



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARÍLLYA MORAIS DA SILVA

**OS EFEITOS DE UM MICROAMBIENTE
PRÓ-INFLAMATÓRIO E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM
FÁRMACOS EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO**

Recife
2023

MARÍLLYA MORAIS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM MICROAMBIENTE
PRÓ-INFLAMATÓRIO E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM
FÁRMACOS EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO**

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

Orientador: Prof^a Dr^a Michelly Cristiny
Pereira

Coorientador: M^a Silvia Maria de Souza

Recife
2023

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

Silva, Marílya Morais da.

Avaliação dos efeitos de um microambiente pró-inflamatório e de sua associação com fármacos em células de câncer de pulmão / Marílya Morais da Silva. - Recife, 2023.

56 : il., tab.

Orientador(a): Michelly Cristiny Pereira

Cooorientador(a): Silvia Maria de Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. Inflamação. 2. Câncer de Pulmão. 3. Macrófagos. 4. Cisplatina. I. Pereira, Michelly Cristiny. (Orientação). II. Souza, Silvia Maria de. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

MARÍLLYA MORAIS DA SILVA

**OS EFEITOS DE UM MICROAMBIENTE PRÓ-INFLAMATÓRIO E DE
SUA ASSOCIAÇÃO COM FÁRMACOS EM CÉLULAS DE CÂNCER
DE PULMÃO**

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

Aprovada em: 26/04/2023

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr^a Paula Sandrin Garcia
UFPE/ Departamento de Genética

Dr. Anderson Almeida
UFPE/Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica

Dedico este trabalho à minha família, meus pais Mariluce e Alenilson e a minha irmã Marina, que mesmo de longe, sempre me deram todo o apoio necessário para continuar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, professora Michelly Pereira, pelo seu acolhimento, paciência, disponibilidade e principalmente por todas as oportunidades que me disponibilizou, oportunidades não só para o meu crescimento profissional, mas também pessoal. Espero que esta parceria dure por muito tempo.

A minha co-orientadora, Silvia de Souza pela paciência de explicar quantas vezes fosse necessário um mesmo experimento e por estar presente auxiliando desde o começo o meu caminhar científico.

A Dr^a Bárbara Oliveira por ter me ajudado tanto na reta final deste trabalho.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica por todo o apoio durante os experimentos e conhecimento que me forneceram.

Aos meus amigos, tanto aqueles que moram longe, mas que sempre se fizeram presentes em minha vida, quanto aqueles que estiveram fisicamente ao meu lado e se tornaram a minha família longe de casa e ajudaram a tornar todos estes anos de curso um pouco mais leve e cheio de risadas.

Por fim, à minha família, especialmente aos meus pais, Alenilson e Mariluce, que sempre fizeram de tudo para que eu e minha irmã tivéssemos acesso ao ensino superior, que eles não tiveram. E que mesmo de longe sempre me apoiaram em tudo e me deram forças para continuar.

“They say the best blaze burns brightest when
circumstances are at their worst.”
Howl's Moving Castle (2004)

SILVA, Marílya. **Os efeitos de um microambiente pró-inflamatório e de sua associação com fármacos em células de câncer de pulmão.** 2023. 58. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

O câncer de pulmão é um dos mais incidentes globalmente e o responsável pelo maior número de óbitos por câncer. No Brasil, são estimados 32 mil novos casos de carcinoma pulmonar para cada ano do triênio 2023-2025. O tumor se desenvolve em um microambiente extremamente complexo, onde a inflamação desempenha papel fundamental nos processos de tumorigênese e progressão tumoral. O microambiente tumoral é majoritariamente anti-inflamatório, possuindo uma população de macrófagos M2 que expressam citocinas que favorecem a remodelagem do tecido, de forma que favoreça o crescimento do tumor. No Brasil, o esquema quimioterápico padrão para o câncer de pulmão de células não pequenas é a associação de cisplatina e etoposido. No entanto, a resistência à platina e seus derivados é a principal limitação no tratamento, assim como os efeitos colaterais. Os meios condicionados por macrófagos podem apresentar diferentes citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, tornando possível estudar, *in vitro*, o efeito dessas moléculas em diversos tumores. Nos últimos anos, vem surgindo imunoterapias voltadas para os macrófagos associados ao tumor, esses tratamentos podem agir no recrutamento, sobrevivência e repolarização de macrófagos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos do microambiente pró-inflamatório no câncer de pulmão isolado ou associado à cisplatina, importante para um melhor entendimento da importância da inflamação no contexto da neoplasia pulmonar, além de propor um modelo para estudo *in vitro* para novas opções terapêuticas. Para avaliar a citotoxicidade após exposição ao meio condicionado, foi realizado o ensaio colorimétrico de viabilidade celular baseado na conversão do sal MTT. Foi ainda avaliado a ação deste meio condicionado no ciclo celular através de citometria de fluxo, onde as células foram marcadas com Iodeto de Propídeo e analisadas pelo software FlowJo. Para avaliar os genes de morte relacionados aos efeitos do meio condicionado, foi realizada PCR em tempo real onde o DNA complementar (cDNA) foi utilizado para avaliar a expressão dos genes caspase 3, BAX e Caspase 1 pelo método TaqMan. A análise dos dados foi realizada pelo GraphPad Prism 8 e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A exposição das linhagens de carcinoma pulmonar ao meio condicionado pró-inflamatório resultou na redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$), na H1299 essa redução foi de 61,29%, na A549 essa redução foi de 59,43%. Além disso, a exposição do meio condicionado em associação a cisplatina, potencializou a ação do quimioterápico no ciclo celular da linhagem H1299, parando as células na fase G0/G1. Os resultados da expressão gênica mostraram que a exposição ao meio condicionado não foi capaz de modular a expressão dos genes BAX e Caspase 3 e Caspase-1. Porém, no grupo exposto ao meio condicionado em associação a cisplatina foi possível observar um aumento da expressão de caspase-1, gene relacionado a piroptose. Assim, os resultados deste estudo sugerem que uma presença de mediadores liberados por macrófagos M1, potencializa a ação da cisplatina na viabilidade e ciclo celular de células de carcinoma pulmonar, a via de morte relacionada precisa ser melhor avaliada.

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

SILVA, Marílya. **The effects of a pro-inflammatory microenvironment and its association with drugs on lung cancer cells.** 2023. 58. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Lung cancer is one of the most numerous globally and responsible for the highest number of cancer deaths. In Brazil, there are an estimated 32,000 new cases of lung cancer for each year of the 2023-2025 period. The tumor develops in an extremely complex microenvironment, where inflammation plays a fundamental role in tumorigenesis and tumor progression. The tumor microenvironment is mostly anti-inflammatory, having a population of M2 macrophages that express cytokines that favor tissue remodeling, in a way that favors tumor growth. In Brazil, the standard chemotherapy scheme for non-small cell lung cancer is the combination of cisplatin and etoposide. However, resistance to platinum and its derivatives is the main limitation in the treatment, as well as the side effects. The media conditioned by macrophages can present different cytokines, chemokines and growth factors, making it possible to study, in vitro, the effect of these molecules in different tumors. In recent years, immunotherapies aimed at tumor-associated macrophages have emerged; these treatments can act on the recruitment, survival and repolarization of macrophages. In this context, the objective of this study was to evaluate in vitro the effects of the pro-inflammatory microenvironment in lung cancer alone or associated with cisplatin, important for a better understanding of the importance of inflammation in the context of lung cancer, in addition to proposing a model for in vitro study for new therapeutic options. To evaluate the cytotoxicity after exposure to the conditioned medium, the colorimetric assay of cell viability based on the conversion of the MTT salt was performed. The action of this conditioned medium on the cell cycle was also evaluated through flow cytometry, where the cells were marked with Propidium Iodide and analyzed by the FlowJo software. To evaluate the death genes related to the effects of the conditioned medium, real-time PCR was performed where complementary DNA (cDNA) was used to evaluate the expression of caspase 3, BAX and Caspase 1 genes by the TaqMan method. Data analysis was performed using GraphPad Prism 8 and p values <0.05 were considered significant. Exposure of lung carcinoma cell lines to the pro-inflammatory conditioned medium resulted in a significant reduction in cell viability ($p < 0.05$), in H1299 this reduction was 61.29%, in A549 this reduction was 59.43%. In addition, exposure to the conditioned medium in association with cisplatin potentiated the action of the chemotherapeutic in the cell cycle of the H1299 cell line, stopping the cells in the G0/G1 phase. Gene expression results showed that exposure to a conditioned medium was not able to modulate BAX, Caspase 3 and Caspase-1 gene expression. However, in the group exposed to a conditioned medium in association with cisplatin, it was possible to observe an increase in caspase-1 expression, a gene related to pyroptosis. Thus, the results of this study suggest that the presence of mediators released by M1 macrophages potentiates the action of cisplatin on the viability and cell cycle of lung carcinoma cells; the related death pathway needs to be better evaluated.

Key words: Inflammation. Lung cancer. Macrophages. Cisplatin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Controle do ciclo celular	20
Figura 2 – Mecanismos de Morte Celular	22
Figura 3 – Vias que conectam a inflamação ao câncer	24
Figura 4 – Alvos terapêuticos no microambiente tumoral	31
Figura 5 – Efeitos do meio condicionado na viabilidade celular das linhagens de carcinoma pulmonar	40
Figura 6 – Marcação dos macrófagos por citometria de fluxo	41
Figura 7 – Efeitos do meio condicionado na viabilidade celular das linhagens de carcinoma pulmonar.	43
Figura 8 – Expressão de genes apoptóticos após exposição ao meio condicionado	44
Figura 9 – Expressão da caspase 1 após exposição ao meio condicionado	45
Figura 10 – Histograma do ciclo celular da linhagem H1299 após exposição a diferentes grupos de tratamento	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais tipos e subtipos de câncer de pulmão	18
Tabela 2 – Distribuição do ciclo celular das células H1299 após exposição aos diferentes grupos de tratamento	47

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PULMÃO 16
1.2	SUBTIPOS DE CÂNCER DE PULMÃO 16
1.2.1	Carcinoma Pulmonar de Pequenas Células 17
1.2.2	Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas 17
1.3	HALLMARKS DO CÂNCER 18
1.4	MECANISMOS DE MORTE CELULAR 20
1.4.1	Apoptose 20
1.4.2	Necrose 21
1.4.3	Piroptose 21
1.5	INFLAMAÇÃO ASSOCIADA AO CÂNCER 22
1.5.1	Inflamação e Câncer de Pulmão 23
1.5.2	Microambiente Tumoral (MAT) e Macrófagos Associados ao Tumor 24
1.5.3	Citocinas Inflamatórias Associadas ao Câncer de Pulmão 26
1.6	OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA O CÂNCER DE PULMÃO 29
2 OBJETIVOS	34
3 METODOLOGIA	35
3.1	COMITÊ DE ÉTICA 35
3.2	CULTURA CELULAR 35
3.2.1	Obtenção das Linhagens Celulares 35
3.3	DIFERENCIAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM U937 E PREPARAÇÃO DOS MEIOS CONDICIONADOS (MC) 35
3.4	ANÁLISE DO FENÓTIPO DOS MACRÓFAGOS POR CITOMETRIA DE FLUXO 36
3.5	PCR EM TEMPO REAL 36
3.5.1	Grupos de Tratamento 36
3.5.2	Extração de RNA 37
3.5.3	Síntese de DNA Complementar 37
3.5.4	Análise da Expressão dos Genes - Caspase 1, Caspase 3 e BAX 38

3.6	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)	38
3.7	ANÁLISE DO CICLO CELULAR	38
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1	Os macrófagos diferenciados com pma + lps apresentam um perfil m1 ou pró-inflamatório	40
4.2	A exposição ao meio condicionado reduziu a viabilidade celular das linhagens de carcinoma pulmonar H1299 e A549	41
4.3	Avaliação de genes apoptóticos após exposição da linhagem h1299 ao meio condicionado	43
4.4	A exposição ao meio condicionado associado à cisplatina aumentou a expressão da caspase 1 na linhagem H1299	44
4.5	O tratamento com meio condicionado associado à cisplatina potencializa a ação do quimioterápico no ciclo celular	46
5	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

INTRODUÇÃO

O câncer é o principal problema de saúde pública a ser enfrentado globalmente. As últimas estatísticas globais sobre o câncer, elaboradas com base nas estimativas do Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) de incidência e mortalidade por câncer, produzidas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, mostram que o câncer de pulmão é o responsável pelo maior número de mortes por câncer em homens e a terceira principal causa de morte por câncer em mulheres (ficando atrás somente do câncer de mama e do câncer cervical) em todo o mundo (SUNG et al., 2021). No Brasil, segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer, 2023), a estimativa de novos casos para cada ano do triênio 2023-2025 é de 704 mil, dentre estes, 32 mil casos de câncer de pulmão. Apenas no ano de 2020, no Brasil ocorreram 16.009 óbitos por câncer de pulmão em homens e 12.609 em mulheres.

O Câncer de pulmão surge de células do epitélio respiratório e pode ser dividido histologicamente em 2 subtipos: (1) Carcinoma Pulmonar de pequenas células (CPPC), um tumor altamente maligno derivado de células com características neuroendócrinas que corresponde a 15% dos casos de câncer de pulmão; e (2) carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP) que corresponde a 85% dos casos. É ainda dividido em três subtipos patológicos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células. O câncer de pulmão é uma doença heterogênea com uma abundância de alterações genéticas e epigenéticas, e para compreender a fisiopatologia da doença precisa-se abranger não só estas alterações, como também o papel do microambiente tumoral e a resposta imune do paciente, uma vez que todos esses fatores estão intimamente entrelaçados durante cada etapa da tumorigênese (SALEHI-RAD et al., 2020).

O tumor se desenvolve em um microambiente extremamente complexo, composto por diversos tipos celulares, inclusas: células endoteliais, fibroblastos e células imunes. Além disso, faz-se presente componentes extracelulares que circundam as células tumorais e uma rede vascular indispensável para sua nutrição (ANDERSON; SIMON, 2020). A inflamação tornou-se uma importante característica do câncer. O processo inflamatório pode preceder o desenvolvimento da malignidade através da liberação de citocinas, quimiocinas, como pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e a presença de inflamação crônica aumenta o

risco de iniciação tumoral. Além disso, os mediadores inflamatórios formam uma parte essencial do microambiente tumoral, e sabe-se que a infiltração do microambiente tumoral por leucócitos promove o desenvolvimento e a progressão tumoral (QU; TANG; HUA, 2018).

A conexão entre o câncer e a inflamação pode ser dividida em duas vias, uma via intrínseca que é ativada por eventos genéticos como a ativação de oncogenes por mutação, rearranjo ou amplificação cromossômica e a inativação de genes supressores de tumor, o que resulta na neoplasia. As células que foram transformadas, começam a liberar mediadores inflamatórios, dando origem ao microambiente inflamatório. Na via extrínseca são as condições inflamatórias ou infecciosas aumentam o risco de desenvolver câncer. Se uma inflamação aguda não for resolvida, ela pode evoluir para uma inflamação crônica, resultando em um microambiente imunossupressor. Essas alterações têm a capacidade de promover a ativação de oncogenes, dano de DNA e proteína, produção de espécies reativas de oxigênio. Ambas as vias convergem, resultando na ativação de fatores de transcrição, incluindo NF- κ B (Fator Nuclear Kappa β), K-RAS e P53, podendo originar doenças crônicas, incluindo câncer (MANTOVANI et al., 2008; ZHAO et al., 2021).

Níveis elevados de citocinas inflamatórias têm sido encontrados em diversos tipos de câncer. Os macrófagos são as células em maior número presentes no microambiente tumoral, quando são recrutados para o local do tumor, eles se diferenciam em macrófagos associados ao tumor (TAM), os quais promovem uma inflamação associada ao tumor e todos os aspectos da iniciação, crescimento e desenvolvimento tumoral (BOLLI et al., 2017).

De acordo com diferentes características fenotípicas, funcionais e de seus papéis frente a diferentes respostas imunológicas, os macrófagos podem ser divididos em M1 e M2. Os macrófagos M1 são aqueles ativados pela via clássica, ou seja, são polarizados por células Th1 (Interferon- γ e fator de necrose tumoral- α , TNF- α) ou lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e passam a exibir um forte perfil pró-inflamatório, expressando citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, e IL-23 (LIU et al., 2022; ZHENG et al., 2017).

Os macrófagos do tipo M2, são ativados pela via alternativa, sua polarização é feita pelas citocinas IL-4, IL-13, IL-10 e Fator de Necrose Tumoral β (TNF- β). A principal função dos macrófagos M2 é a resolução do processo inflamatório,

possuindo uma baixa capacidade de apresentar antígenos, o que inibe a resposta inflamatória e promove a remodelação tecidual e angiogênese (LEE et al., 2019). Os macrófagos associados ao tumor podem representar até 50% da massa tumoral, o microambiente tumoral é majoritariamente anti-inflamatório, possuindo uma população de macrófagos M2 que expressam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β e quimiocinas, como CCL17 e CCL22, favorecendo a remodelagem do tecido, de forma que favoreça o crescimento do tumor. Além disso, esses macrófagos associados ao tumor estão relacionados ao desenvolvimento de resistência ao tratamento, recidiva tumoral e metástase (KHANDIA; MUNJAL, 2019; LIU et al., 2022).

O principal tratamento para casos de CPCNP em estágio I e II é a cirurgia, para os pacientes que têm doença localmente avançada com impossibilidade cirúrgica, a radioterapia em combinação com a quimioterapia é a opção mais recomendada (American Cancer Society, 2020). No Brasil, o esquema quimioterápico padrão para o câncer de pulmão de células não pequenas é a associação de cisplatina e etoposido. A platina e seus derivados agem formando adutos de DNA, que induzem uma cascata de vias de transdução de sinalização que culminam na ativação da apoptose dependente ou independente de p53. No entanto, a resistência à platina e seus derivados é a principal limitação no tratamento. Essa resistência pode ocorrer de forma inata, desde o início do tratamento, ou ao longo do tratamento, após exposição aos medicamentos quimioterápicos à base de cisplatina. Para alguns pacientes com câncer de pulmão avançado, uma terapia mais direcionada a algum alvo alterado ou um medicamento imunoterápico pode ser administrada junto com a quimioterapia (HIRSCH et al., 2017).

Os meios condicionados por macrófagos são utilizados para o estabelecimento de um ambiente pró ou anti-inflamatório e dependendo do estímulo utilizado podem apresentar diferentes citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, tornando possível estudar, in vitro, o efeito dessas células em diversos tumores (THABET et al., 2019). Nos últimos anos, vem surgindo imunoterapias voltadas para os macrófagos associados ao tumor, esses tratamentos podem agir no recrutamento, sobrevivência e repolarização de macrófagos.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo é investigar o efeito do meio condicionado pró-inflamatório e de sua associação com a cisplatina em células de

câncer de pulmão, tendo em vista o surgimento de novas imunoterapias voltadas ao microambiente tumoral, especialmente os macrófagos associados ao tumor.

Portanto, o desenvolvimento do presente trabalho pode contribuir para um melhor entendimento do efeito do microambiente pró-inflamatório na resposta a terapia., ajudando no estabelecimento de um modelo para estudo pré-clínico para novas intervenções imunoterapêuticas.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PULMÃO

O câncer é o principal problema de saúde pública a ser enfrentado globalmente. As últimas estatísticas globais sobre o câncer, elaboradas com base nas estimativas GLOBOCAN de incidência e mortalidade por câncer, produzidas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, mostram que o câncer de pulmão é o responsável pelo maior número de mortes por câncer em homens e a terceira principal causa de morte por câncer em mulheres (ficando atrás somente do câncer de mama e do câncer cervical) em todo o mundo (SUNG et al., 2021).

Ainda de acordo com o GLOBOCAN, para 2025 são estimados mais de 21 milhões novos casos de câncer, destes, sendo 2,5 milhões de casos de câncer de pulmão. Falando de mortalidade, em 2025 são esperadas mais de 11 milhões de mortes por câncer, o carcinoma pulmonar segue liderando essa lista, sendo estimadas mais de 2 milhões de mortes. As maiores taxas de incidência devem ser observadas no continente asiático e na América do Norte. (IARC 2023)

No Brasil, segundo dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer, 2023), a estimativa de novos casos para cada ano do triênio 2023-2025 é de 704 mil, dentre estes, 32 mil casos de câncer de pulmão, correspondendo ao risco estimado de 15,06 casos por 100 mil habitantes. Em homens, é o segundo tipo mais frequente nas regiões Sul e Nordeste. Ficando em terceira posição no Sudeste, Norte e Centro-oeste. Em mulheres, o câncer de pulmão, no Sul, ocupa a terceira posição de neoplasia mais frequente. No Sudeste, Centro-oeste e Norte é o quarto tipo de câncer mais incidente. Apenas no Nordeste, o câncer de pulmão ocupa a quinta posição entre as mulheres (INCA 2022).

1.2 SUBTIPOS DE CÂNCER DE PULMÃO

Primordialmente, o câncer de pulmão pode ser dividido histologicamente em dois tipos principais, são eles: (1) Carcinoma Pulmonar de Pequenas Células

(CPPC), que corresponde a 15% dos casos de câncer de pulmão; e (2) Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas (CPCNP), responsável por 85% restantes dos casos. Apesar dessa classificação, atualmente, o CPCNP é subdividido em diversos tipos através de pequenas biópsias e citologia, os principais tipos de CPCNP incluem o Adenocarcinoma, Carcinoma de Células Escamosas e Carcinoma de Grandes Células (SALEHI-RAD et al., 2020; TRAVIS, 2011).

1.2.1 Carcinoma Pulmonar de Pequenas Células

O carcinoma pulmonar de pequenas células é um tumor altamente maligno derivado de células com características neuroendócrinas, comumente descoberto apenas quando ocorre metástase. A maioria dos pacientes apresenta recidiva nos primeiros 2 anos após o tratamento e a taxa de sobrevida em 2 anos é inferior a 10% em pacientes metastáticos (PLANCHARD; PÉCHOUX, 2011). O CPPC é comumente localizado centralmente na via aérea principal e tem características morfológicas distintas, a partir de um pedaço do tumor corado com hematoxilina e eosina (H&E) é possível diagnosticar com precisão o CPPC (ZHENG, 2016).

1.2.2 Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas

O adenocarcinoma pulmonar é uma neoplasia epitelial maligna com diferenciação glandular ou produção de mucina. Esse é o tipo mais comum de câncer de pulmão e possui diversos subtipos (tabela 1), correspondendo a até 40% dos casos e 60% dos CPCNP. O adenocarcinoma pulmonar comumente forma uma massa localizada perifericamente com fibrose central e enrugamento pleural (TRAVIS, 2011). As células de adenocarcinoma pulmonar geralmente expressam marcadores pneumocíticos. O fator de transcrição da tireoide (TTF-1) e NapsinA são expressos em mais de 85% dos casos e podem servir como marcadores de adenocarcinoma (MUKHOPADHYAY; KATZENSTEIN, 2011).

O carcinoma de células escamosas é responsável por 20% de todos os casos de câncer de pulmão, o CCE geralmente ocorre na porção central do pulmão, ao longo das principais vias aéreas, e pode formar cavidades quando atinge um tamanho grande (ZHENG, 2016). É ainda dividido nos subtipos: queratinizante, não queratinizado e basalóide (tabela 1). É possível estabelecer o diagnóstico de CCE a partir do reconhecimento de características morfológicas de diferenciação de células

escamosas, incluindo queratinização, formação de pérolas de queratina e pontes intercelulares (BRAMBILLA et al., 2014). Quando o tumor é pouco diferenciado e não permite uma classificação morfológica confiável, marcadores seletivos de células escamosas, como p40, CK5/6, CK5 e p63, são usados para demonstrar a diferenciação escamosa (CONDE et al., 2013).

O Carcinoma de Grandes Células (CGC) corresponde a apenas 3% de todos os casos de câncer de pulmão. CGC representam os casos de CPCNP que são desprovidos de diferenciação específica de linhagem e carecem de evidência morfológica e imuno-histoquímica de adenocarcinoma, SCC ou carcinoma neuroendócrino. O CGC geralmente está localizado periféricamente, volumoso e com aparência necrótica. As células tumorais são grandes e de forma poligonal com núcleos pleomórficos e vesiculares, as células tumorais formam folhas ou ninhos sólidos sem padrão ((MUKHOPADHYAY; KATZENSTEIN, 2011).

Tabela 1. Principais tipos e subtipos de câncer de pulmão.

<i>Carcinoma de Pequenas Células</i>
<i>Carcinoma de Não Pequenas Células</i>
Adenocarcinoma - Adenocarcinoma lepidico Adenocarcinoma acinar Adenocarcinoma papilífero Adenocarcinoma micropapilar Adenocarcinoma sólido Adenocarcinoma mucinoso invasivo Adenocarcinoma coloide adenocarcinoma fetal Adenocarcinoma entérico Adenocarcinoma minimamente invasivo
Carcinoma de Células Escamosas - Queratinizante Não queratinizado Basalóide
Carcinoma de Grande Células

Fonte: Adaptado de ZHENG, 2016.

1.3 HALLMARKS DO CÂNCER

O termo neoplasia significa “novo crescimento” e reflete a proliferação descontrolada de células transformadas. A transformação é um processo de várias

etapas onde células normais adquirem características malignas (KEIBEL; SINGH; SHARMA, 2009). O câncer é um processo multifatorial e, que apesar das diferenças encontradas nos diversos tipos de tumores, é possível agrupar o conjunto de alterações funcionais que levam a malignidade, assim tem-se estabelecido os *hallmarks*, ou seja, marcas registradas presentes no câncer (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

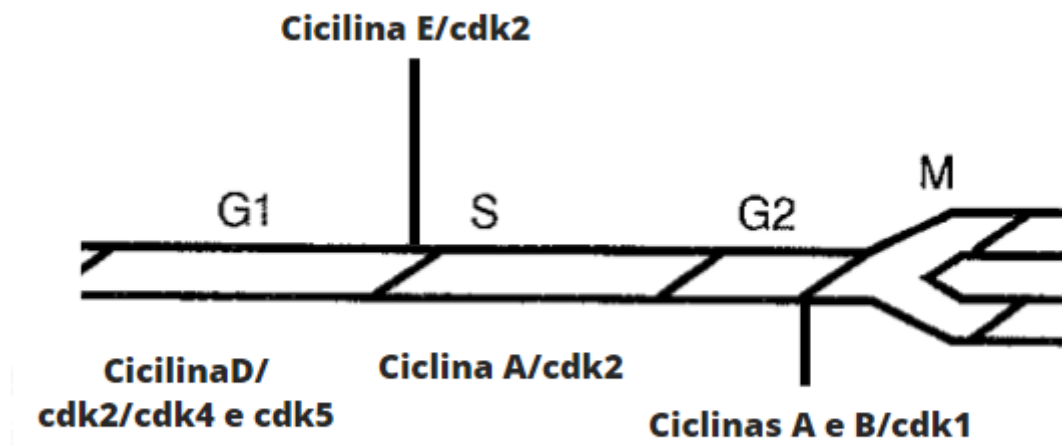
Os *hallmarks* do câncer incluem: Instabilidade e mutação do genoma; resistência a morte celular; desregulação do metabolismo celular; sustentação da sinalização proliferativa; ativação da invasão e metástase; evasão dos supressores de tumor; evasão imunológica; habilitação da imortalidade replicativa; indução ou acesso a vascularização e; inflamações promotoras de tumor (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Em 2022, Hanahan propôs ainda quatro novas marcas em potencial que podem vir a ser incluídas nos hallmarks, são elas: desbloqueio da plasticidade fenotípica; reprogramação epigenética não-mutacional; presença de microbiomas polimórficos; e a presença de células senescentes (HANAHAHAN, 2022).

Em homeostase, as células do corpo humano permanecem em um estado quiescente, a transição das células de um estado inativo para uma fase ativa do ciclo celular, onde há a replicação de seu DNA, é controlada por pontos de verificação, também conhecidos como *checkpoints*. Os pontos de verificação do ciclo celular possuem a capacidade de gerar sinais em resposta a erros no processo de replicação do DNA. Para garantir a transmissão precisa de suas características genéticas, as células interrompem o ciclo celular em pontos específicos até que os reparos necessários sejam realizados (KAR, 2016).

As células que sofreram danos no DNA, quando param no checkpoint presente na fase G1 não conseguem iniciar a sua replicação. Já as células que apresentam danos mais tardios, ao parar no checkpoint da fase G2 não conseguem entrar em mitose (MURRAY, 1994). Estes checkpoints são regulados por complexos proteicos que consistem em uma ciclina e uma quinase dependente de ciclina (CDKs). Em G1, a ciclina D é produzida e interage com cdk2, cdk4 e cdk5. A ciclina E é eficaz na transição da Fase G1-S, já a ciclina A é eficaz durante a fase S e a transição G2/M. porém a ciclina B é a principal ciclina envolvida na regulação da transição G2/M (figura 1) (CROMPTON; SAYDAN, 1994). Quando há dano celular irreparável, para impedir a origem de células mutantes, o organismo induz a morte destas células danificadas. Em células cancerígenas, o controle destes *checkpoints*

pode deixar de ser funcional, levando à proliferação descontrolada (KAR, 2016).

Figura 1: Controle do Ciclo Celular



Controle do ciclo celular mostrando os complexos ciclina/cdk e as fases do ciclo celular regulada por estes complexos.

Fonte: Adaptado de CROMPTON; SAYDAN, 1994.

1.4 MECANISMOS DE MORTE CELULAR

1.4.1 Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular programada importante para manutenção da homeostase tecidual. Este processo é caracterizado por encolhimento celular, condensação da cromatina (picnose) e formação de corpos apoptóticos (GREEN; LLAMBI, 2015). A apoptose pode ser desencadeada por duas vias: (i) via extrínseca, no qual as interações mediadas por receptores transmembrana iniciam o processo de apoptose, e a sequência de eventos resulta na ativação da caspase-8; e (ii) via intrínseca, no qual os estímulos causam alterações na membrana mitocondrial interna, o que resulta na perda do potencial transmembrana e liberação de proteínas pró-apoptóticas. Estas proteínas incluem o citocromo c (Cit C), uma molécula que se liga ao fator 1 de ativação da protease apoptótica (Apaf-1) e pró-caspase-9, formando o apoptossoma, que posteriormente resulta na ativação da caspase 9. Ambos os caminhos convergem em uma via de execução, onde a Caspase-3 é ativada por qualquer uma das caspases iniciadoras

(caspase-8, caspase-9 ou caspase-10) (figura 2), a ativação da caspase 3 resulta em eventos como ativação de endonuclease, degradação do DNA cromossômico, ativação de protease e degradação de proteínas nucleares e do citoesqueleto, culminando nas alterações citomorfológicas características da apoptose (ELMORE, 2007; D'ARCY, 2019).

A integridade da membrana mitocondrial é regulada pela família de proteínas Bcl2. Os membros da família BCL-2 se dividem em pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim e Hrk) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1). Bax quando ativada forma um complexo multiproteico denominado poro de transição de permeabilidade (PTP), que é capaz de criar uma abertura que atravesse ambas as membranas mitocondriais até que haja o rompimento da membrana externa (D'ARCY, 2019).

1.4.2 Necrose

Ao contrário da apoptose, a necrose é uma forma de morte celular descontrolada onde a célula é danificada tão severamente por um choque súbito (radiação, calor, produtos químicos, hipóxia, etc.) que é incapaz de manter seu funcionamento. Quando danificada, há o rompimento da membrana celular, o conteúdo liberado pela célula nas áreas circundantes resulta em uma cascata de inflamação e dano tecidual (figura 2) (D'ARCY, 2019)

1.4.3 Piroptose

A piroptose é outra forma de morte celular programada que depende da ativação de caspases, quando ativada, a caspase-1 induz a maturação e secreção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, a morte celular ocorre como resultado da formação de poros membranosos regulados por gasdermina D (GSDMD) na membrana plasmática (figura 2). Este processo eventualmente leva a lise osmótica com liberação de conteúdo intracelular inflamatório. A caspase 1 é ativada por vários inflamassomas, complexos multiproteicos que se montam em resposta a PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) e DAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Dano) (SHI; GAO; SHAO, 2017).

A piroptose pode ainda ocorrer através de vias alternativas. As caspases-4/5/11 são reconhecidas pelo polissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas no citoplasma, que então levam à piroptose pela clivagem de

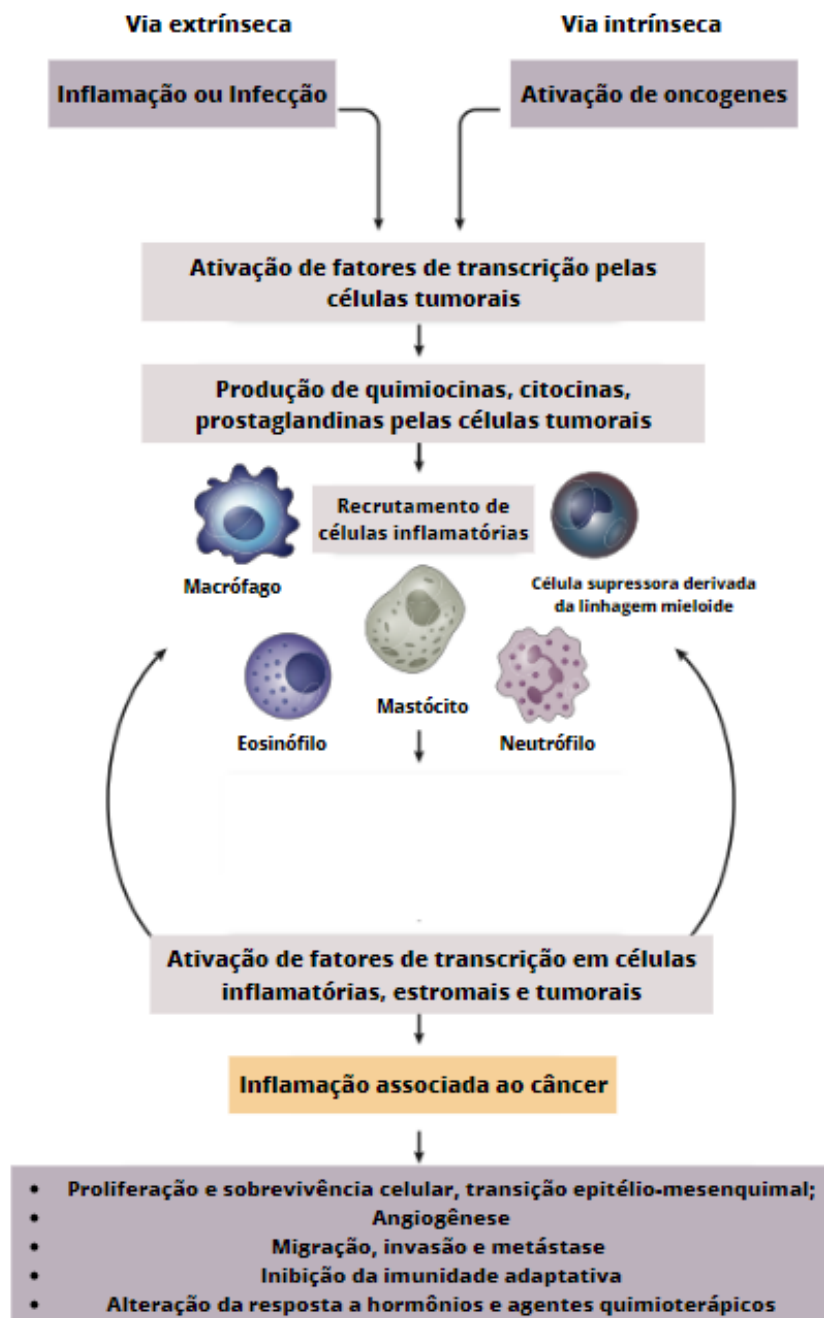
que impulsiona o início e o desenvolvimento da carcinogênese (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Hoje, sabe-se que a inflamação crônica desempenha um papel fundamental na mediação do início do câncer, proliferação celular, invasão, angiogênese e metástase (QIAN; GOLUBNITSCHAJA; ZHAN, 2019) .

A inflamação crônica associada ao câncer é caracterizada pela presença contínua de citocinas majoritariamente anti-inflamatórias, quimiocinas, ROS (espécies reativas de oxigênio), oncogenes, e ativação de importantes fatores de transcrição como NF- κ B (fator nuclear κ B) e STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), AP-1 (proteína ativadora 1) e HIF-1 α (fator induzível por hipóxia 1 α) (SETHI et al., 2011).

A conexão entre câncer e inflamação pode ser explicada através da ação de duas vias: a via intrínseca e a via extrínseca. A via extrínseca consiste em condições inflamatórias ou infecciosas que aumentam o risco de desenvolver câncer em determinados locais anatômicos, principalmente aqueles que estão mais expostos a partículas externas e agentes irritantes, como é o caso do pulmão. Já a via intrínseca é ativada por alterações genéticas que causam neoplasia. Esses eventos incluem a ativação de vários tipos de oncogenes por mutação, rearranjo ou amplificação cromossômica e a inativação de genes supressores de tumor. As células que são transformadas dessa maneira produzem mediadores inflamatórios, e diferente da via extrínseca, gera assim um microambiente inflamatório em tumores para os quais não há condição inflamatória subjacente (MANTOVANI et al., 2008., ZHAO et al., 2021).

Ambas as vias convergem em uma via comum onde há a ativação de fatores de transcrição, principalmente de NF- κ B, STAT3, HIF1 α , em células tumorais. Esses fatores de transcrição coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, bem como a produção de ciclooxigenase 2 (COX2). Esses eventos resultam no recrutamento e ativação de leucócitos, principalmente células da linhagem mielomonocítica. As citocinas ativam os mesmos fatores-chave de transcrição em células inflamatórias, células estromais e células tumorais, resultando na produção de mais mediadores inflamatórios e na geração de um microambiente inflamatório relacionado ao câncer (figura 3) (MANTOVANI et al., 2008., ZHAO et al., 2021).

Figura 3: Vias que conectam a inflamação ao câncer.



Fonte: Adaptado de MANTOVANI et al., 2008.

1.5.1 Inflamação e Câncer de Pulmão

Estudos epidemiológicos mostram que pacientes com doença crônica possuem um risco aumentado de desenvolver um câncer. O pulmão é um órgão aberto, onde ocorrem as trocas gasosas. Devido à sua estrutura fisiológica e função, é facilmente afetado por um grande número de patógenos, poluentes, oxidantes, gases e qualquer outra partícula, inalados do ar (TAN *et al.*, 2021).

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma bronquite crônica e/ou enfisema caracterizada por obstrução do fluxo aéreo, a doença está associada a reações inflamatórias anormais causadas por gases e partículas nocivas, apresentando alta morbidade e mortalidade. Diferentes fatores observados em pacientes com DPOC resultam em um risco aumentado de desenvolver carcinoma pulmonar, por exemplo: a hipóxia causada pela doença, nos pulmões leva a ativação de fatores de transcrição hipóxicos que possuem a capacidade de inibir a apoptose. Além disso, o dano pulmonar causado pela inflamação crônica aumenta o dano endógeno ao DNA, aumentando assim o risco de carcinogênese. (SOHAL; WALTERS, 2017)

O tabagismo é a principal causa de inflamação pulmonar crônica e lesão pulmonar. Ao mesmo tempo, os carcinógenos presentes no tabaco possuem a capacidade de aumentar o estresse oxidativo dos tecidos e causam inflamação tecidual. Quando a fumaça do cigarro entra nos pulmões, tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo é ativado, resultando em redução da depuração dos cílios da mucosa, infiltração da parede das vias aéreas por linfócitos, ativação de células imunes e liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias. (QIAN; GOLUBNITSCHAJA; ZHAN, 2019). A presença constante desses eventos desencadeia alterações genéticas e epigenéticas necessários para o início e a progressão do câncer.

1.5.2 Microambiente Tumoral (MAT) e Macrófagos Associados ao Tumor

O tumor se desenvolve em um microambiente extremamente complexo, composto por células tumorais, células do sistema imune, células endoteliais vasculares, fibroblastos associados ao tumor, matriz extracelular (MEC) e suas enzimas degradantes e fatores de crescimento. Em doenças inflamatórias crônicas e

inflamações latentes causadas por tumores, a inflamação tem grande impacto na composição do MAT, especialmente na plasticidade de tumores e células estromais (TAN *et al.*, 2021).

Dependendo das células e fatores presentes, o MAT pode apresentar atividades pró e anti-tumorais, ou como apresentado por DUAN (2020), pode apresentar um perfil mais frio ou quente. Os tumores quentes são aqueles onde há infiltração de células T e ativação do sistema imune com liberação de citocinas pró-inflamatórias, enquanto os tumores frios são caracterizados pela falta ou exclusão dessa inflamação, o que acaba beneficiando o tumor. (DUAN *et al.*, 2020) Dentre as células do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral, pode-se destacar os macrófagos associados ao tumor (TAM), células T reguladoras (Treg), linfócitos TCD8+ e CD4+, assim como células Natural Killer (NK) (MANSOURI *et al.*, 2022).

Os macrófagos são células do sistema imune inato que possuem diversas funções no organismo, essas funções incluem: defesa imune não específica, vigilância imune, processamento e apresentação de antígenos, efeitos imunomoduladores e participação na inflamação. O MAT tem a capacidade de recrutar tanto os macrófagos infiltrantes quanto aqueles residentes, onde ambos passam a ser macrófagos associados ao tumor (TAMs) (BAGHBAN *et al.*, 2020).

Dependendo do estímulo presente no MAT, os macrófagos podem ser polarizados em M1 ou M2. Na presença de hipóxia, falta de nutrientes e estresse metabólico, as células presentes no MAT entram em apoptose e liberam sinais para recrutamento de mediadores inflamatórios, isso resulta na ativação de macrófagos M1, ou pró-inflamatórios. No entanto, na inflamação crônica, há a liberação de mediadores anti-inflamatórios, visando defender o organismo de um processo inflamatório exacerbado, no câncer isso é benéfico para o tumor. Ao receber estes sinais, os macrófagos M1 são agora polarizados para um fenótipo M2, onde liberam fatores anti-inflamatórios como IL-10 e TGF- β , que possuem um importante papel na angiogênese, remodelação tumoral e imunossupressão (ZOU *et al.*, 2023).

Nas fases iniciais do tumor, o MAT possui uma maior população de macrófagos M1, enquanto em tumores mais avançados encontra-se mais macrófagos M2, sugerindo um processo de repolarização. Esse fenômeno seria explicado pela presença de citocinas e quimiocinas presentes no microambiente em cada fase do tumor, no início do tumor há liberação de fatores pró-inflamatórios,

enquanto em fases mais tardias, fatores anti-inflamatórios participam na manutenção e progressão tumoral (BOUTILIER; ELSAWA, 2021).

1.5.3 Citocinas Inflamatórias Associadas ao Câncer de Pulmão

No microambiente tumoral, o balanço de citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias é importante para alguns processos como, por exemplo, o recrutamento, migração e polarização de macrófagos. Os principais fatores inflamatórios relacionados ao câncer de pulmão incluem: IL-1 β , IL-6, TNF- α , e o fator transformador de crescimento (TGF)- β (TAN *et al.*, 2021; ZOU *et al.*, 2023).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória que tem um papel essencial na resolução da inflamação aguda. No entanto, no tumor, a IL-1 β pode desempenhar papéis ambíguos, podendo ter atividade anti ou pró-tumoral. Pacientes com níveis séricos elevados de IL-1 β geralmente apresentam um mau prognóstico, isso acontece porque estes altos níveis estão relacionados ao desenvolvimento de: inflamação crônica sem resolução, ativação de células endoteliais e angiogênese. O que resulta em supressão da imunidade adaptativa, promoção do tumor e metástase (MANTOVAN *et al.*, 2017).

Por outro lado, a IL-1 β possui efeitos anti tumorais através da indução de respostas imune tipo 1 e 17 que leva a ativação de vias de morte celular. Hoje já existem diversos estudos onde é avaliado o potencial da IL-1 recombinante para induzir efeitos anti tumorigênicos. Como mostrado pelos estudos compilados por BENT *et al.*, a injeção intratumoral de IL-1a resultou na regressão de diferentes tipos de tumores, incluindo sarcoma, melanoma e adenocarcinoma, além disso, foi demonstrado que camundongos com depleção de células T não mostraram sinais dessa regressão tumoral induzida por IL-1, o que sugere que a IL-1 é essencial para a expansão das células T específicas do antígeno tumoral (BENT *et al.*, 2018).

Outra importante citocina pró-inflamatória é a IL-6. A liberação em excesso de IL-6 em resposta a um estímulo inflamatório é capaz de ativar o transdutor de sinal da janus quinase 2 (JAK2) e o ativador da via de sinalização da transcrição 3 (STAT3), essa via é uma das principais vias de transdução de sinal nas células, sendo essencial na proliferação e diferenciação celular (HUANG; LANG; LI, 2022).

Existem diversos estudos sobre a inibição da IL-6 e de outras vias de

sinalização em câncer de pulmão, Caetano et.al descobriu que IL-6 está superexpresso em um modelo de camundongo com câncer de pulmão mutante K-ras e no câncer de pulmão humano. O uso de anticorpos monoclonais anti-IL-6 consegue reduzir o efeito da inflamação no câncer de pulmão (CAETANO et al., 2016).

A IL-6 está aumentada no soro de pacientes com adenocarcinoma de pulmão. Níveis séricos muito elevados estão relacionados a um mau prognóstico. Além disso, foi demonstrado que após tratamento quimioterápico, os níveis séricos de IL-6 de pacientes com CPNPC diminuem significativamente, o que está relacionado a diminuição de recorrência e prolongamento da sobrevida dos pacientes (HUANG; LANG; LI, 2022). Yamaji e colaboradores ainda mostrou que 8 de 15 linhagens celulares de câncer de pulmão expressam mRNA de IL-6, sugerindo que a superexpressão pode interromper o equilíbrio de citocinas e enfraquecer a imunidade antitumoral de pacientes com câncer de pulmão (YAMAJI et al., 2004).

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

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

resistência a apoptose e quimiorresistência (SAITO; HORIE; NAGASE, 2018).

1.6 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA O CÂNCER DE PULMÃO

Segundo o último levantamento do Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), utilizando dados de 2008 a 2012, a taxa de sobrevivência 5 anos após o diagnóstico de pacientes com câncer de pulmão, no Brasil, é de apenas 12,6%. O câncer de pulmão pode ser tratado por diferentes métodos, como a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, e mais recentemente através do uso da imunoterapia. Podendo uma única opção ser o suficiente ou, se necessário, fazer uso de terapia combinada de duas ou mais opções. O principal tratamento para casos de CPCNP em estágio I e II é a cirurgia, para os pacientes que têm doença localmente avançada com impossibilidade cirúrgica, a radioterapia em combinação com a quimioterapia é a opção mais recomendada (American Cancer Society, 2020).

Em casos avançados de CPCNP, onde um tratamento localizado não é mais suficiente e há a necessidade de um tratamento sistêmico, se faz uso de terapias complementares a cirurgia, o esquema terapêutico a base de cisplatina ou carboplatina e o etoposídeo, são a primeira linha de escolha (GRAHAM et al., 2017).

A cisplatina, apesar de ser um dos primeiros quimioterápicos produzidos, atualmente segue tendo atividade anti-tumoral em diversos tipos de tumores sólidos, são alguns deles: câncer de testículo, de bexiga, pulmão e ovários. A cisplatina age principalmente no DNA de células tumorais, quando penetra a célula, tem a capacidade de trocar duas de suas moléculas de cloro por H₂O causando diferentes tipos de lesões irreversíveis no DNA, levando à formação de adutos. Essas alterações levam à inibição da transcrição e replicação, que culminam na ativação da apoptose dependente ou independente de p53 em células tumorais (ALI et al., 2022).

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

Hoje, uma abordagem mais personalizada, ou seja, uma terapia alvo que é

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

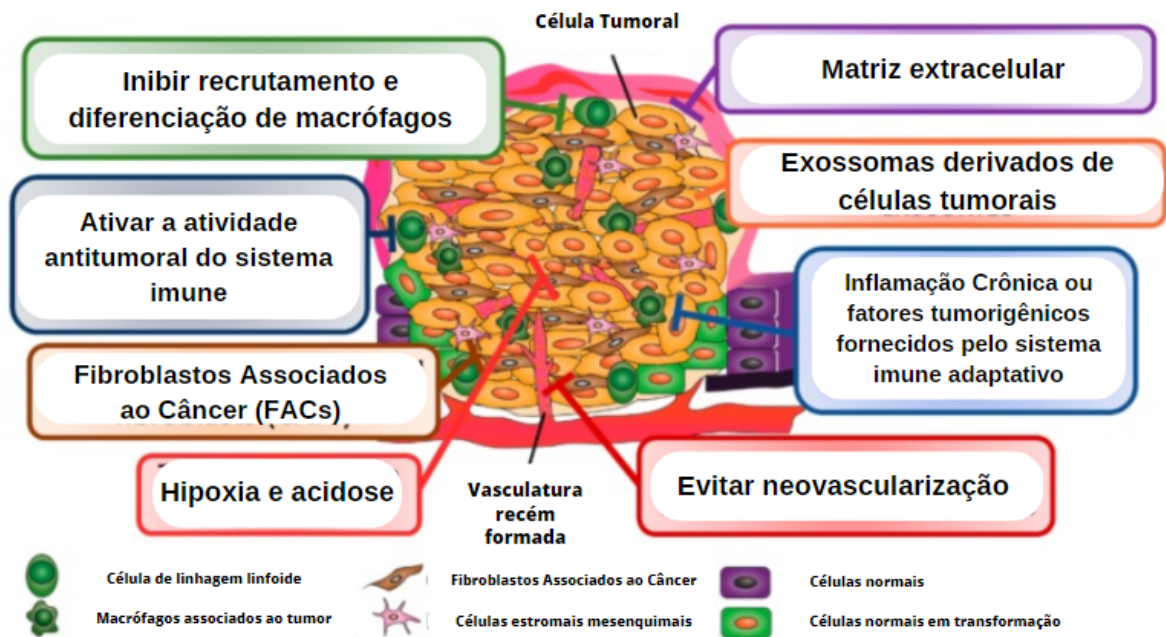
Outra opção terapêutica que vem sendo estudada com afinco nos últimos anos é a imunoterapia. Com o avanço nos estudos sobre a atividade antitumoral do sistema imune, a imunoterapia vem com a premissa de estimular o sistema imunológico a desenvolver respostas mais eficazes contra as células cancerígenas.

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

Os anticorpos monoclonais imunomodulatórios podem atuar diretamente sobre alguns alvos específicos, como o receptor de morte celular programada 1 (PD-1) e a proteína ligante de morte programada-1 (PDL-1). Para câncer de pulmão, os anticorpos monoclonais imunomodulatórios Nivolumabe e pembrolizumabe, agem justamente nesses alvos. Estes agentes imunoterápicos já são aprovados como um tratamento para pacientes com CPCNP avançado. Eles atuam na ligação entre o PD-1 dos linfócitos e o PDL-1 das células tumorais, impedindo o bloqueio da atividade citotóxica da célula T (SHROFF et al., 2018).

Além das opções já disponíveis, hoje inúmeras pesquisas estão voltadas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que têm como alvo os componentes do microambiente tumoral. Sabe-se que o microambiente tumoral é extremamente complexo e heterogêneo, assim diversas estratégias, visando diferentes alvos estão sendo desenvolvidas, como esquematiza a figura 4.

Figura 4 - Alvos terapêuticos no microambiente tumoral.



Fonte: adaptado de ROMA-RODRIGUES et al., 2019

Dentre esses alvos, destacam-se os estudos voltados aos macrófagos associados ao tumor. Para os TAMs, as estratégias estão focadas na inibição do recrutamento e diferenciação de macrófagos. As células supressoras derivadas de mielóide (MDSCs) são células mielóides imaturas que possuem um papel importante na resposta imune contra tumores. As MDSCs são precursoras de células dendríticas, macrófagos e granulócitos, e podem se diferenciar em TAMs em condições hipóxicas (GAO et al., 2023).

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

O fator estimulador de colônias de macrófagos M-CSF (CSF-1) é um potente

fator de crescimento de monócitos/macrófagos. ZHU et. al mostrou que bloqueio da sinalização CSF1/CSF1R pelos inibidores GW2850 e PLX3397 CSF1R ou por anti-CSF-1 bloqueou o recrutamento de TAM e MDSC, além disso também matou TAMs CD206 high e reprogramou os TAMs restantes para um fenótipo mais antitumoral em murinos com adenocarcinoma ductal pancreático. O tratamento anti-CSF1 quando combinado com imunoterapia anti-PD-1/anti-CTLA4 e gencitabina, mostrou regressão completa do tumor em 30% dos camundongos e uma regressão média do tumor de 85% (ZHU et al., 2014).

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

A repolarização de macrófagos M2 em macrófagos M1 também é uma opção de terapia anti-tumoral. A partir da repolarização, há uma redução de fatores imunossupressores no microambiente tumoral, o que antagoniza o tumor (SZE BENI et al., 2016). O tratamento in vivo com IL-12 alterou o perfil dos TAMs, mudando seu fenótipo que apresentava altos níveis de IL-10 e TGF- β , para um fenótipo com alta liberação de TNF- α em um modelo murino de câncer de pulmão (WATKINS et al., 2007). O composto hidrazinocurcumina alcançou resultados similares através da inibição de STAT3, o que resultou na repolarização de TAMs para um fenótipo que expressa altas quantidades de IL-12 e baixas de IL-10 e TGF- β (ZHANG et al., 2013).

Diferentes mecanismos como imunossupressão, angiogênese e metástase, responsáveis pela progressão do câncer estão relacionados à inflamação. Nesse contexto, é de extrema importância compreender de forma mais aprofundada os efeitos da interação dos mediadores inflamatórios liberados pelos macrófagos no câncer de pulmão. Assim, o presente estudo através do uso de meios condicionados por macrófagos, visou investigar, *in vitro*, o efeito de um microambiente pró-inflamatório e da sua associação com a cisplatina no câncer de pulmão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* os efeitos do microambiente pró-inflamatório no câncer de pulmão isolado ou associado à cisplatina.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito citotóxico nas células de câncer de pulmão após serem expostas ao meio condicionado;
- Avaliar o efeito na morte celular das células de câncer de pulmão após serem expostas ao meio condicionado através da expressão dos genes Caspase 3, Caspase 1 e BAX;
- Investigar o efeito no ciclo celular das células de câncer de pulmão após serem expostas ao meio condicionado;
- Avaliar o efeito citotóxico sinérgico da cisplatina e do meio condicionado nas células de câncer de pulmão;

3 METODOLOGIA

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

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

3.2 CULTURA CELULAR

Foram utilizadas as linhagens celulares de câncer de pulmão de células não pequenas A549 e NCI-H1299; assim como a linhagem U937 de monócitos humanos imortalizados. As células A549 e NCI-H1299 foram cultivadas (10^6 células/mL) em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal, 10 mM de HEPES e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina, ou seja, meio RPMI completo, e incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Já as células U937 foram semeadas ($2,5 \times 10^5$ células/ml) em suspensão e cultivadas em meio RPMI completo e incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingir a confluência necessária.

3.2.1 Obtenção das Linhagens Celulares

As linhagens celulares de câncer de pulmão de células não pequenas A549 e NCI-H1299, assim como a linhagem U937 de monócitos humanos imortalizados foram adquiridas do Banco de Células do Nupit-SG/UFPE.

3.3 DIFERENCIAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM U937 E PREPARAÇÃO DOS MEIOS CONDICIONADOS (MC)

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

como meio condicionado para linhagens de câncer de pulmão e os macrófagos foram recolhidos para análise do fenótipo por citometria de fluxo.

3.4 ANÁLISE DO FENÓTIPO DOS MACRÓFAGOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para identificar o fenótipo dos macrófagos diferenciados com PMA em associação ao LPS, as células foram coletadas da placa de cultura, foi utilizada a tripsina para promover a desagregação das células do fundo da placa, em seguida a tripsina foi inativada com meio RPMI completo, e as células foram lavadas com PBS (phosphate-buffered saline - salina tamponada com fosfato) e então centrifugadas. As células foram então marcadas com anticorpos para CD80 e CD86, marcadores de macrófagos M1, os anticorpos CD200 e CD206 marcadores de macrófagos M2 e também CD14 e CD11c, marcadores de monócitos, por 30 min a 4°C no escuro e depois lavadas duas vezes e ressuspensas em 500 µL de PBS. As células foram analisadas no citômetro BD FACSAria II (BDbiosciences) e analisadas usando o software BD FACSDiva (BDbiosciences).

3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES BAX, CASPASE 3 E CASPASE 1

3.5.1 Grupos de Tratamento

A linhagem NCI-H1299 foi semeada em placas de 12 poços, na densidade de 5×10^4 células por poço em 500uL de meio RPMI completo por 24 horas. Após as células aderirem e atingirem a confluência de 70% foram tratadas, houve os seguintes grupos de tratamento:

1. Não tratado 24h: o meio gasto foi trocado por 500uL de meio RPMI completo novo e então incubado por 24h, após o tempo de tratamento as células foram recolhidas em trizol e posteriormente foi feita a extração do RNA;
2. Não tratado 5% 24h: o meio gasto foi trocado por 500uL de meio RPMI contendo 5% de soro fetal bovino e então incubado por 24h, após o tempo de tratamento as células foram recolhidas em trizol e posteriormente foi feita a extração do RNA;

3. Meio Condicionado 24h: o meio gasto foi trocado por 500uL de Meio condicionado suplementado com 5% de soro fetal bovino e então incubado por 24h, após o tempo de tratamento as células foram recolhidas em trizol e posteriormente foi feita a extração do RNA;
4. Meio Condicionado + cisplatina 24h: o meio gasto foi trocado por 500uL de Meio condicionado suplementado com 5% de soro fetal bovino + Cisplatina na dose do IC50 e então incubado por 24h, após o tempo de tratamento as células foram recolhidas em trizol e posteriormente foi feito a extração do RNA;

3.5.2 Extração de RNA

Para a extração de RNA, as amostras ressuspensas em 700 uL de Trizol foram incubadas em temperatura ambiente durante 5 minutos para promover a completa dissociação do complexo de proteínas do núcleo. Em seguida foi adicionado 150 uL de clorofórmio e centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação foi recolhido o sobrenadante e adicionado 375 uL de isopropanol 100%, a amostra foi então centrifugada a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. Após a segunda centrifugação, o pellet foi lavado com 750 uL de etanol a 75%. Após a evaporação do etanol a 75%, o pellet foi reidratado com 30uL de RNase free e feita a quantificação no nanodrop.

3.5.3 Síntese de DNA complementar

Após a extração do RNA, cada amostra foi submetida à obtenção de cDNA utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi quantificado e armazenado a – 80°C para posterior utilização na detecção e quantificação dos genes pela técnica de PCR.

3.5.4 Análise da Expressão dos Genes - Caspase 1, Caspase 3 e Bax e TNF- α

O ensaio para se obter a expressão dos genes: BAX (Hs00180269_m1), CASP3 (Hs00234387_m1) e CASP1 (Hs00354836_m1) foi feito utilizando a sonda específica para cada gene TaqMan®, de acordo com as instruções do fabricante. Para normalização, foi usado o gene endógeno GAPDH (Hs02786624_g1). Para

essa reação foram utilizados 5 ng de cDNA, Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) e água ultrapura, para um volume final de 10 µL. Os experimentos foram realizados em Real-Time PCR usando QuantStudio Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific).

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

3.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico baseado na conversão do sal MTT em cristais de formazan. As células neoplásicas NCI-H1299 foram semeadas na concentração de 5×10^3 células/100µl em placas de 96 poços. Após 24h as células foram estimuladas, houve os seguintes grupos de tratamento:

1. NT - células não tratadas;
2. MC 5% - Meio condicionado suplementado com 5% de soro fetal bovino, levando em consideração que o Meio Condicionado é suplementado com 5% de soro fetal bovino;
3. NT 5% - Meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino;
4. Cisplatina nas concentrações de 10µM e 50µM;
5. Cisplatina nas concentrações de 10µM e 50µM + MC 5%.

Após 72h de tratamento, foi adicionado o sal MTT e levado novamente para a estufa por mais 3 horas, para então ser adicionado o SDS (sodium dodecyl sulfate). As leituras foram feitas após 24h em espectrofotômetro de placa, a 570 nm.

3.7 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

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

NT - Células não tratadas incubadas com meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino;

NT 5% - Células não tratadas incubadas com meio RPMI contendo 5% de soro fetal bovino;

MC - Meio condicionado contendo 5% de soro fetal bovino;

Cis 10 μ M - Cisplatina na dose de 10 μ M

Cis 10 μ M + MC - Cisplatina na dose de 10 μ M em associação ao meio condicionado contendo 5% de soro fetal bovino.

Após 48h de tratamento, as células foram marcadas com Iodeto de Propídeo (eBioscience), de acordo com as especificações do fabricante e utilizando-se o equipamento Accuri C6 (BD Biosciences). A análise dos resultados foi realizada pelo software FlowJo-V10, o qual permite calcular a percentagem de células em cada fase do ciclo celular.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

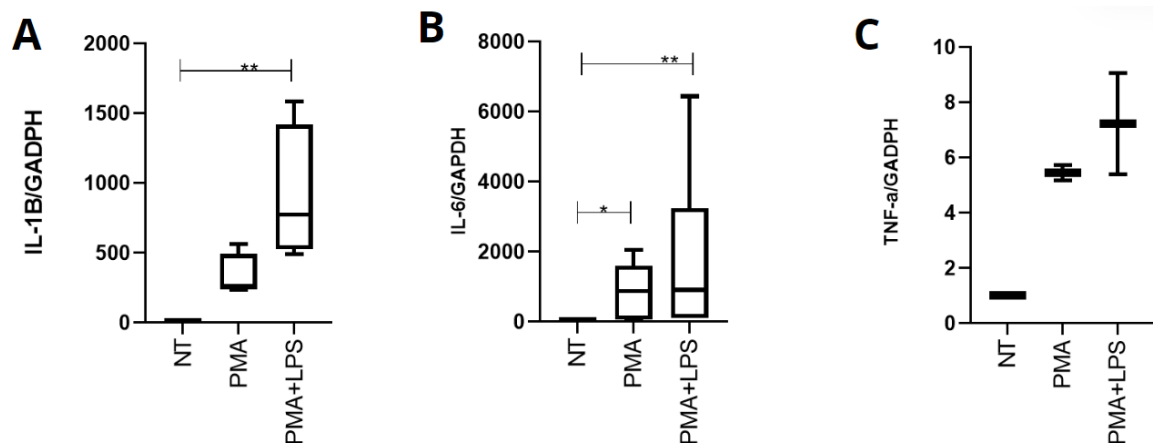
O software *GraphPadPrism* versão 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado para o tratamento estatístico dos dados. Para os resultados que obedecerem a distribuição normal, foi utilizado o teste paramétrico t (Student). Já para os resultados não-paramétricos, o teste utilizado foi o de qui-quadrado (χ^2). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Os macrófagos diferenciados com PMA + LPS apresentam um perfil M1 ou pró-inflamatório

Para caracterização do meio condicionado produzido pelos macrófagos estimulados com PMA e LPS, foi avaliado a expressão das principais citocinas pró-inflamatórias produzidas. Observou-se um aumento significativo da expressão de IL-1 β nas células estimuladas com PMA+LPS comparado às células não estimuladas ($p<0.0039$) (figura 5A). Adicionalmente, foi verificado que tanto as células estimuladas apenas com PMA ($p<0,0118$) quanto com o estímulo duplo (PMA+LPS) ($p<0,0028$) induziu um aumento significativo da expressão da citocina para IL-6 (figura 5B). Além disso, foi observado nos resultados preliminares, um aumento da expressão de TNF- α tanto nas células estimuladas apenas com PMA quanto com o PMA em associação ao LPS (figura 5C), mais ensaios precisam ser realizados para confirmar a expressão desta citocina.

Figura 5: Expressão dos fatores inflamatórios após exposição ao meio condicionado



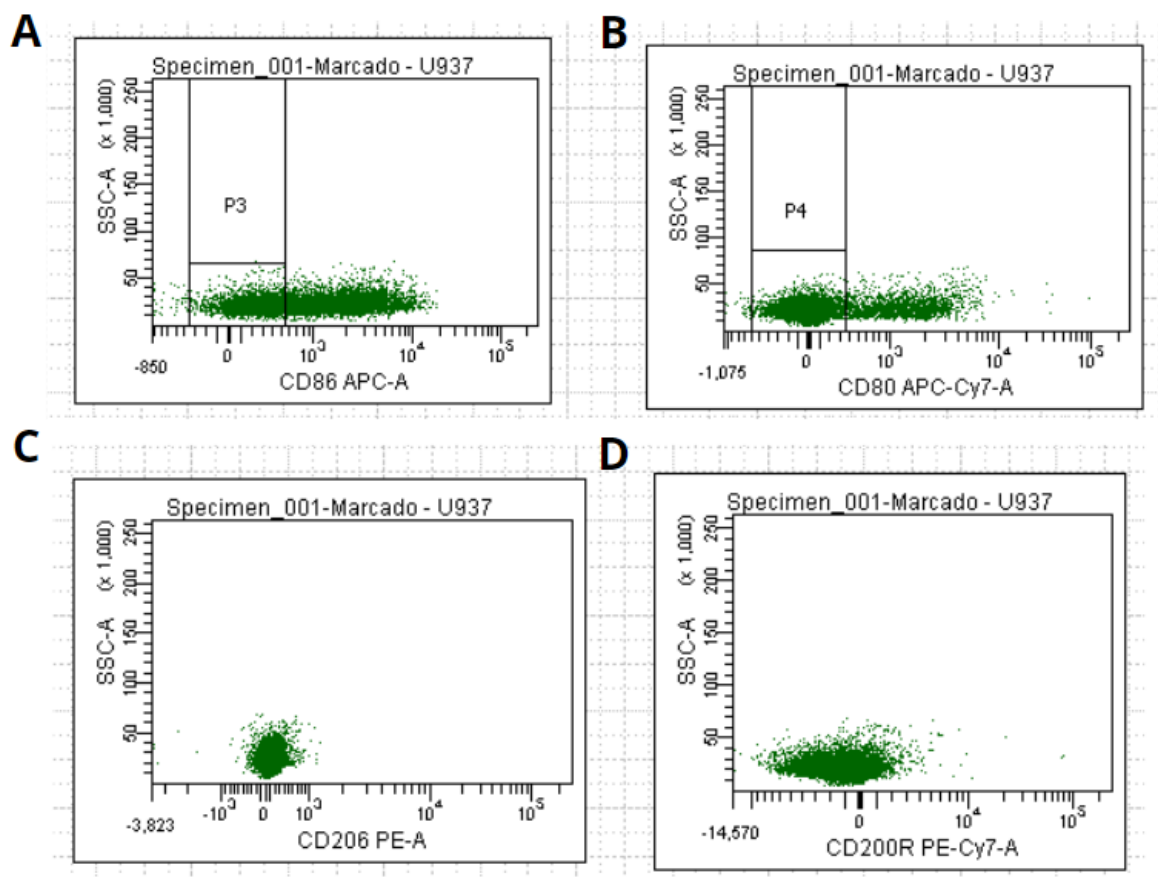
A. Expressão de IL-1 β na linhagem U937 após estímulo com PMA ou PMA + LPS.
 B. Expressão de IL-6 na linhagem U937 após estímulo com PMA ou PMA + LPS.
 C. Expressão de TNF- α na linhagem U937 após estímulo com PMA ou PMA + LPS. (* $P<0,05$, ** $P<0,01$).

Fonte: A autora, (2023).

Para confirmar o perfil dos macrófagos diferenciados utilizando o PMA+LPS foi realizada uma citometria de fluxo, onde foi possível observar a presença dos

marcadores CD80 e CD86 (Figura 6A e B), confirmando o perfil M1, ou seja, pró-inflamatórios dos macrófagos. Foram ainda utilizados os marcadores para macrófagos M2 (CD200 e CD206) (Figura 6C e D) e para monócitos (CD14 e CD11c), onde todos foram negativos. Os macrófagos do tipo M1 estão em maior proporção no início do tumor e atuam inicialmente suprimindo o crescimento de células tumorais no microambiente tumoral, isso ocorre através do recrutamento de células TCD8 e células Natural Killer (NK) (BOUTILIER; ELSAWA, 2021). Macrófagos com esse perfil secretam ainda altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa, IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23, além da produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (SEDIGHZADEH et al., 2021).

Figura 6: Marcação dos macrófagos por citometria de fluxo



A e B: Macrófagos exibindo marcação positiva para os marcadores M1, CD86 e CD80. C e D: Macrófagos exibindo marcação negativa para os marcadores M2, CD206 e CD200.

Fonte: A autora, (2023).

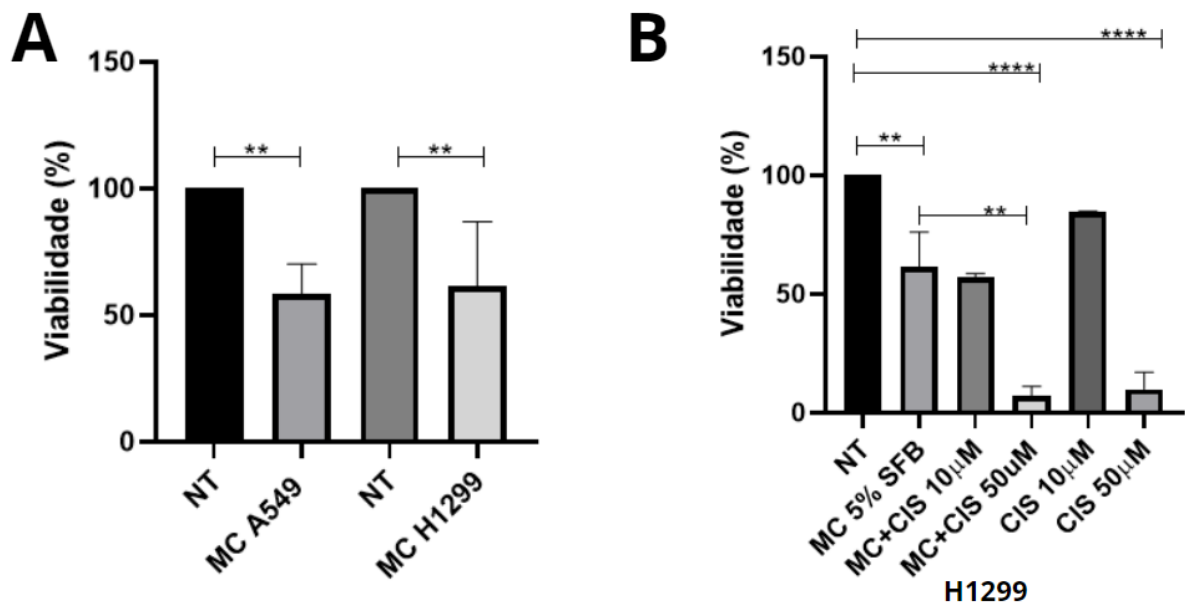
4.2 A exposição ao meio condicionado reduziu a viabilidade celular das linhagens de carcinoma pulmonar H1299 e A549

Para avaliar a ação do meio condicionado pró-inflamatório, a viabilidade celular das linhagens celulares de carcinoma pulmonar A549 e H1299 foi realizado o teste colorimétrico de viabilidade celular, MTT. Os ensaios mostraram que a exposição ao meio condicionado resulta em uma redução significativa na viabilidade celular de ambas as linhagens. Para a H1299, uma linhagem que apresenta deleção parcial da proteína p53, um importante supressor tumoral relacionado ao ciclo celular, a média da redução da viabilidade foi de 61,29%, quando comparado ao grupo controle (células não tratadas) ($p^{**}<0,05$). Já na linhagem A549, que possui o gene Kras mutado, a média na redução na viabilidade celular foi de 59,43% quando comparada ao grupo controle ($p^{**}<0,05$), assim como mostra a figura 7A. Já é conhecido que macrófagos que apresentam um fenótipo M1, possuem papel na imunidade antitumoral e na mediação de processos pró-inflamatórios no microambiente tumoral. Os macrófagos pró-inflamatórios possuem a capacidade de produzir óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, IL-1 e o fator de necrose tumoral (TNF), fatores importantes para a erradicação de microrganismos e na ação tumorocida, juntamente com sua alta capacidade de recrutamento de células TCD8 e apresentação de antígenos (MURRAY; WYNN, 2011; KUMARI; CHOI, 2022).

Para avaliar ainda se o meio condicionado possui algum efeito quando associado à cisplatina, principal fármaco quimioterápico utilizado por pacientes com câncer de pulmão, foram realizados ensaios de MTT, onde as células H1299 foram expostas a cisplatina isoladamente ou em associação ao meio condicionado nas doses de 10 e 50 μ M. No grupo tratado apenas com cisplatina, na dose de 50 μ M, a média da viabilidade celular foi de 9,9%. No grupo tratado com cisplatina 50 μ M em associação ao meio condicionado, a média da viabilidade celular foi de 6,88%, ambos em relação ao grupo controle (figura 7B).

Os resultados evidenciaram que o meio condicionado potencializa a ação da cisplatina na dose de 10 μ M. No grupo tratado isoladamente com cisplatina, a média da viabilidade celular foi de 84,49%, porém no grupo tratado em associação ao meio condicionado, a média da viabilidade celular observada foi de 56,9%, quando comparada às células não tratadas, como mostra a figura 7B.

Figura 7: Efeitos do meio condicionado na viabilidade celular das linhagens de carcinoma pulmonar.



A. Viabilidade celular das linhagens H1299 e A549 quando expostas ao meio condicionado. B. Viabilidade celular da linhagem H1299 após ser exposta ao meio condicionado e da sua associação com a cisplatina nas doses de 10 e 50 µM. NT - Não tratado: grupo controle; MC - Meio condicionado; CIS 10 - Cisplatina 10µM; CIS 50 - Cisplatina 50µM. (**P<0,05, ****P<0,01).

Fonte: A autora, (2023).

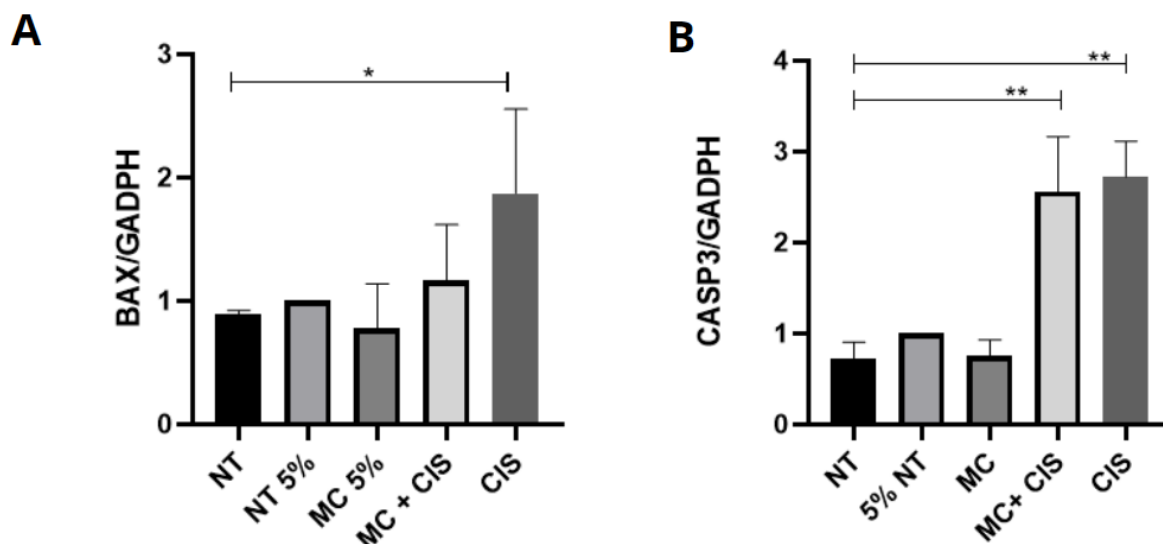
4.3 Avaliação de Genes Apoptóticos após exposição da linhagem H1299 ao meio condicionado

Para identificar qual a via de morte celular responsável pela redução da viabilidade celular na linhagem H1299 após ser exposta ao meio condicionado, foram avaliados através de PCR em tempo real a expressão dos genes apoptóticos caspase 3 e BAX. Como mostrado na figura 8A e B, o meio condicionado sozinho não possui a capacidade de aumentar de forma significativa a expressão de Bax e caspase 3, quando comparado ao grupo controle. Apesar da Bax ser exclusivamente relacionada à via intrínseca da apoptose, a ativação de caspase 3 pode acontecer por qualquer uma das vias.

Além disso, foi possível observar que a cisplatina induziu a expressão de caspase 3 e bax, confirmando que o meio condicionado não modula a expressão destes genes, ou seja, a exposição ao meio condicionado tem um impacto na

viabilidade das células, porém o mecanismo de morte celular relacionado não é a apoptose.

Figura 8: Expressão de genes apoptóticos após exposição ao meio condicionado



A. Expressão de BAX na linhagem H1299 após exposição aos diferentes grupos de tratamento. B. Expressão de Caspase 3 na linhagem H1299 após exposição aos diferentes grupos de tratamento. NT - Não tratado; NT 5% - Não tratado com 5% de Soro fetal bovino; MC 5% - Meio Condicionado com 5% de soro fetal bovino; MC + CIS - Meio condicionado + Cisplatina (Dose IC50); Cisplatina (Dose IC50). (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

Fonte: A autora, (2023).

4.4 A exposição ao meio condicionado associado à cisplatina aumentou a expressão da caspase 1 na linhagem H1299.

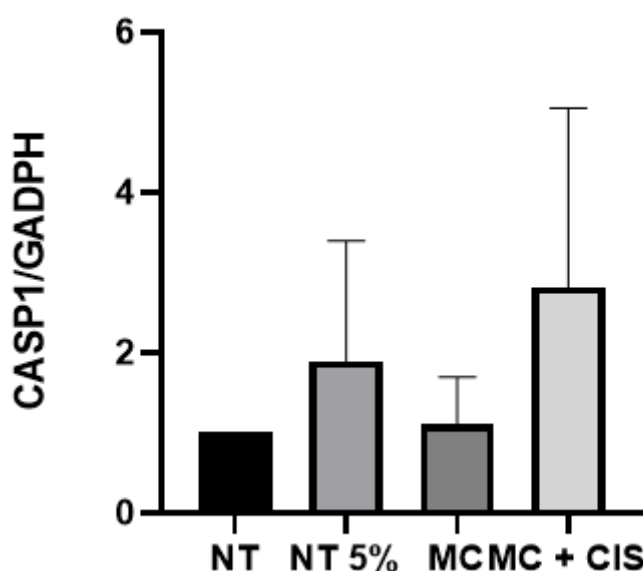
Para avaliar se a redução da viabilidade celular das células de carcinoma pulmonar expostas ao meio condicionado está relacionada à piroptose, foi avaliado a expressão de caspase 1 por PCR em tempo real. Como mostra a figura 9, os resultados preliminares mostraram que o meio condicionado sozinho não aumenta a expressão de caspase 1, no entanto, quando associado à cisplatina, é possível observar um aumento na expressão de caspase 1. Apenas dois ensaios foram feitos para obtenção destes resultados, sendo estes resultados preliminares, mais estudos precisam ser realizados para confirmação.

Como não foi avaliado a expressão de caspase 1 em células H1299 expostas

isoladamente à cisplatina, não foi possível avaliar se o meio condicionado tem a capacidade de potencializar a expressão dessa enzima quando em associação a cisplatina. Além disso, é necessário também avaliar a expressão dos produtos gerados por essa via, como IL-1 β e IL-18, o que não foi possível ser realizado em tempo útil para este trabalho.

Um estudo realizado por Zhang e colaboradores demonstrou que a cisplatina tem a capacidade de induzir piroptose na linhagem de carcinoma pulmonar A549, no entanto, a via relacionada a esse mecanismo de morte não envolve a caspase 1. Foi observado uma expressão aumentada de caspase 3, e esta é clivada pela gasdermina E, gerando um fragmento N-terminal que tem a capacidade de perfurar a membrana plasmática, resultando na piroptose (ZHANG et al., 2019). Assim, a expressão da caspase 1 após o tratamento com cisplatina e o meio condicionado pode estar relacionada diretamente ao meio condicionado. Além disso, ainda há a possibilidade da cisplatina conseguir ativar a piroptose por outra via, além da ativação da caspase 3, novos ensaios precisam ser realizados para confirmação da hipótese.

Figura 9: Expressão da caspase 1 após exposição ao meio condicionado



Expressão de Caspase-1 na linhagem H1299 após exposição aos diferentes grupos de tratamento. NT - Não tratado; NT 5% - Não tratado com 5% de Soro fetal bovino; MC 5% - Meio Condicionado com 5% de soro fetal bovino; MC + CIS - Meio

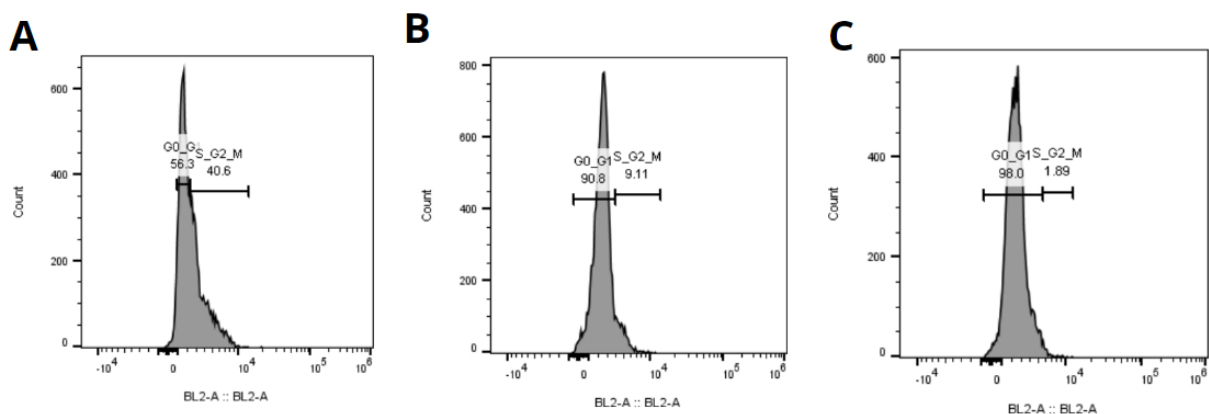
condicionado + Cisplatina (Dose IC50);

Fonte: A autora, (2023).

4.5 O tratamento com meio condicionado associado à cisplatina potencializa a ação do quimioterápico no ciclo celular

Na citometria de fluxo para análise do ciclo celular, no grupo tratado apenas com o meio condicionado observou-se que não houve um aumento significativo de células estacionadas na fase G0/G1 (56%) ou S,G2,M (39,30%) quando comparado ao grupo não tratado (tabela 2). Apesar disso, é possível observar que o tratamento com o meio condicionado associado à cisplatina 10 μ M aumentou o número de células estacionadas na fase G0/G1, comparado a apenas cisplatina (figura 10B e C). Nas células tratadas apenas com cisplatina a porcentagem de células estacionadas na fase G0/G1 foi de 91,8%, enquanto que no grupo tratado com meio condicionado associado à cisplatina essa porcentagem foi de 97,5% (tabela 2), além de observarmos uma redução na porcentagem de células na fase S/G2/M. No entanto, novos ensaios serão realizados para avaliar este efeito do MC no ciclo celular.

Figura 10 - Histograma do ciclo celular da linhagem H1299 após exposição a diferentes grupos de tratamento.



A - Histograma mostrando a distribuição de células nas fases G0/G1 e S/G2/M no grupo controle (Não tratado). B - Histograma mostrando a distribuição de células nas fases G0/G1 e S/G2/M no grupo tratado com cisplatina 10 μ M. C - Histograma mostrando a distribuição de células nas fases G0/G1 e S/G2/M no grupo exposto ao

Meio Condicionado + cisplatina 10 μ M.

Fonte: A autora, (2023).

A cisplatina induz a parada das células na fase G1 do ciclo celular, nas células cancerígenas quando há dano no DNA, o *checkpoint* para induzir a parada da célula na fase G1 é ativado. Essa parada ocorre para a célula tentar reparar o DNA e prosseguir com o ciclo, no entanto, foi demonstrado em um estudo que as células expostas à cisplatina estacionaram na fase G1 antes de morrer (UN, 2007). A associação do meio condicionado à cisplatina resultou em uma potencialização da ação desse quimioterápico no ciclo celular.

Tabela 2: Distribuição do ciclo celular das células H1299 após exposição aos diferentes grupos de tratamento

TRATAMENTO 48H	FASE DO CICLO CELULAR (%)	
	G0/G1	S/G2/M
NÃO TRATADO	54 $\pm$ 3,253	42,65 $\pm$ 2,899
NÃO TRATADO 5% SORO FETAL BOVINO	51,1 $\pm$ 1,414	44,75 $\pm$ 1,485
MEIO CONDICIONADO	56,05 $\pm$ 8,273	39,3 $\pm$ 8,202
CISPLATINA 10 μ M	91,8 $\pm$ 1,414	8,075 $\pm$ 1,464
MEIO CONDICIONADO + CISPLATINA 10 μ M	97,85 $\pm$ 0,070	1,955 $\pm$ 0,091

A tabela apresenta os valores correspondentes a média e o desvio padrão dos resultados.

Fonte: A autora (2023).

Assim, os macrófagos M1 possuem um impacto direto nas células de carcinoma pulmonar. Atualmente, a repolarização de macrófagos M2 em macrófagos M1 vem se mostrando uma opção de terapia antitumoral. A partir da repolarização, há uma redução de fatores imunossupressores no microambiente tumoral, o que antagoniza o tumor (SZE BENI et al., 2016). Além disso, estudos sobre o processo imunológico pelo qual as células imunes inatas adquirem memória imunológica, vem ganhando destaque, sendo os macrófagos importantes componentes para esse

processo de imunidade treinada (OCHANDO et al; 2022). Em suma, o meio condicionado pró-inflamatório apresenta um potencial para o estudo da interação entre mediadores inflamatórios e o câncer de pulmão, além de ajudar na elucidação dos efeitos de imunoterapias voltadas ao microambiente tumoral, especialmente os macrófagos associados ao tumor.

6 CONCLUSÃO

A exposição das linhagens de carcinoma pulmonar H1299 e A549 ao meio condicionado pró-inflamatório resultou em uma redução significativa da viabilidade celular. Além disso, a associação do meio condicionado à cisplatina, mostrou que o meio pró-inflamatório consegue potencializar a ação do fármaco em menores doses. Também foi observado que o meio condicionado tem a capacidade de potencializar a ação da cisplatina no ciclo celular.

A avaliação dos genes de morte celular, Bax e caspase 3 mostraram que o mecanismo de morte celular responsável por esta redução da viabilidade celular não é a apoptose. A exposição da linhagem H1299 ao meio condicionado em associação à cisplatina ainda aumentou a expressão do gene caspase 1, relacionado ao processo de piroptose, porém não foi possível concluir se este aumento da expressão é causado pela associação ao meio condicionado ou apenas pelo uso do quimioterápico.

Assim, os resultados deste estudo são essenciais para melhor compreensão da interação entre mediadores inflamatórios e o câncer de pulmão, além de sua interação com o principal fármaco quimioterápico utilizado por pacientes em estado avançado. O atual trabalho é um ponto de partida para pesquisas subsequentes voltadas para o estudo de novas alternativas terapêuticas no microambiente tumoral para pacientes com câncer de pulmão.

REFERÊNCIAS

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

American Cancer Society. **Chemotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer**. Disponível em: <<http://https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/treating-non-small-cell/chemotherapy.html>>. Acesso em: 12 fev. 2023.

ANDERSON, Nicole M, and SIMON, M Celeste. The tumor microenvironment. **Current biology**, Philadelphia, v.30,16, n.16, p.921–925, ago. 2020.

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

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

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

BRAMBILLA, Christian; LAFFAIRE, Julien; LANTUEJOL, Sylvie; MORO-SIBILOT, Denis; MIGNOTTE, Hélène; ARBIB, François; TOFFART, Anne-Claire; PETEL, Fabien; HAINAUT, Pierre; ROUSSEAU, Sophie. Lung Squamous Cell Carcinomas with Basaloid Histology Represent a Specific Molecular Entity. **Clinical Cancer Research**, Cambridge, v. 20, n. 22, p. 5777-5786, 13 nov. 2014

BOLLI, Evangelia; MOVAHEDI, Kiavash; LAOUI, Damya; VAN GINDERACHTER, Jo A.. Novel insights in the regulation and function of macrophages in the tumor microenvironment. **Current Opinion In Oncology**, Bruxelas, v. 29, n. 1, p. 55-61, jan. 2017.

BOUTILIER, Ava J.; ELSAWA, Sherine F.. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 13, p. 6995, 29 jun. 2021

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

CARTER, Brett W.; HALPENNY, Darragh F.; GINSBERG, Michelle S.; PAPADIMITRAKOPOULOU, Vassiliki A.; GROOT, Patricia M. de. Immunotherapy in

Non–Small Cell Lung Cancer Treatment. **Journal Of Thoracic Imaging**, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 300-312, set. 2017

CHEN, XI; WU, Jianzhang; WANG, Jiabing. Pyroptosis: a new insight of non-small-cell lung cancer treatment. **Frontiers In Oncology**, Zurique, v. 12, n. 1013544, p. 1-14, 29 nov. 2022.

CROMPTON, N. E. A.; SAYDAN, N.. Control of the cell cycle. **Journal Of Neuro-Oncology**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 255-259, 1994

CONDE, E.; ANGULO, B.; IZQUIERDO, E.; PAZ-ARES, L.; BELDA-INIESTA, C.; HIDALGO, M.; LÓPEZ-RÍOS, F.. Lung adenocarcinoma in the era of targeted therapies: histological classification, sample prioritization, and predictive biomarkers. **Clinical And Translational Oncology**, Roma, v. 15, n. 7, p. 503-508, 29 jan. 2013.

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

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

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

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 495-516, jun. 2007.

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

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

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

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, Cambridge, v. 140, n. 6, p. 883-899, mar. 2010

GREEN, Douglas R.; LLAMBI, Fabien. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 60-80, dez. 2015. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>.

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

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

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

HIRSCH, Fred R; SCAGLIOTTI, Giorgio V; MULSHINE, James L; KWON, Regina; CURRAN, Walter J; WU, Yi-Long; PAZ-ARES, Luis. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. **The Lancet**, Londres, v. 389, n. 10066, p. 299-311, jan. 2017.

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

International Agency for Research. World Health Organization. Cancer Tomorrow, 2023. Disponível em:

<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_populations=1&multiple_cancers=1&types=0&cancers=15&years=2025&sort_by=value1>.

Acesso em 11 de maio de 2023.

KAR, Sandip. Unraveling Cell-Cycle Dynamics in Cancer. **Cell Systems**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 8-10, jan. 2016

KEIBEL, Andrew; SINGH, Vinod; SHARMA, Mahesh. Inflammation, Microenvironment, and the Immune System in Cancer Progression. **Current Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 15, n. 17, p. 1949-1955, 1 jun. 2009.

KHANDIA, Rekha; MUNJAL, Ashok. Interplay between inflammation and cancer. **Interplay between inflammation and cancer**, [S.L.], v.119, p.199-245, jan 2020.

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

LEE, Chanju; JEONG, Hyunju; BAE, Younghyeon; SHIN, Kyungmoon; KANG, Sinwoo; KIM, Hwikyung; OH, Jayoung; BAE, Hyunsu. Targeting of M2-like tumor-associated macrophages with a melittin-based pro-apoptotic peptide. **Journal For Immunotherapy Of Cancer**, Denver, v. 7, n. 1, p. 147, jun. 2019.

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

LIU, Mengmeng; LIU, Lina; SONG, Yongping; LI, Wei; XU, Linping. Targeting macrophages: a novel treatment strategy in solid tumors. **Journal Of Translational Medicine**, California, v. 20, n. 1, p. 586, dez. 2022.

LIU, Shenghou; GAO, Hongwei; GAO, Chunzheng; LIU, Wenguang; XING, Deguo. Bindarit Attenuates Pain and Cancer-Related Inflammation by Influencing Myeloid

Cells in a Model of Bone Cancer. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, [S.L.], v. 66, n. 3, p. 221-229, 12 dez. 2017.

LUO, Jun-Li; MAEDA, Shin; HSU, Li-Chung; YAGITA, Hideo; KARIN, Michael. Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. **Cancer Cell**, [s. /], v. 6, n. 3, p. 297-305, set. 2004

MANTOVANI, Alberto; ALLAVENA, Paola; SICA, Antonio; BALKWILL, Frances. Cancer-related inflammation. **Nature**, Londres, v. 454, n. 7203, p. 436-444, jul. 2008.

MANSOURI, Siavash; HEYLMANN, Daniel; STIEWE, Thorsten; KRACHT, Michael; SAVAI, Rajkumar. Cancer genome and tumor microenvironment: reciprocal crosstalk shapes lung cancer plasticity. **Elife**, Londres, v. 11, n. 79895, p. 1-24, 8 set. 2022.

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

MURRAY, Andrew. Cell cycle checkpoints. **Current Opinion In Cell Biology**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 872-876, dez. 1994.

MURRAY, Peter J.; WYNN, Thomas A.. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 11, n. 11, p. 723-737, 14 out. 2011.

OCHANDO, Jordi; MULDER, Willem J. M.; MADSEN, Joren C.; NETEA, Mihai G.; DUIVENVOORDEN, Raphaël. Trained immunity — basic concepts and contributions to immunopathology. **Nature Reviews Nephrology**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 23-37, 17 out. 2022.

PLANCHARD, David; PÉCHOUX, Cécile Le. Small cell lung cancer: new clinical recommendations and current status of biomarker assessment. **European Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 272-283, set. 2011

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

QU, Xinglong; TANG, Ying; HUA, Shucheng. Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: a cross talk. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, p. 563, 20 mar. 2018.

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

ROMA-RODRIGUES, Catarina; MENDES, Rita; BAPTISTA, Pedro; FERNANDES, Alexandra. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 840, 15 fev. 2019

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

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

SEDIGHZADEH, Sahar Sadat; KHOSHBIN, Amin Pastaki; RAZI, Sepideh; KESHAVERZ-FATHI, Mahsa; REZAEI, Nima. A narrative review of tumor-associated macrophages in lung cancer: regulation of macrophage polarization and therapeutic implications. **Translational Lung Cancer Research**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 1889-1916, abr. 2021

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

SHI, Jianjin; GAO, Wenqing; SHAO, Feng. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death. *Trends In Biochemical Sciences*, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 245-254, abr. 2017.

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

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

SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; LAVERSANNE, Mathieu; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin; BRAY, Freddie. Global Cancer Statistics 2020:

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

TAN, Zhaofeng; XUE, Haibin; SUN, Yuli; ZHANG, Chuanlong; SONG, Yonglei; QI, Yuanfu. The Role of Tumor Inflammatory Microenvironment in Lung Cancer.

Frontiers In Pharmacology, Lausanne, v. 12, n. 688625, p. 1-13, 17 maio 2021.

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

TRAVIS, William D.. Pathology of Lung Cancer. **Clinics In Chest Medicine**, Londres, v. 32, n. 4, p. 669-692, dez. 2011.

UN, Frank. G1 arrest induction represents a critical determinant for cisplatin cytotoxicity in G1 checkpoint-retaining human cancers. **Anti-Cancer Drugs**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 411-417, abr. 2007.

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

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

ZHANG, Cheng-Cheng; LI, Chen-Guang; WANG, Yao-Feng; XU, Li-Hui; HE, Xian-Hui; ZENG, Qiong-Zhen; ZENG, Chen-Ying; MAI, Feng-Yi; HU, Bo; OUYANG, Dong-Yun. Chemotherapeutic paclitaxel and cisplatin differentially induce pyroptosis in A549 lung cancer cells via caspase-3/GSDME activation. *Apoptosis*, [S.L.], v. 24, n. 3-4, p. 312-325, 1 fev. 2019.

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

ZHENG, Min. Classification and Pathology of Lung Cancer. **Surgical Oncology Clinics Of North America**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 447-468, jul. 2016

ZHENG, Xiang; TURKOWSKI, Kati; MORA, Javier; BRÜNE, Bernhard; SEEGER, Werner; WEIGERT, Andreas; SAVAI, Rajkumar. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. **Oncotarget**, Nova Iorque, v. 8, n. 29, p. 48436-48452, abr. 2017.

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

ZHENG, Min. Classification and Pathology of Lung Cancer. **Surgical Oncology Clinics Of North America**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 447-468, jul. 2016

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

ZOLLO, Massimo; DATO, Valeria di; SPANO, Daniela; MARTINO, Daniela de; LIGUORI, Lucia; MARINO, Natascia; VASTOLO, Viviana; NAVAS, Luigi; GARRONE,

Beatrice; MANGANO, Giorgina. Targeting monocyte chemotactic protein-1 synthesis with bindarit induces tumor regression in prostate and breast cancer animal models. **Clinical & Experimental Metastasis**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 585-601, 7 abr. 2012. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10585-012-9473-5>.

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