



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

JOÃO PEDRO ALVES GOMES

**INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MIR-181A-5P NO CÂNCER DE PULMÃO:
UMA ANÁLISE IN SÍLICO, IN VITRO E EX VIVO**

Recife
2024

JOÃO PEDRO ALVES GOMES

**INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MIR-181A-5P NO CÂNCER DE PULMÃO:
UMA ANÁLISE IN SÍLICO, IN VITRO E EX VIVO**

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

Orientador (a): Dra. Michelly Cristiny Pereira

Coorientador (a): Dra. Bárbara de Oliveira Silva

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Gomes, João Pedro Alves.

Investigação da expressão do MIR-181A-5P no câncer de pulmão: uma análise in sílico, in vitro e ex vivo / João Pedro Alves Gomes. - Recife, 2024.
69f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2024.

Orientação: Maira Galdino da Rocha Pitta.

Coorientação: Michelly Cristiny Pereira.

Coorientação: Bárbara de Oliveira Silva.

1. Câncer de pulmão de células não pequenas; 2. Câncer de pulmão de células pequenas; 3. miRNA-181a-5p; 4. microRNA; 5. expressão gênica. I. Pitta, Maira Galdino da Rocha. II. Pereira, Michelly Cristiny. III. Silva, Bárbara de Oliveira. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Eu, João Pedro, agradeço primeiramente a Deus por tudo que ele fez na minha vida e por todo cuidado que ele tem por mim, eu acredito que todas as oportunidades e realizações foram obtidas pelo seu intermédio. Agradeço imensamente a minha esposa, Ester Carolina, que está sempre me apoiando em todos os momentos, sempre segurando a minha mão nas horas que eu mais precisei em todo esse processo, em todas as dificuldades e também comemorou comigo em cada realização. Agradeço por ser ela, a pessoa com quem aceitou dividir todos os nossos sonhos, e a finalização dessa etapa é só mais uma na nossa grande história. Agradeço também aos meus pais que sempre se preocuparam quando chegava tarde em casa, que sempre me apoiaram quando eu precisava de algo, que sempre me deram um suporte imenso, eles foram essenciais para eu chegar até aqui.

Agradeço a Plataforma Multiusuário com recursos do edital FACEPE 16/2012, do laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular coordenado pela Profa Glória Duarte. Pelo qual me auxiliou nas etapas de extração das minhas amostras teciduais. agradeço ao PPGIT, NUPIT e a FACEPE por oferecerem todo o suporte necessário para a minha formação.

Quero expressar minha imensa gratidão à Profa. Michelly por toda a orientação e ensinamentos durante esses 2 anos. Agradeço pelas caronas até Olinda, agradeço por cada dica no estágio à docência, por cada correção nos nossos trabalhos e por todo o cuidado e preocupação que teve comigo. Trabalhar ao lado de uma profissional tão capacitada tem sido uma experiência incrível e me deixa muito feliz, e não poderia ter um orientador melhor. Muito obrigado, Profa. Michelly!

Agradeço imensamente a Érika. Por me ajudar a salvar muitos dos meus experimentos, por cada aulinha que me deu de bioinformática, por cada correção, por cada puxão de orelha. Trabalhar ao seu lado é incrível, você sabe responder tudo, até aquelas mínimas curiosidades, você é o nosso verdadeiro cérebro! Obrigado por tudo Érika, e espero continuar trabalhando com você cada vez mais.

Agradeço imensamente a Bárbara (Babi) que é minha orientadora desde o meu 6º período do curso de Biomedicina. Desde sempre foi muito exigente, sempre gostou que tudo saísse perfeito, ainda me lembro da minha defesa de TCC, pois antes de me dar parabéns, puxou minha orelha por ter me esquecido de responder alguns

questionamentos da banca. Mas mesmo assim, não existe ninguém que me faça buscar o melhor de mim a não ser você. Cada puxão de orelha, cada ensinamento, cada conversa desde o começo, foi essencial para minha evolução profissional e pessoal. Sou grato por tudo que você fez e faz por mim Babi, sou grato pelas passagens que você pagava pra mim quando eu não tinha condições de ir todos os dias, sou grato pelos almoços que você já pagou por mim, sou grato por cada realização que tive nesse processo inteiro, onde você sempre torceu por mim e comemorou comigo. Sou muito feliz por ter te conhecido lá em 2020, acredito que eu não seria nem 10% do que eu sou hoje se não fosse por você, minha gratidão por ti é eterna. E te prepara, porque agora vem mais 4 anos!

Quero agradecer também a todos os meus amigos que me apoiaram em todo esse processo. Em especial a Flávia e ao Matheus. A Flávia me ajudou a validar todos os protocolos deste trabalho. Além disso, sou grato por cada conversa que tive com ela, cada conselho, cada surto, por tudo! Sou imensamente grato ao Matheus por me ajudar e estar ao meu lado em cada momento desta minha etapa final do nosso trabalho. Obrigado por cada momento divertido, cada conversa, desabafo, pelas idas e voltas de Olinda até a UFPE, por abdicar de seus finais de semanas e feriados pra vim comigo, somente pra me ajudar, sem você tudo seria mais difícil. Obrigado Flávia e Matheus, amo vocês!

RESUMO

As altas taxas de mortalidade associadas ao câncer de pulmão (CP) representam um desafio significativo para os sistemas de saúde global devido à heterogeneidade dos subtipos histológicos e a falta de um biomarcador padrão. O miRNA 181a-5p (miR-181a-5p) desempenha um papel fundamental em várias neoplasias, por modular genes responsáveis a mecanismos carcinogênicos. Diante disso, o objetivo principal do trabalho é investigar a expressão do miR-181a-5p para o câncer de pulmão em amostras teciduais, séricas e linhagens celulares e associá-las às características clínico-epidemiológicas. Para isso, foi realizada uma análise *in silico* do miR-181a-5p no CP, para identificar os possíveis genes alvos e vias de sinalização associadas a sua regulação. Simultaneamente, a expressão do miR-181a-5p foi avaliada por RT-qPCR em linhagens celulares de câncer de pulmão (A549 e H1299) e linhagem pulmonar não neoplásica (MRC5). Paralelamente, também foi analisada a expressão desse microRNA (miRNA) em 57 amostras teciduais de pacientes com câncer de pulmão e 21 amostras teciduais com ausência de neoplasia, bem como em 44 amostras séricas neoplásicas e 17 amostras séricas de indivíduos com ausência de neoplasia. Os resultados da análise *in silico*, revelaram que o miR-181a-5p regula diversos genes associados a processos tumorais, como *HMGA2*, *TGFBR3* e *WIF1*, os quais estão envolvidos em vias de proliferação celular, invasão e progressão tumoral. A análise de expressão do miR-181a-5p, demonstrou que há um aumento significativo da expressão nas linhagens H1299 e A549 quando comparadas à linhagem não neoplásica MRC5. Similarmente, esse aumento de expressão foi observado nas amostras teciduais de pacientes com adenocarcinoma e carcinoma escamoso quando comparados com os pacientes com ausência de neoplasia. Da mesma forma, foi observada o aumento dessa expressão em amostras séricas de carcinoma neuroendócrino de pequenas células, quando comparados com o grupo de pacientes com ausência de neoplasia. Adicionalmente, as variáveis: estadiamento, histórico familiar, tumores prévios, comorbidades e alcoolismo foram associadas ao aumento da expressão do miR-181a-5p ($p < 0.05$). Embora preliminar, o estudo sugere uma possível associação entre o miR-181a-5p e o desenvolvimento tumoral do CP, orientando uma exploração de mecanismos moleculares subjacentes, para identificação de novas estratégias terapêuticas e biomarcadores moleculares específicos para o CP.

Palavras-chave: Câncer de pulmão de células não pequenas, Câncer de pulmão de células pequenas, microRNA; miRNA-181a-5p; expressão gênica.

ABSTRACT

The high mortality rates associated with lung cancer (LC) represent a significant challenge for global healthcare systems due to the heterogeneity of histological subtypes and the lack of a standardized biomarker. MicroRNA 181a-5p (miR-181a-5p) plays a crucial role in various neoplasms by modulating genes involved in carcinogenic mechanisms. Accordingly, the main objective of this study was to investigate the expression of miR-181a-5p in lung cancer using tissue samples, serum samples, and cell lines, and to associate its expression with clinical and epidemiological characteristics. To achieve this, an *in silico* analysis of miR-181a-5p was conducted to identify potential target genes and signaling pathways related to its regulation in lung cancer. Simultaneously, miR-181a-5p expression was assessed via RT-qPCR in lung cancer cell lines (A549 and H1299) and a non-neoplastic lung cell line (MRC5). In parallel, expression levels were also evaluated in 57 tissue samples from lung cancer patients and 21 non-neoplastic tissue samples, as well as in 44 neoplastic serum samples and 17 serum samples from non-neoplastic individuals. The *in silico* analysis revealed that miR-181a-5p regulates several genes associated with tumor-related processes, such as HMGA2, TGFBR3, and WIF1, which are involved in pathways of cell proliferation, invasion, and tumor progression. Expression analysis demonstrated a significant upregulation of miR-181a-5p in H1299 and A549 cell lines compared to the non-neoplastic MRC5 line. Similarly, increased expression was observed in tissue samples from patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma compared to non-neoplastic controls. Furthermore, a significant elevation in expression was noted in serum samples from patients with small cell neuroendocrine carcinoma compared to those without neoplasia. Additionally, clinical variables such as tumor stage, family history of cancer, previous tumors, comorbidities, and alcohol consumption were associated with increased miR-181a-5p expression ($p < 0.05$). Although preliminary, the study suggests a potential association between miR-181a-5p and lung cancer progression, highlighting the need for further exploration of underlying molecular mechanisms to identify novel therapeutic strategies and specific molecular biomarkers for lung cancer.

Keywords: Non-small cell lung cancer, Small cell lung cancer, microRNA; miRNA-181a-5p; signaling pathways; gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxa de incidência e mortalidade para ambos os sexos	18
Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes para o triênio 2023-2025 por sexo, exceto o câncer de pele não melanoma	19
Figura 3. Classificação do câncer de pulmão.	20
Figura 4. Diagnóstico do CP	22
Figura 5. Estadiamento do CP	25
Figura 6. Via canônica da síntese de miRNA	28
Figura 7. Delineamento experimental.....	32
Figura 8. Template da síntese de cDNA para o miR-181a-5p, U6 e RNU44	36
Figura 9. Genes alvos do miR-181a-5p no Adenocarcinoma de Pulmão.....	40
Figura 10. Genes alvos do miR-181a-5p no Carcinoma Escamoso de Pulmão.....	41
Figura 11. Ontologia genética do miR-181a-5p no Adenocarcinoma de Pulmão.....	41
Figura 12. Ontologia genética do miR-181a-5p no Carcinoma Escamoso de Pulmão.....	42
Figura 13. Vias de sinalização do miR-181a-5p no Adenocarcinoma de Pulmão	43
Figura 14. Vias de sinalização do miR-181a-5p no Carcinoma Escamoso de Pulmão	44
Figura 15. Análise de expressão do miR-181a-5p nas linhagens H1299, A549 e MRC5 Erro! Indicador não definido.	
Figura 16. Análise de expressão do miR-181a-5p em amostras teciduais e séricas de pacientes com adenocarcinoma, carcinoma escamoso, carcinoma neuroendócrino e ausência de neoplasia.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. miR-181a-5p em diferentes tipos neoplásicos	31
Tabela 2. Dados de expressão dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão	47
Tabela 3. Regressão Linear Múltipla	499

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC:	Do inglês <i>America Joint Committe on Cancer</i>
cDNA:	DNA complementar
CP:	Câncer de pulmão
CPNPC:	Câncer de pulmão de não pequenas células
CPPC:	Câncer de pulmão de pequenas células
Globocan:	Do inglês <i>Global Cancer Observatory</i>
HCP:	Hospital do câncer de Pernambuco
HUOC:	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
LUAD:	Adenocarcinoma de Pulmão
LUSC:	Carcinoma Escamoso de Pulmão
miRNA:	MicroRNA
Pre-miRNA:	miRNA precursor
Pri-miRNA:	miRNA primário
RNA _m :	RNA mensageiro
TCGA:	Atlas do Genoma do Câncer

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 JUSTIFICATIVA	16
1.2 OBJETIVOS	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2 Objetivos específicos	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DO CP	18
2.1.1 Aspectos histológicos e citológicos do CP	19
2.1.2 Sintomatologia e Diagnóstico do CP	21
2.1.3 Aspectos Moleculares do CP	23
2.1.3 Prognóstico e Tratamento do CP	24
2.1.4 Epigenética do CP	26
2.2 MICRORNAS	27
2.2.1 MicroRNAs e o câncer de pulmão	29
2.2.2 MiRNAs como biomarcadores prognóstico e diagnóstico no CP	29
2.3 MICRORNA 181A-5P	30
3 METODOLOGIA	31
3.1 TIPO E PERÍODO DE ESTUDO	32
3.2 ANÁLISE IN SÍLICO	32
3.3 ANÁLISE IN VITRO	33
3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	33
3.5 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	33
3.6 ANÁLISE EX VIVO	34
3.7 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	34
3.8 SÍNTESE DE CDNA E EXPRESSÃO DO MIR-181A-5P POR RT-QPCR	35
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
3.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	38
4 RESULTADOS	38
4.1 ANÁLISE IN SÍLICO	38
4.1.1 Predição dos genes alvos do miR-181a-5p	38
4.1.2 Ontologia genética (GO)	40
4.1.3 Vias de sinalização do miR-181a-5p	43
4.2 ANÁLISE IN VITRO	46
4.3 ANÁLISE EX VIVO	46
4.3.1 Análise de expressão do miR-181a-5p em amostras de CP	46
4.3.2 Avaliação da expressão do miR-181a-5p em relação às características clínico-epidemiológica dos pacientes com CP	478
4.3.3 Análise multivariada da expressão do miR-181a-5p (Regressão Linear Múltipla)	50
5 DISCUSSÃO	51

6 CONCLUSÃO	545
7 ATIVIDADES COMPLEMENTARES	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A- SUBMISSÃO DE ARTIGO.....	64
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (HCP).....	65
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (HUOC).....	68

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão (CP) é a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer em todo o mundo e o mais incidente, apresentando uma estimativa de 2 milhões de novos casos por ano. (Thandra et al., 2021; Globocan, 2022).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), no Brasil serão estimados 18.020 novos casos em homens e 14.540 em mulheres para cada ano no triênio 2023-2025. Esses valores correspondem a um risco estimado de 17,06 casos novos a cada 100 mil homens e de 13,15 a cada 100 mil mulheres, respectivamente (INCA, 2023).

Com base nas características das células tumorais, o câncer de pulmão é classificado em dois grupos histológicos, o carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC), que representa 15% dos tumores, e o carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPNPC) que representa 85% dos tumores. Esses grupos histológicos apresentam diversos subtipos, sendo o adenocarcinoma, proveniente do grupo de CPNPC, o mais comum, apresentando diversos estudos relacionados ao seu diagnóstico, prognóstico e tratamento (Mithoowani e Febbraro, 2022).

O diagnóstico do câncer de pulmão é realizado através de exames físicos, exames de imagem, biópsia e pesquisa molecular (ACS, 2024). No entanto, detectá-lo precocemente é um grande desafio devido à presença de sintomas iniciais inespecíficos, rápida progressão e à ausência de biomarcadores séricos estabelecidos na prática clínica (Carneiro et al., 2023). Além disso, o avanço da doença também reflete em problemas sociais, uma vez que a exposição aos fatores de risco depende das condições socioeconômicas, culturais e da oferta de serviços de saúde, dificultando no tratamento da doença (Sá et al., 2016).

O tratamento do CP ainda enfrenta inúmeros desafios, por apresentar resistência celular à quimioterapia convencional e à radioterapia. Tem sido sugerido que algumas mutações genéticas conferem esse papel de resistência à terapias direcionadas. Diante disso, existe uma necessidade de explorar novos biomarcadores e alvos terapêuticos para superar esse problema. (Mithoowani e Febbraro, 2022).

Atualmente, há diversos estudos relacionados à compreensão dos microRNAs (miRNAs) como biomarcadores genéticos em diversas neoplasias, incluindo o câncer de pulmão. Os miRNAs pertencem à família dos RNAs não codificantes com 17 a 25 nucleotídeos. Sua expressão é altamente conservada e exhibe alta especificidade.

Geralmente, os miRNAs regulam a expressão gênica degradando ou inibindo o RNA mensageiro (RNAm), evidenciando um papel importante em quase todas as vias genéticas, desde a proliferação até a morte celular por apoptose, regulando assim inúmeros genes-alvo (H. Yang et al., 2023).

Estudos demonstram evidências que o miRNA 181a-5p desempenha um papel importante em diversos tipos de neoplasias. Isso ocorre, devido à inibição de genes reguladores da apoptose e de proliferação celular, conferindo a regulação de vias que podem estar associadas à sobrevivência ou morte tumoral (Indrieri et al., 2020; Minemura et al., 2022).

No CP, ainda não há estudos suficientes para definir o papel do miR-181a-5p nesta neoplasia. Alguns trabalhos demonstraram que no CPNPC, a expressão do miR-181a-5p pode inibir o crescimento tumoral e a metástase, visando múltiplos fatores pró-tumorais (Li et al., 2023). Semelhantemente, os níveis basais elevados do miR-181a-5p no plasma dos pacientes diagnosticados com CPNPC demonstraram uma melhor resposta à imunoterapia (Leonetti et al., 2021). Em outros trabalhos, é revelado que os níveis plasmáticos do miR-181a-5p estão elevados em pacientes que foram diagnosticados com o carcinoma escamoso de pulmão, sugerindo um papel oncogênico, além de conferir uma resistência terapêutica a inibidores de tirosino quinase (Shan et al., 2018; Ping et al., 2018). Além disso, ainda não há estudos do miR-181a-5p referente ao CPPC, destacando a necessidade de investigações adicionais para compreender o papel completo deste miRNA e seus genes alvos no CP.

Diante do exposto, observamos que um número crescente de estudos sugerem que os miRNAs estão envolvidos na fisiopatologia de diversas neoplasias, incluindo o CP, desempenhando mecanismos oncogênicos ou supressores tumorais. Embora, alterações na expressão dos miRNAs possam constituir em um achado secundário ao fenótipo tumoral, ainda não está completamente claro se a expressão alterada dos miRNAs constitui a causa ou a consequência da transformação maligna das neoplasias (Mohammadi et al., 2021). Logo, estudar os mecanismos associados aos miRNAs supressores e oncogênicos correlacionado com o CP é de fundamental importância para fornecer uma nova compreensão sobre o diagnóstico e o prognóstico da doença.

1.1 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços nas estratégias de diagnóstico e no desenvolvimento de novos tratamentos com alvos moleculares para o CP, ainda há pouco progresso em relação à identificação de biomarcadores específicos. Essa dificuldade pode ser atribuída à heterogeneidade das células tumorais, que pode contribuir para as altas taxas de letalidade apresentada neste tipo de neoplasia. Por isso, a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao CP é de suma importância para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e prognóstico. Nesse contexto, os miRNAs vem se destacando como possíveis biomarcadores promissores para a predição clínica do câncer, devido ao seu papel na regulação da expressão gênica, implicação na oncogênese e supressão tumoral. Diversos estudos destacam a importância do miR-181a-5p, que desempenha um papel supressor tumoral e oncogênico em diversos tipos de neoplasias. No entanto, a integração da expressão do miR-181a-5p no CP, ainda é pouco estudada. Logo, a investigação do miR-181a-5p no CP poderá auxiliar na determinação de um possível biomarcador, sugerindo uma nova abordagem de estratificação dos grupos de risco e de acompanhamento clínico da doença.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a expressão do miR-181a-5p para o câncer de pulmão em amostras teciduais, séricas e linhagens celulares e associá-las às características clínico-epidemiológicas

1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma análise *in silico* para identificar os genes potencialmente alvos do miR-181a-5p e verificar se os mesmos estão envolvidos em mecanismos de sobrevivência ou morte tumoral;
- Analisar a expressão deste miRNA em linhagens neoplásicas de pulmão (H1299 e A549) e não neoplásicas de pulmão (MRC5);
- Investigar a expressão do miR-181a-5p em amostras teciduais e séricas (não neoplásico e neoplásico de pulmão);

- Avaliar as possíveis associações entre os achados da expressão tecidual e sérica do miR-181a-5p com as características clínicas-epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão.

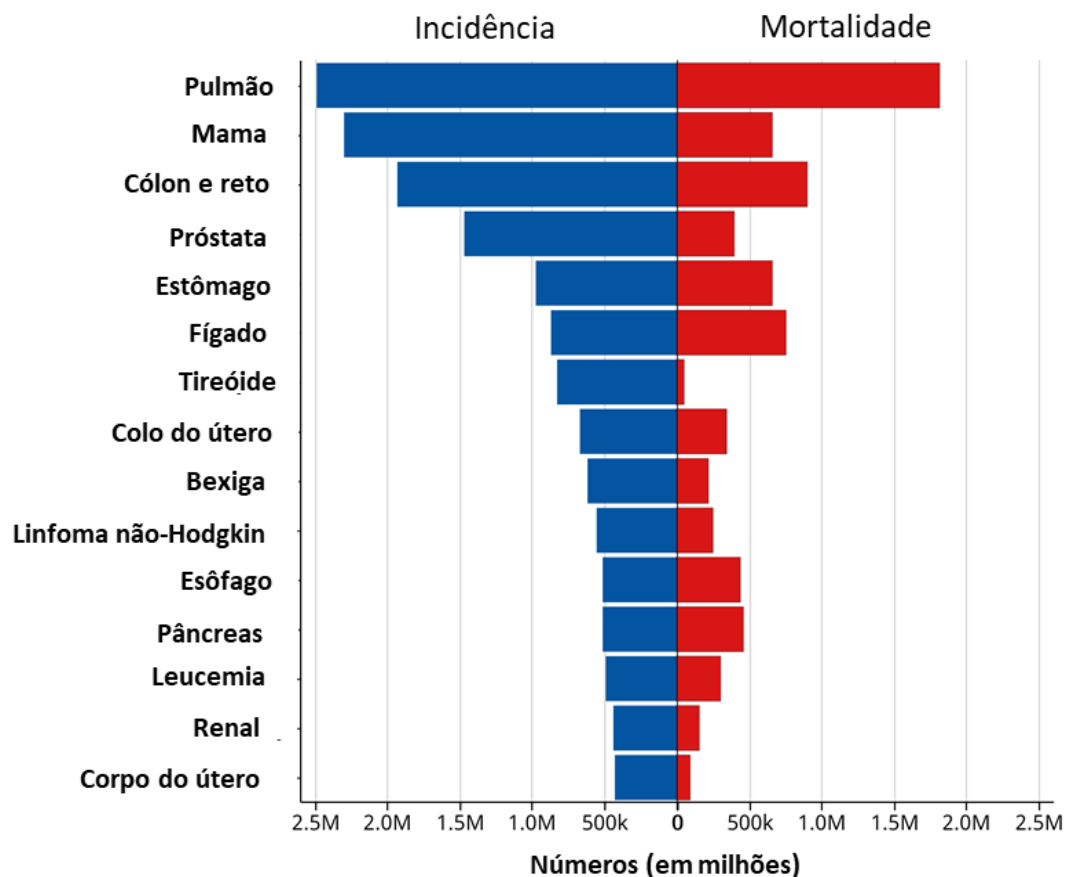
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DO CP

O CP se refere a tumores originados no parênquima pulmonar ou nos brônquios. (Toumazi *et al.*, 2020). Segundo os últimos dados estimados pelo *Global Cancer Observatory* (Globocan) em 2022, o CP é considerado a principal causa de morte relacionada ao câncer em ambos os sexos em todo o mundo, com uma estimativa de 1,80 milhões de mortes por ano. Além disso, o CP é a neoplasia mais incidente no mundo, apresentando uma taxa de 2,48 milhões de novos casos por ano (Figura 1) (Globocan, 2022; Thandra *et al.*, 2021).



No Brasil, desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o CP ocupa a quarta posição entre os tipos de neoplasias mais incidentes. Para cada ano do triênio de 2023 a 2025, o número estimado para novos casos é de 32.560, correspondendo a um risco de 15,06 casos a cada 100 mil habitantes, sendo 18,020 casos entre os homens e 14,540 casos entre as mulheres (Figura 2) (INCA, 2023).

Figura 1. Taxa de incidência e mortalidade para ambos os sexos



Fonte: Globocan, 2022

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes para o triênio 2023-2025 por sexo, exceto o câncer de pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

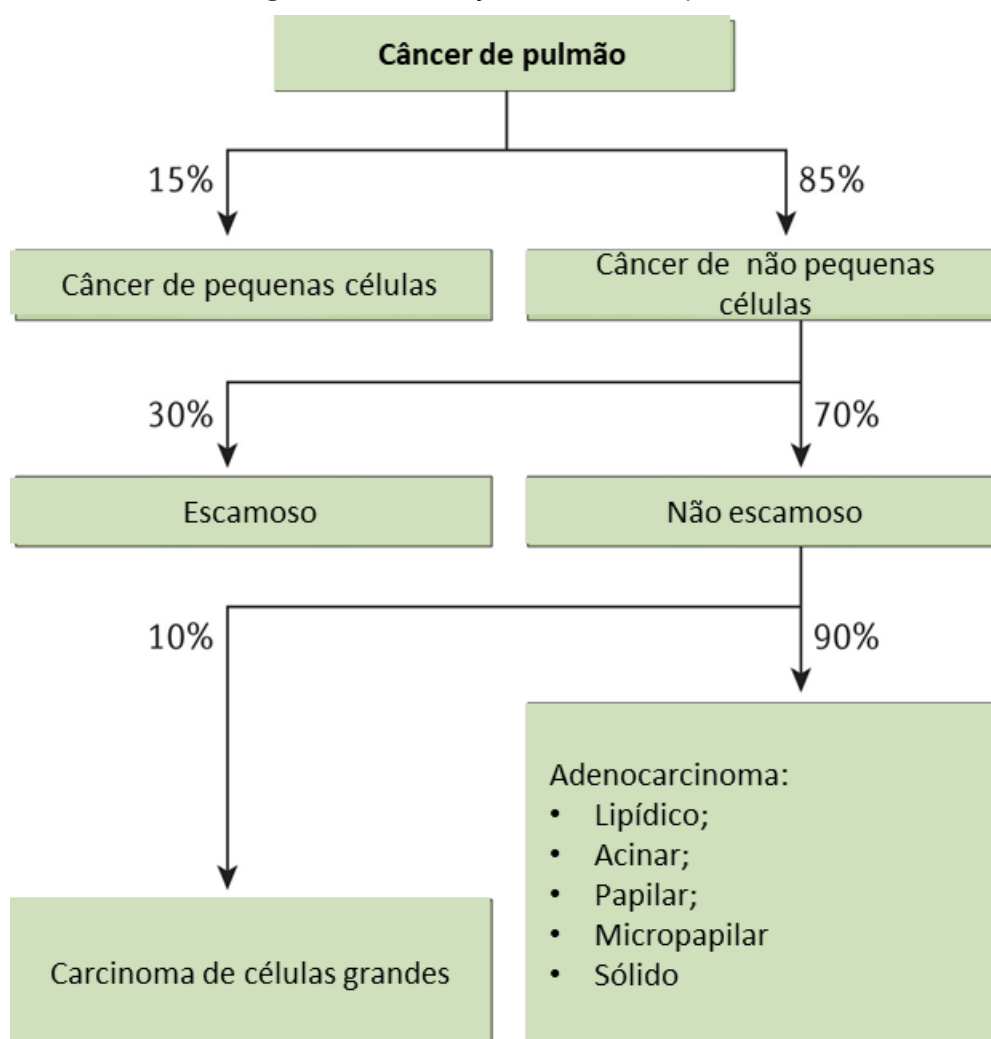
*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2023

2.1.1 Aspectos histológicos e citológicos do CP

O CP é classificado em dois principais grupos histológicos, o CPNPC e o CPPC (Figura 3). O primeiro grupo é o mais comum e compreende 85% das neoplasias pulmonares, e estão incluídos: o adenocarcinoma de pulmão, carcinoma escamoso e o carcinoma de células grandes. O adenocarcinoma é caracterizado pela malignidade de células glandulares, exibindo os subtipos mucinoso e não mucinoso (acinar, papilar, micropapilar, lipídico e sólido) diferenciando-se conforme a extensão e arquitetura das glândulas; O carcinoma escamoso é descrito devido a malignidade de células queratinizantes e células não queratinizantes. O carcinoma de células grandes tem como principal particularidade a presença de células redondas ou poligonais com citoplasma abundante e que não apresenta similaridade citológica consistente com o adenocarcinoma ou o carcinoma escamoso (Gridelli et al., 2015; Rajdev et al., 2018; Saab et al., 2020)

Já o CPPC, compreende 15% das neoplasias pulmonares, e é caracterizado pelos carcinomas neuroendócrinos, que apresentam células com características redondas ou ovais com pouco citoplasma e que são extensivamente necróticas. Esses tumores apresentam um alto grau de agressividade, e estão frequentemente associados ao tabagismo, apresentando uma taxa de cura reduzida, prognóstico desfavorável e sintomas como tosse persistente, falta de ar ou expectoração de muco com sangue (Rudin et al., 2021).

Figura 3. Classificação do câncer de pulmão.

Fonte: Adaptado de Gridelli et al., 2015

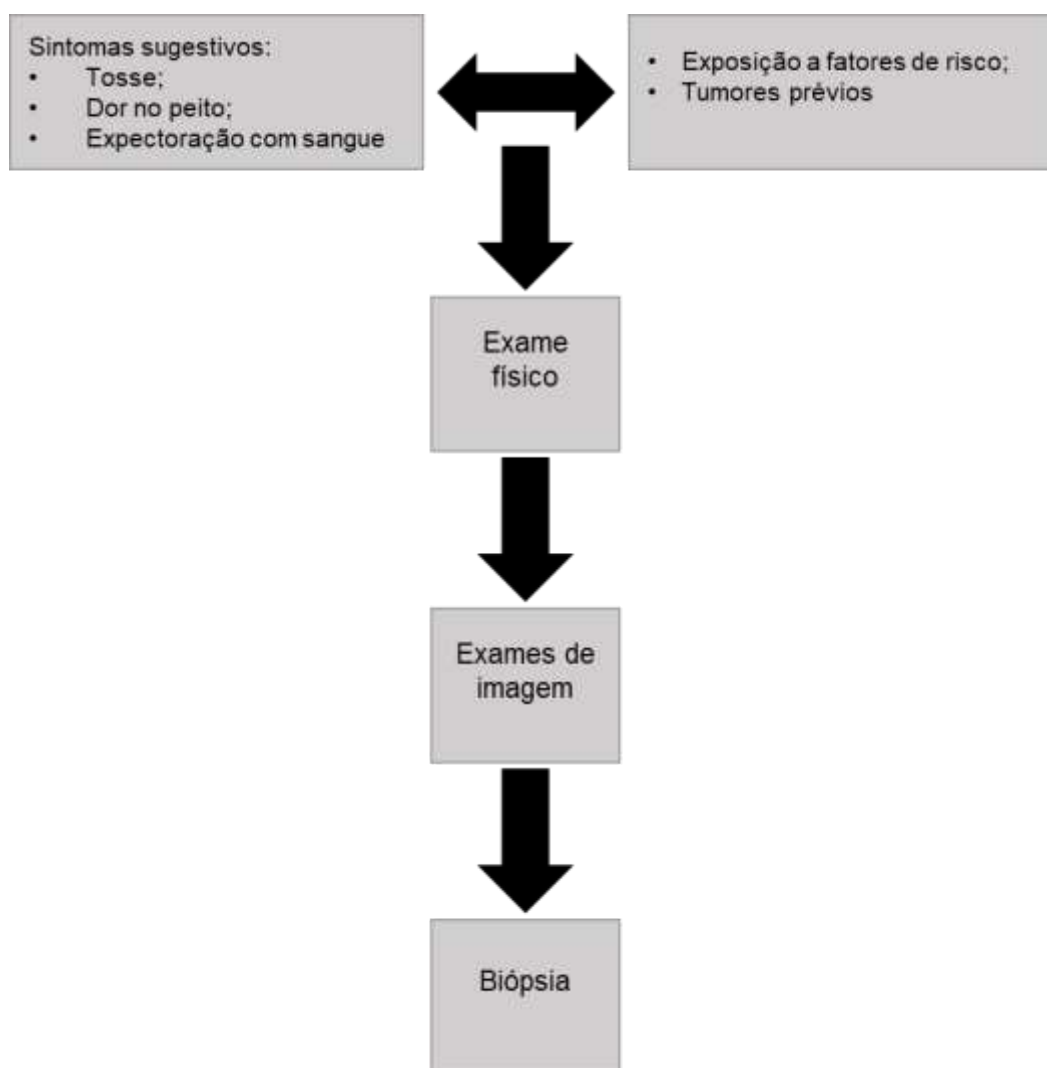
2.1.2 Sintomatologia e Diagnóstico do CP

Os sintomas do CP não são específicos. A maioria dos pacientes já apresentam um diagnóstico avançado da doença no momento da apresentação dos primeiros sintomas, tais como tosse, dor no peito, rouquidão, expectoração com muco ou sangue, entre outros (Calixto et al., 2023).

O diagnóstico do CP pode ser mediado através do rastreamento, utilizando a tomografia computadorizada de baixa dose (TCBD), em pacientes enquadrados no grupo de alto risco, ou seja, aqueles com mais de 50 anos e histórico de tabagismo por pelo menos 30 anos (Filho et al., 2020). Além disso, se o paciente apresentar histórico de tumores prévios, exposição a fatores de risco e sintomas sugestivos de CP, serão realizados exames de imagem, como radiografia de tórax e tomografia

computadorizada (TC), para identificar nódulos ou massas no tecido pulmonar. Na detecção de anormalidades nesse tecido, a biópsia é conduzida para confirmar se há características neoplásicas (Figura 4) (ACS, 2024).

Figura 4. Diagnóstico do CP



Fonte: Adaptado de Bagatin et al., 2006

Apesar do CP contar com rastreamento, a maioria dos pacientes são diagnosticados tardiamente, devido a um cenário frequentemente atribuído a problemas socioeconômicos (Sá et al., 2016). Países em desenvolvimento, como o Brasil, abriga em suas regiões, uma diversidade de características socioeconômicas distintas, refletindo em um perfil de adoecimento típico de países de alta e baixa renda. Esta disparidade resulta em uma distribuição irregular dos serviços de saúde,

dificultando o acesso da população mais vulnerável, contribuindo para o desenvolvimento da doença (Santos et al., 2018; Araújo et al., 2018).

O desenvolvimento do CP depende de diversos fatores de risco, mas o principal é o tabagismo. Cerca de 85% dos casos de pacientes dependentes de produtos derivados do tabaco estão associados à evolução do carcinoma pulmonar. Nicotina, N-nitrosaminas e hidrocarbonetos aromáticos são os principais compostos carcinogênicos do cigarro, que ocasionam danos repetidos no DNA, gerando mutações no material genético. Entretanto, a exposição a agentes químicos (asbesto, arsênico, berílio, radônio, e outros), poluição do ar, infecções pulmonares de repetição, fatores genéticos e histórico familiar de câncer também favorecem o seu desenvolvimento. Nos últimos anos, houve um grande avanço no manejo do CP, determinando o tratamento através de um diagnóstico com base nas alterações histológicas e moleculares (Bade e Dela Cruz, 2020).

2.1.3 Aspectos Moleculares do CP

Para a avaliação diagnóstica do CP, é de suma importância reconhecer a alta heterogeneidade desta neoplasia. Logo, a caracterização molecular de precisão e a identificação de modificações pontuais, é fundamental para compreender a doença e determinar o prognóstico e o tratamento personalizado (Junior; Harada; Mello 2019). Dentre as principais alterações moleculares do CP, destacam-se a presença de genes supressores tumorais, proto-oncogenes e fatores relacionados à proliferação, apoptose e angiogênese, os quais são amplamente investigados como estratégia para o prognóstico e diagnóstico da doença (Duarte et al., 2006).

Nos últimos anos, o diagnóstico do CP tem avançado significativamente em direção a uma abordagem molecular, evidenciando diferentes famílias de genes e eventos mutagênicos (Wild; Weiderpass; Stewart, 2020). Mutações pontuais no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), ou a presença do receptor-1 de morte programada (PD-L1) conferem um bom prognóstico em terapias direcionadas com inibidores da tirosina quinase e anticorpos monoclonais (Anti-PD-L1). Em contrapartida, mutações presentes no gene ALK e ROS1, estão associados a um prognóstico desfavorável, devido a tendência de desenvolvimento da doença em crianças e em pacientes sem histórico de tabagismo (Costa et al., 2022).

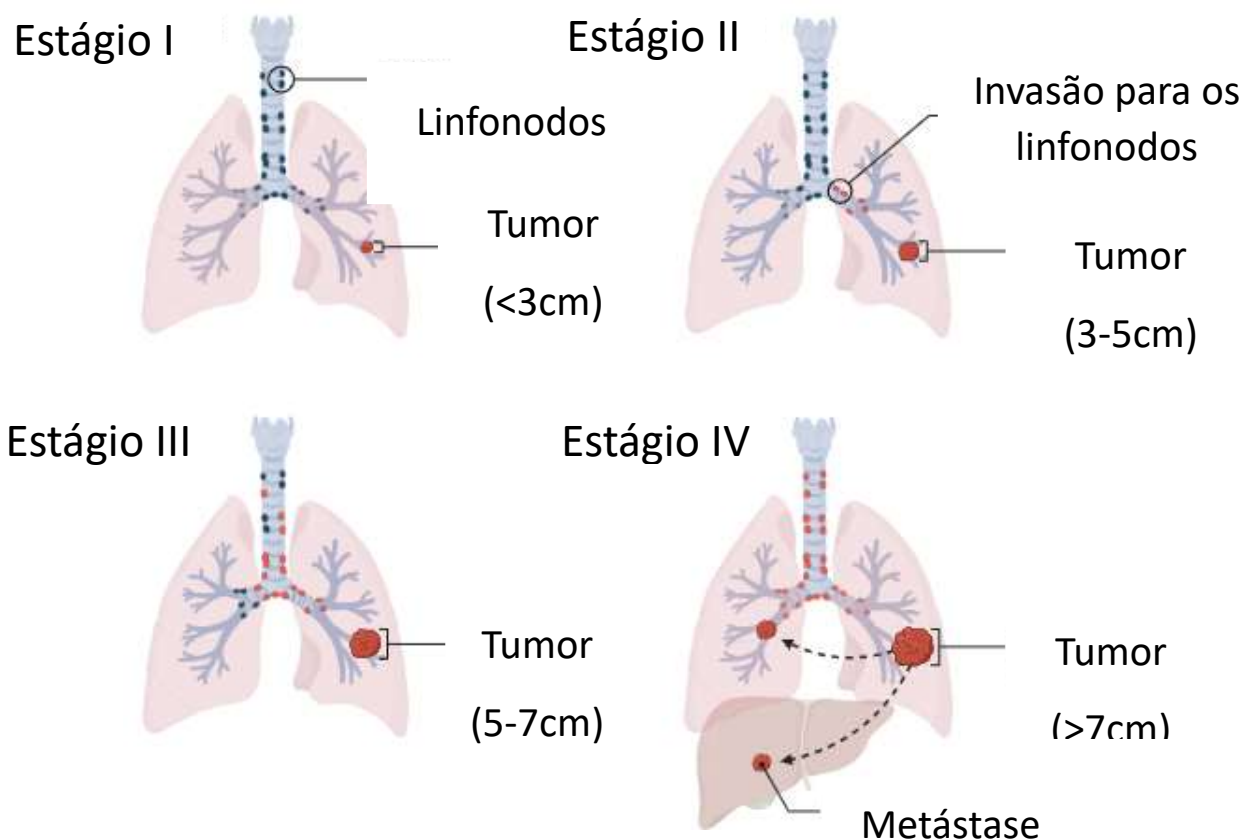
Essas mutações genéticas são identificadas através de análises moleculares como a reação em cadeia polimerase (PCR) e imunohistoquímica (IHQ) após a

retirada do fragmento neoplásico pela biópsia. A identificação dessas mutações pontuais é crucial para direcionar o acompanhamento clínico, apesar da acessibilidade aos exames genéticos ser pouco factível para a população em geral, devido aos altos custos (ALA, 2024). No entanto, devido à ausência de biomarcadores séricos estabelecidos na prática clínica, essa abordagem ainda enfrenta desafios significativos, especialmente devido à sua invasividade. Isso pode aumentar o risco de complicações em tumores localizados em áreas de difícil acesso no tecido pulmonar, dificultando o prognóstico do paciente (Carneiro et al., 2023; Ramos et al., 2023).

2.1.3 Prognóstico e Tratamento do CP

Para prever o prognóstico e o diagnóstico do paciente e determinar o tratamento adequado, se faz necessário conhecer o estágio do tumor, seu crescimento e metástase, e todas essas características são definidas como estadiamento. Para o CP, o estadiamento pode ser realizado com auxílio da tomografia de tórax e de abdômen superior, cintilografia óssea, ressonância nuclear magnética de sistema nervoso central, tomografia por emissão de pósitrons/computadorizada (PET-CT), broncoscopia, broncoscopia com ultrassom endoscópico (EBUS), endoscopia com ultrassom endoscópico (EUS), mediastinoscopia, punção aspirativa com agulha fina (PAAF) ou biópsia cirúrgica de áreas suspeitas de comprometimento (Silva et al., 2021.)

No câncer de pulmão é utilizado o sistema de estadiamento TNM (Figura 5) do *America Joint Committee on Cancer* (do inglês, AJCC). Esse comitê utiliza três critérios de classificação: o T indica o tumor primário, o N descreve se existe disseminação da doença para os linfonodos e o M determina se existe a presença de metástase. A compreensão desses parâmetros é fundamental para a orientação adequada do tratamento do câncer de pulmão (INCA 2023).

Figura 5. Estadiamento do câncer de pulmão

Fonte: Adaptado do INCA (2023).

O tratamento oferecido aos pacientes com CP depende do estágio em que a doença foi diagnosticada. As modalidades mais utilizadas no tratamento do CP são cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A cirurgia representa a melhor chance de cura para o paciente com CPNPC. Esse procedimento pode ser realizado isoladamente ou associado à quimioterapia e radioterapia, visando a melhora da sobrevida dos pacientes com CP. Indivíduos com tumores em estágio I, II e IIIA são tratados inicialmente com cirurgia e podem receber quimioterapia adjuvante. Porém, tumores em estágio IIIB e IV, na maioria das vezes, não são tratados com cirurgia (Novaes et al., 2008).

Estudos reportam que 30% a 70% dos pacientes com CPNPC que foram submetidos a tratamento curativo têm recorrência da doença. A maioria dessas recorrências (cerca de 80% dos casos) se dá nos dois primeiros anos após o tratamento. Isso pode estar associado a fatores genéticos que alteram a susceptibilidade individual, resultando em alterações genéticas específicas. Destaca-

se, ainda a necessidade de explorar mecanismos epigenéticos, a fim de buscar novos biomarcadores moleculares e alvos terapêuticos, para aumentar sobrevida e diminuir a incidência de pacientes com CP (Araújo et al., 2018; Sugimura et al., 2007).

2.1.4 Epigenética do CP

A epigenética engloba uma série de mecanismos que modulam a expressão gênica sem implicar alterações na sequência do DNA. Esses mecanismos epigenéticos envolvem principalmente três modificações químicas: as modificações nas histonas, que influenciam a transcrição genética; a metilação do DNA, que resulta no silenciamento de genes; e a presença de RNAs não codificantes (ncRNA), reconhecidos como agentes modificadores epigenéticos (Ramazi et al., 2023).

É evidenciado que no CP a desregulação epigenética exerce um importante papel no desenvolvimento tumoral. Modificações pós-traducionais presentes nas histonas, como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação, influenciam a estrutura da cromatina e afetam o acesso do DNA aos fatores de transcrição, modulando assim a expressão gênica de diversas vias de sinalização, como: Ciclo celular, senescência, apoptose e fatores de crescimento (Bajbouj et al., 2021).

Além disso, outras alterações epigenéticas, como as metilações no DNA, são amplamente investigadas no CP. A metilação é um processo natural, pelo qual os grupos metil são adicionados à molécula do DNA, alterando a atividade do DNA sem alterar a sequência genética (Hoang; Landi, 2022). Essas metilações, ocorrem por sua maioria em regiões denominadas de ilhas de dinucleotídeos citosina-guanina (CpG). As ilhas CpG desempenham um papel crucial na preservação da estabilidade genômica e na promoção da expressão gênica adequada. No CP, observa-se uma alta metilação das ilhas CpG, acarretando em consequências prejudiciais em todo o genoma. Essas metilações afetam diversos genes essenciais em processos celulares, como reparo do DNA, apoptose, proliferação e metástase (Kim et al., 2023).

Atualmente, estudos referentes a alterações epigenéticas vem sendo bastante avançados. Como por exemplo, a implementação do teste de detecção precoce de múltiplos tipos de câncer (do inglês, *MCED Test*) do grupo Grail, capaz de detectar alguns tipos de câncer precocemente através de amostras de sangue, inclusive o CP. Essa metodologia é baseada na identificação de metilações, utilizando algoritmos avançados de aprendizado de máquina e reconhecimento de padrões para “ler” padrões de metilação, no entanto nota-se a necessidade de mais métodos de

detecção a base de modificações epigenéticas para diminuir os riscos de falsos positivos e falsos negativos (Grail, 2024).

Outra modificação epigenética de importância, é a presença dos ncRNAs, que constitui uma classe diversificada de moléculas de RNA, amplamente investigada devido às suas propriedades na regulação genética e à capacidade de degradar o RNAm (Langevin et al., 2015). O amplo reconhecimento ncRNAs como moléculas reguladoras de diversos processos celulares, ocorreu entre o final do século XX e o início do século XXI com a descoberta dos RNAs interferentes (siRNAs) e os miRNAs, que desempenham um papel crucial na expressão de diversos genes (Mattick et al., 2023).

2.2 MICRORNAS

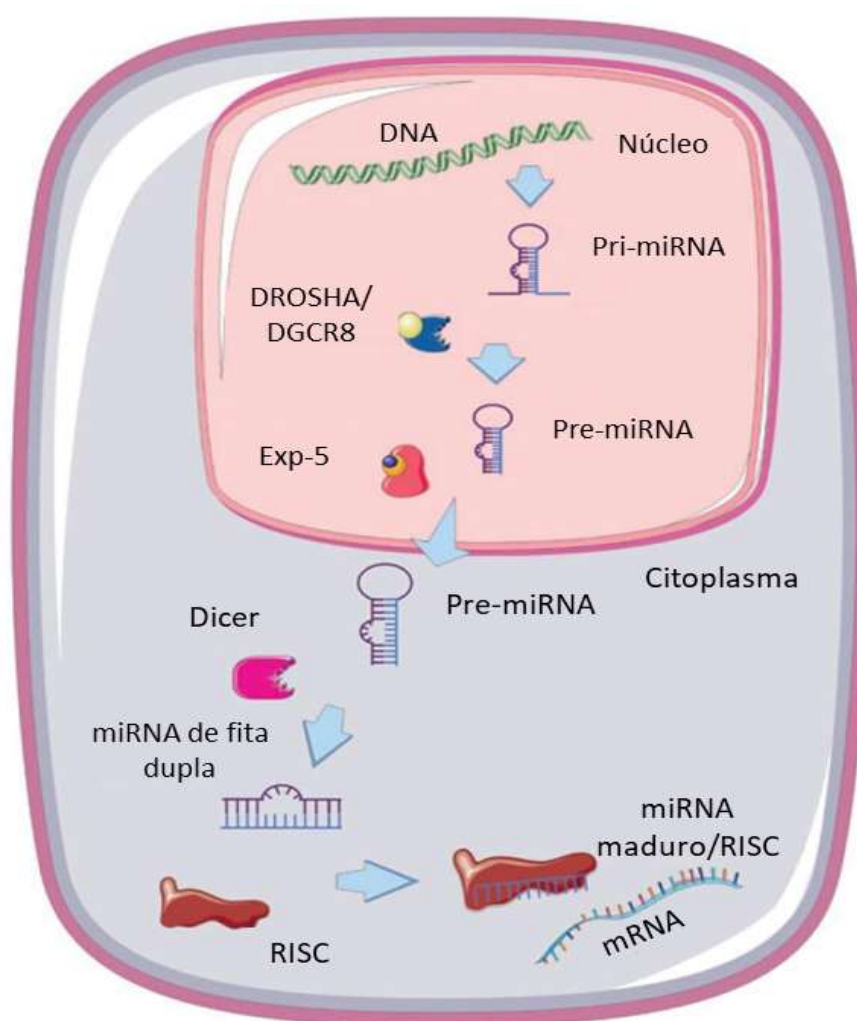
Os miRNAs são pequenas moléculas (17-25 nucleotídeos) da classe dos RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica através da degradação ou repressão do RNAm. Essas moléculas desempenham um papel essencial em diversos processos biológicos, tais como: proliferação, migração, metabolismo e apoptose celular. Inúmeros miRNAs foram identificadas em humanos nos últimos 30 anos. Atualmente, o banco de dados miRBase registra 48.860 sequências maduras de miRNA de 271 organismos, e 2.654 codificadas pelo genoma humano (Tan et al., 2018; Fu et al., 2022; Jorge et al., 2021).

Os miRNAs estão envolvidos em todos os processos celulares, desempenhando um papel essencial para a regulação gênica. Acredita-se que um único miRNA possa modular diversos genes, além de múltiplos miRNAs regulando um único gene, e essa cooperação é essencial no ajuste da expressão protéica, protegendo a célula contra as flutuações genéticas. Todas as células expressam uma variedade de miRNAs, e sua síntese é mediada por diversas enzimas nucleares e citoplasmáticas (Gebert e MacRae, 2019).

A síntese dos miRNAs é dividida em duas etapas, a primeira ocorre no núcleo da célula e a segunda etapa no citoplasma (Figura 6). Na primeira etapa, ocorre a partir de sequências de DNA que vão ser transcritas pelas enzimas RNA polimerase II/III em miRNA primário (Pri-miRNA), que é clivado posteriormente pelo complexo proteico Drosha-DGCR8, liberando o miRNA precursor (Pre-miRNA). O pré-miRNA vai ser transportado ao citoplasma da célula via Exportina-5 (Exp5) e dar início à

segunda etapa. No citoplasma, a enzima DICER irá processar o pre-miRNA em miRNA de fita dupla e posteriormente em uma fita simples de miRNA maduro. Após a maturação, os miRNAs são transportados por proteínas da família Argonaute (AGO), induzindo o complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC), que se ligam na região 3' não traduzida (UTR) do RNAm reprimindo ou inibindo genes alvos, regulando assim a expressão gênica (Kanthaje et al., 2021; O'Brien et al., 2018).

Figura 6. Via canônica da síntese de miRNA



Abreviações. DNA: Ácido desoxirribonucleico; DROSHA/DGCR8: Drosha ribonuclease III; DICER:

Dicer 1 Ribonuclease III; Exp-5: Exportina-5; Pri-miRNA: miRNA primário; Pré-miRNA: miRNA precursor; mRNA: RNA mensageiro; RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA. Fonte:

Adaptado de Jorge et al., 2021

2.2.1 MicroRNAs e o câncer de pulmão

Devido ao seu papel na regulação da expressão gênica, os miRNAs vem sendo relacionados como potenciais biomarcadores para algumas condições fisiológicas e doenças específicas, como o câncer. Em consequência das características genéticas e epigenéticas do câncer, os miRNAs, dependendo do contexto e do tipo celular em que são expressos, podem exibir uma atividade oncogênica ou supressora tumoral, controlando mecanismos de proliferação celular e apoptose. Dessa maneira, a função dos miRNAs podem em última instância depender do microambiente tumoral, ao qual são expostos a diferentes genes alvos. Além disso, um único miRNA é capaz de regular diversos genes-alvo e com isso, controlar simultaneamente atividades opostas (Smolarz et al., 2022).

Foi mostrado evidências que a expressão de certos miRNAs estão alterados em diversos tipos de neoplasias, inclusive o câncer de pulmão. Por exemplo, o MicroRNA-21 (miR-21) apresenta uma expressão consideravelmente elevada em pacientes diagnosticados com adenocarcinoma pulmonar. O miR-21 é um protagonista essencial para a progressão da neoplasia, devido a sua atuação inibindo genes supressores tumorais da via da apoptose. Por outro lado, o MicroRNA-206 (miR-206) é encontrado regulado negativamente em indivíduos com câncer de pulmão. Estudos de transfecção celular provaram que o miR-206 apresenta um papel pró-apoptótico, antimetastático e antiangiogênico. Como resultado, os miRNAs podem servir como potenciais biomarcadores moleculares para diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer de pulmão (Wani et al., 2022).

2.2.2 MiRNAs como biomarcadores prognóstico e diagnóstico no CP

Os biomarcadores moleculares têm sido uma ferramenta adjuvante no rastreio do câncer de pulmão. Entre eles, os miRNAs podem ser usados para diferenciar subtipos do CP, além de demonstrar um papel importante no tratamento da doença (Wu et al., 2019).

Considerando os dados clínicos e experimentais recentemente publicados, a quantificação dos miRNAs pode ser uma ferramenta poderosa na detecção de padrões carcinogênicos, complementando o diagnóstico do CP (Galvão-Lima et al., 2021). Por exemplo, é evidenciado que o MicroRNA-205 (miR-205) é específico para o carcinoma pulmonar de células escamosas, enquanto o MicroRNA-124a (miR-124a) é específico para adenocarcinoma de pulmão (Wu et al., 2019). Em outros estudos, o

MicroRNA-21 (miR-21) é visualizado como protagonista crucial no desenvolvimento do CP, suprimindo diversos genes supressores de tumor, no entanto mais estudos são necessários para determinar a associação dos miRNAs e o desenvolvimento do CP, bem como para esclarecer seu papel como possível biomarcador (Saab et al., 2021). Com o avanço e o desenvolvimento tecnológico, diversos miRNAs foram descritos de forma precisa e conveniente, o que os torna um potencial biomarcador (Ho et al., 2022). Atualmente, há um entendimento do miR-181a-5p para fins diagnósticos, prognósticos e terapêuticos em diversas neoplasias (Lin et al., 2021). No entanto, há poucos estudos associando o miR-181a-5p e o CP. Portanto, mais estudos são necessários para fornecer evidências desse miRNA na aplicação clínica dessa doença (Li et al., 2023).

2.3 MICRORNA 181A-5P

A família miR-181, localizada nos cromossomos 1, 9 e 19, é composta por 4 membros altamente conservados (miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-181c-5p e miR-181d-5p), e apresentam importância significativa em diversos processos biológicos, como: autofagia, resposta imunológica, função mitocondrial e também na sobrevivência ou morte de células neoplásicas, indicando sua ação supressora tumoral e oncogênica, sendo esse último mais incidente em diversas neoplasias, como carcinoma mamário, hepatocelular, gástrico, pancreático e algumas leucemias. (Feng et al., 2018; Indrieri et al., 2020).

O miR-181a-5p desempenha um papel significativo em várias características tumorais, exercendo uma influência específica em determinados tecidos e interagindo simultaneamente com vários genes (Tabela 2). No câncer colorretal (CRC) por exemplo, o miR-181a-5p suprime o crescimento tumoral, regulando a via de sinalização Wnt/ β -catenina, inibindo a proliferação celular e promovendo a apoptose das células neoplásicas (Han et al., 2017). Já no câncer gástrico (CG), a elevação do miR-181a-5p vai inibir diretamente os genes TGF- β e o ATP4B, promovendo o crescimento das células tumorais (Ge et al., 2019). No melanoma ocular, o miR-181a-5p suprime as células tumorais devido a inibição do GNAQ, promovendo a atuação da via das caspases favorecendo a apoptose (Wang et al., 2023). No câncer de mama, o miR-181a-5p ativa a via de sinalização PTEN/AKT pela inibição do gene NDRG2, oferecendo um papel oncogênico (Zhai et al., 2022).

Já no CP, os estudos envolvendo o miR-181a-5p, citam papéis oncogênicos e supressores tumorais. No CPNPC, a indução do miR-181a-5p inibi o crescimento tumoral e a metástase, além de suprimir a atividade de diversos oncogenes, como CDK1, E2F7 e o Kras (Wang et al., 2020). Além disso, foi identificado que o miR-181a-5p pode inibir a migração e a invasão das células tumorais de CPNPC, através da repressão do gene HMGB2 (Li et al., 2018).

Em controvérsia a esses achados, o miR-181a-5p é regulado positivamente em células resistentes ao gefitinibe (inibidor de tirosino quinase) no CP, visando o gene GAS7, contribuindo para a sobrevivência das células tumorais (Ping et al., 2018). Em outro trabalho, é visualizado que os níveis plasmáticos do miR-181a-5p estão elevados em pacientes que foram diagnosticados com o carcinoma escamoso de pulmão, sugerindo que tal miRNA possa estar envolvido na tumorigênese da doença (Shan et al., 2018).

Tabela 1. miR-181a-5p em diferentes tipos neoplásicos

Tipo de Tumor	Gene Alvo	Mecanismo	Referências
Câncer de colorretal	Wnt/ β -catenina	Supressor tumoral	Han et al., 2017
Câncer gástrico	TGF- β	Oncogênico	Ge et al., 2019
CPNPC	Kras	Supressor tumoral	Wang et al., 2020
Melanoma ocular	GNAQ	Supressor tumoral	Wang et al., 2023
Câncer de mama	NDRG2	Oncogênico	Zhai et al., 2022

Abreviações. CPNPC: carcinoma pulmonar de células não pequenas; Wnt/ β -catenina: Via de sinalização tipo Wingless/ β -catenina; TGF β : Fator de transformação do crescimento beta; Kras: Kras Proto-oncogene, GTPase; GNAQ: Proteína G de subunidade alfa Q; NDRG2: Processamento regulatório N-myc 2.

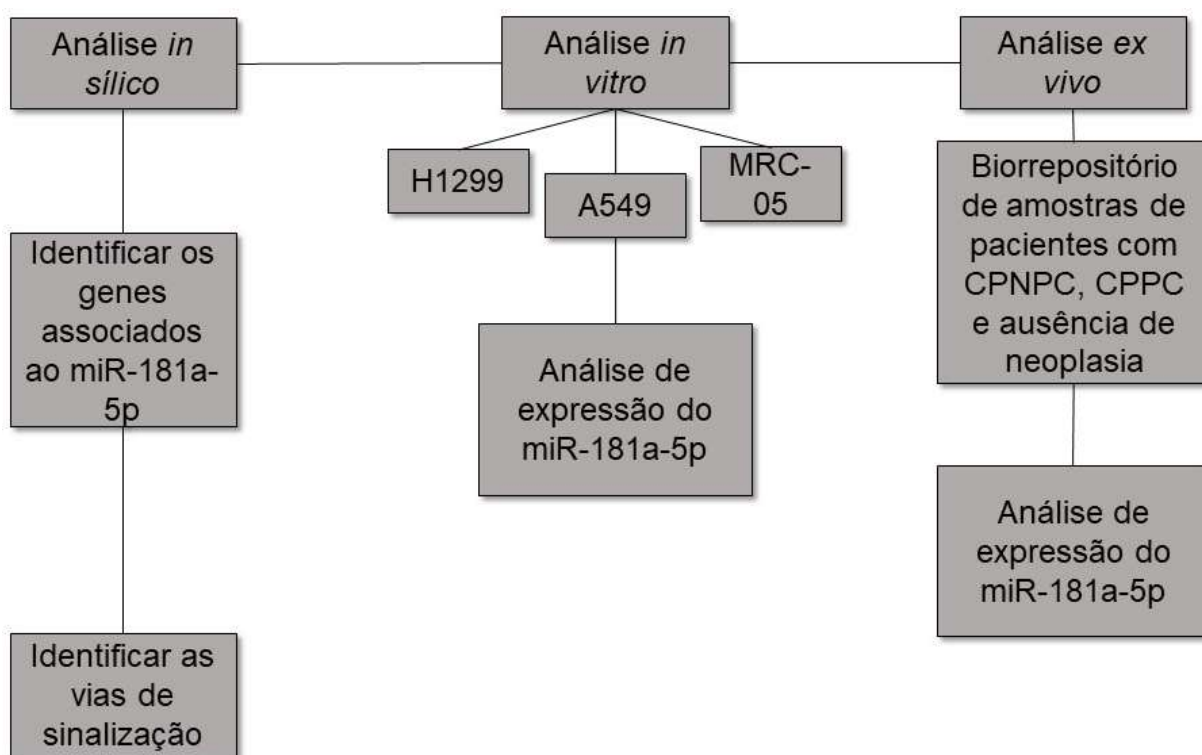
Neste contexto, o papel do miR-181a-5p no CP ainda não está completamente esclarecido. Necessitando de mais estudos, para obter evidências na aplicação clínica, como potencial biomarcador para o prognóstico da doença (Li et al., 2023). Além disso, ainda não há estudos do miR-181a-5p no CPPC, ressaltando a importância de investigar os mecanismos deste miRNA nessa condição específica. Diante disso, as análises realizadas neste trabalho permitirão avaliar a expressão deste miRNA no desenvolvimento e progressão do CP, fornecendo informações importantes para o entendimento da patogênese dessa neoplasia, sugerindo potenciais estratégias de prognóstico e acompanhamento clínico.

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO E PERÍODO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo caso-controle e experimental, com utilização de amostras de tecido pulmonar neoplásico e não neoplásico. O projeto foi realizado em 24 meses, no período de julho de 2022 a julho de 2024. Segue abaixo o delineamento experimental (Figura 7) que detalha as etapas *in silico*, *ex vivo* e *in vitro* do presente estudo.

Figura 7. Delineamento experimental



3.2 ANÁLISE IN SÍLICO

Para identificar os principais genes-alvo do miR-181a-5p no CP, foram utilizados dados de expressão gênica extraídos do The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGACOAD>). A investigação dos potenciais vias de interação do miRNA foi conduzida por meio de ferramentas de bioinformática. Quatro bases de dados preditivas — TargetScan, miRDB, miRTarBase e DIANA — foram empregadas para identificar os genes possivelmente regulados pelo miR-181a-5p.

Posteriormente, os genes consensualmente identificados foram então selecionados para análise de ontologia gênica, selecionando os termos de processo biológico, função molecular e componente celular. Após isso, foi realizada uma análise de enriquecimento funcional das vias associadas, utilizando a base de dados da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG).

Toda a metodologia computacional foi conduzida utilizando software RStudio (RStudio Team, 2020).

3.3 ANÁLISE *IN VITRO*

Três linhagens celulares foram cultivadas, sendo elas a H1299 e A549 oriundas de Adenocarcinoma de pulmão e a MRC5 proveniente de fibroblasto de tecido pulmonar saudável, para avaliar a expressão do miR-181a-5p. O cultivo foi realizado em uma placa de 6 poços contendo meio RPMI 1640 e DMEN-F12K, suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino, 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco), como agente tamponante, e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina, como antibióticos, em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídas no estudo amostras séricas e teciduais de pacientes com idade superior a 18 anos; com biópsia confirmatória de CPNPC (adenocarcinoma e carcinoma escamoso) e CPPC (carcinoma neuroendócrino), ressecável, irressecável e/ou localmente avançada ou inoperável. Além disso, também foram incluídas, amostras de pacientes com ausência de neoplasia pulmonar, que foram submetidos a cirurgia torácica e apresentaram um resultado de lesão benigna para compor o grupo controle. Foram excluídos do estudo, pacientes que apresentem outros tipos de neoplasia primária que não seja pulmonar.

3.5 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para o presente projeto, as amostras foram selecionadas do Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), localizados na cidade do Recife- Pernambuco. Os pacientes foram selecionados nos ambulatórios do setor de oncologia dos hospitais citados e convidados a participar do

estudo. O voluntário que, após ter recebido os devidos esclarecimentos e concordou em participar do estudo, assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A e B) e respondeu a ficha clínica. Ao aceitar os termos do estudo, o voluntário permitiu o acesso ao tecido pulmonar (100mg) e ao sangue periférico (8 ml). O tecido foi imediatamente armazenado em RNAlater™(1mL) e o sangue foi centrifugado para obtenção de soro. Todas as amostras foram armazenadas no freezer a -80°C.

3.6 ANÁLISE *EX VIVO*

Para a análise de expressão do miR-181a-5p, foram avaliadas 78 amostras teciduais e 61 amostras séricas. Para a análise de expressão nas amostras de tecido, um total de 57 amostras neoplásicas foram utilizadas, nos quais 27 eram amostras de adenocarcinoma de pulmão, 21 de carcinoma escamoso de pulmão, e 9 de carcinoma neuroendócrino de pequenas células. Foram incluídas 21 amostras com ausência de neoplasia. Para a análise de expressão nas amostras séricas, um total de 44 amostras neoplásicas foram utilizadas, nos quais 19 eram amostras de adenocarcinoma de pulmão, 18 de carcinoma escamoso de pulmão e 7 de carcinoma neuroendócrino de pequenas células. Foram incluídas 17 amostras de pacientes com ausência de neoplasia.

Todas essas amostras são oriundas do biorrepositório de pulmão, sob coordenação da Profa. Dra. Michelly C Pereira, localizado no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG) – localizada na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.7 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

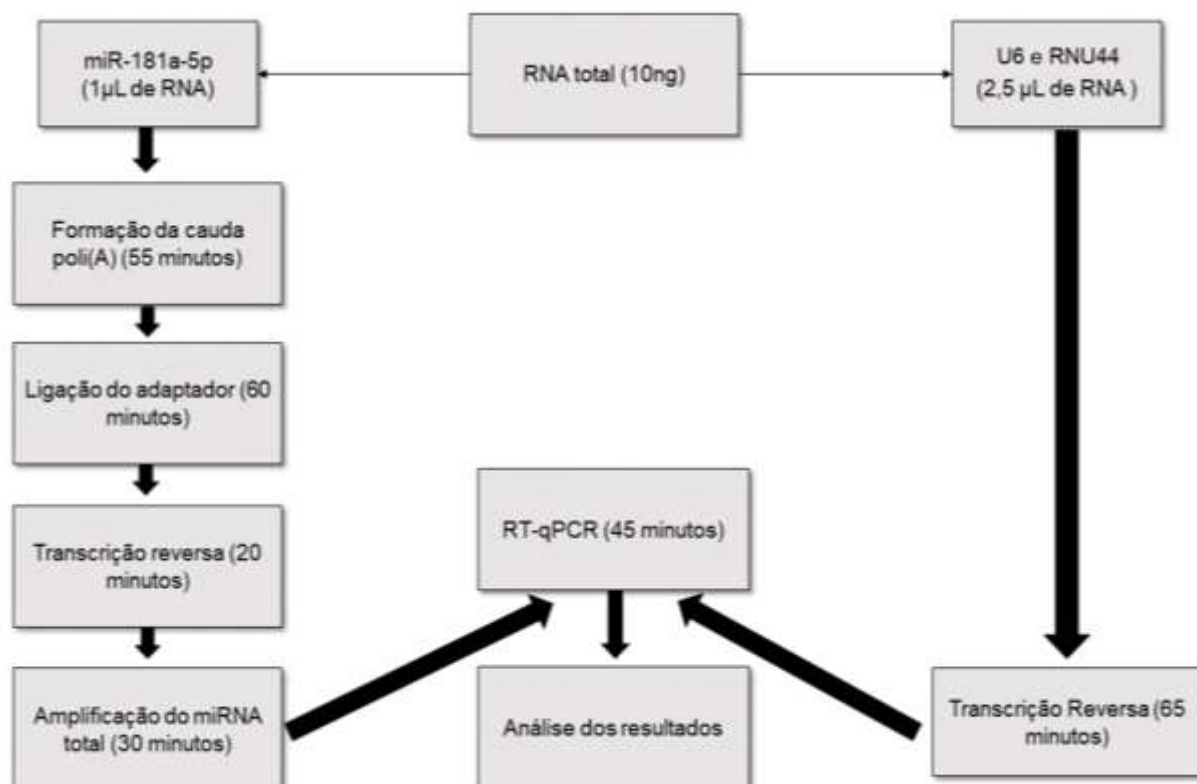
Para a extração do RNA total das amostras séricas, foram processadas no Maxwell® RSC 48 Instrument, utilizando o kit Maxwell® RSC miRNA from Plasma and Serum (Promega), seguindo as orientações do fabricante. O RNA total das amostras teciduais e das linhagens celulares foram isoladas a partir do método baseado em Trizol (SIGMA). Para tanto, as células foram cultivadas e distribuídas em triplicata em uma placa de 6 poços, após atingirem uma confluência de 70%, a suspensão celular foi conservada em 700 µL de Trizol (SIGMA) para a extração de RNA total.

Similarmente, para as amostras teciduais foram adicionados 700 μ L de Trizol (SIGMA) para cada 50 mg de tecido. Posteriormente, foram adicionados 150 μ L de clorofórmio no material isolado com Trizol (SIGMA). As amostras e as células foram homogeneizadas por 20 segundos e incubadas à temperatura ambiente por 3 minutos. Após essa etapa, foram submetidas à centrifugação a 17000g por 15 minutos a 4°C.

Depois dessa etapa foi possível visualizar uma fase aquosa superior, que foi cuidadosamente transferida para um novo tubo eppendorf, no qual foram adicionados 375 μ L de isopropanol a 100% e incubadas a -20°C “Overnight”. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 17000g por 10 minutos a 4°C. Os pellets foram lavados com 750 μ L de etanol a 75% e levados ao vórtex brevemente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 6300g por 5 minutos a 4°C e incubadas em temperatura ambiente por 3 horas. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas com 30 μ L de água RNase Free. Por fim, as amostras já ressuspensas foram submetidas ao banho seco à 50°C por 15 minutos e quantificadas utilizando o Thermo Scientific™ NanoDrop™ Lite, para posterior síntese de DNA complementar (cDNA) e reação em cadeia polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR).

3.8 SÍNTESE DE CDNA E EXPRESSÃO DO MIR-181A-5P POR RT-QPCR

O RNA total extraído foi submetido à síntese de cDNA utilizando o kit Taqman™ Advanced miRNA cDNA Synthesis para o miR-181a-5p e o HighCapacity cDNA reverse transcription para o pequeno RNA nuclear (snRNA) U6 e o RNU44 como controles endógenos, seguindo as orientações do fabricante (Figura 8).

Figura 8. Template da síntese de cDNA para o miR-181a-5p, U6 e RNU44

Para o miR-181a-5p foi utilizado 10 ng/µL de RNA total por reação, para as seguintes etapas: A primeira etapa consiste na formação da cauda poli(A), para cada reação foi utilizado 1µL de RNA total para as seguintes condições: 37°C por 45' para a poliadenilação e 65°C por 10' para encerrar a reação.

A segunda etapa consiste na ligação do adaptador, para cada reação foi utilizado 2,5µL do resultado da poliadenilação para as seguintes condições: 16°C por 60' para a reação de ligação do adaptador.

A terceira etapa consiste na transcrição reversa (RT), para cada reação foi utilizado 15µL do resultado da reação de ligação do adaptador para as seguintes condições: 42°C por 15' para a transcrição reversa e 88°C por 5' para encerrar a reação.

A quarta etapa consiste na amplificação do miRNA total (miRAmp), para cada reação foi utilizado 2,5µL do resultado da reação RT para as seguintes condições: 95° por 5' para ativação da enzima; 14 ciclos (95°C por 3' e 60°C por 30") para a desnaturação e anelamento/extensão; 99°C por 10' para encerrar a reação.

Para o snRNA U6 e o RNU44 foram utilizados 10ng de RNA total por reação, para a seguinte etapa: Essa etapa consistiu na reação RT, foi utilizado para cada

reação 2,5µL de RNA total diluído e 1,5µL do adaptador do U6 (5x) e RNU44 (5x) para as seguintes condições: 2 ciclos (16°C por 30' e 42° por 30') para a reação RT e 85°C por 5' para encerrar a reação.

Após a síntese do cDNA do miR-181a-5p, snRNA U6 e RNU44 a RT-qPCR foi conduzida utilizando o kit TaqMan® Fast Advanced, de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação, foi utilizado 5µL de TaqMan® Fast Advanced Master Mix; 0,5µL da sonda do miR-181a-5p (TaqMan® Advanced miRNA Assay- A25576): (5'-AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU-3'); 0,5uL da sonda do snRNA U6 (TaqMan® Advanced Assay- 4427975): (5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAACGATACAGAGAAGATTAGCATGGCCCCTGCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTT-3'); 0,5uL da sonda do RNU44 (TaqMan® Advanced Assay- 4427975): (5'-CCTGGATGATGATAGCAAATGCTGACTGAACATGAAGGTCTTAATTAGCTCTAAC TGACT-3'); 2µL de água, para as seguintes condições: 95°C por 20", seguido de 40 ciclos (95°C por 1", 60°C por 20")

A avaliação quantitativa da amplificação dos miR-181a-5p foi realizada no QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System pelo método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), usando o snRNA U6 e o RNU44 como controles endógenos.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as características clínicas-epidemiológicas dos pacientes foram apresentadas de forma descritiva. A partir do cálculo da mediana da expressão do miR-181a-5p dos pacientes, utilizou-se o teste exato de Fisher para a comparação das variáveis categóricas entre os grupos com alta e baixa expressão do miR-181a-5p.

Para os dados de expressão do miR-181a-5p dos pacientes obtidos pelo TCGA, a curva de Kaplan-meier foi usada para a sobrevida em meses, as diferenças de sobrevida entre os grupos foram comparadas usando o teste log-rank de Mantel Cox ($p < 0,05$).

Para o grupo *ex vivo*, foi realizado método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para a análise dos dados. Essa metodologia consiste no cálculo inicial das médias e do desvio padrão dos valores de *Cycle Threshold* (CT) das duplicatas das amostras

obtidas do QuantStudio™ 5 Real-Time PCR. Cada amostra foi normalizada a partir da subtração do CT médio do gene alvo, menos o CT médio do controle endógeno (CT alvo - CT endógeno), para a obtenção do ΔCT . Posteriormente foi calculado o ΔCT e o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para em seguida, calcular a mediana global das amostras teciduais de pacientes com adenocarcinoma, carcinoma escamoso, carcinoma neuroendócrino de pulmão e pacientes com ausência de neoplasia. Para o teste não paramétrico, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Consecutivamente, foi conduzida uma regressão linear múltipla utilizando o modelo dos mínimos quadrados ordinários para avaliação das variáveis ($p < 0,05$).

Os *softwares* GraphPadPrism versão 8 (GraphPad Software Inc San Diego, CA, EUA) e o STATA foram utilizados para o tratamento estatístico dos dados, bem como para a elaboração dos gráficos.

3.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os protocolos experimentais das análises *ex vivo* foram compilados e aprovados pelas diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) do HUOC (CAAE 38505920.3.3001.5192) e do HCP (CAAE: 40936420.9.0000.5205) seguindo as orientações da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2013). A coleta de qualquer espécime clínico foi realizada apenas após a obtenção do consentimento do paciente ou indivíduo saudável, dados os devidos esclarecimentos, e pela assinatura do TCLE.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE *IN SÍLICO*

4.1.1 Predição dos genes alvos do miR-181a-5p

Os genes associados ao miR-181a-5p no CP foram identificados e extraídos a partir do banco de dados TCGA, resultando em um total de 532 genes potencialmente regulados. Esses genes foram submetidos a uma análise de expressão diferencial considerando contextos de alta expressão do miR-181a-5p no Adenocarcinoma de

Pulmão (TCGA-LUAD) e no Carcinoma Escamoso de Pulmão (TCGA-LUSC). Os genes resultantes foram ranqueados com base nos valores de Log Fold Change (LogFC). A partir dessa classificação, foram estratificados os 20 genes com menor expressão e os 20 genes com maior expressão, com o intuito de identificar os alvos e as vias moduladas pelo miR-181a-5p (Figura 9 e 10). Entre os genes analisados, observou-se uma possível regulação direta do miR-181a-5p sob o *HGMA2* e o *TMPRSS11A*. Adicionalmente, o gene *ANKRD1* foi identificado como um possível alvo indireto. Esses achados indicam que o miR-181a-5p pode atuar na regulação de vias moleculares relevantes para a progressão tumoral, reforçando um papel potencial no contexto do CP.

Figura 9. Genes alvos do miR-181a-5p no Adenocarcinoma de Pulmão

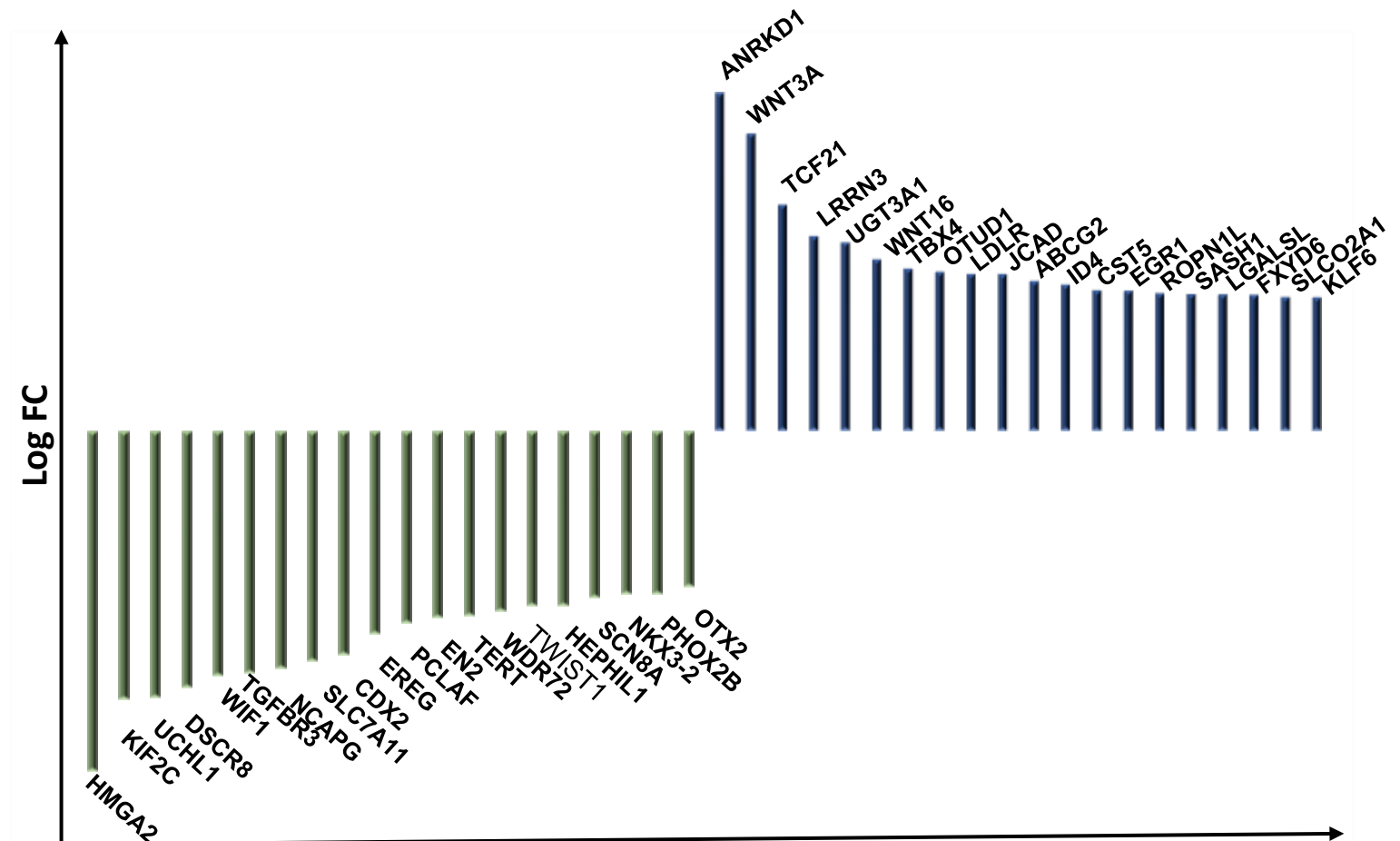


Figura 9. Distribuição dos 20 genes com menor expressão e dos 20 genes com maior expressão, estratificados com base nos valores de LogFC. O gene *HMGA2* foi identificado como o principal gene-alvo direto potencial do miR-181a-5p, enquanto *ANKRD1* foi apontado como possível gene-alvo indireto.

Figura 10. Genes alvos do miR-181a-5p no Carcinoma Escamoso de Pulmão

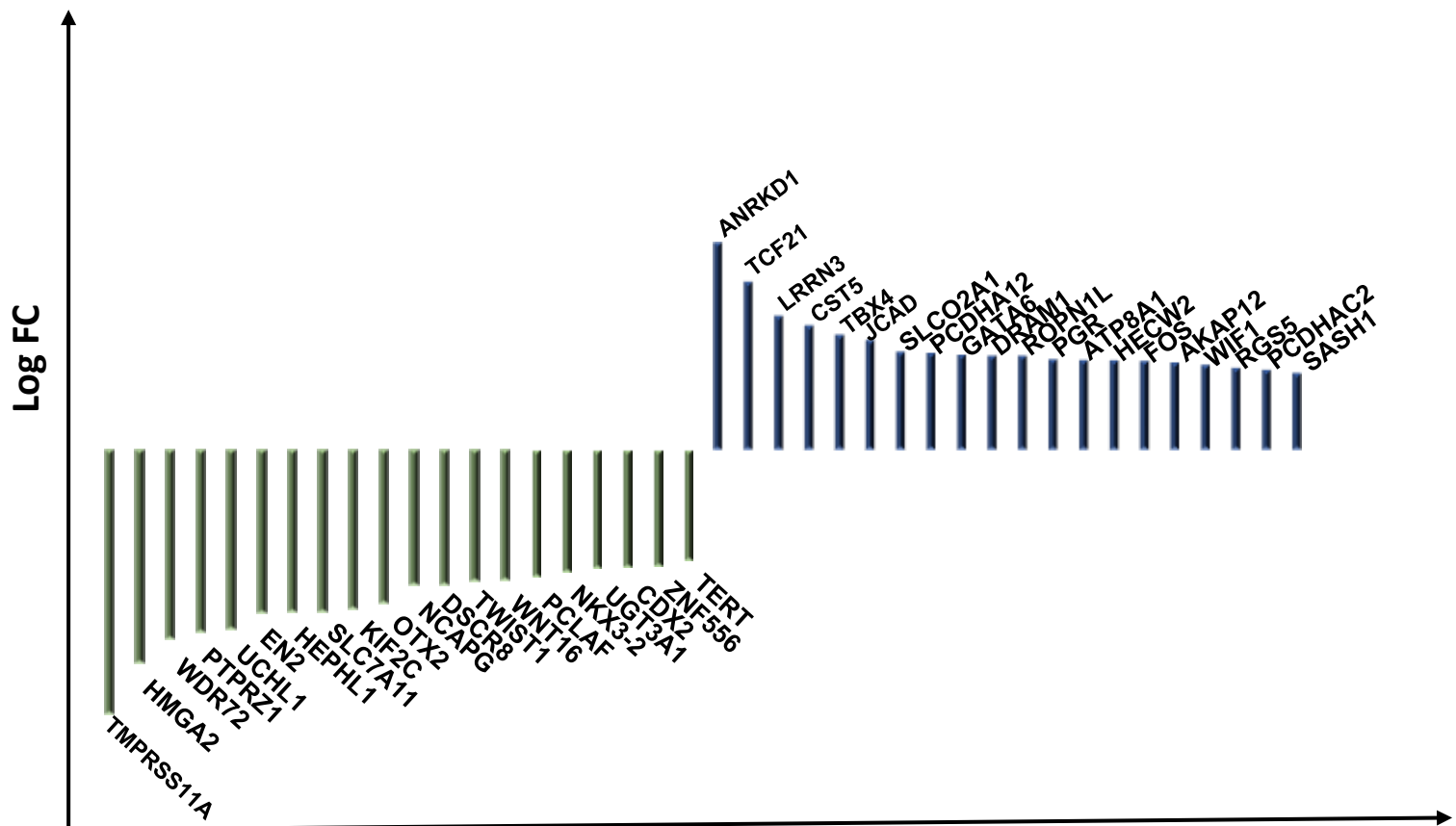


Figura 10. Distribuição dos 20 genes com menor expressão e dos 20 genes com maior expressão, estratificados com base nos valores de LogFC. O gene *TMPS11A* foi identificado como o principal gene-alvo direto potencial do miR-181a-5p, enquanto *ANKRD1* foi apontado como possível gene-alvo indireto.

4.1.2 Ontologia genética (GO)

Em seguida, os genes alvos associados ao miR-181a-5p foram selecionados para análise de ontologia genética (GO) relacionado aos termos de Processo Biológico (PB), Função Molecular (MF) e Componente Celular (CC). Para isso, foi utilizada a função *gseGO* do pacote *clusterProfiler*, que permite uma avaliação de enriquecimento genético. Os resultados dessa análise revelaram que os genes potencialmente regulados pelo miR-181a-5p estão predominantemente envolvidos no termo de PB, quando comparados aos domínios de MF e CC (Figura 11 e 12). Esses achados sugerem que o miR-181a-5p pode regular vias funcionais associadas a proliferação celular, diferenciação celular, apoptose, contribuindo na modulação de possíveis mecanismos neoplásicos.

Figura 11. Ontologia genética do miR-181a-5p no Adenocarcinoma de Pulmão

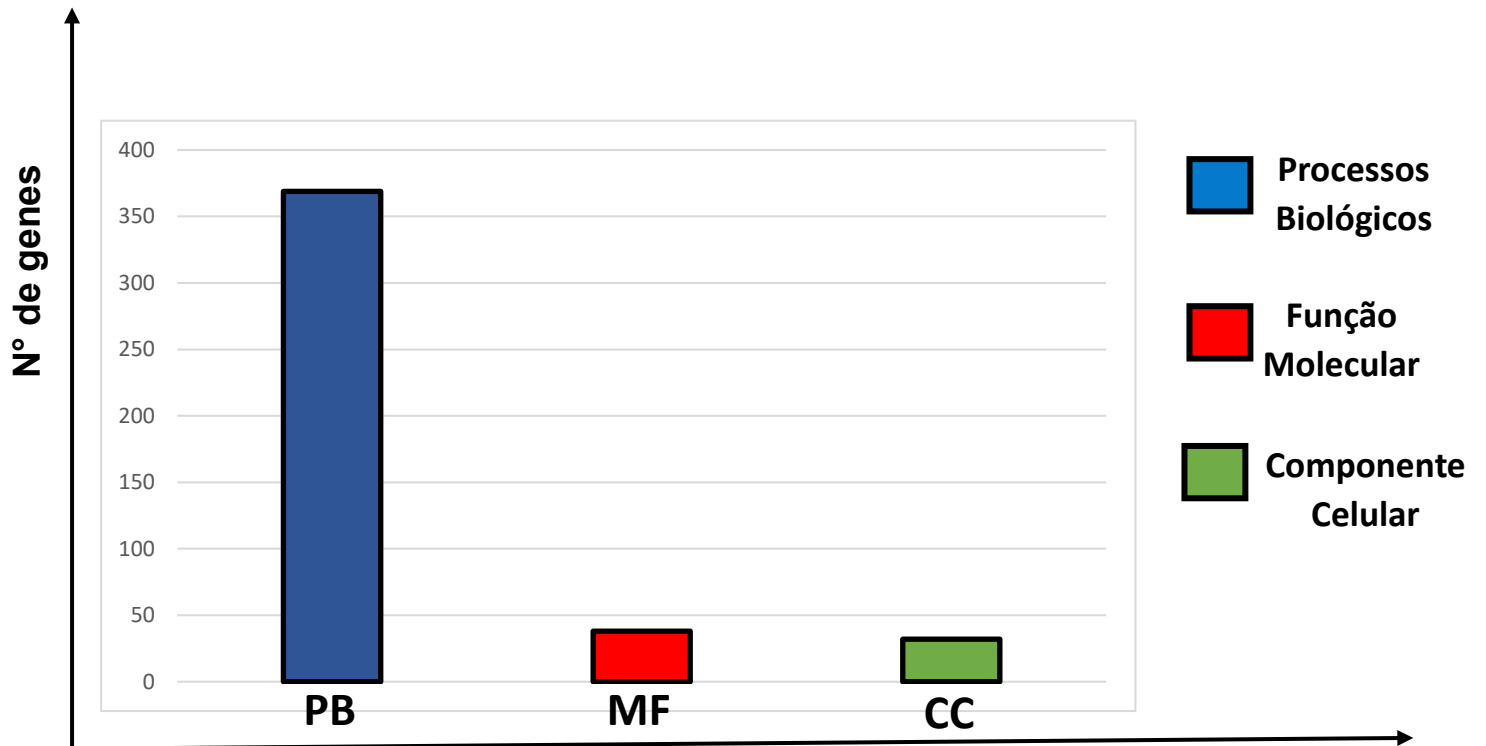


Figura 11. Análise de ontologia gênica (GO) dos genes associados ao miR-181a-5p no adenocarcinoma de pulmão (TCGA-LUAD). Observa-se que a maioria dos genes está significativamente associada a Processos Biológicos.

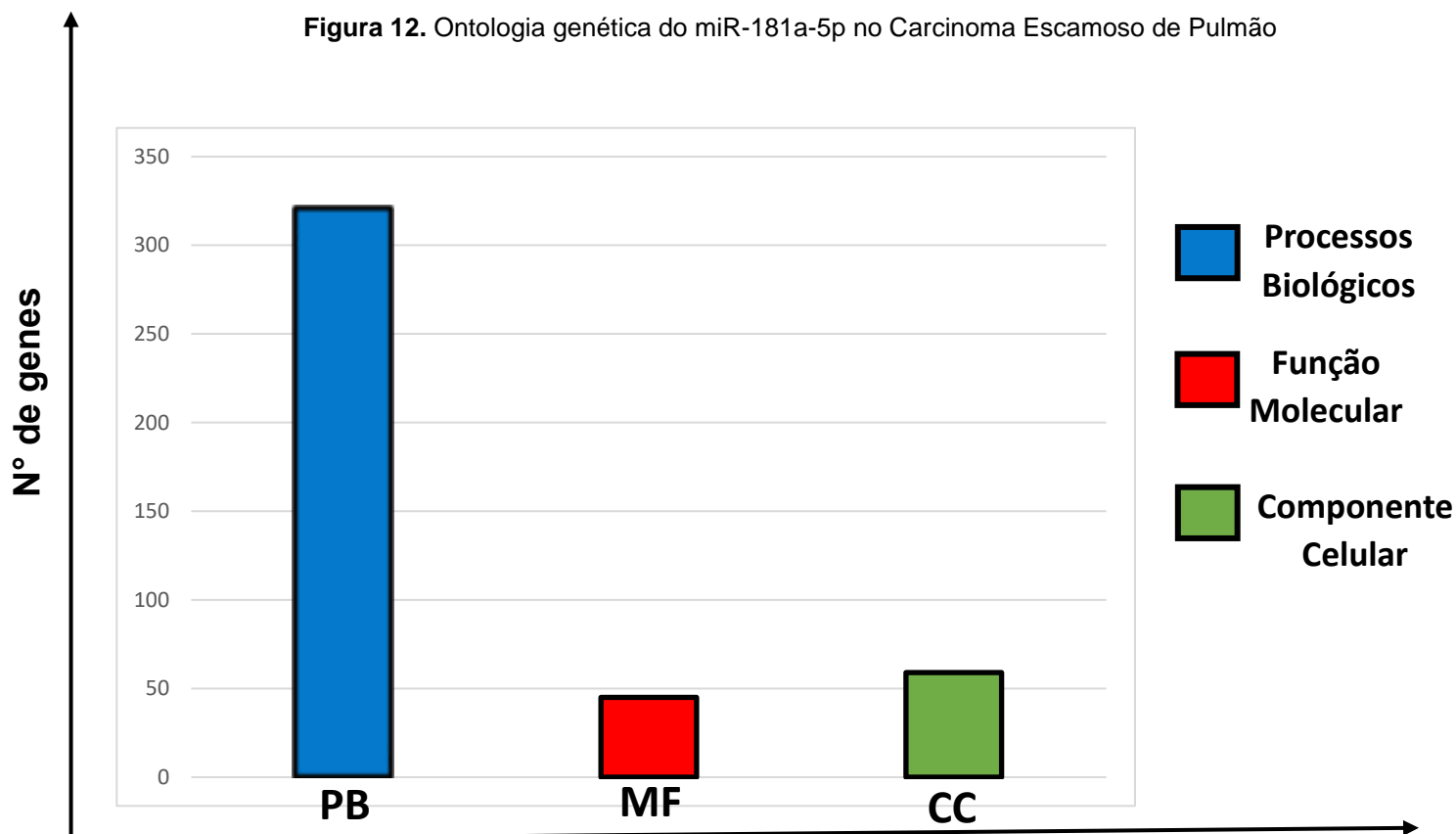


Figura 12. Análise de ontologia gênica (GO) dos genes associados ao miR-181a-5p no Carcinoma Escamoso de pulmão (TCGA-LUSC). Observa-se que a maioria dos genes está significativamente associada a Processos Biológicos.

4.1.3 Vias de sinalização do miR-181a-5p

A análise de enriquecimento funcional foi realizada a partir da lista de genes alvos obtida da análise de predição. Por meio do software *DAVID*, identificaram-se as vias de sinalização relacionadas às funções dos genes-alvo do miR-181a-5p, utilizando a base de dados KEGG. Em seguida, os dados foram encaminhados e processados no software SRplot (Tang et al., 2023), para elaboração dos gráficos (Figura 13 e 14).

Os resultados demonstraram que a maioria dos genes estão associados a vias com respostas à “transdução de sinal”, com destaque para a via de sinalização MAPK, cuja desregulação pode predispor ao desenvolvimento neoplásico. Além disso, observou-se envolvimento em contextos mais amplos como “microRNAs no câncer”, reforçando a relevância funcional do miR-181a-5p na biologia tumoral. No entanto, os valores mais significativos estiveram majoritariamente associados a outros subtipos de câncer, sugerindo que os genes regulados por esse miRNA podem participar de

mecanismos moleculares comuns ao desenvolvimento tumoral, mesmo em diferentes tipos histológicos.

Figura 13. Vias de sinalização do miR-181a-5p no Adenocarcinoma de Pulmão

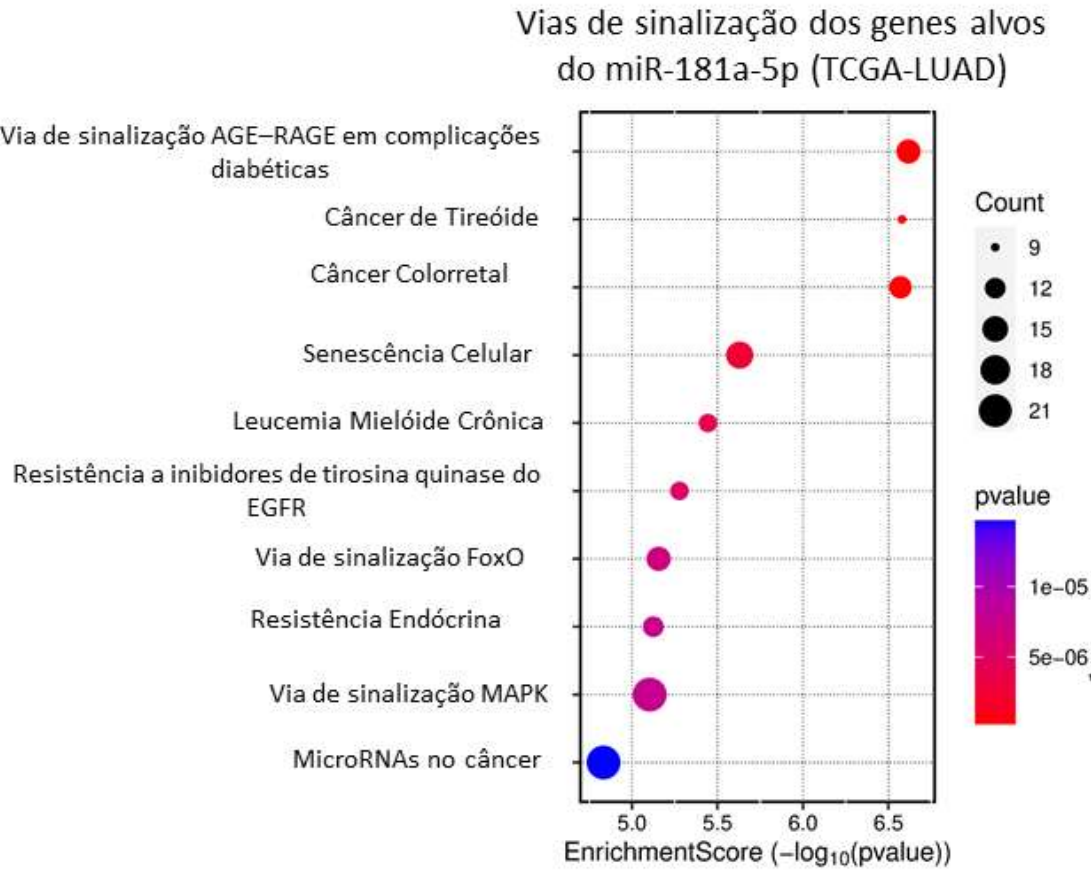


Figura 13. Análise de enriquecimento funcional das vias de sinalização associadas aos genes-alvo do miR-181a-5p. O eixo X representa o Enrichment Score ($-\log_{10}$ do valor de p), enquanto o tamanho dos círculos indica o número de genes envolvidos em cada via (Count). A coloração representa a significância estatística (p-value), sendo as cores mais próximas do vermelho indicativas de maior significância. Dentre as vias mais enriquecidas, destacam-se MicroRNAs no câncer, via de sinalização MAPK e vias associadas a outros subtipos de câncer. SRplot (Tang et al., 2023).

Figura 14. Vias de sinalização do miR-181a-5p no Carcinoma Escamoso de Pulmão

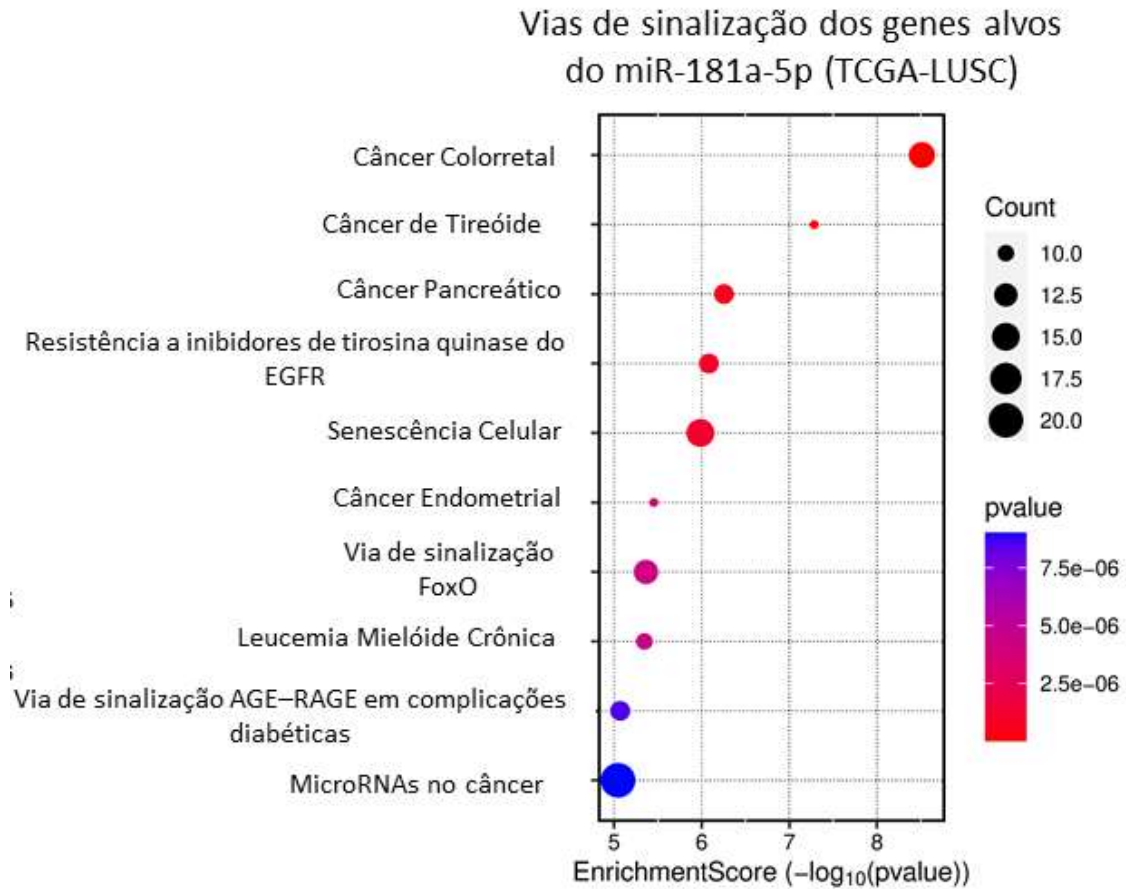


Figura 14. Análise de enriquecimento funcional das vias de sinalização associadas aos genes-alvo do miR-181a-5p. O eixo X representa o Enrichment Score ($-\log_{10}$ do valor de p), enquanto o tamanho dos círculos indica o número de genes envolvidos em cada via (Count). A coloração representa a significância estatística (*p-value*), sendo as cores mais próximas do vermelho indicativas de maior significância. Dentre as vias mais enriquecidas, destacam-se MicroRNAs no câncer, vias associadas a outros subtipos de câncer e via de resistência a inibidores de tirosina quinase do EGFR. SRplot (Tang et al., 2023).

4.2 ANÁLISE *IN VITRO*

4.2.1 Expressão do miR-181a-5p em células neoplásicas de pulmão

A figura 15 ilustra a comparação dos níveis de expressão do miR-181a-5p nas linhagens celulares estudadas (MRC5, H1299 e A549). A partir disso, observou-se um aumento da expressão do miR-181a-5p nas linhagens H1299 (7.6 ± 3.46 ; $p < 0.05$) e A549 (6.9 ± 1.44 ; $p < 0.05$) quando comparadas à linhagem não neoplásica MRC5 (1.25 ± 0.02 ; $p < 0.05$).

Figura 15. Análise de expressão do miR-181a-5p nas linhagens H1299, A549 e MRC5

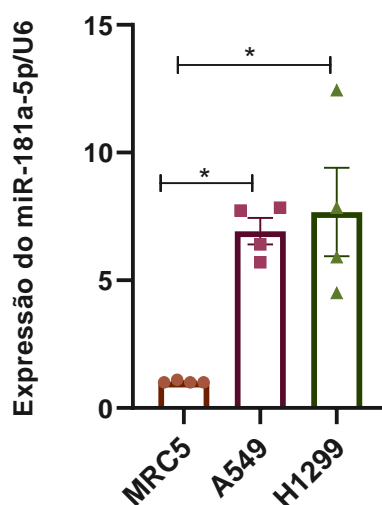


Figura 15. Análise de expressão do miR-181a-5p nas linhagens neoplásicas de pulmão. H1299: linhagem celular oriunda de câncer de pulmão, A549: linhagem celular oriunda de câncer de pulmão e MRC-5: células de fibroblasto de pulmão humano. *P < 0,05, indica diferenças estatisticamente significativas. Os dados foram mostrados como mediana. GraphPad Prism 8.0.

4.3 ANÁLISE *EX VIVO*

4.3.1 Análise de expressão do miR-181a-5p em amostras de CP

Na análise de expressão do miR-181a-5p nas amostras teciduais, os dados apontaram um aumento significativo na expressão deste miRNA tanto em pacientes com adenocarcinoma ($4,6 \pm 6,0$; $p < 0,05$) quanto em pacientes com carcinoma escamoso ($1,4 \pm 3,1$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo não neoplásico ($0,6 \pm 0,9$; $p < 0,05$). Além disso, foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão do miR-181a-5p entre os grupos de adenocarcinoma de pulmão e carcinoma neuroendócrino de pulmão ($p = 0,0163$).

A análise de expressão do miR-181a-5p em amostras séricas dos pacientes diagnosticados com CP, observou uma tendência de maior expressão deste miRNA em pacientes com carcinoma neuroendócrino de pequenas células ($3,9 \pm 5,3$) e o grupo de pacientes com ausência de neoplasia ($2,1 \pm 2,3$) quando comparados com o grupo de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma ($0,76 \pm 0,78$) e carcinoma escamoso ($0,75 \pm 0,86$). Apesar das variações observadas, não foi identificada

diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

Figura 16. Análise de expressão do miR-181a-5p em amostras teciduais e séricas de pacientes com adenocarcinoma, carcinoma escamoso, carcinoma neuroendócrino e ausência de neoplasia

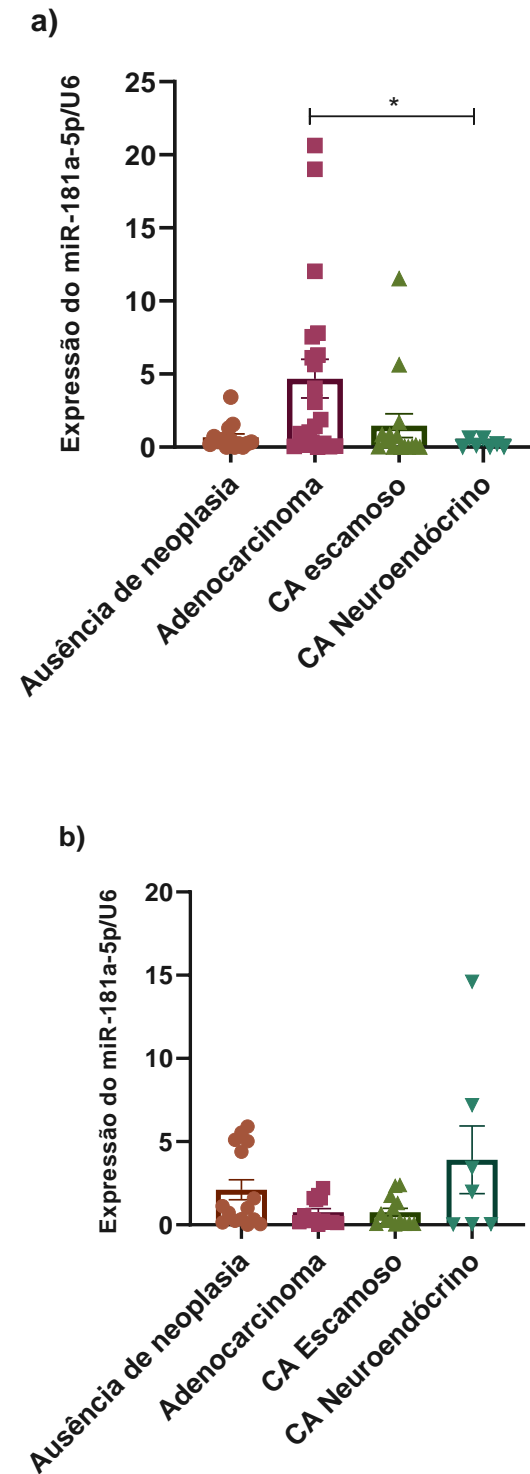


Figura 16. Análise dos níveis de expressão do miR-181a-5p entre os diferentes grupos experimentais. Nas amostras teciduais, foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão

entre os subtipos adenocarcinoma e carcinoma neuroendócrino de pequenas células ($p = 0,0163$; teste de Kruskal-Wallis). Por outro lado, nas amostras séricas, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados ($p > 0,05$). Os dados são apresentados como mediana. Análises realizadas no software GraphPad Prism 8.0.

4.3.2 Avaliação da expressão do miR-181a-5p em relação às características clínico-epidemiológica dos pacientes com CP

A análise de associação entre a expressão do miR-181a-5p e as características clínico-epidemiológicas dos pacientes com CP demonstrou que, entre os pacientes com alta expressão ($n = 26$), a maioria era do sexo feminino (61,54%), com idade ≥ 62 anos (58,62%), fumantes (84,62%), não etilistas (76,92%), com comorbidades (57,69%), em estágios clínicos avançados III/IV (73,08%), sem histórico familiar de câncer (57,69%) e com diagnóstico de CPNPC (92,31%). Já entre os pacientes com baixa expressão ($n = 27$), predominou o sexo feminino (62,96%), com idade ≥ 62 anos (51,85%), fumantes (74,07%), não etilistas (77,78%), com comorbidades (77,78%), em estágio clínico I/II (77,78%), sem histórico familiar de câncer (59,26%) e com diagnóstico de CPNPC (74,07%). Apesar das tendências observadas, nenhuma das associações apresentou significância estatística ($p < 0,05$), de acordo com o teste exato de Fisher (Tabela 4).

Tabela 2. Dados de expressão dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão

Características	Todos os pacientes (N=53)	Expressão do miR-181a-5p		*p-value
		Baixa expressão	Alta expressão	
Sexo				
Masculino	20	10 (37.04%)	10 (38.46%)	>0.9999
Feminino	33	17 (62.96%)	16 (61.54%)	
Idade				
≥ 62 anos	34	14 (51.85%)	20 (58.82%)	0.0861
< 62 anos	19	13 (48.15%)	6 (31.58%)	
Fumante				
Sim	42	20 (74.07%)	22 (84.62%)	0.4614
Não	11	7 (25.93%)	4 (15.38%)	
Etilismo				
Sim	12	6 (22.22%)	6 (23.08%)	>0.9999

Não	41	21 (77.78%)	20 (76.92%)	
Estadiamento				
Estágio I/II	13	6 (22.22%)	7 (26.92%)	0.7570
Estágio III/IV	40	21 (77.78%)	19 (73.08%)	
Comorbidades				
Sim	36	21 (77.78%)	15 (57.69%)	0.1480
Não	17	6 (22.22%)	11 (42.31%)	
Histórico Familiar				
Sim	22	11 (40.74%)	11 (42.31%)	>0.9999
Não	31	16 (59.26%)	15 (57.69%)	
Histologia				
CPNPC	44	20 (74.07%)	24 (92.31%)	0.1415
CPPC	9	7 (25.93%)	2 (7.69%)	

Tabela 2. Distribuição das características clínicas e epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão, de acordo com os níveis de expressão do miR-181a-5p (alta ou baixa expressão). A análise estatística foi realizada utilizando o teste exato de Fisher no software GraphPad Prism, versão 8. Considerou-se nível de significância de $p < 0,05$. Abreviações: CPNPC – Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células; CPPC – Câncer de Pulmão de Pequenas Células.

4.3.3 Análise multivariada da expressão do miR-181a-5p (Regressão Linear Múltipla)

Após analisar a expressão do miR-181a-5p, foram conduzidas uma regressão linear múltipla utilizando o modelo dos mínimos quadrados ordinários, cuja variável dependente é o valor da expressão. Os resultados indicam que nos grupos de pacientes estudados, o estadiamento, presença de histórico familiar, tumores prévios, comorbidades e etilismo foram associados a um aumento significativo para o aumento da probabilidade do indivíduo apresentar alta expressão do miR-181a-5p. Especificamente, um aumento de uma unidade na variável estadiamento está relacionado a um aumento de 0,343 desvios padrão na expressão do miR-181a-5p ($p < 0,05$). Ter histórico familiar aumenta a expressão em 0,471 desvios padrão ($p < 0,05$), enquanto tumores prévios aumentam a expressão em 0,433 desvios padrão (p

< 0,05). Comorbidades estão associadas a um aumento de expressão em 0,505 desvios padrão ($p < 0,05$) e o etilismo a um aumento da expressão de 0,888 desvios padrão ($p < 0,05$). Além disso, o coeficiente de determinação (Pseudo-R²) reflete aproximadamente 18% das variações na expressão do miR-181a-5p entre os pacientes estudados (Tabela 5).

Tabela 3. Regressão Linear Múltipla

Variáveis	Coeficiente	Erro Padrão	p-value
Estadiamento TNM	0.343	0.168	0.044*
Histórico familiar de câncer	0.471	0.195	0.017*
Tumores prévios	0.433	0.217	0.049*
Comorbidades	0.505	0.217	0.022*
Tabagismo	-0.031	0.257	0.904
Etilismo	0.888	0.289	0.003*
Idade	0.000	0.011	0.986
Sexo Feminino	0.080	0.226	0.723
Branco	-0.130	0.242	0.592
Ausência de Neoplasia	-0.789	0.555	0.159
Constante	-1.007	0.730	0.171
R ²	0.1823		

Tabela 3. Regressão linear múltipla. Foram incluídas variáveis clínicas e epidemiológicas como possíveis preditores da expressão do miR-181a-5p. Os coeficientes representam o impacto de cada variável independente sobre a expressão do miRNA, ajustados pelas demais variáveis no modelo. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (*). O modelo apresentou R² = 0,1823. STATA 17.0 MP.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi investigado possíveis associações entre a elevação dos níveis de expressão do miR-181a-5p e as características clínicas de pacientes diagnosticados com CP. Os dados obtidos indicaram um aumento progressivo da

expressão desse miRNA em estágios mais avançados da doença, sugerindo um papel oncogênico do miR-181a-5p nesse contexto. Tal comportamento pode estar associado a desregulação de vias genéticas envolvidas na proliferação tumoral.

A análise *in silico* permitiu identificar os principais genes alvos regulados pelo miR-181a-5p, destacando o *HMGA2*. Esse gene é um membro da família de proteínas do grupo *HMG* e é amplamente expresso em tecido tumoral humano, e tem sido associado à promoção da tumorigênese em diversos tipos de neoplasias. (Mansoori et al., 2021). No CP, assim como em outros tumores sólidos, a superexpressão de *HMGA2* é frequentemente observada em comparação a tecidos paraneoplásicos normais. Essa expressão elevada está associada, sobretudo, a estágios mais avançados e à presença de metástases (Li et al., 2018).

Embora o *HMGA2* tenha sido previsto como principal gene-alvo do miR-181a-5p, essa associação parece contradizer os achados que indicam um papel oncogênico para esse miRNA no contexto do CP, uma vez que sua regulação deveria, teoricamente, suprimir a expressão de *HMGA2*. No entanto, é importante destacar que outros genes também foram identificados como potenciais alvos do miR-181a-5p, oferecendo uma perspectiva mais ampla sobre sua função biológica. Dentre esses, destaca-se o *TGFBR3*, que codifica um receptor com alta afinidade de ligação ao *TGF- β* , impedindo sua ativação e consequentemente, bloqueando efeitos pró-tumorais associados à ativação dessa via (Zhang et al., 2024). Adicionalmente, também é destacado o gene *WIF1* no qual é identificado como um importante antagonista da via de sinalização *Wnt/ β -catenina* (Guo et al., 2017). Ambos genes previstos são relatados como supressores tumorais e possuem baixa expressão no CP, sendo essa diminuição associada a mecanismos de proliferação, invasão e angiogênese para essa neoplasia (Deng et al., 2024 e Guo et al., 2017).

Além disso, interações entre o miR-181a-5p e os genes *TGFBR3* e *WIF1* já foram relatadas em outras neoplasias, corroborando os resultados do presente estudo (Yue et al., 2021 e Lyu et al., 2017). Em ensaios *in vitro* de Leucemia Linfóide Aguda (LLA), por exemplo, a superexpressão do miR-181a-5p favoreceu o crescimento e a proliferação de células de LLA, por meio da repressão do gene *WIF1* e subsequente ativação da via *Wnt/ β -catenina* (Lyu et al., 2017).

Diante desses dados, embora o *HMGA2* seja um conhecido oncogene e tenha sido previsto como principal alvo direto do miR-181a-5p, é fundamental considerar outros genes-alvo regulados por esse miRNA, para uma interpretação mais abrangente de seu papel biológico, ressaltando a importância em que o mesmo miRNA pode exercer um efeito oncogênico ou supressor tumoral, a depender do contexto celular e do tipo de neoplasia envolvido (Kanthaje et al., 2021). Essa observação é atribuída ao fato de que um único miRNA pode modular múltiplos genes alvos, sendo, portanto, essencial a realização de análises de enriquecimento funcional para identificar os processos biológicos subjacentes às interações entre miRNAs-RNA. (Garcia-Moreno e Carmona-Saez, 2020).

A análise de ontologia genética revelou que a maioria dos genes associados ao miR-181a-5p no CP está envolvida em PB. Esse mesmo resultado, foi relatado no trabalho publicado por Zhang *et al* (2019), em um estudo com carcinoma papilífero de tireoide, no qual também se observou que a maioria dos genes regulados pelo miR-181a-5p estavam associados ao termo "PB" na análise de ontologia. Esses dados apontam para um papel regulador do miR-181a-5p em funções celulares específicas. No entanto, para compreender melhor seus efeitos no contexto tumoral, torna-se essencial identificar as vias de sinalização associadas aos genes-alvo envolvidos nesses processos biológicos, o que pode revelar mecanismos moleculares relevantes na progressão do CP (Zhang et al., 2019).

Estudos prévios destacam o papel do miR-181a-5p em diversas atividades moleculares e processos biológicos, incluindo a regulação gênica em vias de sinalização em câncer, CPNPC e autofagia (He et al., 2015; Wang et al., 2022; Xie et al., 2022; Long et al., 2023). Nossos resultados revelaram que os genes alvo do miR-181a-5p estavam envolvidos em vias de transdução de sinal, vias relacionadas ao câncer, microRNAs em câncer, corroborando com os resultados supracitados. Resultados similares foram observados também em carcinoma papilífero de tireoide, no qual o miR-181a-5p regulou várias vias relacionadas ao câncer, destacando seu potencial oncogênico (Zhang et al., 2019). É importante destacar que os achados baseados em análises computacionais, podem necessitar de validação experimental adicional para reforçar sua relevância biológica pois, a heterogeneidade dos tecidos e condições experimentais, podem afetar as interações entre os miRNAs e seus genes-alvo.

Em um estudo realizado por Ma *et al* (2015), a expressão de miR-181a-5p também foi detectada em seis linhagens celulares de CPNPC humanas por qRT-PCR. Os resultados mostraram que o nível de expressão de miR-181a-5p foi significativamente regulado negativamente nas linhagens A549 e H1299 em comparação com BEAS-2B (linhagem saudável de pulmão). No entanto, esses achados não corroboram com os nossos resultados, no qual visualizamos que a expressão do miR-181a-5p estava elevada em células neoplásicas (A549 e H1299), quando comparadas a célula saudável de pulmão (MRC5). Tal discrepância pode ser atribuída à diferença nas linhagens de controle utilizadas, a BEAS-2B é derivada de pneumócito saudável, enquanto MRC5 é composta por fibroblasto de pulmão. Além disso, variações no estado de diferenciação celular também podem influenciar significativamente a expressão de miRNAs (Segeritz & Vallier, 2021).

Diversas pesquisas têm explorado o envolvimento dos miRNAs nos processos tumorigênicos (Jorge *et al.*, 2021). O miR-181a-5p tem se destacado devido à sua influência regulatória no desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de câncer (Li *et al.*, 2023). Simiene *et al* (2023) observou que os níveis de expressão do miR-181a-5p em amostras de tecido e plasma de adenocarcinoma e carcinoma escamoso foram significativamente mais baixos em comparação a amostras controle adjacentes, sugerindo uma possível associação entre a redução da expressão do miR-181a-5p e a progressão tumoral nessas condições. Consequentemente em sua análise multivariada foi descrito que a alta expressão do miR-181a-5p no tecido tumoral está significativamente envolvida na sobrevida global dos pacientes diagnosticados com CPNPC. Entretanto, uma limitação no estudo de Simiene *et al* (2023) é a não inclusão do carcinoma neuroendócrino de pequenas células, uma vez que diferentes tipos histológicos de CP podem apresentar perfis moleculares distintos e possuir características biológicas e clínicas que podem influenciar os níveis de expressão de miRNAs de maneira diferente dos adenocarcinomas e carcinomas escamosos (Oser *et al.*, 2015).

Além disso, a supressão tumoral desse miRNA em CP foi observada em outros estudos, associando sua baixa expressão ao crescimento tumoral *in vivo* quanto *in vitro*, conforme demonstrado por Li *et al* (2020). No entanto, esses achados contradizem os resultados obtidos no presente estudo, onde o miR-181a-5p parece desempenhar papel oncogênico na população estudada. Adicionalmente, nossa análise multivariada, as variáveis: estadiamento, histórico familiar, tumores prévios,

comorbidades e etilismo estiveram associadas ao aumento da expressão do miR-181a-5p, sugerindo uma possível associação entre o miR-181a-5p e o desenvolvimento tumoral do CP. Da mesma forma, Ping *et al.* (2018) relataram que os níveis de expressão do miR-181a foram regulados positivamente em amostras teciduais e séricas tumorais de pacientes diagnosticados com CP na população chinesa. Além de conferir um papel de resistência terapêutica devido a inibição do gene *GAS7*, sugerindo que níveis altos de miR-181a estão associados ao desenvolvimento tumoral do CP.

Essa ambiguidade relatada no miR-181a-5p também é observada em outros tipos de tumores. No câncer de mama, por exemplo, Zhai *et al.* (2022), demonstrou que o aumento de expressão do miR-181a-5p facilita a progressão tumoral ao inativar o gene *NDGR2*. Em contrapartida, também foi relatado que a indução desse miRNA se mostrou capaz de reduzir a expressão do receptor de estrogênio α , bloqueando a via proliferativa dependente de estrogênio a qual está diretamente associada à progressão do câncer de mama (Benedetti *et al.*, 2021). Tais dados refletem que as funções do miRNAs podem variar consideravelmente dependendo de alguns contextos específicos como o estadiamento da doença e até mesmo diferenças entre as populações (Kanthaje *et al.*, 2021). Uma hipótese para a divergência entre os resultados do nosso estudo e alguns estudos da literatura em relação ao papel do miR-181a-5p no câncer, pode estar relacionada a plasticidade dos miRNAs, ou seja, um mesmo miRNA pode desempenhar papéis opostos em diferentes contextos biológicos (Kanthaje *et al.* 2021). Essa flexibilidade é uma característica inerente à complexidade das redes regulatórias envolvidas na biologia do câncer, onde um mesmo miRNA pode regular alvos distintos em diferentes contextos, gerando efeitos aparentemente contraditórios sobre a proliferação e metástase (Peng *et al.*, 2016).

Os dados observacionais apresentados são promissores e sugerem uma possível associação entre o miR-181a-5p e o desenvolvimento tumoral do CP. Apesar do presente estudo apresentar algumas limitações, como um tamanho amostral pequeno e a ausência de uma análise funcional, este estudo oferece insumos iniciais valiosos, ao evidenciar um padrão de expressão com possível relevância clínica. Este trabalho estabelece uma base inicial sólida para futuras investigações sobre o papel funcional do miR-181a-5p na biologia tumoral do CP. Além disso, esses achados fornecem uma base sólida na exploração de mecanismos moleculares subjacentes,

para identificação de novas estratégias terapêuticas e biomarcadores moleculares específicos para essa doença.

6 CONCLUSÃO

- A análise *in silico* revelou que o miR-181a-5p regula diversos genes associados a processos tumorais, como *HMGA2*, *TGFBR3* e *WIF1*;
- A superexpressão do miR-181a-5p foi observada nas linhagens neoplásicas A549 e H1299, em comparação à linhagem normal MRC5;
- Foi observado um aumento da expressão do miR-181a-5p em linhagens neoplásicas de pulmão (H1299 e A549), bem como em amostras teciduais e séricas de pacientes diagnosticados com CP;
- As variáveis: estadiamento, histórico familiar, tumores prévios, comorbidades e alcoolismo estiveram associadas ao aumento da expressão do miR-181a-5p.

7 ATIVIDADES COMPLEMENTARES

Como atividade complementar, submetemos o artigo intitulado "*miRNA-21, an OncomiR that regulates cell proliferation, migration, invasion and therapy response in lung cancer*" à revista *Pathology – Research and Practice* (Apêndice A).

REFERÊNCIAS

- American Cancer Society. (2024). **Lung Cancer**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer.html>. Acesso em: 10 de março de 2024;
- American Lung Association. (2022). **Lung Cancer**. Disponível em: <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer>. Acesso em: 10 de março de 2024;
- ARAUJO, Luiz Henrique et al. Lung cancer in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, p. 55-64, 2018;
- BADE, Brett C.; CRUZ, Charles S. Dela. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. **Clinics in chest medicine**, v. 41, n. 1, p. 1-24, 2020;
- BAGATIN, Ericson; JARDIM, José Roberto Brito; STIRBULOV, Roberto. Doença pulmonar obstrutiva crônica ocupacional. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, p. S35-S40, 2006;
- BAJBOUJ, Khuloud et al. Histone modification in NSCLC: molecular mechanisms and therapeutic targets. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 21, p. 11701, 2021;
- BENEDETTI, Rosaria et al. Regulatory interplay between miR-181a-5p and estrogen receptor signaling cascade in breast cancer. **Cancers**, v. 13, n. 3, p. 543, 2021.
- CALIXTO, Murilo Seixas et al. O impacto dos cuidados paliativos no tratamento de pacientes com câncer de pulmão. **Revista Eletrônica Acervo Médico**, v. 23, n. 7, p. e12815-e12815, 2023;
- CARNEIRO, Ellis Neide Alves et al. IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES SÉRICOS PARA DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE PULMÃO. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n. 7, p. 1845-1855, 2023;
- CASTRO JUNIOR, Gilberto de; HARADA, Guilherme; MELLO, Evandro Sobroza de. A importância da caracterização molecular no câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 45, p. e20190139, 2019;
- DENG, Xin et al. The role of TGFBR3 in the development of lung cancer. **Protein & Peptide Letters**, v. 31, n. 7, p. 491-503, 2024.
- DUARTE, Ricardo Luiz de Menezes; PASCHOAL, Marcos Eduardo Machado. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, p. 56-65, 2006;
- FENG, Xialu et al. Role of miR-181a in the process of apoptosis of multiple malignant tumors: A literature review. **Advances in Clinical & Experimental Medicine**, v. 27, n. 2, 2018;
- FILHO, Laerte et al. O uso da tomografia computadorizada de baixa dose (TCBD) no rastreio de câncer de pulmão: revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 9, p. e3998-e3998, 2020;

FU, Zhen-Jie et al. Regulation of miR-30b in cancer development, apoptosis, and drug resistance. **Open Life Sciences**, v. 17, n. 1, p. 102-106, 2022;

GALVÃO-LIMA, Leonardo J. et al. miRNAs as biomarkers for early cancer detection and their application in the development of new diagnostic tools. **Biomedical engineering online**, v. 20, p. 1-20, 2021;

GARCIA-MORENO, Adrian; CARMONA-SAEZ, Pedro. Computational methods and software tools for functional analysis of miRNA data. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1252, 2020;

GE, Shaohua et al. MiR-181a, a new regulator of TGF- β signaling, can promote cell migration and proliferation in gastric cancer. **Investigational new drugs**, v. 37, p. 923-934, 2019;

GEBERT, Luca FR; MACRAE, Ian J. **Regulation of microRNA function in animals. Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 1, p. 21-37, 2019;

GRAIL. Multi-Cancer Early Detection. Disponível em: <https://grail.com/multi-cancer-early-detection/>. Acesso em: 30 abr. 2024;

GRIDELLI, Cesare et al. Non-small-cell lung cancer. **Nature reviews Disease primers**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2015;

GUO, H. et al. Clinicopathological significance of WIF1 hypermethylation in NSCLC, a meta-analysis and literature review. **Oncotarget**. 2017; 8 (2): 2550–7

HAN, Peng et al. The lncRNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation and chemoresistance via miR-181a-5p-mediated regulation of Wnt/ β -catenin signaling. **Molecular cancer**, v. 16, p. 1-13, 2017;

HE, Shuming et al. Hsa-microRNA-181a is a regulator of a number of cancer genes and a biomarker for endometrial carcinoma in patients: a bioinformatic and clinical study and the therapeutic implication. **Drug design, development and therapy**, p. 1103-1175, 2015;

HO, Phuong TB; CLARK, Ian M.; LE, Linh TT. MicroRNA-based diagnosis and therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7167, 2022.

HOANG, Phuc H.; LANDI, Maria Teresa. DNA methylation in lung cancer: mechanisms and associations with histological subtypes, molecular alterations, and major epidemiological factors. **Cancers**, v. 14, n. 4, p. 961, 2022;

INDRIERI, Alessia et al. The pervasive role of the miR-181 family in development, neurodegeneration, and cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 6, p. 2092, 2020;

International Agency for Research on Cancer - IARC. **Globocan 2022**: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 10 de março de 2024;

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - **INCA 2023**: Tipos de câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>. Acesso em: 10 de março de 2024;

JORGE, Ariany Lima et al. MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer. **Einstein (São Paulo)**, v. 19, 2021;

KANTHAJE, Shruthi et al. Repertoires of MicroRNA-30 family as gate-keepers in lung cancer. **Frontiers in Bioscience-Scholar**, v. 13, n. 2, p. 141-156, 2021;

KIM, Kwangho et al. Epigenetic regulation of SMAD3 by histone methyltransferase SMYD2 promotes lung cancer metastasis. **Experimental & Molecular Medicine**, p. 1-13, 2023;

KOTURBASH, Igor et al. Sex-specific radiation-induced microRNAome responses in the hippocampus, cerebellum and frontal cortex in a mouse model. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 722, n. 2, p. 114-118, 2011;

KUAN-LI, Wu et al. The roles of microRNA in lung cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, 2019;

LANGEVIN, Scott M.; KRATZKE, Robert A.; KELSEY, Karl T. Epigenetics of lung cancer. **Translational Research**, v. 165, n. 1, p. 74-90, 2015;

IANNONE, Francesca et al. Circulating miR-181a as a novel potential plasma biomarker for multimorbidity burden in the older population. **BMC geriatrics**, v. 22, n. 1, p. 772, 2022;

LEONETTI, Alessandro et al. Dynamic evaluation of circulating miRNA profile in EGFR-Mutated NSCLC patients treated with EGFR-TKIs. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1520, 2021;

LI, ShiDong et al. Long noncoding RNA NEAT1 promotes proliferation and invasion via targeting miR-181a-5p in non-small cell lung cancer. **Oncology research**, v. 26, n. 2, p. 289, 2018;

LI, Liping et al. Long noncoding RNA SNHG7 accelerates proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by suppressing miR-181a-5p through AKT/mTOR signaling pathway. **Cancer Management and Research**, p. 8303-8312, 2020;

LI, Xueren; FENG, Chunjing; PENG, Shouchun. Epigenetics alternation in lung fibrosis and lung cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 1060201, 2022;

LI, Junxin et al. Role of miR-181a-5p in cancer. **International Journal of Oncology**, v. 63, n. 4, p. 1-18, 2023;

LIN, Jianmin et al. Upregulation of microRNA-181a-5p increases the sensitivity of HS578T breast cancer cells to cisplatin by inducing vitamin D receptor-mediated cell autophagy. **Oncology Letters**, v. 21, n. 4, p. 1-1, 2021;

LI, X.-X. et al. The role of let-7 and HMGA2 in the occurrence and development of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. **European Review for Medical & Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 23, 2018.

LONG, Ze et al. MiR-181a-5p promotes osteogenesis by targeting BMP3. **Aging (albany NY)**, v. 15, n. 3, p. 734, 2023;

LYU, Xiaoming et al. miR-181a-5p, an inducer of Wnt-signaling, facilitates cell proliferation in acute lymphoblastic leukemia. **Oncology reports**, v. 37, n. 3, p. 1469-1476, 2017.

MA, Zhongliang et al. MiR-181a-5p inhibits cell proliferation and migration by targeting Kras in non-small cell lung cancer A549 cells. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 47, n. 8, p. 630-638, 2015;

MANSOORI, Behzad et al. HMGA2 as a critical regulator in cancer development. **Genes**, v. 12, n. 2, p. 269, 2021.

MATTICK, John S. et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 24, n. 6, p. 430-447, 2023;

MELO, Carina Mucciolo et al. Investigação in silico dos genes correlacionados à heparanase nos diferentes subtipos de câncer de mama. **einstein (São Paulo)**, v. 18, p. eAO5447, 2020;

MINEMURA, Chikashi et al. Identification of tumor-suppressive miR-30e-3p targets: Involvement of SERPINE1 in the molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3808, 2022;

MITHOOWANI, Hamid; FEBBRARO, Michela. Non-small-cell lung cancer in 2022: A review for general practitioners in oncology. **Current Oncology**, v. 29, n. 3, p. 1828-1839, 2022;

MOHAMMADI, Ali et al. Restoration of miR-330 expression suppresses lung cancer cell viability, proliferation, and migration. **Journal of cellular physiology**, v. 236, n. 1, p. 273-283, 2021;

NING, Zhi-Qiang et al. MicroRNA-30e reduces cell growth and enhances drug sensitivity to gefitinib in lung carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 3, p. 4572, 2017;

NOVAES, Fabiola Trocoli et al. Câncer de pulmão: histologia, estágio, tratamento e sobrevida. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, p. 595-600, 2008;

O'BRIEN, Jacob et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 388354, 2018;

OSER, Matthew G. et al. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 4, p. e165-e172, 2015.

PENG, Yong; CROCE, Carlo M. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2016

PING, Wei et al. MiR-181a contributes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells by targeting GAS7. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 495, n. 4, p. 2482-2489, 2018;

RAJDEV, Kartikeya et al. An unusually aggressive large cell carcinoma of the lung: undiagnosed until autopsy. **Cureus**, v. 10, n. 2, 2018;

RAMAZI, Shahin et al. Epigenetic regulation in lung cancer. **MedComm**, v. 4, n. 6, p. e401, 2023;

RAMOS, João Vitor Dornela et al. Aspectos epidemiológicos do câncer de pulmão na sociedade contemporânea. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 5, n. 5, p. 5405-5421, 2023;

RIOLO, Giulia et al. miRNA targets: from prediction tools to experimental validation. **Methods and protocols**, v. 4, n. 1, p. 1, 2020;

RUDIN, Charles M. et al. Small-cell lung cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 3, 2021;

SÁ, V. K., et al. Lung cancer in Brazil: Epidemiology and treatment challenges. **Lung Cancer: Targets and Therapy**, v.7, p. 141-148, 2016;

SAAB, Sara et al. Insights into lung cancer immune-based biology, prevention, and treatment. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 502465, 2020;

SAAB, Azza Abdel Rahman et al. Clinical value of serum miR-21 as a potential biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). **Medical Science**, v. 25, n. 112, p. 1477-1485, 2021;

SANTOS, Carlos Vinícius Jenezi. **Viabilidade socioeconômica do uso de imunoterapia no tratamento de câncer de pulmão**. 2018. Tese de Doutorado;

SEGERITZ, Charis-P.; VALLIER, Ludovic. Cell culture: Growing cells as model systems in vitro. In: **Basic science methods for clinical researchers**. Academic Press, 2017. p. 151-172;

SHAN, Xia et al. Identification of four plasma microRNAs as potential biomarkers in the diagnosis of male lung squamous cell carcinoma patients in China. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 6, p. 2370-2381, 2018;

SHARMA, Salil; EGHBALI, Mansoureh. Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. **Biology of sex differences**, v. 5, p. 1-8, 2014;

SILVA, Pamela Alcantara Borges Santana et al. O novo 8º sistema TNM de câncer de pulmão: um panorama geral das mudanças. **ULAKES JOURNAL OF MEDICINE**, v. 1, n. 2, 2021;

SIMIENE, Julija et al. Potential of miR-181a-5p and miR-630 as clinical biomarkers in NSCLC. **BMC cancer**, v. 23, n. 1, p. 857, 2023;

SMOLARZ, Beata et al. miRNAs in cancer (review of literature). **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 5, p. 2805, 2022;

SOARES COSTA, Amanda Angelo et al. Biomarcadores de câncer de pulmão. Uma revisão de literatura. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 58, p. e4152022, 2022;

SUGIMURA, Hiroshi et al. Survival after recurrent nonsmall-cell lung cancer after complete pulmonary resection. **The Annals of thoracic surgery**, v. 83, n. 2, p. 409-418, 2007;

TAKAHASHI, Kei et al. Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 272, n. 1, p. 154-160, 2013;

TAN, Weige et al. MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. **Oncology letters**, v. 15, n. 3, p. 2735-2742, 2018;

THANDRA, Krishna Chaitanya et al. Epidemiology of lung cancer. **Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia**, v. 25, n. 1, p. 45-52, 2021;

TOUMAZIS, Iakovos et al. Risk-based lung cancer screening: a systematic review. **Lung Cancer**, v. 147, p. 154-186, 2020;

TRAKUNRAM, Keson et al. MicroRNA isolation by trizol-based method and its stability in stored serum and cDNA derivatives. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 20, n. 6, p. 1641, 2019;

WANG, Guoqing et al. Persistence of smoking-induced dysregulation of miRNA expression in the small airway epithelium despite smoking cessation. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0120824, 2015;

WANG, Liming; ZHANG, Lili; WANG, Liwei. SNHG7 contributes to the progression of non-small-cell lung cancer via the SNHG7/miR-181a-5p/E2F7 axis. **Cancer management and research**, p. 3211-3222, 2020;

WANG, Mingbo et al. MicroRNA-181a-5p prevents the progression of esophageal squamous cell carcinoma in vivo and in vitro via the MEK1-mediated ERK-MMP signaling pathway. **Aging (Albany NY)**, v. 14, n. 8, p. 3540, 2022;

WANG, Rui et al. MiR-181a-5p inhibits uveal melanoma development by targeting GNAQ and AKT3. **American Journal of Cancer Research**, v. 13, n. 1, p. 293, 2023;

WANI, Javaid Ahmad et al. MiRNAs in lung cancer: Diagnostic, prognostic, and therapeutic potential. **Diagnostics**, v. 12, n. 7, p. 1610, 2022;

WILD, Chris; WEIDERPASS, Elisabete; STEWART, Bernard W. (Ed.). **World cancer report: cancer research for cancer prevention**. International Agency for Research on Cancer, 2020;

XIE, Xiao-Hui et al. Upregulation of miR-181a-5p and miR-125b-2-3p in the Maternal Circulation of Fetuses with Rh-Negative Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn Could Be Related to Dysfunction of Placental Function. **Disease Markers**, v. 2022, 2022;

XUE, Wei-Xiao et al. Serum miR-1228-3p and miR-181a-5p as noninvasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis and prognosis. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1-13, 2020;

YANG, Han et al. MiRNA-based therapies for lung cancer: Opportunities and challenges?. **Biomolecules**, v. 13, n. 6, p. 877, 2023;

YANG, N. et al. Propofol inhibits lung cancer cell viability and induces cell apoptosis by upregulating microRNA-486 expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, p. e5794, 2017;

YANG, Meng et al. miR-181a-5p promotes proliferation and invasion and inhibits apoptosis of cervical cancer cells via regulating inositol polyphosphate-5-phosphatase A (INPP5A). **Oncology Research**, v. 26, n. 5, p. 703, 2018;

YUE, Yang et al. SNHG5 protects chondrocytes in interleukin-1 β -stimulated osteoarthritis via regulating miR-181a-5p/TGFBR3 axis. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 10, p. e22866, 2021.

ZHAI, Zhen et al. MiR-181a-5p facilitates proliferation, invasion, and glycolysis of breast cancer through NDRG2-mediated activation of PTEN/AKT pathway. **Bioengineered**, v. 13, n. 1, p. 83-95, 2022.



ZHANG, Cong et al. BCL2 and hsa-miR-181a-5p are potential biomarkers associated with papillary thyroid cancer based on bioinformatics analysis. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 17, n. 1, p. 221, 2019.

ZHANG, Hanrong et al. TGFBR3 inhibits progression of papillary thyroid cancer by inhibiting the PI3K/AKT pathway and EMT. **Endocrine Connections**, v. 13, n. 12, 2024.

APÊNDICE A- SUBMISSÃO DE ARTIGO

Review

miRNA-21, an oncomiR that regulates cell proliferation, migration, invasion and therapy response in lung cancer

Roberta Queiroz da Silva Lima ^a, César Freire Melo Vasconcelos ^b,
João Pedro Alves Gomes ^a, Erika da Silva Bezerra de Menezes ^a, Barbara de Oliveira Silva ^a,
Claudio Montenegro ^a, Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior ^c, Michelly Cristiny Pereira ^{a 1}  

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (HCP)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa intitulada: “Avaliação da expressão de Par-4 e seu papel funcional na proliferação, morte celular, metástase e tratamento em câncer de pulmão”, que está sob a responsabilidade dos pesquisadores Cirurgião César Freire de Melo Vasconcelos, residente na Rua Santos Dumont 702 apt-01-Aflitos – Recife-PE – CEP 52050050 – telefone para contato (81) 988998677, inclusive a cobrar do pesquisador e Profa Dra Michelly Cristiny Pereira (UFPE), residente da Rua José Augusto da Silva Braga, 555, Bairro Novo, Olinda -PE; respectivamente. TELEFONE: (81) 998274256 e com o e-mail: michelly2305@yahoo.com.br

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Informo que estou ciente de necessito do procedimento cirúrgico, pois faço parte do grupo de pacientes neoplasia pulmonar, doença que apresenta problemas sérios a minha saúde. O médico que lhe atende dará mais explicações, se você achar necessárias, podendo a qualquer momento fazer suas perguntas.

RISCOS E BENEFÍCIOS:

RISCOS: A retirada da amostra tecidual é muito pequena a chance de causar desconfortos, edema (inchaço), infecção, ferimento, rasgo (laceração) na pele e tecidos moles como acontece em cirurgia de exérese de tumor pulmonar, que logo pode ser controlado de imediato com a simples compressão manual feita pelo cirurgião.

BENEFÍCIOS: Compreendo também a importância e os benefícios pelos esclarecimentos que esta pesquisa trará sobre nas cirurgias de retirada de tumores pulmonares que é prognóstico precoce imediato de metástase e resposta a terapia utilizada, dando uma sobrevida melhor ao paciente no quadro pós-operatório.

ACOMPANHAMENTO MÉDICO: O acompanhamento médico será iniciado na sua primeira consulta com o médico cirurgião torácico, quando você responderá a um questionário para que o médico possa avaliar a indicação do sua cirurgia. Depois a sua cirurgia será marcada conforme a disponibilidade de vagas para cirurgia do Centro Cirúrgico. É importante que você entenda que o procedimento cirúrgico que será realizado é necessário para o tratamento desta doença e, devido a esta cirurgia, estima-se que seja necessário que você fique internado por aproximadamente 3 dia. Este tempo de internação poderá ser maior ou menor que 7 dias e isto dependerá da sua resposta ao tratamento. Durante todo o período da internação você receberá visita de um médico participante desta pesquisa que informará a você sobre o seu quadro e a previsão de alta. O tempo de permanência do médico durante a visita pode variar, mas em média pode durar 30 minutos. O acompanhamento será realizado por meio de consultas que serão agendadas nos ambulatório dos serviços que realizarão a pesquisa.

O procedimento médico poderá ser interrompido ante qualquer intercorrência adversa. E, neste caso, pesquisador responsável, ao perceber qualquer risco ou dano significativos ao participante da pesquisa, previstos ou não neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, comunicará o fato, imediatamente, ao Sistema CEP/CONEP, que avaliará, em caráter emergencial, a necessidade de adequar ou suspender o estudo.

SEGURO E ASSISTÊNCIA MÉDICA EM CASO DE DANOS: Todo e qualquer dano decorrente desta pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da equipe médica que lhe prestou atendimento nesta Instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem da sua participação nesta pesquisa. Quaisquer despesas para a sua participação na pesquisa (como por exemplo, as despesas com transporte e alimentação nos dias de atendimento/consulta) serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de despesas). Fica também garantida indenização em casos de danos decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Além da indenização, em caso de danos decorrentes da sua participação nesta pesquisa, você, bem como os seus responsáveis, terá direito a assistência integral, incluindo acompanhamento médico, gratuitamente, financiados pelo patrocinador principal desta pesquisa.

CUSTOS: Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente que aceitar participar desta pesquisa. Você será ressarcido de gastos relacionados ao estudo, considerando as despesas decorrentes de transporte e alimentação nos dias em que for necessária à sua presença para consultas ou exames.

BASES DA PARTICIPAÇÃO: É importante que você saiba que sua participação nesta pesquisa é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda dos benefícios aos quais você tem direito.

Os dados coletados nesta pesquisa, ficarão armazenados em (pastas de arquivo e computador pessoal), sob a responsabilidade do pesquisador, no NUPIT-SG, pelo período de mínimo 5 anos

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida Prof. Moraes Rego s/n – 3º Andar- Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil CEP: 50670-420, Tel.: (81) 2126.3743 – e-mail: cephufpe@gmail.com).

(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo _____ (colocar o nome completo da pesquisa) _____, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Impressão digital

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa

e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (HUOC)



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS PARTICIPANTES DO ESTUDO CASO-CONTROLE (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **"BARCODE DA NEOPLASIA PULMONAR EM PERNAMBUCO: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES CLÍNICOS E GEORREFERENCIAMENTO DOS PACIENTES COMO ESTRATÉGIA PARA VIABILIZAR O DIAGNÓSTICO PRECOCE E REDUÇÃO DE CUSTOS PARA O SUS"** que está sob a responsabilidade da Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira (UFPE), residente na Rua José Augusto da Silva Braga, 555 - Bairro Novo, Olinda-PE; telefone para contato (81) 998274256, e-mail (michelly2305@yahoo.com.br) e do Dr. Luiz Alberto Reis Mattos Júnior, residente na Avenida Prof. Moraes do Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE; telefone para contato (81) 996689778, e-mail: luiz.mattos@ufpe.br.

Esse termo de consentimento pode haver alguns tópicos que o(a) senhor(a) não entenda. Caso haja dúvidas, todas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

O(a) senhor(a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Informo que estou ciente que faço parte de um grupo de pacientes que participará de um grupo controle (sem neoplasia pulmonar) e que fui recrutado a partir da lista de pacientes que se submeterão ao teste de PCR para cirurgia no ambulatório de cirurgia do Hospital das Clínicas de Pernambuco. Se o senhor achar necessário o pesquisador lhe dará mais explicações, sinta-se confortável para fazer perguntas a qualquer momento.

➤ **PROPÓSITO DA PESQUISA:** Esse estudo tem o objetivo de identificar proteínas presentes no sangue e no tecido do tumor que possam contribuir para o diagnóstico precoce de câncer de pulmão, identificar a resposta do paciente a quimioterapia, bem como propiciar o desenvolvimento de novos medicamentos.

➤ **PROCEDIMENTOS DA PESQUISA:** Para realizar o estudo com os participantes do grupo controle, uma amostra de sangue periférico (coletado na veia do braço) será coletada quando o participante estiver no setor de coleta de PCR para Covid no ambulatório de cirurgia geral. Esse procedimento é necessário para identificar biomarcadores que ajudarão no diagnóstico precoce do câncer de pulmão. Na ocasião desse procedimento e só após a autorização, uma pequena quantidade do seu sangue será coletado (o equivalente a dois tubos pequenos de 4 mililitros cada e um tudo de 8 mililitros, que corresponde a aproximadamente quatro colheres de sopa) que serão armazenadas no Biorrepositório do NUPIT (Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica) para pesquisas futuras. Todas as amostras biológicas coletadas durante essa pesquisa, conforme descrito acima, serão utilizadas para os propósitos descritos no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Ao final da pesquisa ou depois que todos os resultados dos exames ficarem prontos, se tiver sobrado alguma quantidade de sangue, essas amostras serão destruídas.

➤ **RISCOS:** Os riscos imediatos relacionados ao processo de coleta de sangue, são inerentes ao procedimento e consiste basicamente ao risco de dor leve no local onde a agulha será inserida e um inchaço debaixo da pele que contém sangue (hematomas). De maneira menos provável a infecção no local da picada da agulha, no entanto o grupo responsável pela coleta possui experiência em coleta de sangue.

➤ **BENEFÍCIOS:** Você não será remunerado pela sua participação e esta pesquisa poderá não oferecer benefícios diretos a você. Se você concordar com o uso de suas informações e/ou do material do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes desta pesquisa. Esta pesquisa trará benefícios para pacientes com câncer de pulmão, uma vez que trará no futuro possibilidades para a busca de novos biomarcadores e desenvolvimento de novos medicamentos.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (coletas de sangue), ficarão sob responsabilidade da Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira no Núcleo de Pesquisa e Inovações Terapêuticas Suely Galdino NUPIT-SG localizado no 1º andar do Prédio da Diretoria de Inovação e Empreendedorismo - DINE (ao lado do Departamento de Educação Física) cujo endereço é Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE, por um período mínimo de 5 anos.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o(a) senhor(a) poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO(A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **"BARCODE DA NEOPLASIA PULMONAR EM PERNAMBUCO: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES CLÍNICOS E GEORREFERENCIAMENTO DOS PACIENTES COMO ESTRATÉGIA PARA VIABILIZAR O DIAGNÓSTICO PRECOCE E REDUÇÃO DE CUSTOS PARA O SUS"** como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão digital
(opcional)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: