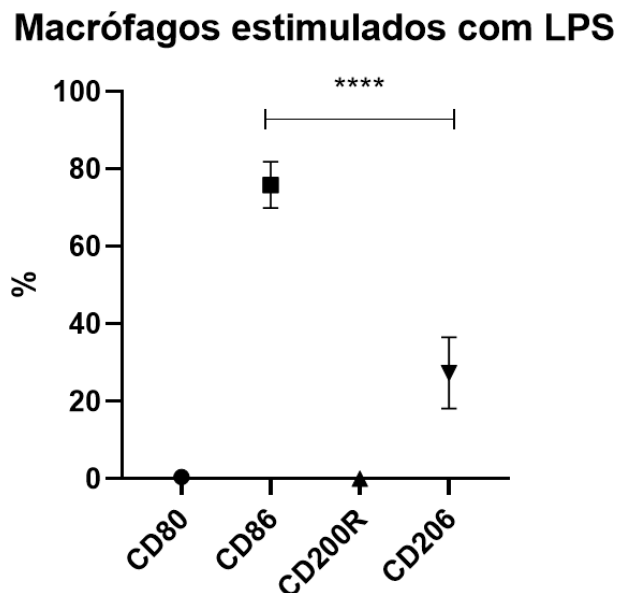
Para a caracterização da população de macrófagos diferenciados a partir da linhagem U937 estimulada com PMA e LPS, foi avaliado, por citometria de fluxo, o seu perfil de marcação. Foram utilizados os marcadores de superfície celular, CD80 e CD86 para caracterização de macrófagos M1 e CD200R e CD206 para caracterização de macrófagos M2. Os resultados mostraram que a diferenciação e polarização com PMA e LPS aumentaram a expressão do marcador para M1 CD86, mas também CD206. No entanto, a porcentagem de células expressando CD86 foi significativamente ($p^{****} < 0,0001$) maior do que aquelas expressando o CD206, indicando uma polarização para o fenótipo pró-inflamatório (figura 4).

Os CD80 e CD86 são grupos de moléculas co-estimulatórias expressos em células apresentadoras de antígeno, são expressos nos macrófagos ativados, especialmente os do tipo M1 (pró-inflamatórios) (SOSKIC et al., 2021). Assim, em processos inflamatórios, a expressão de CD80/86 facilita a ativação das células T e a amplificação da resposta inflamatória, favorecendo a eliminação de patógenos e células tumorais (ZHANG; YANG; ERICSSON, 2021).

O CD206, também conhecido como receptor de manose C tipo 1 (MRC1), é uma proteína de superfície celular abundantemente presente em populações de macrófagos M2 e células dendríticas. Embora nossa análise não tenha investigado os níveis de marcadores M1 e M2 na linhagem U937 após a diferenciação com o PMA sem o estímulo do LPS, foi descrito por Abdulhadi (2014) que a linhagem U937 quando diferenciada de monócitos em macrófagos pelo PMA para um fenótipo M0, expressa uma quantidade significativa de CD206, comparada com a linhagem não diferenciada. Assim, os níveis de CD206 observados nos macrófagos diferenciados estimulados pelo LPS pode estar relacionada ao processo prévio de diferenciação

das células U937 pelo PMA, como corrobora a literatura (SHARP, 2013, ABDULHADI, 2014, BAKHEIT et al., 2023).

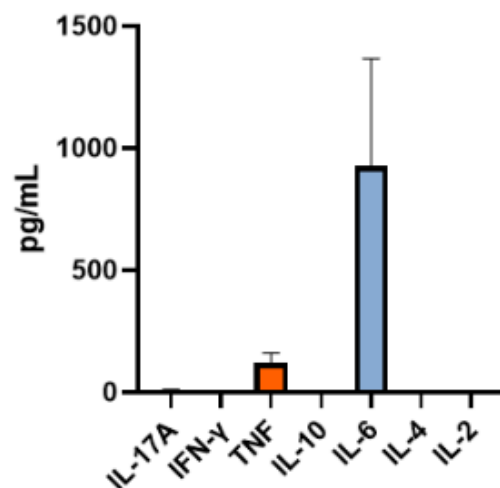
Figura 4: Expressão dos marcadores CD80, CD86, CD200R e CD206 após estímulo com LPS



Porcentagem de macrófagos derivados da linhagem U937 expressando os marcadores CD80, CD86, CD200R e CD206 após exposição ao LPS por 48h. $p^{****} < 0,0001$.

Além disso, para confirmar o perfil dos macrófagos, as concentrações de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) presentes no meio condicionado. Foi possível observar níveis exacerbados de IL-6 e um aumento nos níveis de TNF, confirmando que o meio condicionado possui características pró-inflamatórias (figura 6). Estes resultados estão de acordo com estudos prévios do grupo de pesquisa, onde os níveis da expressão IL-6, TNF- α e ainda IL-1 β foram avaliados por PCR em tempo real nas células U937 diferenciadas com PMA e LPS.

Figura 6: Dosagem dos níveis de citocinas presentes no meio condicionado dos macrófagos derivados da linhagem U937 após estímulo ao LPS



Níveis das citocinas IL17A, INF- γ , TNF, IL-6, IL-4 e IL-2 dosadas no meio condicionado por macrófagos U937 diferenciados com PMA e estimulados com LPS por 48h.

O fator de necrose tumoral (TNF) é um mediador inflamatório de destaque, inicialmente reconhecido por sua habilidade de induzir necrose em células tumorais (BALKWILL, 2009). Estudos mais recentes mostram que a partir da análise de screenings genéticos em células tumorais, sugeriu que a partir de direcionamento farmacológico contra proteínas específicas, poderia potencialmente reverter os efeitos pró-tumorais do TNF em citotoxicidade para as células tumorais (FREEMAN, 2021).

Já a interleucina-6 é uma citocina pró-inflamatória conhecida principalmente por suas funções pró-tumorais. Níveis elevados de IL-6 são capazes de ativar o transdutor de sinal da janus quinase 2 (JAK2) e o ativador da via de sinalização da transcrição 3 (STAT3), uma das principais vias de transdução de sinal, essencial na proliferação e diferenciação celular. O tratamento com anticorpos monoclonais anti IL-6 já vem sendo utilizado por pacientes com carcinoma pulmonar (HUANG; LANG; LI, 2022).

Apesar dos efeitos ambíguos que os fatores pró-inflamatórios podem apresentar, sua presença no meio condicionado é importante para melhor mimetização de um microambiente inflamatório em um paciente de câncer de pulmão. Por exemplo, os níveis de IL-6 estão aumentados em pacientes fumantes e ex-fumantes, além de pacientes com carcinoma pulmonar em estágios mais avançados (GAUR et al., 2019).

6.2 A exposição ao meio condicionado reduziu significativamente a viabilidade da linhagem NCI-H1299

Para avaliação da viabilidade celular da linhagem de CPCNP, NCI-H1299, foi utilizado o ensaio colorimétrico de viabilidade celular, MTT. A NCI-H1299 é uma linhagem agressiva que apresenta deleção parcial da proteína p53, um importante supressor tumoral relacionado ao ciclo celular. Os resultados demonstraram que a exposição ao meio condicionado isoladamente culminou em uma redução de 72.4% da viabilidade celular após 72h, quando comparadas ao grupo controle (células não tratadas) ($p^{****}<0,0001$) (figura 7A).

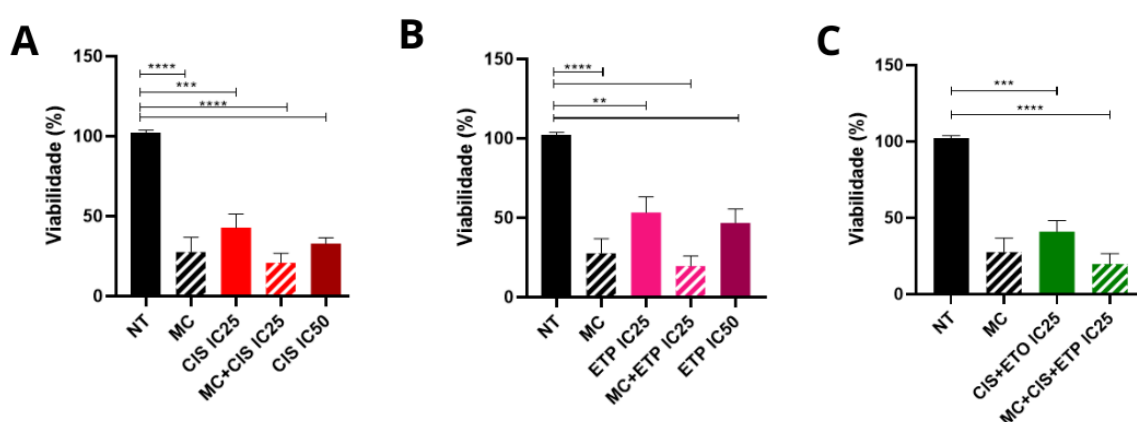
Para avaliar ainda os efeitos do meio condicionado associado aos principais fármacos quimioterápicos utilizados na clínica para pacientes de câncer de pulmão, a linhagem NCI-H1299 foi exposta ao MC em associação a cisplatina na concentração de metade do IC50 (IC25), MC em associação ao etoposídeo na concentração de metade do IC50 (IC25) e ainda a associação destes dois fármacos em adição ao MC.

Os resultados revelaram que a associação do MC a cisplatina IC25, potencializou a ação da cisplatina quando comparado ao grupo controle. A média da viabilidade celular nas células expostas apenas a cisplatina foi de 42,81% ($p^{***}0,0005$), enquanto nas células expostas ao MC em associação a cisplatina foi de 20,85% ($p^{****}<0,0001$), como mostra a figura 7A. No grupo tratado com etoposídeo, a diferença entre o grupo tratado apenas com o quimioterápico e o grupo tratado com o quimioterápico em associação ao MC foi ainda mais

significativa, com a redução na viabilidade correspondendo a 53,25% e 19,6%, respectivamente (figura 7B).

Além disso, nos grupos que foram expostos a associação da cisplatina e etoposídeo com ou sem o MC, também foi possível observar uma redução significativa da viabilidade celular no grupo contendo o meio pró-inflamatório (figura 7C), onde houve uma redução de 40,98% para 19,64%.

Figura 7: Efeitos do meio condicionado na viabilidade celular das linhagem de carcinoma pulmonar NCI-H1299



A. Viabilidade celular da linhagem NCI-H1299 após exposta ao MC e a cisplatina nas concentrações do IC25 e IC50 (6,635 μ M e 13,27 μ M). B. Viabilidade celular da linhagem NCI-H1299 após ser exposta ao MC e ao quimioterápico etoposídeo nas concentrações do IC25 e IC50 (1,6 μ M e 3,2 μ M). C. Viabilidade celular da linhagem NCI-H1299 após exposição a associação da cisplatina e etoposídeo nas concentrações do IC25, e sua adição ao MC. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; CIS IC25 - Cisplatina 6,635 μ M; CIS IC50 - Cisplatina 13,27 μ M; ETP IC25 - Etoposídeo 1,6 μ M; ETP IC50 - Etoposídeo 3,2 μ M. (** $P < 0,05$, *** $P < 0,0005$, **** $P < 0,0001$).

Os macrófagos pró-inflamatórios além da capacidade de eliminação de patógenos, possuem funções anti-tumorais, agindo através da liberação de mediadores inflamatórios que tem capacidade tumoricida, produção de espécies reativas de oxigênio e recrutamento de células TCD8 (KUMARI; CHOI, 2022).

Dentre as citocinas e quimiocinas presentes no meio condicionado, o TNF possui a capacidade de desencadear diferentes tipos de morte celular, apoptose, necroptose e piroptose. A apoptose desencadeada por TNF- α envolvem a formação de complexos de sinalização que resultam na ativação da via extrínseca da apoptose pela ativação de caspase 8, ou piroptose pela clivagem de gasdermina D (GSDMD). Quando há a inativação da caspase 8, TNF- α desencadeia necroptose (necrose celular programada) através da ativação de moléculas como proteína quinase 3 e 1 que interage com o receptor (RIPK3 e RIPK1) e proteína semelhante ao domínio da quinase de linhagem mista (MLKL) (VAN LOO; BERTRAND, 2022).

Os macrófagos M1 produzem espécies reativas de oxigênio em resposta a estímulos inflamatórios, como é o caso do LPS, utilizado para a produção do meio condicionado. A presença de ROS pode levar a danos de membrana, danos ao DNA, disfunção mitocondrial e outros mecanismos que podem resultar em morte celular. Estudos demonstram que ROS tem um papel importante na ativação do inflamassoma NLRP3, além de regular positivamente a expressão de expressão de NLRP3, pro-caspase-1 e pro-IL-1 β , moléculas necessárias para a via de sinalização da piroptose (ABAIS et al., 2015, ZHENG et al., 2022).

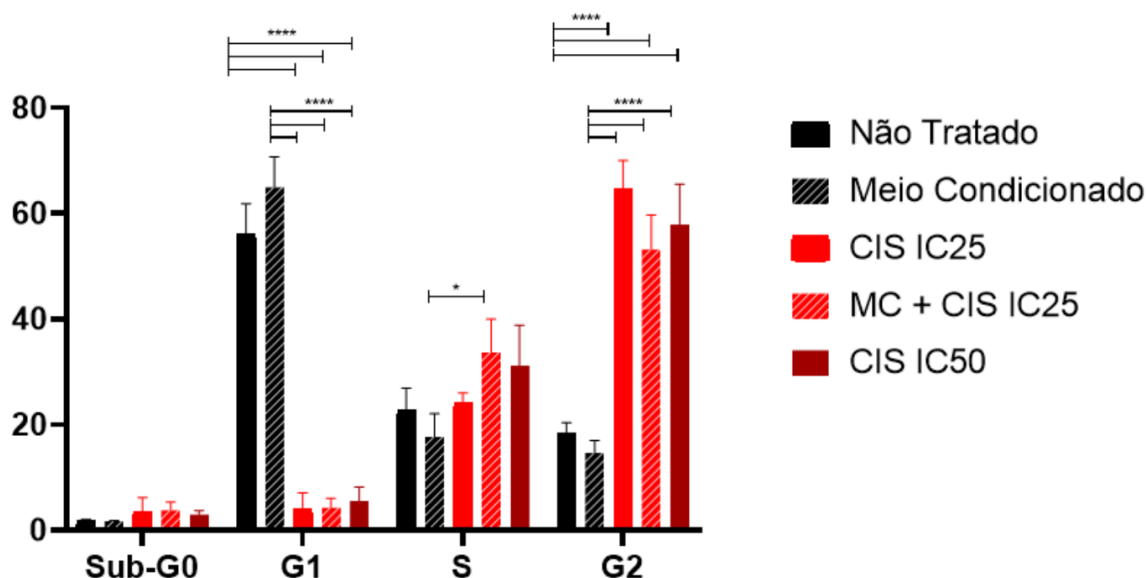
6.3 O meio condicionado em associação a cisplatina leva a um aumento de células estacionadas na fase S do ciclo celular na linhagem H1299

A avaliação do impacto do meio condicionado revelou que, sozinho, ele não é capaz de interferir no ciclo celular das células de câncer de pulmão analisadas. Quando comparado ao grupo controle, pode-se notar um aumento de células estacionadas na fase G1, no entanto esse aumento não foi significativo (figura 8).

Nos grupo tratados com a cisplatina, foi possível observar que sua associação ao MC aumentou a porcentagem média de células estacionadas na fase S (33,7%), quando comparado com o grupo tratado apenas com a cisplatina (24,03%). Para a fase G2, ocorreu uma inversão, o grupo tratado apenas com

cisplatina possui uma maior porcentagem média de células estacionadas (64,58%), enquanto a sua associação ao MC reduziu essa média para (53,16%) (figura 8).

Figura 8: Avaliação dos efeitos do MC e sua associação ao quimioterápico cisplatina no ciclo celular da linhagem NCI-H1299



Porcentagem média de células NCI-H1299 estacionadas nas fases, Sub-G0, G1, S e G2 do ciclo celular após expostas ao MC e a cisplatina nas concentrações do IC25 e IC50 (6,635 μ M e 13,27 μ M).

É bem estabelecido que a cisplatina possui a capacidade de parar o ciclo celular na fase G2/M, isso ocorre devido aos danos ao DNA causados pelos adutos de cisplatina. Os danos ao DNA ativam a via de sinalização ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada - ATM)/ATR (ATM e Relacionado a Rad3), estas proteínas ativam as quinases Chk1 e Chk2, que são reguladoras dos pontos de controle do ciclo celular. As quinases Chk1 e Chk2 fosforilam e inibem Cdc25, inibindo também Cdc2 e a ciclina B, responsáveis pela transição da fase G2 para a mitose (HE et al., 2011).

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, as células expostas somente a cisplatina, possuem uma maior porcentagem de células paradas na fase G2. A exposição ao MC associado a cisplatina, aumentou a

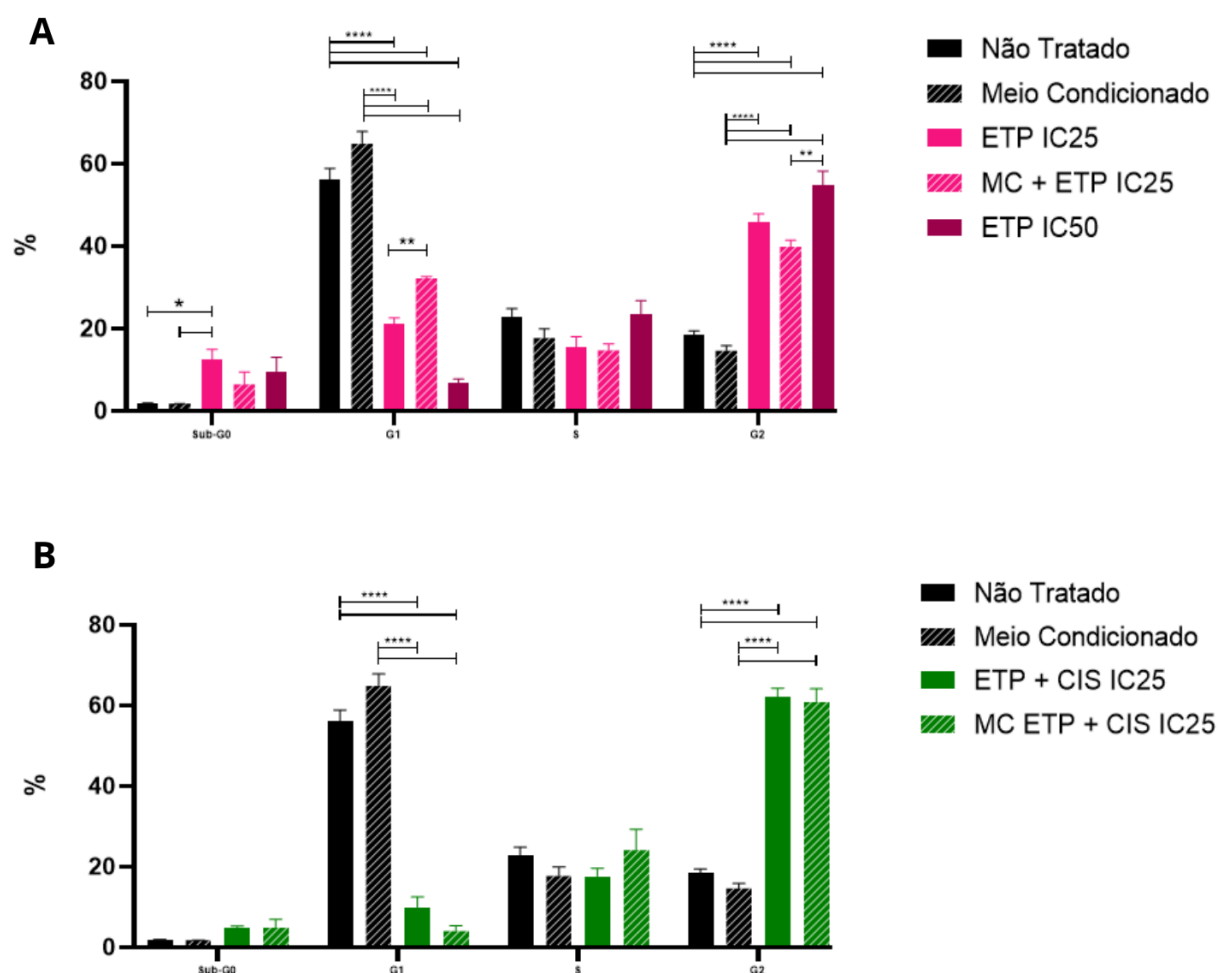
porcentagem de células na fase S. Os mecanismos que levam a parada da célula na fase S pela cisplatina são bastante semelhantes aqueles que levam a parada na fase G2, compartilhando a mesma via até a inibição de Cdc25, que além de resultar na inibição de Cdc2/ciclina B, inibe também Cdk2/ciclina A, sugerindo assim que o MC pode potencializar a ação da cisplatina na parada na fase S.

6.4 O meio condicionado em associação ao etoposídeo leva a um aumento de células estacionadas na fase G1 do ciclo celular na linhagem H1299

No grupos tratado com o etoposídeo na concentração do IC25, diferente dos grupos tratados com a cisplatina, houve uma porcentagem significativa de células na fase Sub-G0 (12,34%) ($p^{**}0,0071$), quando comparado ao grupo controle e o grupo exposto apenas ao MC. A associação do MC ao etoposídeo resultou em um aumento significativo de células estacionadas na fase G1 do ciclo celular (32,18%) ($p^{*}0,0158$), quando comparado ao grupo exposto somente ao MC. Para as fases S e G2, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com etoposídeo isoladamente na concentração do IC25 e sua associação ao MC, como mostra a figura 9A.

Foi avaliado também a associação entre cisplatina e etoposídeo na concentração do IC25, além do impacto da adição do MC a esse grupo. A presença do MC na associação entre os dois quimioterápicos, diminuiu a média de células estacionadas na fase G1, de 9,97% no grupo tratado com cisplatina e etoposídeo, para 4,04% no grupo com cisplatina, etoposídeo e o MC. Na fase S, houve um aumento da porcentagem média de células no grupo exposto aos quimioterápicos em adição ao MC. Na fase G2 a diferença da média de porcentagem entre os dois grupos foi imperceptível (figura 9B).

Figura 9: Avaliação dos efeitos do MC e sua associação aos quimioterápicos cisplatina e etoposídeo no ciclo celular da linhagem NCI-H1299



A. Intensidade Média de Fluorescência na linhagem NCI-H1299 estacionadas nas fases, Sub-G0, G1, S e G2 do ciclo celular após expostas ao MC e etoposídeo nas concentrações do IC25 e IC50 (1,6 μ M e 3,2 μ M). B. Porcentagem média de células NCI-H1299 estacionadas nas fases, Sub-G0, G1, S e G2 do ciclo celular após exposição a associação da cisplatina e etoposídeo nas concentrações do IC25, e sua adição ao MC. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; CIS

IC25 - Cisplatina 6,635 μ M; CIS IC50 - Cisplatina 13,27 μ M; ETP IC25 - Etoposídeo 1,6 μ M; ETP IC50 - Etoposídeo 3,2 μ M. (**P<0,05, ***P<0,0005, ****P<0,0001).

Assim como a cisplatina, o etoposídeo é um quimioterápico que leva a danos no DNA, ativando as mesmas vias de sinalização responsáveis pelas paradas do ciclo nas fases S e/ou G2 (MONTECUCCO; BIAMONTI, 2007). Os resultados encontrados, mais uma vez concordam com os resultados descritos na literatura, as células H1299 expostas ao etoposídeo estão em sua maioria estacionadas na fase G2. No entanto, a exposição ao etoposídeo em associação ao MC resultou em um aumento das células estacionadas na fase G1, o que pode ser explicado pela presença da inflamação gerada pelos macrófagos M1 em associação aos danos do DNA, gera um ciclo vicioso que pode interromper o ciclo celular para reduzir o acúmulo de mutações geradas pela replicação do DNA (PEZONE et al., 2023).

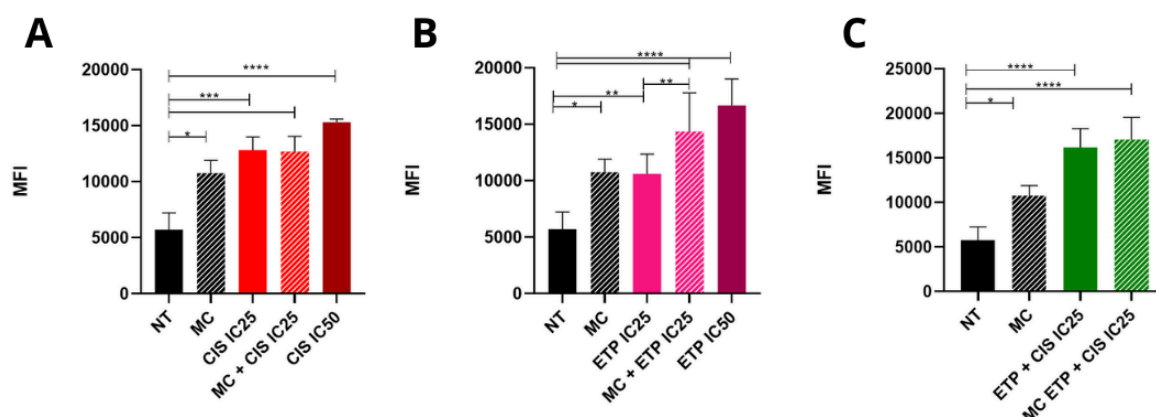
6.5 O meio condicionado potencializa a produção de espécies reativas na linhagem NCI-H1299 de carcinoma pulmonar

A marcação da linhagem de CPCNP, NCI-H1299, com o dihydroethidium demonstrou que a exposição ao meio condicionado resulta no aumento da produção de ROS (10.754), quando comparado ao grupo controle (5.729). A exposição a cisplatina em associação ao meio condicionado resultou em uma média de intensidade de fluorescência (MFI) (12.699), enquanto no grupo exposto apenas a cisplatina na concentração do IC25 a MFI foi de (12.822), não havendo uma diferença significativa(figura 10A).

Nas células expostas ao etoposídeo na concentração do IC25 (10.601), foi possível ver um aumento significativo de ROS (**p<0,005), quando comparado ao grupo controle. Quando adicionado o MC, esse aumento passa a ser maior (14.360) (****P<0,0001), sugerindo uma potencialização da ação do etoposídeo em doses mais baixas (figura 10B) A associação dos quimioterápicos resultou na elevação da média de intensidade de fluorescência (16.177), quando adicionado o meio

condicionado a esse grupo, a média aumentou (17.043), mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (figura 10C).

Figura 10: Média de intensidade de fluorescência (MFI) da linhagem NCI-H1299 em diferentes grupos de tratamento após marcação com DHE



A. Porcentagem média de MFI na linhagem NCI-H1299 após exposição ao MC e a cisplatina nas concentrações do IC25 e IC50 (6,635 μ M e 13,27 μ M). B. Porcentagem média de MFI na linhagem NCI-H1299 após exposição ao MC e etoposideo nas concentrações do IC25 e IC50 (1,6 μ M e 3,2 μ M). C. Porcentagem média de MFI na linhagem NCI-H1299 após exposição a associação da cisplatina e etoposideo nas concentrações do IC25, e sua adição ao MC. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; CIS IC25 - Cisplatina 6,635 μ M; CIS IC50 - Cisplatina 13,27 μ M; ETP IC25 - Etoposideo 1,6 μ M; ETP IC50 - Etoposideo 3,2 μ M. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,0005$, **** $P < 0,0001$).

Como radicais livres quimicamente ativos, as espécies reativas de oxigênio desempenham um papel indispensável na homeostase. A produção de ROS ocorre principalmente na mitocôndria. Além das mitocôndrias, outras organelas celulares, como o retículo endoplasmático e os peroxissomos, podem participar da formação de ROS. O aumento dos níveis de produção de ROS pode resultar no desenvolvimento de eventos patológicos, incluindo doenças neurodegenerativas, diabetes e câncer (MIRZAEI et al., 2021). No entanto, estudos demonstram que utilizar a produção de ROS como alvo terapêutico é uma estratégia promissora para

combater o câncer, quando os níveis de ROS ultrapassam o limite tolerado pelas células e ocorre um desequilíbrio redox, diferentes vias podem ser ativadas, culminando na morte celular (GLORIEUX et al., 2024).

Como já citado, os macrófagos produzem ROS na presença de estímulo inflamatórios, como o lipopolissacarídeo foi utilizado na produção do meio condicionado, isso explica a presença de espécies reativas de oxigênio nas células expostas somente ao meio condicionado. A cisplatina consegue promover o aumento de radicais livres, principalmente de ROS, como mecanismo para induzir a morte celular.

Assim como a cisplatina, o etoposídeo é um quimioterápico que também induz a geração de ROS para induzir a morte celular. Um estudo demonstrou que o etoposídeo na presença da inibição de p53, leva ao aumento da ativação de via quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e ao acúmulo de ROS nas mitocôndrias durante a apoptose induzida por etoposídeo em células do tubulo proximal do rim humano (SHIN et al., 2016). Como a linhagem NCI-H1299 possui uma deleção parcial de p53, é possível que o acúmulo de ROS também ocorra.

A adição de etoposídeo ao meio condicionado por macrófagos M1 resultou em um aumento significativo na produção de ROS nas células de câncer de pulmão. Esses resultados podem ser atribuídos ao fato de que tanto o meio condicionado, com sua composição de mediadores pró-inflamatórios, quanto a ação direta do etoposídeo, atuam sinergicamente para promover a produção de espécies reativas de oxigênio. Assim, essa combinação potencializa o ambiente pró-oxidativo, contribuindo para o aumento do estresse e morte nas células tumorais.

6.6 Avaliação da regulação de genes de morte celular após exposição ao meio condicionado e sua associação aos quimioterápicos

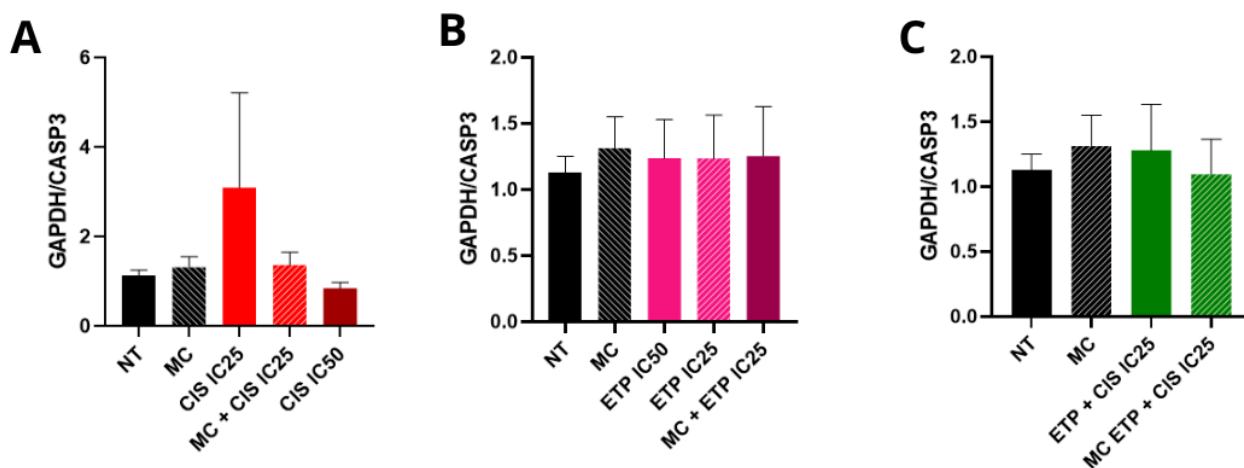
Para tentar identificar qual a via de morte celular poderia ser responsável pela redução da viabilidade celular na linhagem NCI-H1299 após ser exposta ao meio

condicionado, foram avaliados através de PCR em tempo real, a expressão dos genes *CASP3*, *NLRP3*, *GSMD* e *RIPK1*.

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias, ambos os caminhos convergem em uma via de execução, onde a Caspase-3 é ativada por qualquer uma das caspases iniciadoras, a ativação da caspase 3 resulta em eventos como ativação de endonuclease, degradação do DNA cromossômico, ativação de protease e degradação de proteínas nucleares e do citoesqueleto, culminando nas alterações citomorfológicas características da apoptose (D'ARCY, 2019).

Os resultados da análise da PCR em tempo real mostram que a linhagem NCI-H1299 exposta somente a cisplatina na concentração do IC25 possui uma maior expressão do gene *CASP3*, quando comparado ao grupo exposto a cisplatina em associação ao MC (figura 11A), esse aumento no entanto, não foi significativo estatisticamente.

Figura 11: Expressão do gene *CASP3* na linhagem NCI-H1299 após exposição por 48h a diferentes grupos de tratamento



A. Expressão de *CASP3* na linhagem NCI-H1299 após exposição ao MC e a cisplatina nas concentrações do IC25 e IC50 (6,635 μ M e 13,27 μ M). B. Expressão de *CASP3* na linhagem NCI-H1299 após exposição ao MC e etoposídeo nas concentrações do IC25 e IC50 (1,6 μ M e 3,2 μ M). C. Expressão de *CASP3* na linhagem NCI-H1299 após exposição a associação da cisplatina e etoposídeo nas

concentrações do IC25, e sua adição ao MC. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; CIS IC25 - Cisplatina 6,635 μ M; CIS IC50 - Cisplatina 13,27 μ M; ETP IC25 - Etoposídeo 1,6 μ M; ETP IC50 - Etoposídeo 3,2 μ M.

O gene *NLRP3*, codifica a proteína *NLRP3*, uma proteína intracelular que age como sensor de estresse e dano celular, sendo indispensável para a formação do inflamassoma *NLRP3*. Os resultados mostraram que quando a linhagem NCI-H1299 foi exposta ao MC, cisplatina (IC25 e IC50) e associação de cisplatina (IC25) ao MC, houve uma regulação positiva do gene *NLRP3* (figura 12A).

Os mediadores inflamatórios no MC podem levar a um aumento na expressão do gene *NLRP3*, através da ação de citocinas como TNF- α , IL-1B e IL-6, que podem ativar fatores de transcrição como NF- κ B, um dos principais reguladores do gene *NLRP3*. Além disso, a produção de ROS gerada pelo MC age como gatilho de ativação para o inflamassoma *NLRP3*, podendo levar a um aumento na expressão do gene (WANG et al., 2024).

A cisplatina, além de levar a apoptose, tem ações tumorícidas a partir de outras vias de morte celular. Em linhagens como a NCI-H1299 que possuem alteração em p53, os danos ao DNA e produção de ROS gerados pelo quimioterápico levam a ativação da piroptose. Estudos mostram que a cisplatina tem a capacidade de ativar a piroptose pela via *NLRP3*/caspase-1/*GSDMD*, concordando com os resultados encontrados no estudo (YAN et al., 2021).

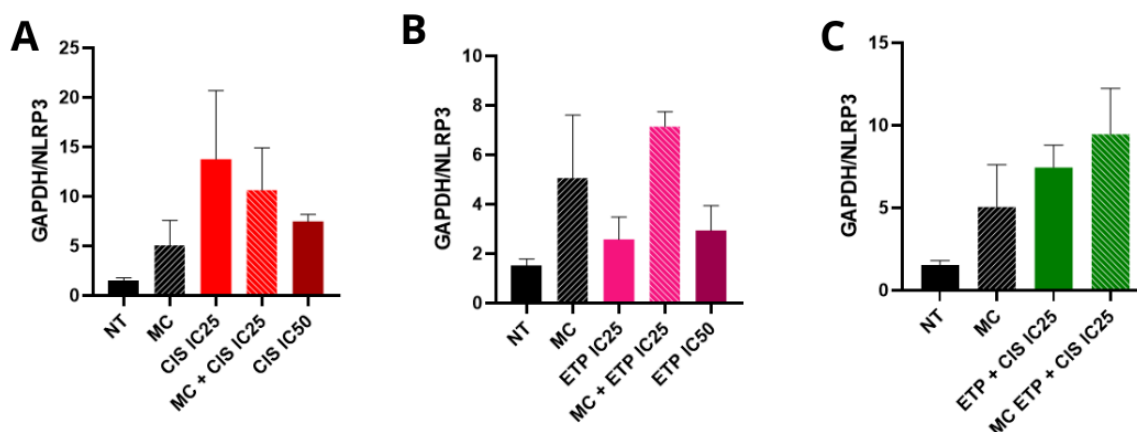
Já nos grupos expostos ao etoposídeo (IC25 e IC50) e sua associação ao MC, foi possível observar que a presença do meio condicionado leva a uma tendência de aumento da expressão do gene *NLRP3* na linhagem NCI-H1299, onde a média de expressão do grupo tratado apenas com etoposídeo (IC25) foi de 2,56, quando associado ao MC, a média da expressão aumentou para 7,13 (figura 12B).

Assim como a cisplatina, estudos mostram que o etoposídeo é capaz de ativar a morte celular por piroptose, no entanto essa ativação se dá pela via caspase-9/caspase-3/*GSDME*. Essa via, no entanto, não possui impacto na

expressão do gene *NLRP3*. A análise de genes associados a via caspase-9/caspase-3/GSDME é essencial para verificar se esse mecanismo está em ação neste caso (GIELECÍŃSKA et al., 2023).

Além disso, a combinação dos quimioterápicos cisplatina e etoposídeo, aumentou a expressão de *NLRP3* (7,45), provavelmente pela presença da cisplatina. Quando associados ao MC, esse aumento foi ainda maior (9,45), quando comparados ao grupo controle (figura 12C).

Figura 12: Expressão do gene *NLRP3* na linhagem NCI-H1299 após exposição por 48h a diferentes grupos de tratamento.



A. Expressão de *NLRP3* na linhagem NCI-H1299 após exposição ao MC e a cisplatina nas concentrações do IC25 e IC50 (6,635 μ M e 13,27 μ M). B. Expressão de *NLRP3* na linhagem NCI-H1299 após exposição ao MC e etoposídeo nas concentrações do IC25 e IC50 (1,6 μ M e 3,2 μ M). C. Expressão de *NLRP3* na linhagem NCI-H1299 após exposição a associação da cisplatina e etoposídeo nas concentrações do IC25, e sua adição ao MC. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; CIS IC25 - Cisplatina 6,635 μ M; CIS IC50 - Cisplatina 13,27 μ M; ETP IC25 - Etoposídeo 1,6 μ M; ETP IC50 - Etoposídeo 3,2 μ M.

Para avaliar melhor o possível impacto do meio condicionado na via da piroptose, foi avaliada ainda os níveis de expressão da gasdermina D (*GSDMD*). A gasdermina D é uma proteína efetora que está envolvida tanto na via canônica, quanto a não canônica da piroptose. Quando ativada resulta na formação de um

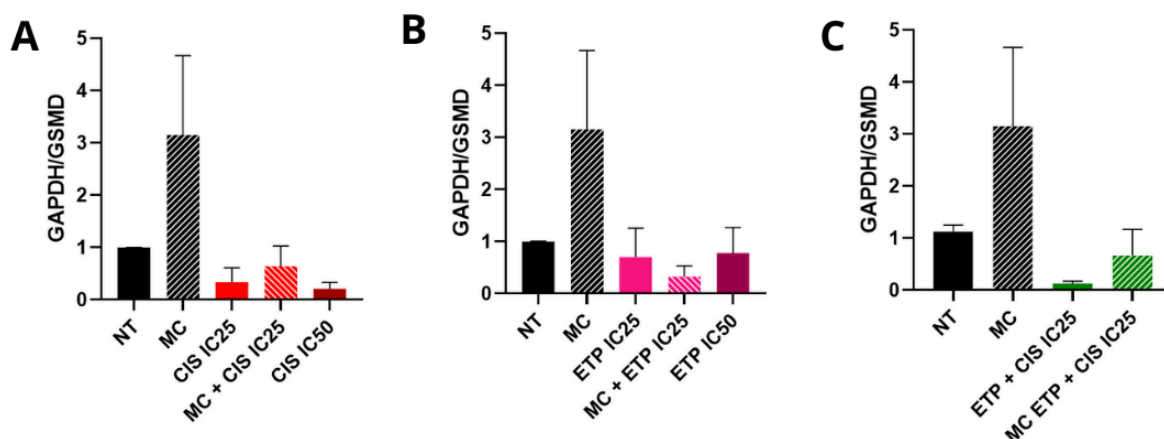
poro transmembrana que libera citocinas como IL-1 β e IL-18, além de quebrar o equilíbrio entre íons e água na célula, culminando na morte celular por piroptose. A gasdermina D (BURDETTE et al., 2021).

Os resultados mostraram que quando exposta ao meio condicionado pró-inflamatório, a linhagem H1299 tende a ter um aumento na expressão do gene *GSMD* (3.153) quando comparado ao grupo controle (figura 13A). Nos grupos tratados com os quimioterápicos, com ou sem a adição do meio condicionado, não foi possível observar mudanças significativas na expressão de *GSMD*.

Essa tendência de aumento na expressão gênica de *GSMD* no grupo exposto ao meio condicionado pode ser explicada pela ativação do inflamassoma NLRP3 nas células tumorais. O inflamassoma NLRP3 pode ser ativado por diversos PAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos) e DAMPs (Padrões moleculares associados a danos), como o LPS e espécies reativas de oxigênio (DAI et al., 2023). Como mostrado em resultados anteriores, a expressão do gene NLRP3 também tende a aumentar no grupo exposto ao meio condicionado, além da exposição gerar um aumento significativo nos níveis de ROS nas células tumorais, o que corrobora com essa hipótese.

Já nos grupos tratados com os quimioterápicos, apesar de ter sido visto uma tendência no aumento da expressão de NLRP3 em alguns grupos, principalmente naqueles expressos ao MC, porém essa tendência não foi acompanhada pelos níveis de *GSMD* (figura 13 B-C). A ausência de ativação de *GSDMD* sugere que as células podem ter sofrido morte precoce por vias alternativas ou que a montagem do inflamassoma foi incompleta na ausência de um segundo sinal, não havendo a ativação completa do inflamassoma.

Figura 13: Expressão do gene *GSMD* na linhagem NCI-H1299 após exposição por 48h a diferentes grupos de tratamento.



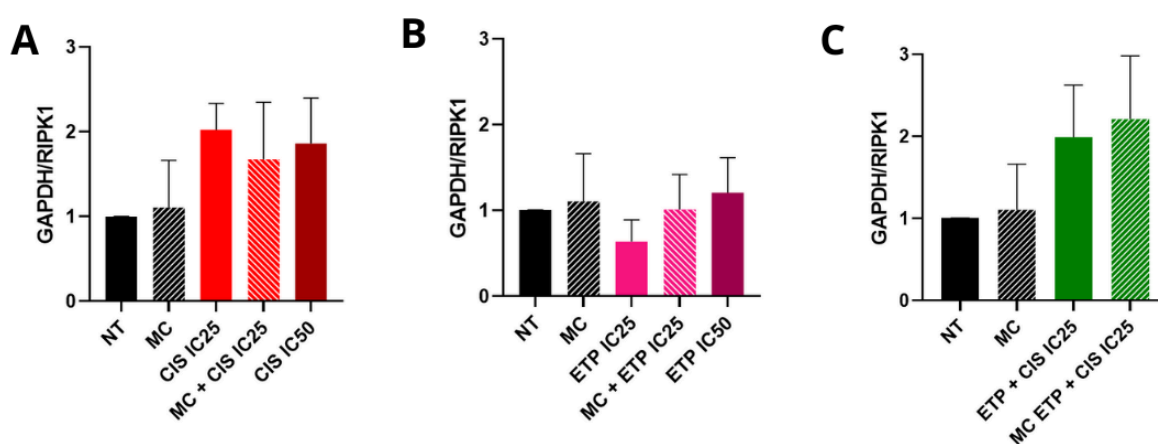
A. Expressão de GSMD na linhagem NCI-H1299 após exposição ao MC e a cisplatina nas concentrações do IC25 e IC50 (6,635 μ M e 13,27 μ M). B. Expressão de GSMD na linhagem NCI-H1299 após exposição ao MC e etoposídeo nas concentrações do IC25 e IC50 (1,6 μ M e 3,2 μ M). C. Expressão de GSMD na linhagem NCI-H1299 após exposição a associação da cisplatina e etoposídeo nas concentrações do IC25, e sua adição ao MC. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; CIS IC25 - Cisplatina 6,635 μ M; CIS IC50 - Cisplatina 13,27 μ M; ETP IC25 - Etoposídeo 1,6 μ M; ETP IC50 - Etoposídeo 3,2 μ M.

Foi avaliado ainda os níveis de expressão do gene *RIPK1*, que codifica a proteína *RIPK1* (proteína quinase 1 que interage com o receptor serina/treonina), uma proteína quinase crucial que regula a necroptose. A necroptose foi descoberta recentemente como uma forma de morte celular programada. As proteínas *RIPK1*, *RIPK3* (proteína quinase 3 que interage com o receptor serina/treonina) e o domínio semelhante à quinase de linhagem mista (*MLKL*) mediam a necroptose (YAO et al., 2025). No câncer a presença de *RIPK1* pode agir como uma “faca de dois-gumes”, onde níveis elevados de *RIPK1* podem dificultar o crescimento e a progressão tumoral, e em outros tipos de tumor podem potencialmente cultivar um ambiente propício à tumorigênese (CHEN et al., 2022).

Os resultados demonstraram que apenas os grupos tratados com cisplatina exibiram um discreto aumento na expressão do gene *RIPK1* (Figura 14A), sugerindo uma possível ativação dessa via em resposta ao quimioterápico. No entanto, nenhuma alteração significativa foi observada nos grupos expostos exclusivamente

ao etoposídeo ou ao meio condicionado, indicando que esses estímulos, nas condições testadas, não são suficientes para modular a expressão de RIPK1. Esses dados sugerem que a cisplatina, mas não o etoposídeo ou o meio condicionado, pode desencadear vias dependentes de RIPK1. No entanto, a confirmação dessa hipótese requer a avaliação de outros genes-chave da mesma via, como RIPK3 e MLKL, bem como a análise funcional da atividade proteica associada.

Figura 14: Expressão do gene RIPK1 na linhagem NCI-H1299 após exposição por 48h a diferentes grupos de tratamento.



A. Expressão de RIPK1 na linhagem NCI-H1299 após exposição ao MC e a cisplatina nas concentrações do IC25 e IC50 (6,635 μ M e 13,27 μ M). B. Expressão de RIPK1 na linhagem NCI-H1299 após exposição ao MC e etoposídeo nas concentrações do IC25 e IC50 (1,6 μ M e 3,2 μ M). C. Expressão de RIPK1 na linhagem NCI-H1299 após exposição a associação da cisplatina e etoposídeo nas concentrações do IC25, e sua adição ao MC. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; CIS IC25 - Cisplatina 6,635 μ M; CIS IC50 - Cisplatina 13,27 μ M; ETP IC25 - Etoposídeo 1,6 μ M; ETP IC50 - Etoposídeo 3,2 μ M.

De modo geral, embora os resultados tenham indicado tendências de aumento na expressão dos genes analisados, o estudo também revelou limitações metodológicas importantes. Para uma compreensão mais abrangente do impacto dos quimioterápicos e do meio condicionado nas vias de morte celular, são

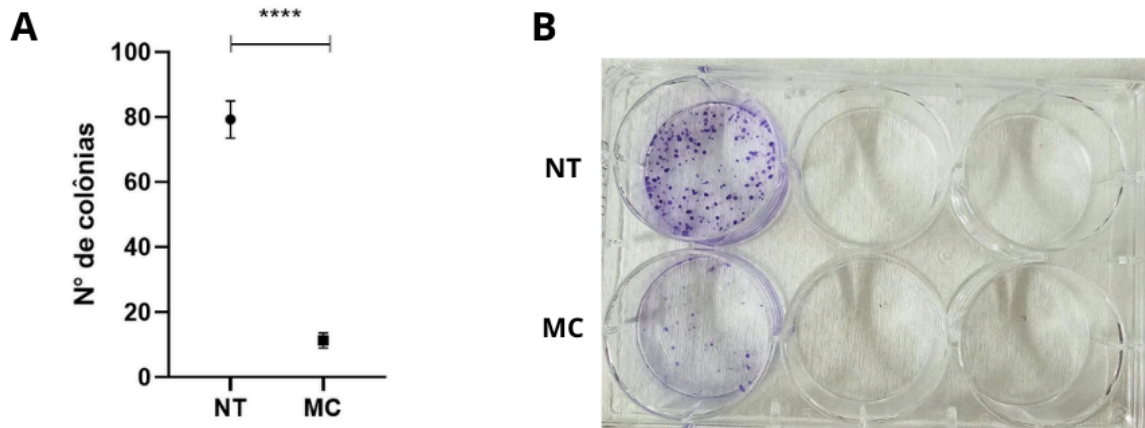
necessários estudos subsequentes que realizem análises em diferentes tempos de exposição, que permitam avaliar a dinâmica temporal das respostas celulares, e estudos complementares que investiguem, em nível proteico, marcadores específicos das diferentes vias de morte celular programada. Essas abordagens poderão elucidar com maior precisão os mecanismos moleculares desencadeados pela presença do meio condicionado pró-inflamatório na linhagem de carcinoma pulmonar NCI-H1299.

6.7 O meio condicionado inibe a formação de colônias na linhagem celular NCI-H1299 de carcinoma pulmonar

O ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônias é utilizado para medir a capacidade de células individuais em formar colônias in vitro. Neste trabalho o teste foi essencial para avaliar se os fatores secretados pelos macrófagos M1, presentes no meio condicionado, influenciam a sobrevivência, proliferação e capacidade de autorrenovação das células tumorais.

Os resultados revelaram que a presença do meio condicionado inibe significativamente ($p^{****}<0,0001$) a formação de colônias na linhagem NCI-H1299, quando comparado ao grupo controle, como mostra a figura 15A. A redução no número de colônias formadas, complementa os resultados obtidos nos testes de viabilidade celular e de produção de espécies reativas de oxigênio, sugerindo que os efeitos anti-tumoral do meio condicionado pró-inflamatório obtidos de macrófagos M1 não apenas compromete a proliferação celular, mas também reduz significativamente a capacidade de auto-renovação das células tumorais.

Figura 15: Impacto do meio condicionado na formação de colônias na linhagem NCI-H1299.



A. Número de colônias obtido após as células NCI-H1299 serem expostas ao meio RPMI completo - grupo controle (NT) ou ao meio condicionado derivado de macrófagos M1 (MC) por 72h. B. Imagem representativa da formação de colônias utilizando a linhagem NCI-H1299, após 72h de exposição aos grupos de tratamento e cultivo por mais 144h em meio RPMI completo.

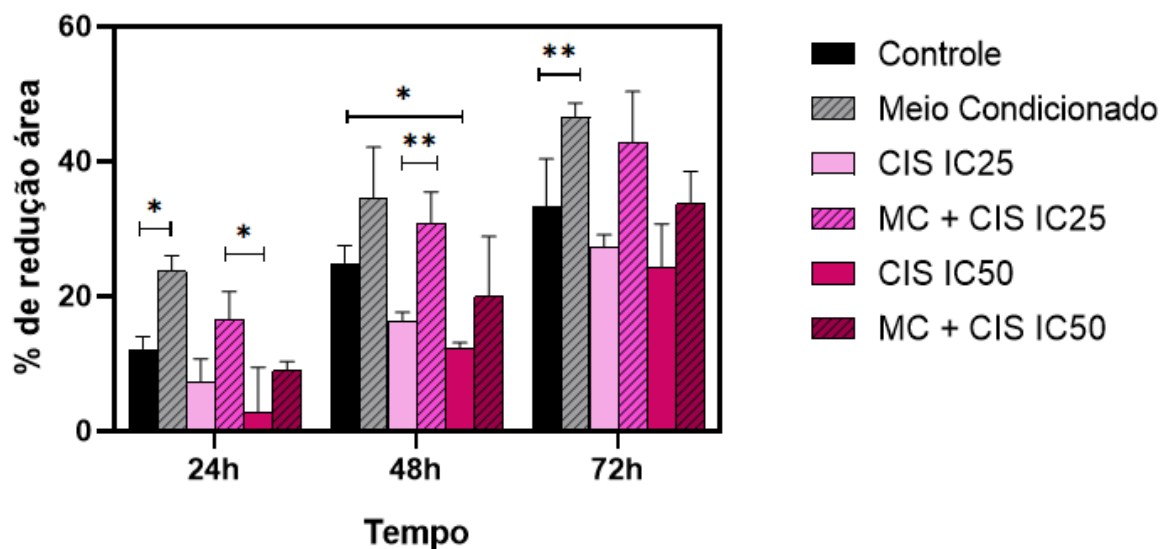
6.8 O meio condicionado induz uma redução da área de culturas 3D, além de potencializar a ação dos quimioterápicos nesse processo

Os esferoides são um tipo de cultura celular tridimensional (3D), formados a partir da agregação de células em um ambiente que impede sua aderência a superfícies planas. A formação dos esferóides só é possível devido às proteínas de membrana (integrinas) e às proteínas da matriz extracelular presentes nas células. De acordo com Białkowska (2020), a formação dos esferóides é dividida em 3 etapas: 1. as células dispersas se agregam devido às fibras da matriz extra-celular de cadeia longa permitem a ligação da integrina à superfície celular, o que leva à expressão aumentada da caderina; 2. a caderina se acumula na superfície da membrana celular; 3. a ligação hemofílica caderina-caderina entre células vizinhas permite o estreitamento das conexões entre as células e a formação dos esferoides (BIAŁKOWSKA et al., 2020).

Ao realizar uma cultura 3D com linhagem NCI-H1299 de carcinoma pulmonar foi possível observar que a presença do meio condicionado pró-inflamatório resultou em uma redução mais significativa da área dos esferóides, no tempo de 24h ($p^* < 0,05$). Quando avaliado em 72h, esse aumento foi ainda mais significativo ($p^{**} < 0,005$) (figuras 16 e 17), indicando assim que a presença do meio condicionado tem a capacidade de interferir no tamanho dos esferóides, resultando em uma redução da área.

Quando os esferóides foram expostos ao meio condicionado em associação a cisplatina IC25 no tempo de 48h, foi observado um aumento significativo ($p^* < 0,05$) da porcentagem de redução de sua área quando comparado ao grupo exposto somente ao quimioterápico na mesma concentração (figuras 13 e 14).

Figura 16: Porcentagem de redução da área dos esferóides após exposição ao meio condicionado e cisplatina em diferentes concentrações nos tempos de 24, 48 e 72h.

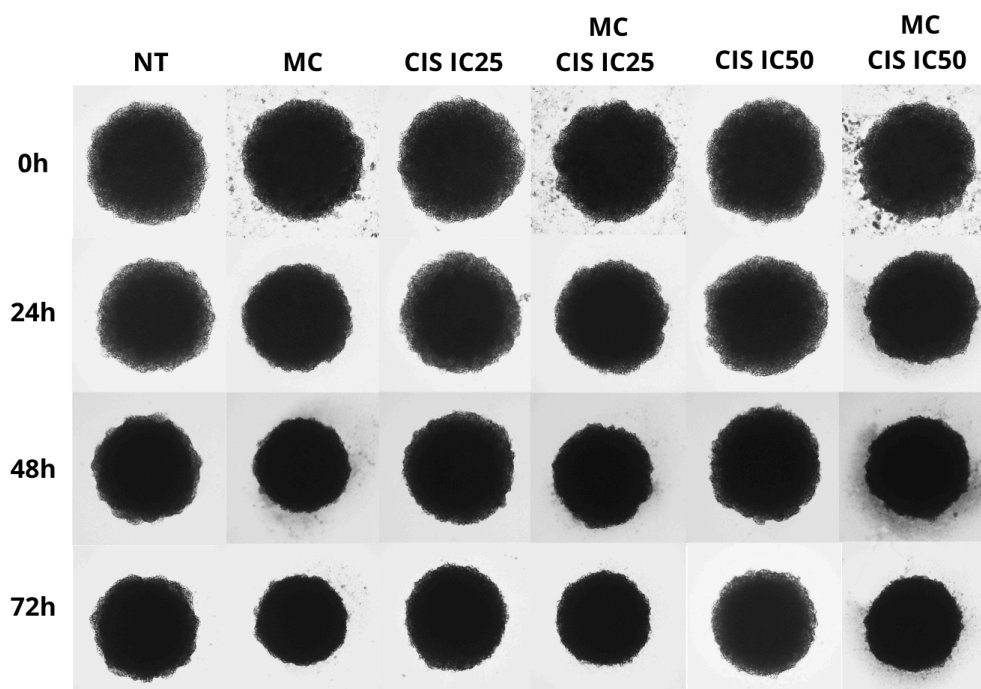


Porcentagem de redução da área dos esferóides da linhagem NCI-H1299 e expostos ao meio condicionado e a cisplatina em diferentes concentrações, nos tempos de 24h, 48h e 72h. CIS IC25 - Cisplatina 6,635 μM ; CIS IC50 - Cisplatina 13,27 μM ; (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$)

Os esferóides demonstram características que representam de forma mais realista o que ocorre *in vivo*, oferecendo resultados mais fidedignos do que culturas 2D. Sendo aplicados em diferentes ensaios, incluindo o desenvolvimento pré-clínico de novas terapias, onde é possível observar seu impacto em fenômenos como interações célula-célula, compactação do sistema, núcleo hipóxico, transporte nutricional, penetração de fármacos e resistência (PARK; HONG; LEE, 2022).

A exposição da linhagem NCI-H1299 ao meio condicionado em culturas 2D, como demonstrado neste trabalho, leva a uma redução acentuada da viabilidade celular. Além disso, também foi observado que o meio condicionado quando em associação a cisplatina, potencializou a ação do quimioterápico em concentrações mais baixas frente a linhagem NCI-H1299 de carcinoma pulmonar. Dessa forma, a redução da área dos esferóides sugere que estes efeitos se ampliam a cultura 3D.

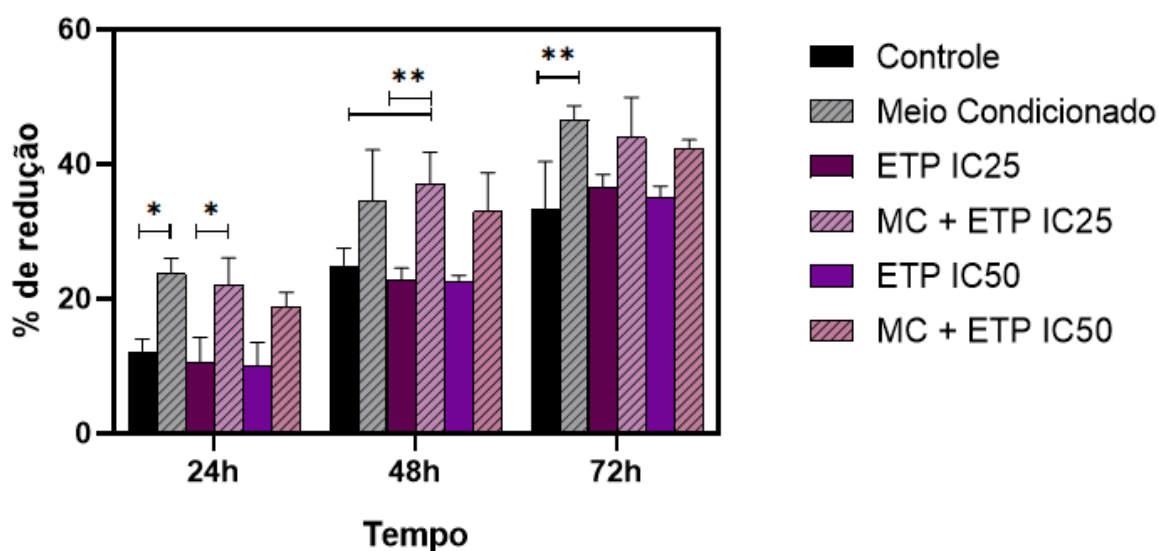
Figura 17: Esferóides NCI-H1299 após exposição ao meio condicionado e a cisplatina em diferentes concentrações por 0, 24, 48 e 72h.



Redução da área dos esferoides após exposição ao meio condicionado e a cisplatina em diferentes concentrações nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; CIS IC25 - Cisplatina 6,635 μ M; CIS IC50 - Cisplatina 13,27 μ M; Escala 300 μ m.

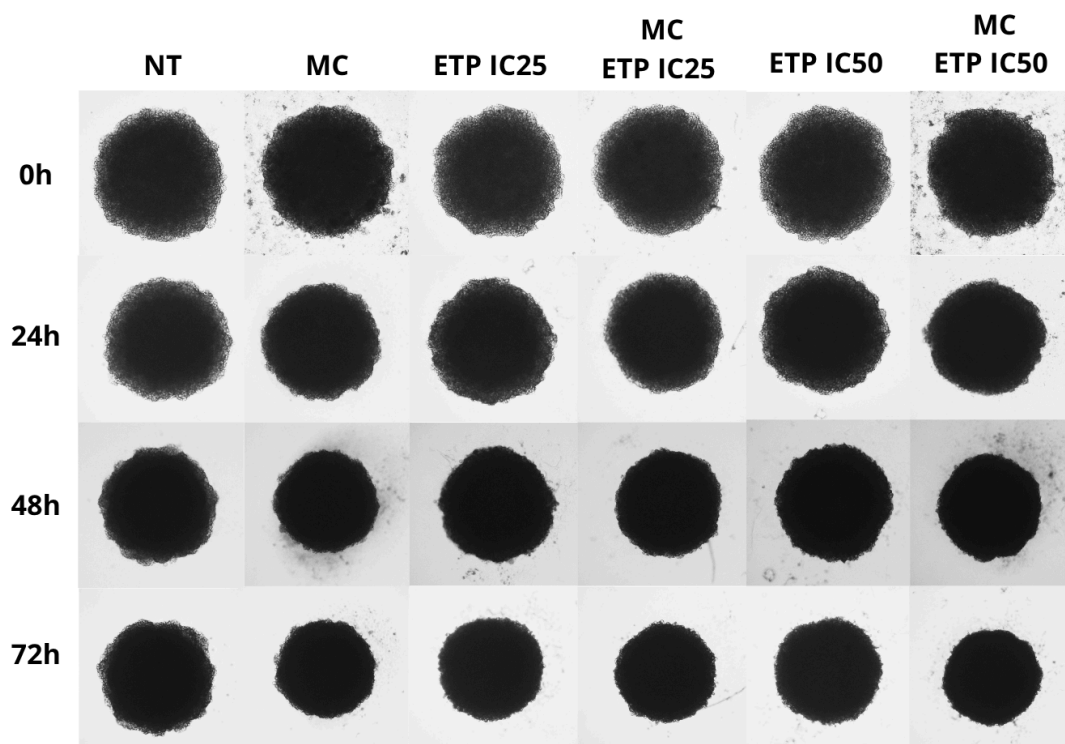
Foi avaliada a ação do etoposídeo em diferentes concentrações, sozinho ou em associação ao meio condicionado, na linhagem NCI-H1299 onde foi possível observar que no tempo de 24h a associação ao meio condicionado resultou em um aumento significativo ($p^* < 0,05$) na redução da área do esferóide, quando comparado ao grupo exposto apenas ao etoposídeo na concentração do IC25. Esse aumento foi ainda mais significativo após 48h de exposição ($p^{**} < 0,01$) como mostram as figuras 18 e 19.

Figura 18: Porcentagem de redução da área dos esferoides após exposição ao meio condicionado e etoposídeo em diferentes concentrações nos tempos de 24, 48 e 72h.



Porcentagem de redução da área dos esferóides da linhagem NCI-H1299 e expostos ao meio condicionado e ao etoposídeo em diferentes concentrações, nos tempos de 24h, 48h e 72h. ETP IC25 - Etoposídeo 1,6 μ M; ETP IC50 - Etoposídeo 3,2 μ M. (*P<0,05, **P<0,01)

Figura 19: Esferóides NCI-H1299 após exposição ao meio condicionado e ao etoposídeo em diferentes concentrações por 0, 24, 48 e 72h.



Redução da área dos esferóides após exposição ao meio condicionado e a cisplatina em diferentes concentrações nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; ETP IC25 - Etoposídeo 1,6 μ M; ETP IC50 - Etoposídeo 3,2 μ M.

De forma semelhante aos efeitos observados com a cisplatina, a associação do etoposídeo com o meio condicionado demonstrou potencializar a redução da viabilidade celular em culturas 2D da linhagem NCI-H1299, mesmo em concentrações mais baixas do quimioterápico. Adicionalmente, os resultados obtidos

nas 3D revelaram uma redução significativa na área dos esferoides, indicando que os efeitos citotóxicos mediados pelo meio condicionado se mantêm neste modelo mais complexo.

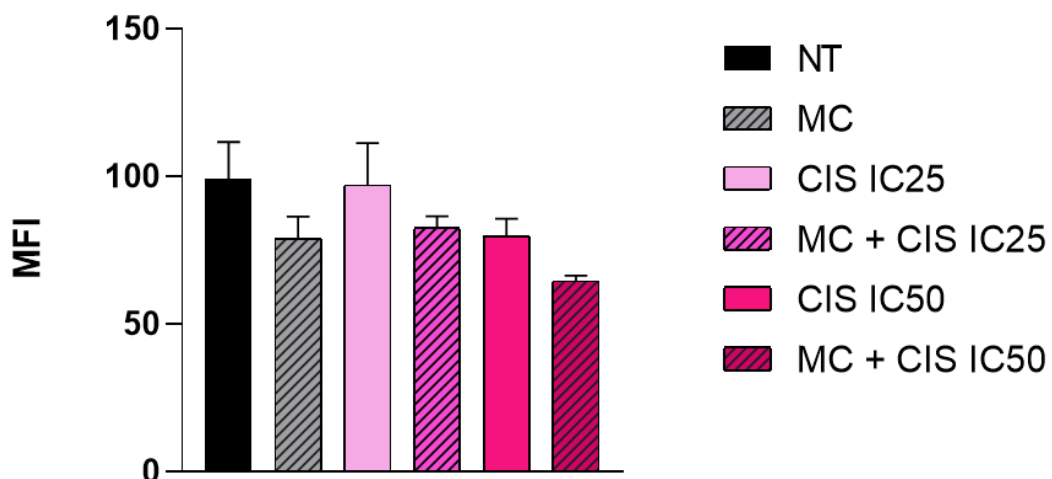
Estudos complementares são fundamentais para elucidar os mecanismos de ação envolvidos na associação entre o meio condicionado e os quimioterápicos nos esferoides da linhagem NCI-H1299. Como a realização de ensaios de viabilidade celular específicos para culturas 3D; e análises de morte celular através de marcação com Calceína e homodímero de etídio, além da avaliação da ativação das caspases 3 e 7, que permitiriam uma melhor caracterização dos efeitos citotóxicos e das vias de sinalização ativadas no modelo tridimensional.

6.9 Redução da expressão de Ki67 na presença do meio condicionado e sua associação com a cisplatina em modelo 3D

Além da avaliação da porcentagem de redução da área, os esferóides foram ainda marcados com o marcador Ki67 para avaliação da atividade de proliferação celular. O Ki67 é uma proteína expressa em todos os vertebrados, estando presente em células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, mas não em células quiescentes (fase G0) sendo assim utilizada como um marcador de proliferação celular em diversos tipos de câncer (MENON et al., 2019).

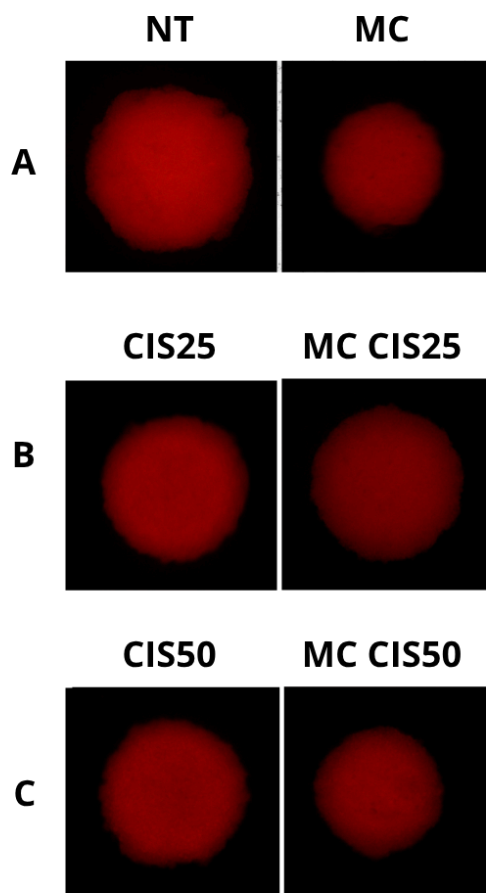
No entanto, os resultados não alcançaram significância estatística ($p > 0,05$) (figura 20).

Figura 20: Média da intensidade de fluorescência do Ki67 após exposição ao meio condicionado e a cisplatina em diferentes concentrações.



Média de intensidade de fluorescência (MFI) do marcador KI67 na linhagem NCI-H1299 após a exposição ao meio condicionado e a cisplatina em diferentes concentrações após 72h. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; CIS IC25 - Cisplatina 6,635 μM ; CIS IC50 - Cisplatina 13,27 μM ;

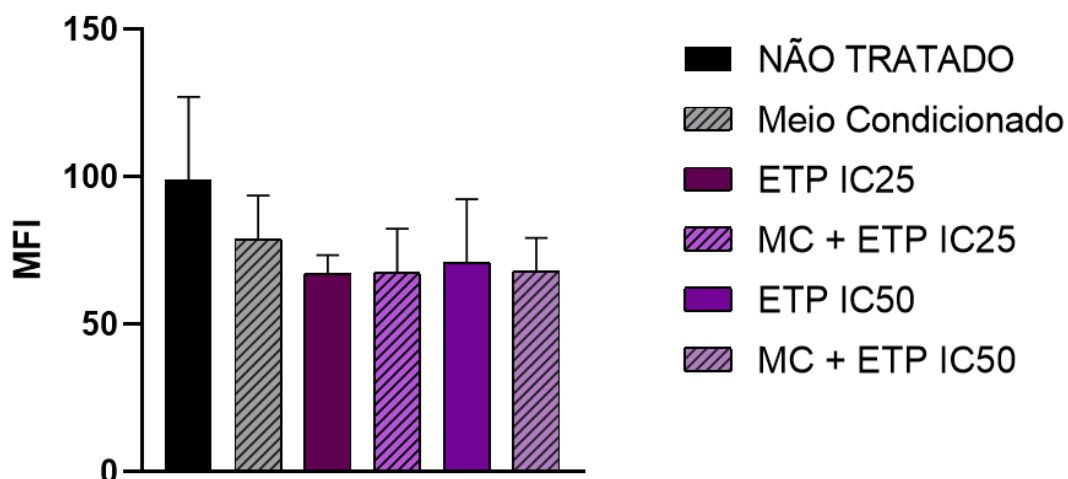
Figura 21: Fluorescência do KI67 após exposição ao meio condicionado e a cisplatina em diferentes concentrações.



Fluorescência correspondente ao marcador Ki67 nos esferóides NCI-H1299 após exposição por 72h aos diferentes grupos de tratamento. A. Grupo controle (NT) e meio condicionado (MC). B. Grupo tratado com CIS25 (cisplatina 6,635 μM) e sua associação ao meio condicionado (MC CIS25). C. Grupo tratado com CIS50 (Cisplatina 13,27 μM) e sua associação ao meio condicionado (MC CIS50).

Nos grupos tratados com etoposídeo, também não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) ou tendências consistentes na expressão de Ki67, tanto nas concentrações correspondentes ao IC25 quanto ao IC50. Esses resultados foram observados tanto para o tratamento isolado com o quimioterápico quanto para sua associação com o meio condicionado.

Figura 22: Média da intensidade de fluorescência do KI67 após exposição ao meio condicionado e ao etoposídeo em diferentes concentrações.



Média de intensidade de fluorescência (MFI) do marcador KI67 na linhagem NCI-H1299 após a exposição ao meio condicionado e ao etoposídeo em diferentes concentrações após 72h. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; ETP IC25 - Etoposídeo 1,6 μ M; ETP IC50 - Etoposídeo 3,2 μ M.

Embora as diferenças na média de intensidade de fluorescência do marcador KI67 não tenham alcançado significância estatística no presente estudo, a consistência da tendência observada nos grupos expostos ao meio condicionado e sua associação a cisplatina, sugerem um potencial efeito antiproliferativo que merece investigação mais aprofundada.

7. Conclusão

- O meio condicionado provocou uma redução significativa na viabilidade celular na linhagem NCI-H1299 e aumentou a eficácia dos quimioterápicos cisplatina e etoposídeo na concentração do IC25 (6,635 μ M)

- O meio condicionado interferiu no crescimento do esferóide formado pelas células da linhagem NCI-H1299, além de potencializar a ação da cisplatina e do etoposídeo na redução do tamanho do esferoide.
- O meio condicionado promoveu um aumento na proporção de células na fase G1 do ciclo celular, além de intensificar o efeito do etoposídeo em induzir a parada das células NCI-H1299 nessa fase.
- Foi possível concluir que o MC tem a capacidade de aumentar a produção de ROS na linhagem de carcinoma pulmonar, além de potencializar a produção de ROS pelo etoposídeo em doses abaixo do IC50.
- O meio condicionado derivado de macrófagos M1 inibe significativamente a formação de colônias pela linhagem NCI-H1299 de câncer de pulmão, corroborando os dados de viabilidade celular e estresse oxidativo previamente obtidos.
- Esses resultados indicam que os fatores secretados por macrófagos M1 no meio condicionado atuam comprometendo não apenas a proliferação das células tumorais, mas também sua capacidade de auto-renovação, fatores cruciais para a progressão tumoral.
- Para tentar compreender melhor as vias que levam a redução da viabilidade celular, foram avaliados os genes de morte celular, *CASP3*, *NLRP3*, *GSMD* e *RIPK1*. Em síntese, os resultados deste estudo demonstraram tendências promissoras na modulação da expressão gênica em resposta aos tratamentos avaliados, embora limitações metodológicas tenham sido identificadas.
- Por fim, foi observado que o meio condicionado derivado de macrófagos M1 induziu uma redução de aproximadamente 20% na fluorescência de Ki67 na linhagem NCI-H1299, sugerindo um possível efeito antiproliferativo.
- Os resultados obtidos fornecem uma base para investigações futuras que possam explorar novas estratégias combinatórias no tratamento do câncer de pulmão, integrando a modulação do microambiente

tumoral à quimioterapia convencional, contribuindo para o avanço do conhecimento na área de oncologia experimental.

Referências

ABDULHADI, Fatma Husien S. Differentiation of U-937 Monocytes to Macrophage-Like Cells Polarized into M1 or M2 Phenotypes According to Their Specific Environment: A Study of Morphology, Cell Viability, and Cd Markers of an In Vitro Model of Human Macrophages. 2014. 123 f. Tese (Mestrado em ciência) – Wright State University, Dayton, Ohio, 2014.

ABAI, Justine M.; XIA, Min; ZHANG, Yang; BOINI, Krishna M.; LI, Pin-Lan. Redox Regulation of NLRP3 Inflammasomes: ros as trigger or effector?. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S.L.], v. 22, n. 13, p. 1111-1129, maio 2015.

ALI, Reem; AOUIDA, Mustapha; SULAIMAN, Abdallah Alhaj; MADHUSUDAN, Srinivasan; RAMOTAR, Dindial. Can Cisplatin Therapy Be Improved? Pathways That Can Be Targeted. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 13, p. 7241, 29 jun. 2022.

American Cancer Society. Chemotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/treating-non-small-cell/chemotherapy.html>>. Acesso em: 09 set. 2024.

ASHRAFIZADEH, Milad; ZARRABI, Ali; HUSHMANDI, Kiavash; HASHEMI, Farid; MOGHADAM, Ebrahim Rahmani; OWRANG, Marzieh; HASHEMI, Fardin; MAKVANDI, Pooyan; GOHARRIZI, Mohammad Ali Sheikh Beig; NAJAFI, Masoud. Lung cancer cells and their sensitivity/resistance to cisplatin chemotherapy: role of micrnas and upstream mediators. **Cellular Signalling**, [S.L.], v. 78, p. 109871, fev. 2021.

BAGHBAN, Roghayyeh; ROSHANGAR, Leila; JAHANBAN-ESFAHLAN, Rana; SEIDI, Khaled; EBRAHIMI-KALAN, Abbas; JAYMAND, Mehdi; KOLAHIAN, Saeed; JAVAHERI, Tahereh; ZARE, Peyman. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. **Cell Communication And Signaling**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-19, 7 abr. 2020.

BAKHEIT, Halla Falih; TAURIN, Sebastien; ELAMIN, Elwaleed Mohamed; BAKHIET, Moiz. Akt1 players promote PMA U937 cell line differentiation into macrophage-like cells. **Arab Gulf Journal Of Scientific Research**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 1257-1270, 23 out. 2023.

BALKWILL, Frances. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, Londres, v. 9, n. 5, p. 361-371, 3 abr. 2009.

BENT, Rebekka; MOLL, Lorna; GRABBE, Stephan; BROS, Matthias. Interleukin-1 Beta—A Friend or Foe in Malignancies? **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 2155, 24 jul. 2018

BIAŁKOWSKA, Kamila; KOMOROWSKI, Piotr; BRYSZEWSKA, Maria; MIŁOWSKA, Katarzyna. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 17, p. 6225, 28 ago. 2020.

BRAY, Freddie; LAVERSANNE, Mathieu; SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2022: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 74, n. 3, p. 229-263, 4 abr. 2024.

BRAY, Freddie; LAVERSANNE, Mathieu; WEIDERPASS, Elisabete; SOERJOMATARAM, Isabelle. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, [S.L.], v. 127, n. 16, p. 3029-3030, 4 jun. 2021.

BURDETTE, Brandon E.; ESPARZA, Ashley N.; ZHU, Hua; WANG, Shanzhi. Gasdermin D in pyroptosis. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 2768-2782, set. 2021.

CAETANO, Mauricio S.; ZHANG, Huiyuan; CUMPIAN, Amber M.; GONG, Lei; UNVER, Nese; OSTRIN, Edwin J.; DALIRI, Soudabeh; CHANG, Seon Hee; OCHOA, Cesar E.; HANASH, Samir. IL6 Blockade Reprograms the Lung Tumor Microenvironment to Limit the Development and Progression of K-ras–Mutant Lung Cancer. **Cancer Research**, Cambridge, v. 76, n. 11, p. 3189-3199, 31 maio 2016.

CARTER, Brett W.; HALPENNY, Darragh F.; GINSBERG, Michelle S.; PAPADIMITRAKOPOULOU, Vassiliki A.; GROOT, Patricia M. de. Immunotherapy in Non–Small Cell Lung Cancer Treatment. **Journal Of Thoracic Imaging**, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 300-312, set. 2017

CHEN, Lu; ZHANG, Xiaoqin; OU, Yaqing; LIU, Maoyu; YU, Dongke; SONG, Zhiheng; NIU, Lihong; ZHANG, Lijuan; SHI, Jianyou. Advances in RIPK1 kinase inhibitors. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 13, p. 1-16, 28 set. 2022.

CHEN, Zhao; FILLMORE, Christine M.; HAMMERMAN, Peter S.; KIM, Carla F.; WONG, Kwok-Kin. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 535-546, 24 jul. 2014

DAI, Zhen; LIU, Wan-Cong; CHEN, Xiao-Yi; WANG, Xiao; LI, Jun-Long; ZHANG, Xiang. Gasdermin D-mediated pyroptosis: mechanisms, diseases, and inhibitors. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 14, n. , p. 1-16, 18 maio 2023.

D'ARCY, Mark s. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 582-592, 25 abr. 2019.

DUAN, Qianqian; ZHANG, Hualing; ZHENG, Junnian; ZHANG, Lianjun. Turning Cold into Hot: firing up the tumor microenvironment. *Trends In Cancer*, Cambridge, v. 6, n. 7, p. 605-618, jul. 2020.

DUGBARTEY, George J.; PEPPONE, Luke J.; GRAAF, Inge A.M. de. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology*, [S.L.], v. 371, p. 58-66, set. 2016. Elsevier BV.

FEND, Laetitia; ACCART, Nathalie; KINTZ, Jacqueline; COCHIN, Sandrine; REYMANN, Carine; POGAM, Fabrice Le; MARCHAND, Jean-Baptiste; MENGUY, Thierry; SLOS, Philippe; ROOKE, Ronald. Therapeutic Effects of Anti-CD115 Monoclonal Antibody in Mouse Cancer Models through Dual Inhibition of Tumor-Associated Macrophages and Osteoclasts. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 1-11, 3 set. 2013

FREEMAN, Andrew J.; KEARNEY, Conor J.; SILKE, John; OLIARO, Jane. Unleashing TNF cytotoxicity to enhance cancer immunotherapy. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 42, n. 12, p. 1128-1142, dez. 2021.

GAO, Yuewen; PAN, Zhengwu; LI, Hongqi; WANG, Fei. Antitumor Therapy Targeting the Tumor Microenvironment. **Journal Of Oncology**, [S.L.], v. 2023, p. 1-16, 3 mar. 2023.

GAUR, Priyanka; BHATTACHARYA, Sandeep; KANT, Surya; KUSHWAHA, R As; GARG, Rajiv; SINGH, Gaurav; PANDEY, Sarika. Association of inflammatory biomarkers with lung cancer in North Indian population. **African Health Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 2147, 21 ago. 2019.

GIELECIEŃSKA, A.; KCIUK, M.; YAHYA, E.-B.; AINANE, T.; MUJWAR, S.; KONTEK, R.. Apoptosis, necroptosis, and pyroptosis as alternative cell death pathways induced by chemotherapeutic agents? **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Reviews On Cancer**, [S.L.], v. 1878, n. 6, p. 189024, nov. 2023.

GLORIEUX, Christophe; LIU, Shihua; TRACHOOTHAM, Dunyaporn; HUANG, Peng. Targeting ROS in cancer: rationale and strategies. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 23, n. 8, p. 583-606, 9 jul. 2024.

GRAHAM Mary V.; BYHARDT Roger W.; SAUSE William T.; CURRAN Walter J.; FULLER Donald; KO Benny; KOMAKI Ritsuko; WEISENBURGER Thomas H; KAISER Larry R; LEIBEL Steven A. Terapia não agressiva, não cirúrgica, de câncer de pulmão de célula não pequena inoperável. **Colégio Brasileiro de Radiologia**, São Paulo, v.50, n. 3, p.1403-1418, 2017.

HALLIWELL, Barry. Reactive oxygen species (ROS), oxygen radicals and antioxidants: where are we now, where is the field going and where should we go?. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 633, p. 17-19, dez. 2022.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 31-46, 1 jan. 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A.. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011.

HERBST, Roy S.; MORGENSZTERN, Daniel; BOSHOFF, Chris. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, [S.L.], v. 553, n. 7689, p. 446-454, jan. 2018.

HINSHAW, Dominique C.; SHEVDE, Lalita A.. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. **Cancer Research**, [S.L.], v. 79, n. 18, p. 4557-4566, 13 set. 2019.

HORN, Leora; MANSFIELD, Aaron S.; SZCZĘSNA, Aleksandra; HAVEL, Libor; KRZAKOWSKI, Maciej; HOCHMAIR, Maximilian J.; HUEMER, Florian; LOSONCZY, György; JOHNSON, Melissa L.; NISHIO, Makoto. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 379, n. 23, p. 2220-2229, 6 dez. 2018.

HUANG, Bei; LANG, Xiaoling; LI, Xihong. The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers. **Frontiers In Oncology**, Zurique, v. 12, n. 1023177, p. 1-14, 16 dez. 2022.

HUANG, Yu-Han; KLINGBEIL, Olaf; HE, Xue-Yan; WU, Xiaoli S.; ARUN, Gayatri; LU, Bin; SOMERVILLE, Tim D.D.; MILAZZO, Joseph P.; WILKINSON, John E.; DEMERDASH, Osama E.. POU2F3 is a master regulator of a tuft cell-like variant of small cell lung cancer. **Genes & Development**, [S.L.], v. 32, n. 13-14, p. 915-928, 26 jun. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2023 Incidência de Câncer no Brasil**, Rio de Janeiro - Brasil, 2022.

International Agency for Research. World Health Organization. Cancer Tomorrow, 2023. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_populations=1&multiple_cancers=1&types=0&cancers=15&years=2025&sort_by=value1>. Acesso em 09 de setembro de 2024

JIANG, Le; KON, Ning; LI, Tongyuan; WANG, Shang-Jui; SU, Tao; HIBSHOOSH, Hanina; BAER, Richard; GU, Wei. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. **Nature**, [S.L.], v. 520, n. 7545, p. 57-62, 18 mar. 2015.

JIN, Yajuan; CHEN, Yanxu; QIN, Zhen; HU, Liang; GUO, Chenchen; JI, Hongbin. Understanding SCLC heterogeneity and plasticity in cancer metastasis and chemotherapy resistance. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, [S.L.], v. 6, n. 55, p. 948-955, 1 maio 2023.

KUMARI, Nisha; CHOI, Seung Hong. Tumor-associated macrophages in cancer: recent advancements in cancer nanoimmunotherapies. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 1-39, 19 fev. 2022.

LEE, Hyang-Mi; LEE, Hye-Jin; CHANG, Ji-Eun. Inflammatory Cytokine: an attractive target for cancer treatment. **Biomedicines**, Zurique, v. 10, n. 9, p. 2116, 29 ago. 2022.

LIU, Mingli; GUO, Shanchun; HIBBERT, Jacqueline M.; JAIN, Vidhan; SINGH, Neeru; WILSON, Nana O.; STILES, Jonathan K.. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [S.L.], p. 1, jul. 2011.

LIU, Shenghou; GAO, Hongwei; GAO, Chunzheng; LIU, Wenguang; XING, Deguo. Bindarit Attenuates Pain and Cancer-Related Inflammation by Influencing Myeloid Cells in a Model of Bone Cancer. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, [S.L.], v. 66, n. 3, p. 221-229, 12 dez. 2017.

LUO, Jun-Li; MAEDA, Shin; HSU, Li-Chung; YAGITA, Hideo; KARIN, Michael. Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth

mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. **Cancer Cell**, [s. /], v. 6, n. 3, p. 297-305, set. 2004.

MATTAROLLO, Stephen R.; LOI, Sherene; DURET, Helene; MA, Yuting; ZITVOGEL, Laurence; SMYTH, Mark J.. Pivotal Role of Innate and Adaptive Immunity in Anthracycline Chemotherapy of Established Tumors. **Cancer Research**, [S.L.], v. 71, n. 14, p. 4809-4820, 14 jul. 2011

MEGYESFALVI, Zsolt; BARANY, Nandor; LANTOS, Andras; VALKO, Zsuzsanna; PIPEK, Orsolya; LANG, Christian; SCHWENDENWEIN, Anna; OBERNDORFER, Felicitas; PAKU, Sandor; FERENCZ, Bence. Expression patterns and prognostic relevance of subtype-specific transcription factors in surgically resected small-cell lung cancer: an international multicenter study. **The Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 257, n. 5, p. 674-686, 25 maio 2022.

MEGYESFALVI, Zsolt; GAY, Carl M.; POPPER, Helmut; PIRKER, Robert; OSTOROS, Gyula; HEEKE, Simon; LANG, Christian; HOETZENECKER, Konrad; SCHWENDENWEIN, Anna; BOETTIGER, Kristiina. Clinical insights into small cell lung cancer: tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 73, n. 6, p. 620-652, 17 jun. 2023

MENON, Sunil Sankunny; GURUVAYOORAPPAN, Chandrasekharan; SAKTHIVEL, Kunnathur Murugesan; RASMI, Rajan Radha. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. **Clinica Chimica Acta**, [S.L.], v. 491, p. 39-45, abr. 2019.

MIRZAEI, Sepideh; HUSHMANDI, Kiavash; ZABOLIAN, Amirhossein; SALEKI, Hossein; TORABI, Seyed Mohammad Reza; RANJBAR, Adnan; SEYEDSALEH, Seyedhesam; SHARIFZADEH, Seyed Omid; KHAN, Haroon; ASHRAFIZADEH, Milad. Elucidating Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cisplatin Chemotherapy: a focus on molecular pathways and possible therapeutic strategies. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 8, p. 2382, 19 abr. 2021.

MONTECUCCO, Alessandra; BIAMONTI, Giuseppe. Cellular response to etoposide treatment. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 252, n. 1, p. 9-18, jul. 2007

MUKHOPADHYAY, Sanjay; KATZENSTEIN, Anna-Luise A.. Subclassification of Non-small Cell Lung Carcinomas Lacking Morphologic Differentiation on Biopsy Specimens. **American Journal Of Surgical Pathology**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 15-25, jan. 2011.

NICHOLSON, Andrew G.; TSAO, Ming S.; BEASLEY, Mary Beth; BORCZUK, Alain C.; BRAMBILLA, Elisabeth; COOPER, Wendy A.; DACIC, Sanja; JAIN, Deepali; KERR, Keith M.; LANTUEJOUL, Sylvie. The 2021 WHO Classification of Lung

Tumors: impact of advances since 2015. **Journal Of Thoracic Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 362-387, mar. 2022.

OHRI, Chandra M; SHIKOTRA, Aarti; GREEN, Ruth H; A WALLER, David; BRADDING, Peter. Chemokine receptor expression in tumour islets and stroma in non-small cell lung cancer. **Bmc Cancer**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1, 29 abr. 2010.

OSER, Matthew G; NIEDERST, Matthew J; SEQUIST, Lecia V; A ENGELMAN, Jeffrey. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. **The Lancet Oncology**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 165-172, abr. 2015.

PARK, Se Yeon; HONG, Hye Jin; LEE, Hyun Jong. Fabrication of Cell Spheroids for 3D Cell Culture and Biomedical Applications. **Biochip Journal**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 24-43, 2 nov. 2022.

PERILLO, Bruno; DONATO, Marzia di; PEZONE, Antonio; ZAZZO, Erika di; GIOVANNELLI, Pia; GALASSO, Giovanni; CASTORIA, Gabriella; MIGLIACCIO, Antimo. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental & Molecular Medicine**, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 192-203, fev. 2020.

PEZONE, Antonio; OLIVIERI, Fabiola; NAPOLI, Maria Vittoria; PROCOPIO, Antonio; AVVEDIMENTO, Enrico Vittorio; GABRIELLI, Armando. Inflammation and DNA damage: cause, effect or both. **Nature Reviews Rheumatology**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 200-211, 7 fev. 2023.

QIAN, Shehua; GOLUBNITSCHAJA, Olga; ZHAN, Xianquan. Chronic inflammation: key player and biomarker-set to predict and prevent cancer development and progression based on individualized patient profiles. **Epma Journal**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 365-381, 20 nov. 2019.

RAJASEGARAN, Thiviyadarshini; HOW, Chee Wun; SAUD, Anoosha; ALI, Azhar; LIM, Jonathan Chee Woei. Targeting Inflammation in Non-Small Cell Lung Cancer through Drug Repurposing. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 451-481, 16 mar. 2023.

RELLI, Valeria; TREROTOLA, Marco; GUERRA, Emanuela; ALBERTI, Saverio. Abandoning the Notion of Non-Small Cell Lung Cancer. **Trends In Molecular Medicine**, [S.L.], v. 25, n. 7, p. 585-594, jul. 2019

RIETKÖTTER, Eva; MENCK, Kerstin; BLECKMANN, Annalen; FARHAT, Katja; SCHAFFRINSKI, Meike; SCHULZ, Matthias; HANISCH, Uwe-Karsten; BINDER, Claudia; PUKROP, Tobias. Zoledronic acid inhibits macrophage/microglia-assisted breast cancer cell invasion. **Oncotarget**, [S.L.], v. 4, n. 9, p. 1449-1460, 19 ago. 2013.

SAITO, Akira; HORIE, Masafumi; NAGASE, Takahide. TGF- β Signaling in Lung Health and Disease. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 2460, 20 ago. 2018.

SALEHI-RAD, Ramin; LI, Rui; PAUL, Manash K.; DUBINETT, Steven M.; LIU, Bin. The Biology of Lung Cancer. **Clinics In Chest Medicine, Londres**, v. 41, n. 1, p. 25-38, mar. 2020.

SCHWENDENWEIN, Anna; MEGYESFALVI, Zsolt; BARANY, Nandor; VALKO, Zsuzsanna; BUGYIK, Edina; LANG, Christian; FERENCZ, Bence; PAKU, Sandor; LANTOS, Andras; FILLINGER, Janos. Molecular profiles of small cell lung cancer subtypes: therapeutic implications. **Molecular Therapy - Oncolytics**, [S.L.], v. 20, p. 470-483, mar. 2021.

SETHI, Gautam; SHANMUGAM, Muthu K.; RAMACHANDRAN, Lalitha; KUMAR, Alan Prem; TERGAONKAR, Vinay. Multifaceted link between cancer and inflammation. **Bioscience Reports**, Portland, v. 32, n. 1, p. 1-15, 26 set. 2011.

SHARP, Bradley M. Conversion of the U937 Monocyte into "Macrophage-Like" Populations Exhibiting M1 or M2 Characteristics. 2013. 68 f. Tese (Mestrado em ciência) - Wright State University, Dayton, Ohio, 2013.

SHIN, Hyeon-Jun; KWON, Hyuk-Kwon; LEE, Jae-Hyeok; ANWAR, Muhammad Ayaz; CHOI, Sangdun. Etoposide induced cytotoxicity mediated by ROS and ERK in human kidney proximal tubule cells. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1, 26 set. 2016.

SHROFF, Girish S.; GROOT, Patricia M. de; PAPADIMITRAKOPOULOU, Vassiliki A.; TRUONG, Mylene T.; CARTER, Brett W.. Targeted Therapy and Immunotherapy in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. **Radiologic Clinics Of North America**, Londres, v. 56, n. 3, p. 485-495, maio 2018.

SIAHMAZGI, Zohreh Gholizadeh; IRANI, Shiva; GHIASEDDIN, Ali; FALLAH, Parviz; HAGHPANAH, Vahid. Xanthohumol hinders invasion and cell cycle progression in cancer cells through targeting MMP2, MMP9, FAK and P53 genes in three-dimensional breast and lung cancer cells culture. **Cancer Cell International**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 1, 2 ago. 2023.

SOHAL, Sukhwinder Singh; WALTERS, Eugene. Essential need for rethink of COPD airway pathology: implications for new drug approaches for prevention of lung cancer as well as small airway fibrosis. **International Journal Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, [S.L.], v. 12, p. 2677-2679, set. 2017

SOSKIC, Blagoje; JEFFERY, Louisa E.; KENNEDY, Alan; GARDNER, David H.; HOU, Tie Zheng; HALLIDAY, Neil; WILLIAMS, Cayman; JANMAN, Daniel;

ROWSHANRAVAN, Behzad; HIRSCHFIELD, Gideon M.. CD80 on Human T Cells Is Associated With FoxP3 Expression and Supports Treg Homeostasis. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1, 8 jan. 2021.

SRIVASTAVA, Saumya; MOHANTY, Atish; NAM, Arin; SINGHAL, Sharad; SALGIA, Ravi. Chemokines and NSCLC: emerging role in prognosis, heterogeneity, and therapeutics. **Seminars In Cancer Biology**, [S.L.], v. 86, p. 233-246, nov. 2022.

SZEBENI, Gabor; VIZLER, Csaba; NAGY, Lajos; KITAJKA, Klara; PUSKAS, Laszlo. Pro-Tumoral Inflammatory Myeloid Cells as Emerging Therapeutic Targets. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 1958, 23 nov. 2016

TAN, Zhaofeng; XUE, Haibin; SUN, Yuli; ZHANG, Chuanlong; SONG, Yonglei; QI, Yuanfu. The Role of Tumor Inflammatory Microenvironment in Lung Cancer. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 12, p. 1, 17 maio 2021.

TENG, Jin-Feng; MEI, Qi-Bing; ZHOU, Xiao-Gang; TANG, Yong; XIONG, Rui; QIU, Wen-Qiao; PAN, Rong; LAW, Betty Yuen-Kwan; WONG, Vincent Kam-Wai; YU, Chong-Lin. Polyphyllin VI Induces Caspase-1-Mediated Pyroptosis via the Induction of ROS/NF- κ B/NLRP3/GSDMD Signal Axis in Non-Small Cell Lung Cancer. **Cancers**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 193-193, 13 jan. 2020.

THABET, Nadia A.; EL-GUENDY, Nadia; MOHAMED, Mona M.; SHOUMAN, Samia A.. Suppression of macrophages- Induced inflammation via targeting RAS and PAR-4 signaling in breast cancer cell lines. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 385, p. 114773, dez. 2019.

VAN LOO, Geert; BERTRAND, Mathieu J. M.. Death by TNF: a road to inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 289-303, 15 nov. 2022.

WANG, Yuwen; ZOU, Songyun; ZHAO, Zhuyun; LIU, Po; KE, Changneng; XU, Shi. New insights into small-cell lung cancer development and therapy. **Cell Biology International**, [S.L.], v. 44, n. 8, p. 1564-1576, 18 abr. 2020.

WATKINS, Stephanie K.; EGILMEZ, Nejat K.; SUTTLES, Jill; STOUT, Robert D.. IL-12 Rapidly Alters the Functional Profile of Tumor-Associated and Tumor-Infiltrating Macrophages In Vitro and In Vivo. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 178, n. 3, p. 1357-1362, 1 fev. 2007.

WÉBER, András; MORGAN, Eileen; VIGNAT, Jerome; LAVERSANNE, Mathieu; PIZZATO, Margherita; RUMGAY, Harriet; SINGH, Deependra; NAGY, Péter; KENESSEY, István; SOERJOMATARAM, Isabelle. Lung cancer mortality in the wake of the changing smoking epidemic: a descriptive study of the global burden in 2020 and 2040. **Bmj Open**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 065303, maio 2023.

WEI, Xiang; XIE, Feng; ZHOU, Xiaoxue; WU, Yuchen; YAN, Haiyan; LIU, Ting; HUANG, Jun; WANG, Fangwei; ZHOU, Fangfang; ZHANG, Long. Role of pyroptosis in inflammation and cancer. **Cellular & Molecular Immunology**, [S.L.], v. 19, n. 9, p. 971-992, 15 ago. 2022.

YAMAJI, Haruko; IIZASA, Toshihiko; KOH, Eitetsu; SUZUKI, Makoto; OTSUJI, Mizuto; CHANG, Hao; MOTOHASHI, Shinichiro; YOKOI, Sana; HIROSHIMA, Kenzo; TAGAWA, Masatoshi. Correlation between interleukin 6 production and tumor proliferation in non-small cell lung cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, Alemanha, v. 53, n. 9, p. 786-792, 4 jun. 2004.

YAN, Honglin; LUO, Bin; WU, Xiaoyan; GUAN, Feng; YU, Xinxin; ZHAO, Lina; KE, Xiaokang; WU, Juan; YUAN, Jingping. Cisplatin Induces Pyroptosis via Activation of MEG3/NLRP3/caspase-1/GSDMD Pathway in Triple-Negative Breast Cancer. **International Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 2606-2621, 2021.

YAO, Kunhou; SHI, Zhihao; ZHAO, Fengya; TAN, Cong; ZHANG, Yixin; FAN, Hao; WANG, Yingzhe; LI, Xingwang; KONG, Jun; WANG, Qun. RIPK1 in necroptosis and recent progress in related pharmaceuticals. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 16, p. 1-16, 11 fev. 2025.

YUAN, Renyikun; ZHAO, Wentong; WANG, Qin-Qin; HE, Jia; HAN, Shan; GAO, Hongwei; FENG, Yulin; YANG, Shilin. Cucurbitacin B inhibits non-small cell lung cancer in vivo and in vitro by triggering TLR4/NLRP3/GSDMD-dependent pyroptosis. **Pharmacological Research**, [S.L.], v. 170, p. 105748-105748, ago. 2021.
ZHANG, Chunye; YANG, Ming; ERICSSON, Aaron C.. Function of Macrophages in Disease: current understanding on molecular mechanisms. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, p. 1, 8 mar. 2021.

ZHANG, Jun; VEERAMACHANENI, Nirmal. Targeting interleukin-1 β and inflammation in lung cancer. **Biomark Res** [S.L.], v. 10, n. 5, p.1-9, jan. 2022.

ZHANG, Xiwen; TIAN, Wenxia; CAI, Xiaozhong; WANG, Xiaofei; DANG, Weiqi; TANG, Hao; CAO, Hong; WANG, Lin; CHEN, Tingmei. Hydrazinocurcumin Encapsulated Nanoparticles “Re-Educate” Tumor-Associated Macrophages and Exhibit Anti-Tumor Effects on Breast Cancer Following STAT3 Suppression. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 1-9, 25 jun. 2013.

ZHAO, Huakan; WU, Lei; YAN, Guifang; CHEN, Yu; ZHOU, Mingyue; WU, Yongzhong; LI, Yongsheng. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 263, jul. 2021.

ZHENG, Dongdong; LIU, Jia; PIAO, Hulin; ZHU, Zhicheng; WEI, Ran; LIU, Kexiang. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 13, p. 1, 1 nov. 2022.

ZHU, Yu; KNOLHOFF, Brett L.; MEYER, Melissa A.; NYWENING, Timothy M.; WEST, Brian L.; LUO, Jingqin; WANG-GILLAM, Andrea; GOEDEGEBUURE, S. Peter; LINEHAN, David C.; DENARDO, David G.. CSF1/CSF1R Blockade Reprograms Tumor-Infiltrating Macrophages and Improves Response to T-cell Checkpoint Immunotherapy in Pancreatic Cancer Models. **Cancer Research**, [S.L.], v. 74, n. 18, p. 5057-5069, 14 set. 2014.

ZOLLO, Massimo; DATO, Valeria di; SPANO, Daniela; MARTINO, Daniela de; LIGUORI, Lucia; MARINO, Natascia; VASTOLO, Viviana; NAVAS, Luigi; GARRONE, Beatrice; MANGANO, Giorgina. Targeting monocyte chemotactic protein-1 synthesis with bindarit induces tumor regression in prostate and breast cancer animal models. **Clinical & Experimental Metastasis**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 585-601, 7 abr. 2012.

ZOU, Zijuan; LIN, Hongfen; LI, Mengsen; LIN, Bo. Tumor-associated macrophage polarization in the inflammatory tumor microenvironment. **Frontiers In Oncology**, Zurich, v. 13, n. 1103149, p. 1-10, 2 fev. 2023.