



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

RODRIGO SANTIAGO MOREIRA

**AVALIAÇÃO DE SIGLEC-15 E TYRO3 COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE
PROGNÓSTICO EM CÂNCER DE PULMÃO NÃO PEQUENAS CÉLULAS**

Recife
2023

RODRIGO SANTIAGO MOREIRA

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

Orientador (a): Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira, Professora Adjunta do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE; NUPIT-SG

Coorientador (a): Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego, professor adjunto do Departamento de Bioquímica da UFPE; coordenador do Banco de Células tumorais do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino - NUPIT-SG

Recife

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Moreira, Rodrigo Santiago.

Avaliação de Siglec-15 e Tiro 3 como possíveis biomarcadores de prognóstico em câncer de pulmão não pequenas células. / Rodrigo Santiago Moreira. – 2023.

85 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Michelly Cristiny Pereira.

Coorientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências e anexos.

1. Siglec 15. 2. Tyro 3. 3. Câncer de Pulmão. 4. Câncer. 5. Biomarcador Tumoral. I. Pereira, Michelly Cristiny. (Orient.). II. Rego, Moacyr Jesus Barreto de Melo. (Coorient.). III. Título.

616

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-267

RODRIGO SANTIAGO MOREIRA

AVALIAÇÃO DE SIGLEC-15 E TYRO3 COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE PROGNÓSTICO EM CÂNCER DE PULMÃO NÃO PEQUENAS CÉLULAS

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

Aprovada: 09/08/2023

Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira
Orientadora. Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego
Coorientador. Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro
Universidade Federal de Pernambuco (Examinador interno)

Prof. Dr. Anderson Rodrigues de Almeida
Universidade Federal de Pernambuco (Examinador externo)

Dr. Cesar Freire de Melo Vasconcelos
Universidade Federal de Pernambuco (Examinador externo)

AGRADECIMENTOS

É com imensa gratidão que dedico este momento especial a todos que contribuíram para a concretização desta dissertação de mestrado no Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da UFPE.

Primeiramente, agradeço a Deus, que me concedeu força, sabedoria e perseverança para enfrentar os desafios ao longo desta jornada acadêmica. Sua orientação divina foi fundamental em cada passo dado, guiando-me rumo ao conhecimento e ao crescimento pessoal.

À minha família, Francisco Gonçalves e Maria dos Reis Santos, meu pai e minha mãe, vocês são a base sólida que sempre me apoiou e incentivou em todas as etapas da minha vida. Aos meus queridos irmãos, Maria Clara e Rômulo Santiago, agradeço pela cumplicidade e pela parceria ao longo dessa trajetória.

À minha amada esposa, Isabela Pina, e à minha adorável filha, Ana Elisa, agradeço por serem minha fonte de motivação e inspiração. Seu amor e encorajamento foram essenciais para que eu pudesse me dedicar aos estudos e enfrentar os desafios com determinação.

À minha orientadora, Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira, sou profundamente grato por sua orientação, dedicação e expertise ao longo deste trabalho. Sua sabedoria e incentivo foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação, além de terem enriquecido minha formação acadêmica.

Meu agradecimento especial ao meu amigo e colega de trabalho, César Freire de Melo Vasconcelos, cuja colaboração e troca de conhecimentos foram inestimáveis durante toda a jornada do mestrado.

Agradeço também a todos os professores e colegas que participaram dessa jornada acadêmica, além da universidade, que compartilharam seus conhecimentos e experiências, tornando essa jornada mais rica e enriquecedora.

Por fim, expresso minha gratidão à banca examinadora, composta por Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro, Anderson Rodrigues de Almeida e César Freire de Melo Vasconcelos, cujas contribuições e avaliações foram essenciais para o aprimoramento deste trabalho.

Cada um de vocês deixou uma marca indelével em minha trajetória acadêmica e pessoal. Sem a colaboração e o apoio de cada um, esta conquista não seria possível.

RESUMO

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer desde 1985. Foi a principal causa de morte relacionada ao câncer nos Estados Unidos nos últimos anos. Siglec-15 e Tyro 3 possuem potencial como possíveis candidatos, como alvos terapêuticos para a imunoterapia no câncer de pulmão, com características como expressão maior em tecido tumoral; mínima expressão em tecidos normais; participação na evasão imune do tumor. O presente estudo objetivou analisar a expressão dessas moléculas *in sílico*, *in vitro* e *ex vivo*. Amostras séricas e de tecidos com câncer de pulmão não pequenas células foram selecionadas, submetidas a avaliação por imuno-histoquímica e as linhagens celulares foram avaliadas quanto a expressão gênica por RT-qPCR de Siglec-15 e Tyro-3. Pacientes com neoplasia pulmonar não pequenas células foram recrutados (n=51). A análise por imuno-histoquímica para Siglec-15 e para Tyro 3 sugeriu marcação de maior intensidade em quadros mais avançados, em estágio metastático, tanto para Siglec-15 quanto Tyro 3, com predominância estromal. A análise *in sílico* para avaliação da expressão gênica mostrou menor sobrevida global para pacientes com maior expressão de Tyro-3 (p=0,045), em pacientes com subtipo escamoso. Resultado semelhante com Siglec-15 (p= 0,67). Menor sobrevida global em pacientes com subtipo adenocarcinoma foi encontrada no grupo com maior expressão de Tyro 3 (p 0,11). A expressão gênica de Siglec-15 está aumentada nas células neoplásicas H1299 (média 1.003 ± 0.004) e A549 (2.811± 2.3), comparado a célula não transformada MRC-5 (0.0022 ± 0.004). Adicionalmente, verificou-se que o quimioterápico cisplatina reduz a expressão de Siglec-15 nas células H1299. Em suma, foi possível destacar características valiosas sobre o câncer de pulmão e a análise de biomarcadores prognósticos. Assim, a busca de biomarcadores com relevância diagnóstica e prognóstica no câncer de pulmão não pequenas células para promoção de melhor sobrevida do paciente é necessária, além da contribuição com dados para o desenvolvimento de possíveis alternativas de imunoterapias, marcadores prognósticos, tendo como alvos Siglec-15 e/ou Tyro 3.

Palavras-chave: Siglec 15; Tyro 3; Câncer de Pulmão; Câncer, Biomarcador Tumoral.

ABSTRACT

Lung cancer has been the leading cause of cancer death since 1985. It has been the leading cause of cancer-related death in the United States in recent years. Siglec-15 and Tyro 3 have potential as possible candidates, as therapeutic targets for immunotherapy in lung cancer, with characteristics such as higher expression in tumor tissue; minimal expression in normal tissues; participation in tumor immune evasion. The present study aimed to analyze the expression of these molecules in silico, in vitro and ex vivo. Serum and tissue samples with non-small cell lung cancer were selected, subjected to immunohistochemistry evaluation and cell lines were evaluated for gene expression by RT-qPCR of Siglec-15 and Tyro-3. Patients with non-small cell lung cancer were recruited (n=51). Immunohistochemical analysis for Siglec-15 and Tyro 3 suggested higher intensity staining in more advanced cases, at the metastatic stage, for both Siglec-15 and Tyro 3, with stromal predominance. In silico analysis to evaluate gene expression showed lower overall survival for patients with higher Tyro-3 expression (p=0.045), in patients with the squamous subtype. Similar result with Siglec-15 (p= 0.67). Lower overall survival in patients with adenocarcinoma subtype was found in the group with higher Tyro 3 expression (p 0.11). Siglec-15 gene expression is increased in H1299 (mean 1.003 ± 0.004) and A549 (2.811 ± 2.3) neoplastic cells, compared to non-transformed MRC-5 cells (0.0022 ± 0.004). Additionally, it was found that the chemotherapy drug cisplatin reduces the expression of Siglec-15 in H1299 cells. In short, it was possible to highlight valuable characteristics about lung cancer and the analysis of prognostic biomarkers. Therefore, the search for biomarkers with diagnostic and prognostic relevance in non-small cell lung cancer to promote better patient survival is necessary, in addition to contributing data to the development of possible alternative immunotherapies, prognostic markers, targeting Siglec- 15 and/or Tyro 3.

Keywords: Siglec 15; Tyro 3; Lung Cancer; Cancer; Tumor Biomarker.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação do câncer de pulmão-----	18
Figura 2 – Marcadores em câncer (hallmarks) -----	22
Figura 3 - Principais mecanismos de evasão tumoral-----	23
Figura 4 - Estruturas tridimensionais PD-1/PD-L1-----	27
Figura 5 - Interação entre Célula tumoral e célula T, através de PD-1/PD-L1--- -----	30
Figura 6 - Estrutura tridimensional (a) e cristalina (b) Siglec-15-----	31
Figura 7 - Esquema de estrutura do receptor Tyro 3-----	33
Figura 8 - Representação esquemática vias de sinalização TYRO3-----	35
Figura 9 – Classificação de biomarcadores moleculares-----	37
Figura 10 - Controle positivo para Siglec 15 em tecido de pulmão com adenocarcinoma (A – aumento de 20x; B aumento de 40x) -----	46
Figura 11 – Controle positivo Tyro 3, aumento 20x, adenocarcinoma próstata-----	46
Figura 12 – Avaliação por Imuno-histoquímica de subtipos de câncer de pulmão para Siglec 15 -----	48
Figura 13 - Avaliação por Imuno-histoquímica de subtipos de câncer de pulmão para Tyro 3 -----	50
Figura 14 - Análise de <i>Fold Change</i> para expressão dos genes SIGLEC e TYRO entre pacientes com Adenocarcinoma pulmonar e pacientes saudáveis do banco de dados do TCGA (TCGA-LUAD).-----	55
Figura 15 - Análise de <i>Fold Change</i> para expressão dos genes SIGLEC e TYRO entre pacientes com Carcinoma de pulmão de células escamosas e pacientes saudáveis do banco de dados do TCGA(TCGA-LUSC). -----	56
Figura 16 - Curva de probabilidade para sobrevida global para níveis de expressão alta ou baixa de Siglec 15 e Tyro 3, em pacientes com Adenocarcinoma pulmonar.-	57
Figura 17 - Curva de probabilidade para sobrevida global para níveis de expressão alta ou baixa de Siglec 15 e Tyro 3, em pacientes com carcinoma escamoso pulmonar.-----	58
Figura 18 - Expressão gênica de Siglec 15 em células neoplásicas de pulmão e células não neoplásicas, antes e após uso de Cisplatina e Etoposídeo.-----	59
Figura 19 - Expressão gênica de Tyro em células neoplásicas de pulmão e células não neoplásicas, antes e após uso de Cisplatina e Etoposídeo. -----	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–Características dos pacientes com câncer de pulmão não pequenas células. -----	45
Tabela 2 – Perfil de marcação de imuno-histoquímica para Siglec 15-----	47
Tabela 3 - Perfil de marcação de imuno-histoquímica para Tyro 3 -----	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resumo principais mecanismos de crescimento, progressão e evasão tumoral e interações com sistema imune-----	26
Quadro 2: associação de variáveis clínicas e Siglec-15 (+) e Siglec-15 (-) -----	51
Quadro 3: associação de variáveis clínicas e Tyro 3 (+) e Tyro 3 (-) -----	52
Quadro 4: Associação sobrevida média e Siglec-15 e Tyro 3-----	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT - Proteína quinase B (Protein Kinase B)

ALK - Cinase do Linfoma Anaplásico

APCs - Células Apresentadoras de Antígeno (Antigen-Presenting Cells)

AR - American Cancer Society (Sociedade Americana de Câncer)

B7 - Família de proteínas imunorreceptoras relacionadas ao PD-L1 e outras moléculas de coestimulação.

CD279 - Designação alternativa para o PD-1 (Cluster of Differentiation 279)

CD33L3 - Molécula de Adesão da Família do CD33 (Cluster of Differentiation 33)

CPNPC - Câncer de Pulmão Não Pequenas Células

CPPC - Câncer de Pulmão de Pequenas Células

CTLA4 - Antígeno citotóxico linfocitário T-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)

DAP12 - Proteína Associada a DAP12 (DNAX-activating protein 12)

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

EMT - Transição Epitelial para Mesenquimal (Epithelial-Mesenchymal Transition)

EAE - Encefalomielite Autoimune Experimental (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)

ER - Receptor de Estrogênio (Estrogen Receptor)

EUA - Estados Unidos da América

FOXO1 - Proteína Forkhead Box O1

HEK-293T - Células Humanas Embrionárias do Rim 293 Transformadas com T Antígeno de Tumor

HER2 - Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)

HsT1361 - Gene associado a um marcador do antígeno CD1361.

IASLC - Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão

IL-1 - Interleucina-1

IL-3 - Interleucina-3

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

INCA - Instituto Nacional de Câncer

MAPK/ERK - Proteína quinase ativada por mitogênio / Proteína cinase regulada extracelularmente (Mitogen-Activated Protein Kinase / Extracellular Signal-Regulated Kinase)

M-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (Macrophage Colony-Stimulating Factor)

MAT - Macrófagos associados a tumores (Tumor-Associated Macrophages)

MHCI - *Major Histocompatibility Complex*

mTOR - Proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos (Mammalian Target of Rapamycin)

MS - Ministério da Saúde

NF-κB - Fator Nuclear Kappa B (Nuclear Factor Kappa B)

NK - Células Naturais Killer

NSCLC - Carcinoma de Pulmão de Não Pequenas Células (Non-Small Cell Lung Cancer)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAH - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

PD-1 - Receptor de Morte Celular Programada 1

PD-L1 - Ligante de morte programada 1 (Programmed Death-Ligand 1)

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase (Phosphoinositide 3-kinase)

PR - Receptor de Progesterona (Progesterone Receptor)

PROS1 - Proteína S (Protein S)

siRNA - RNA interferente pequeno (small interfering RNA)

Syk - Tirosina quinase Zap-70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70)

TAM - TYRO3, AXL, MERTK (uma família de tirosinas quinases)

TCBD - Tomografia Computadorizada de Baixa Dose

TKIs - Inibidores de Tirosina Quinase

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador Beta (Transforming Growth Factor Beta)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa (Tumor Necrosis Factor Alpha)

TYRO3 - Receptor de Tirosina Quinase 3

UK - Reino Unido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Revisão da Literatura	15
1.2	Epidemiologia	15
1.3	Fatores de risco	17
1.4	Classificação histopatológica	17
1.5	Estadiamento e sobrevida do câncer de pulmão	19
1.6	Diagnóstico e tratamento	19
1.7	Tratamento para CPNPC	20
1.8	Marcadores do câncer (hallmarks)	21
1.9	A importância dos hallmarks no câncer de pulmão	23
1.10	Hallmark: evitando destruição imune	24
1.11	Principais mecanismos de evasão imune tumoral	25
1.12	PD-1/PD-L1 e imunologia tumoral	27
1.12.1	PD-1	27
1.12.2	PD-L1	28
1.12.3	PD-L1 no câncer de pulmão	29
1.13	Siglec-15	30
1.14	Siglec-15 e a regulação imunológica	31
1.15	TYRO3	33
1.15.1	TYRO3 no câncer	33
1.15.2	Principais sinalizações TYRO3 no câncer	34
1.16	Semelhanças entre Siglec-15 e TYRO3 na imunologia tumoral	35
1.17	Siglec-15 e TYRO3 como potenciais biomarcadores em câncer de pulmão	36
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo geral	38
2.2	Objetivos específicos	38
3	METODOLOGIA	38
3.1	Crítérios de elegibilidade	39
3.1.1	Inclusão	39
3.1.2	Exclusão	39
3.2	Coleta de amostra e dosagem de moléculas no soro	40
3.3	Amostras clínicas	40

3.4	Imuno-histoquímica	40
3.5	Análise de imagens	41
3.6	Avaliação <i>in silico</i>	41
3.7	Criação de banco de dados para análises de expressão gênica	41
3.8	Análises de fold-change / DEGs (expressão diferenciada entre genes) entre amostras tumorais e normais	42
3.9	Análise de sobrevida (Overall Survivor) Kaplan-meier	42
3.10	Expressão gênica nas células neoplásicas (<i>in vitro</i>)	42
3.10.1	Confecção da Cultura celular	42
3.10.2	Extração de RNA e Síntese de cDNA	42
3.10.3	Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR	43
3.10.4	Análise estatística	44
4	RESULTADOS	44
4.1	Resultados ex-vivo em amostras de pacientes com neoplasia pulmonar	44
4.1.1	Caracterização clínico-epidemiológica	44
4.1.2	Análise por Imuno-histoquímica	45
4.1.3	Análise por imuno-histoquímica de Siglec-15	46
4.1.4	Análise por imuno-histoquímica de Tyro-3	49
4.2	Análise <i>in silico</i> Siglec-15 e TYRO 3	51
4.3	Expressão gênica nas células neoplásicas (<i>in vitro</i>)	58
4.3.1	Avaliação da expressão de Siglec 15 nas células neoplásicas de pulmão.	58
4.3.2	Avaliação da expressão de Tyro-3 nas células neoplásicas de pulmão.	59
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO A – Termo de consentimento Livre e esclarecido	78
	ANEXO B – Ficha clínica	83

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão foi a principal causa de morte relacionada ao câncer nos Estados Unidos nos últimos anos, com cerca de 23% e 22% do total de mortes por de câncer, respectivamente em homens e mulheres. Para o Brasil, estimam-se, para cada ano do triênio 2020-2022, 17.760 casos novos de câncer de pulmão em homens e 12.440 em mulheres. Para o Brasil, foram estimados para o triênio 2023-2025, 32 mil casos novos de câncer de pulmão, 4,6% do total de casos de câncer para o período (excluindo casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2022)). As taxas de sobrevida variam entre 49% e 1% para câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC), entre os estágios IA e IV, respectivamente (ARAUJO et al., 2018). Neste cenário, o entendimento da resposta imune tumoral e a busca de alvos terapêuticos na cascata da resposta imune no microambiente tumoral vem ganhando mais força, com resultados satisfatórios, como inibidores para PD-1/PD-L1, com melhora em sobrevida global em pacientes em estágios avançados (RAJU; JOSEPH; SEHGAL, 2018). Siglec-15 e TYRO3 surgem como bons candidatos como alvo terapêutico para a imunoterapia no câncer de pulmão, com características como expressão maior em tecido tumoral; mínima expressão em tecidos normais; participação na evasão imune do tumor. (KANG et al., 2020; SMART et al., 2018; WANG et al., 2019).

Existem poucos estudos consistentes para avaliação destas proteínas em câncer de pulmão não pequenas células e o possível comportamento como biomarcador prognóstico e as associações às variáveis clínicas. Assim, existe a necessidade de uma busca de marcadores com relevância diagnóstica e prognóstica no câncer de pulmão não pequenas células para promoção de melhor sobrevida do paciente, além da contribuição com dados para o desenvolvimento de imunoterapias tendo como alvos Siglec-15 e TYRO3.

1.1 Revisão da Literatura

1.2 Epidemiologia

O câncer de pulmão é a principal causa de mortalidade por câncer no Brasil, sendo o quarto tipo em incidência em mulheres e o segundo em homens, com sobrevida em 5 anos padronizada pela idade de 18% (ARAUJO et al., 2018). As taxas de sobrevida alcançam até 1% para câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC) estágio IV. O câncer de pulmão foi a principal causa de morte relacionada ao câncer nos Estados Unidos (EUA) nos últimos anos, com 72.500 mortes para homens e 63.220 para mulheres em 2020, representando 23% e 22% do total de mortes por de câncer,

respectivamente. Nos Estados Unidos em 2020, o câncer de pulmão foi segundo lugar para homens e mulheres, com prevalência de 13% e 12%, respectivamente, inferior apenas a neoplasia de próstata e mama (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). As estimativas da American Cancer Society para câncer de pulmão nos Estados Unidos para 2022 foram:

- Cerca de 236.740 novos casos de câncer de pulmão (117.910 em homens e 118.830 em mulheres).
- Cerca de 130.180 mortes por câncer de pulmão (68.820 em homens e 61.360 em mulheres). (WYANT, T., ALTERI, R., KALIDAS, 2022)

A American Cancer Society projeta 238.340 novos casos de câncer de pulmão nos Estados Unidos em 2023 (117.550 em homens e 120.790 em mulheres), cerca de 127.070 mortes por câncer de pulmão (67.160 em homens e 59.910 em mulheres). (SOCIEDADE AMERICANA DE CÂNCER, 2023)

O câncer de pulmão é o terceiro câncer mais comum no Reino Unido, representando 13% de todos os novos casos de câncer (2016-2018). (CANCER RESEARCH UK, 2021). O Reino Unido possui tendências de incidência de câncer de pulmão e tabagismo semelhantes às dos EUA. A prevalência de tabagismo masculino atingiu o pico nas décadas de 1940 a 1950, seguido por um pico na incidência de câncer de pulmão na década de 1970. Apesar das taxas decrescentes em ambos os sexos, o câncer de pulmão continua sendo a segunda malignidade mais comum no Reino Unido (BARTA; POWELL; WISNIVESKY, 2019). Nas mulheres, o câncer de pulmão é o segundo câncer mais comum (13% de todos os novos casos de câncer feminino). Nos homens no Reino Unido, é o 2º câncer mais comum (13% de todos os novos casos de câncer masculino). (CANCER RESEARCH UK, 2021).

A Europa continental exhibe ampla variação geográfica na incidência de câncer de pulmão. Em geral, as taxas são mais altas na Europa Central e Oriental. Entretanto, a incidência em todo o continente tem diminuído em homens desde o início da década de 1990. As exceções incluem Noruega, Finlândia, Espanha e França, onde o câncer de pulmão permaneceu com taxas estáveis. Nas mulheres, o aumento da incidência de câncer de pulmão a incidência diminuiu nos EUA e no Reino Unido, mas as taxas continuam aumentar na Europa Central e Oriental (BRAY; WEIDERPASS, 2010; MALVEZZI et al., 2014). Essas diferenças regionais refletem os estágios anteriores da epidemia de tabaco em países como Bielorrússia, Hungria, Polônia, e a Federação Russa (TORRE et al., 2000). Além disso, desigualdades socioeconômicas e

educacionais, bem como diagnóstico em fase tardia da doença, contribuem para a variabilidade na incidência e mortalidade por câncer de pulmão na Europa (WALTERS et al., 2013). À semelhança dos EUA, a sobrevida média é menor do que qualquer outra malignidade na Europa. EUROCORE-5 relatou uma sobrevida média de cinco anos de 13% para todos os pacientes com câncer de pulmão diagnosticados entre 2000–2007, com uma variação de 9% no Reino Unido e Irlanda a 15% na Europa Central (FRANCISCI et al., 2015).

Na Ásia, o Japão possui altas taxas de incidência e mortalidade de câncer de pulmão, comparáveis aos dos EUA e Europa (FERLAY et al., 2015). Uma maior incidência de doenças pulmonares por câncer é descrita em homens desde a década de 1970, devido a diferenças de gênero na prevalência do tabagismo (TOYODA et al., 2008). Por outro lado, as taxas de mortalidade em mulheres são menores no Japão do que em outras nações industrializadas, provavelmente devido a maior incidência de adenocarcinomas com mutações responsivo a terapias direcionadas (WOO et al., 2012).

Para o Brasil, foram estimados para o triênio 2023-2025, 32 mil casos novos de câncer de pulmão, 4,6% do total de casos de câncer para o período (excluindo casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2022). O risco estimado de 16,99 casos novos a cada 100 mil homens e 11,56 para cada 100 mil mulheres (INCA; MS, 2019). As taxas de sobrevida variam entre 49% e 1% para câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC), entre os estágios IA e IV, respectivamente (ARAUJO et al., 2018). Nesse cenário, terapias direcionadas a mutações específicas, EGFR e ALK por exemplo, mostraram melhores resultados para tratamento em estágios avançados. A Imunoterapia tem mostrado resultados encorajadores nos últimos estudos, com o estímulo ao reconhecimento das células tumorais como estranhas pelo sistema imune e a inibição da tolerância ao crescimento tumoral (RAJU; JOSEPH; SEHGAL, 2018).

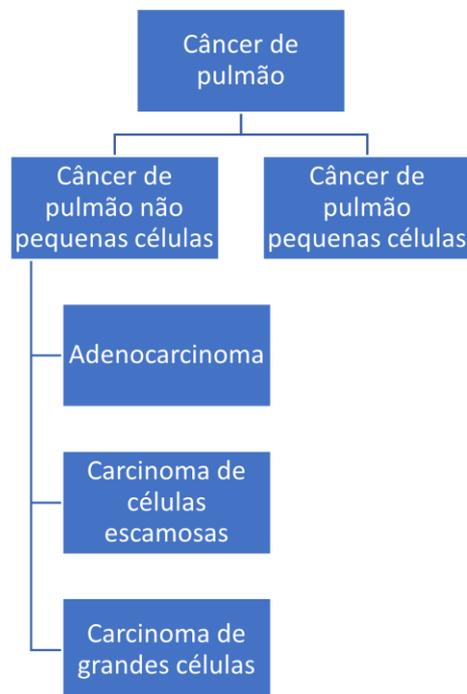
1.3 Fatores de risco

Cerca de 80% das mortes por câncer de pulmão são causadas pelo tabagismo. Outros fatores de risco para câncer de pulmão incluem radônio, amianto, exposição cumulativa e de longo prazo à poluição do ar, especialmente emissões de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e história pessoal ou familiar de câncer de pulmão (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

1.4 Classificação histopatológica

Os tumores pulmonares são divididos em duas grandes categorias pela Organização Mundial da Saúde (OMS); câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC), compreendendo 80-85% de todos os casos de câncer de pulmão, e câncer de pulmão de pequenas células (CPPC), constituindo os outros 15% de incidência (Li Q, et al., 2016). O CPNPC pode ser subdividido em adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células (Figura 1). Cada subcategoria com base no perfil genético alvo molecular pode ser subcategorizada em vários tipos (INAMURA K. et al., 2017). As taxas de sobrevivência para câncer de pulmão metastático de ambos os tipos CPNPC e CPPC são baixas, com uma sobrevivência de 5 anos de apenas cerca de 4% (BOLOKER G. et al., 2018).

Figura 1 – Classificação do câncer de pulmão.



Fonte: o autor (2023)

O adenocarcinoma de pulmão de não pequenas células é o tipo mais comum de câncer de pulmão atualmente, representando cerca de 40% de todos os casos, principalmente nos EUA. Ele pode se desenvolver tanto em fumantes como em não fumantes, independentemente da idade e sexo (COURAUD S., et al., 2012). O adenocarcinoma origina-se das células glandulares dos alvéolos e tende a ocorrer nas áreas periféricas do órgão. Devido ao seu crescimento mais lento em comparação com outros tipos de câncer de pulmão, há uma maior chance de ser detectado antes de se espalhar para além dos pulmões (STELLMAN, S.D., et al., 1997).

O carcinoma de células escamosas de pulmão é o segundo tipo mais comum de câncer de pulmão, representando de 25 a 30% dos casos. Ele está fortemente associado ao tabagismo e caracteriza-se por alterações genéticas e vias somáticas recorrentes ligadas ao consumo de tabaco (AROS C. J., et al., 2020). Esse tipo de câncer geralmente se origina das células escamosas das vias traqueobrônquicas, especialmente das células basais, e é mais frequentemente encontrado na parte central dos pulmões, nas vias aéreas principais, mas também pode ocorrer nas áreas periféricas (AROS C. J., et al., 2020).

Já o carcinoma de células grandes é responsável por aproximadamente 5 a 10% dos casos de câncer de pulmão e também está associado ao tabagismo (BRAMBRILLA, E. P. B., et al., 2004). Geralmente não apresenta características específicas de maturação escamosa ou glandular, sendo considerado indiferenciado. Por esse motivo, o diagnóstico muitas vezes é obtido por exclusão de outras possibilidades. Esses tumores costumam começar na parte central dos pulmões e têm alta tendência a se espalhar rapidamente, invadindo os linfonodos próximos e, em estágios avançados, podem fazer metástases à distância (BRAMBRILLA, E. P. B., et al., 2004).

1.5 Estadiamento e sobrevida do câncer de pulmão

O estadiamento do câncer de pulmão, de acordo com a definição da Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão (IASLC), mostrou que pacientes diagnosticados e tratados em estágios iniciais da doença têm maiores chances de sobrevivência. A sobrevida média após o tratamento varia conforme o estágio patológico, sendo de aproximadamente 95 meses para o estágio IA, 75 meses para o estágio IB, 44 meses para o estágio IIA, 29 meses para o estágio IIB e 19 meses para o estágio IIIA. Assim, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado são fundamentais para melhorar as perspectivas de sobrevivência dos pacientes (CHANSKY et al., 2009).

1.6 Diagnóstico e tratamento

No tratamento do câncer de pulmão, tanto o CPNPC quanto o CPPC, várias estratégias anticancerígenas são empregadas, como cirurgia, quimioterapia e irradiação. Entretanto, o câncer de pulmão em estágio avançado representa um desafio significativo, tornando-se imperativa a busca por estratégias eficazes para cura ou controle da doença (YASUMOTO K et al., 2009; ARAUJO, L. H., et al., 2018). O pior prognóstico do CPNPC pode ser devido à falta de uma plataforma eficiente

para o diagnóstico em estágios iniciais e ao surgimento tardio de sintomas durante o desenvolvimento da doença, o que limita as opções de tratamento e a sobrevida (GULLEY et al., 2015). A tomografia computadorizada de baixa dose (TCBD) é considerada o padrão-ouro para a triagem de pacientes com câncer de pulmão. Entretanto, a sua utilização é ainda baixa nos EUA, com apenas 5% dos 15 milhões de indivíduos de alto risco aconselhados a fazer a triagem usando TCBD. Isso se deve a problemas como baixa eficiência na detecção precoce, falsos positivos, risco de radiação e falta de recursos para a implementação de um programa eficiente de triagem baseado em TC (DYER O., 2021).

Embora a detecção precoce aumente a probabilidade de sucesso no tratamento, a indisponibilidade de uma plataforma adequada de triagem, a natureza metastática do câncer de pulmão, a heterogeneidade genética e a resposta mínima à quimioterapia em estágios avançados ainda resultam em altas taxas de mortalidade (KHANNA P et al., 2017). A quimioterapia e a radioterapia são recomendadas para cânceres localmente avançados e metastáticos, mas têm mostrado sobrevida global limitada e efeitos colaterais tóxicos. Terapias direcionadas, combinadas ou não com quimioterapia, têm se tornado padrão para pacientes com CPNPC que apresentam alterações oncogênicas acionáveis, resultando em aumento da sobrevida livre de progressão e sobrevida global em vários casos (DYER O., 2021).

1.7 Tratamento para CPNPC

Para câncer de pulmão ressecável (estágio I, II e IIIA selecionado), a ressecção cirúrgica é o padrão de tratamento, seguido de terapia sistêmica adjuvante com esquemas duplos baseados em cisplatina. Estudos recentes mostraram resultados promissores para a terapia adjuvante com imunoterapia ou inibidores orais de tirosina quinase (TKIs) como o osimertinibe, desafiando o padrão anterior (PISTERS K. M., et al 2007; WU Y. L. Et al. 2020).

Para CPNPC estágio III, o tratamento varia de acordo com o tumor e a sintomatologia. A cirurgia é controversa e pode ser considerada em certos casos, mas a maioria dos pacientes é tratada com terapia multimodal envolvendo quimioterapia e radioterapia, simultaneamente ou sequencialmente. A incorporação de imunoterapia após quimioterapia e radioterapia concomitantes mostrou melhora na sobrevida global (BRADLEY J. D. et al., 2020).

No CPNPC metastático, os objetivos são melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevida geral. O teste de mutações condutoras é crucial e a terapia

direcionada é preferida para pacientes com mutações EGFR, ALK ou ROS1. A imunoterapia é uma opção para pacientes sem mutações condutoras, com bons resultados, como o caso da terapia alvo para PD-1/PD-L1 (FAIVRE-FINN C et al., 2021).

Assim, o tratamento do câncer de pulmão envolve abordagens personalizadas, multimodais e multiprofissionais, com benefícios potenciais da imunoterapia e terapias direcionadas, almejando melhores resultados para sobrevida global e sobrevida livre de doença.

1.8 Marcadores do câncer (hallmarks)

As capacidades do câncer (hallmarks of cancer, em inglês) é um conjunto de capacidades funcionais adquiridas pelas células humanas à medida que elas se desenvolvem, indo da normalidade para estados de crescimento neoplásico. Essas etapas para o desenvolvimento do câncer são as capacidades essenciais para a formação de tumores malignos (HANAHAN, 2022). Essas etapas (hallmarks) constituem um princípio para ajudar na organização e no entendimento das complexidades do desenvolvimento da doença neoplásica. Eles incluem sustentação da sinalização proliferativa, evasão de mecanismos supressores de crescimento, resistência à morte celular, a imortalidade replicativa, indução a angiogênese e ativação a invasão e metástase, a reprogramação do metabolismo celular. Além disso, estão presentes a instabilidade do genoma, que gera a diversidade genética, a inflamação, que promove múltiplas funções promotoras do tumor, além de mecanismos descritos recentemente, como a participação de microbiomas polimórficos, o desbloqueio da plasticidade celular, a presença de células senescentes e a reprogramação epigenética não mutacional. (Figuras 2 e 3) (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2 – Marcadores em câncer (hallmarks)



Fonte: adaptado de (HANAHAN, 2022).

Figura 3 – Principais mecanismos de evasão tumoral



Fonte: adaptado de (HANAHAN, 2022).

1.9 A importância dos hallmarks no câncer de pulmão

Décadas de pesquisa contribuíram para o entendimento de que o câncer de pulmão é um processo de várias etapas envolvendo alterações genéticas e epigenéticas em que o dano resultante do DNA transforma células epiteliais

pulmonares normais em câncer de pulmão. Ainda não é conhecido se todas as células epiteliais pulmonares ou apenas um subconjunto dessas células (como células-tronco epiteliais pulmonares ou seus progenitores imediatos) são suscetíveis à transformação maligna completa. Além disso, enquanto a célula iniciadora do tumor pode ter apenas uma fração das mutações, à medida que o tumor se expande, as células podem adquirir novas mutações. (LARSEN; MINNA, 2011). Por exemplo, o tabagismo favorece a lesão do epitélio respiratório e, com isso, a ocorrência de alterações moleculares, observadas no epitélio pulmonar histologicamente normal, bem como em uma variedade de lesões histológicas pré-neoplásicas/pré-malignas, que também abrigam anormalidades moleculares comuns às células adjacentes tumor (DAKUBO et al., 2007). Essas mudanças levam ao desenvolvimento do câncer de pulmão exibindo todos os “hallmarks do câncer” (incluindo autossuficiência de sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, evasão de morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, entre outros, já destacados na figura 1 (HANAHAN, 2022). O câncer de pulmão é uma doença heterogênea clinicamente, biologicamente, histologicamente e molecularmente. Compreender suas causas moleculares dessa heterogeneidade e mecanismos de desenvolvimento é o foco das pesquisas atuais e estas podem refletir alterações que ocorrem em diferentes classes de células epiteliais ou diferentes alterações moleculares que ocorrem nas mesmas células epiteliais pulmonares alvo. Identificar os genes e vias envolvidas, determinar como eles se relacionam entre si e com o comportamento biológico do câncer de pulmão e sua utilidade como alvos diagnósticos e terapêuticos são importantes questões básicas e de pesquisa translacional. (LARSEN; MINNA, 2011).

1.10 Hallmark: evitando destruição imune

O envolvimento do sistema imunológico na progressão do câncer vem sendo objeto de muitos estudos. Essas interações entre o sistema imunológico e o câncer, em geral, ocorrem por meio de eventos complexos que geralmente culminam na erradicação bem-sucedida do tumor ou na evasão imunológica pelo câncer. (VINAY et al., 2015).

O desenvolvimento e a sobrevivência do tumor é um processo que envolve a interação entre células cancerosas, células estromais normais e mecanismos de defesa do hospedeiro. Descobertas fundamentais vitais feitas nas últimas décadas mostraram que o sistema imunológico desempenha um papel crítico na manutenção

do equilíbrio entre o reconhecimento imunológico e o desenvolvimento do tumor, com uma capacidade dupla de promover e suprimir o crescimento tumoral. (VINAY et al., 2015). Diversos processos podem, eventualmente, permitir que os tumores prejudiquem a capacidade do sistema imunológico de erradicá-los por efeitos imunossupressores ou pela perda da expressão do antígeno alvo, entre outros mecanismos. Nesse momento que ocorre o escape do tumor, resultando em câncer clínico evidente (SHAY; RONINSON, 2004).

1.11 Principais mecanismos de evasão imune tumoral

A imunossupressão no microambiente tumoral, mediada por células T reguladoras CD4+, CD25⁺, FoxP3+ (células T reguladoras), ou outros tipos de células supressoras, parece ser um mecanismo importante de escape imune tumoral (JACOBS et al., 2012). As células T reguladoras são atraídas para o microambiente tumoral através da produção de quimiocinas mediada por células tumorais (LEE et al., 2005). Além disso, o fator de crescimento transformador (TGF)- β produzido por células tumorais estaria envolvido, auxiliando na conversão de células T CD4+ em células T reguladoras supressoras *in situ* (ZOU, 2006). Células mieloides, especialmente as células supressoras derivadas de mieloides, células dendríticas moduladas e macrófagos M1 e M2 ativados alternativamente criam um microambiente inflamatório atuando também como mediadores da iniciação do tumor, angiogênese e metástase, como será destacado adiante. (MURDOCH et al., 2008).

A Apresentação de antígeno defeituosa é bem estabelecida como mecanismo fundamental porque os tumores escapam da vigilância imunológica. Há modulação na maquinaria de processamento de antígeno que afeta a via do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I, subunidades de proteossoma latentes, proteína de membrana LMP2 e LMP7, transportador associado com proteína de processamento de antígeno (TAP) e tapasina. Assim, há uma regulação negativa da expressão do antígeno tumoral, aumentando a incidência do tumor e favorecendo metástase, já que os linfócitos T citotóxicos (CTL) não podem mais reconhecer antígenos-alvo no nas células tumorais. (MAEURER et al., 1996).

Além dos mecanismos citados, os tumores podem evadir da vigilância imunológica através da funcionalidade dos linfócitos T citotóxicos prejudicada, por meio da produção de citocinas supressoras, seja pelas células cancerígenas ou pelas células não cancerosas presentes no microambiente tumoral, especialmente células imunes e células epiteliais. O TGF- β é um dos principais mediadores desta atividade.

Além disso, participam as interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF), fator estimulador de colônias (CSF)-1, interferons (INF), entre outros, contribuindo significativamente para o crescimento tumoral (GABRILOVICH D. I, CHEN H. L, GIRGIS K. R, CUNNINGHAM H. T, MENY G. M, NADAF S, 1996).

Os tumores são também conhecidos por evitar o ataque imunológico, mudando o equilíbrio de das respostas Th1 a Th2 (desvio imunológico) através de citocinas imunomediadoras. Além disso, a expressão tumoral de moléculas inibitórias como o receptor de morte celular programada PD-1 (B7-H1) demonstrou causar deleção ou anergia em células tumorais reativas. Há também evidência de que a regulação negativa dos receptores de morte previne a morte mediada por ligante de células tumorais por ambos os linfócitos T citotóxicos e células naturais killer (NK). Assim, além dos destacados, diversos fatores estão envolvidos na tolerância e nos mecanismos de evasão imunológica do câncer. O quadro 1 traz um breve resumo destes e de outros mecanismos envolvidos na evasão imunológica tumoral. (FRENCH; TSCHOPP, 2002; TOPALIAN; DRAKE; PARDOLL, 2013).

Quadro 1 – Resumo principais mecanismos de crescimento, progressão e evasão tumoral e interações com sistema imune.

Interações entre formação tumoral e respostas imunes	Progressão tumoral e imunidade	Evasão imune pelo Tumor
<ul style="list-style-type: none"> • Infecções, estresse inflamatório - ↑ Crescimento tumoral; angiogênese e sobrevivência tumoral • Doenças autoimunes - ↑ crescimento tumoral 	<ul style="list-style-type: none"> • Imunoedição - ↑ crescimento tumoral 	<ul style="list-style-type: none"> • Células T reguladoras • Macrófagos M2 • Apresentação de Antígeno defeituosa • Mediadores supressivos imunes • Tolerância e escape imune • Apoptose • Imunomediação por citocinas

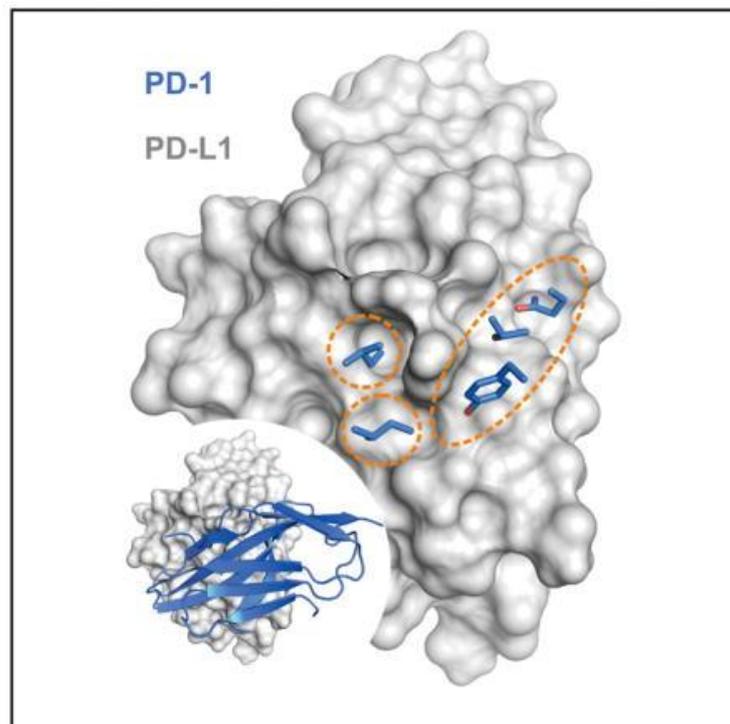
Fonte: adaptado de (LARSEN; MINNA, 2011)

1.12 PD-1/PD-L1 e imunologia tumoral

1.12.1 PD-1

PD-1, também designado como CD279, foi descoberto pela primeira vez em linhagens celulares LyD9 (progenitor hematopoiético murino) e 2B4-11 (hibridoma de células T murinas) privadas de interleucina-3 (IL-3) em 1992 (ISHIDA et al., 1992). PD-1 é 15% semelhante à sequência de aminoácidos de CD28, 20% semelhante a CTLA4 e 13% semelhante ao co-estimulador de células T induzido. PD-1 é uma proteína transmembrana de 55 kDa contendo em sua estrutura 288 aminoácidos com um domínio N-terminal extracelular, um domínio de permeação de membrana e uma cauda citoplasmática localizada nas extremidades nitrogenada e carboxilada, respectivamente, com duas bases tirosina (figura 4) (NEEL; GU; PAO, 2003).

Figura 4 – Estruturas tridimensionais PD-1/PD-L1.



Fonte: adaptado de (MUSIELAK et al., 2016)

PD-1 é um inibidor das respostas imunes adaptativa e inata. É expresso em linfócitos T ativados, natural killer (NK) linfócitos B, macrófagos, células dendríticas (DCs) e monócitos. PD-1 é altamente expresso em células T no microambiente tumoral (AHMADZADEH et al., 2016). Fatores de transcrição como fator nuclear de células T ativadas (NFAT), proteína Forkhead box (FOX) O1 e interferon (IFN) fator

regulador 9 (IRF9) podem desencadear a transcrição de PD-1. As regiões reguladoras a montante conservadas B e C (CR-B e COR-C) são importantes para a expressão do gene PD-1. Existe um sítio de ligação na região CR-C que está conectado ao NFATc1 (NFAT2) nas unidades TCD4 e TCD8. Em vez disso, o c-FOS se conecta a locais na região CR-B e aumenta a expressão de PD-1 quando estimula os receptores de células T após a detecção de Ag em células T virgens. O NFATc é ativado e se liga à região promotora do gene *pdcd1*. Durante infecções crônicas, PD-1 é expresso em células TCD8 devido ao seu promotor desmetilado, e o fator de transcrição FOXO1 se liga ao promotor PD-1 para aumentar sua expressão. O vazamento de células cancerosas aumenta a expressão da subunidade c-FOS de AP1, aumentando assim a expressão de PD-1 (LI et al., 2015; XIAO et al., 2012).

O PD-1 desempenha dois papéis opostos: benéfico ou prejudicial. De forma benéfica, desempenha um papel fundamental na redução da regulação de respostas imunes ineficazes ou prejudiciais e na manutenção da tolerância imune. Prejudicialmente, possui potencial para proliferação de células malignas ao interferir na resposta imune protetora (HAN; LIU; LI, 2020).

1.12.2 PD-L1

O ligante PD-1 (PD-L1; também referido como CD279 e B7-H1), pertence à série B7 e é uma glicoproteína transmembranar tipo 1 de 33 kDa que contém 290 aminoácidos com domínios Ig- e IgC em sua região extracelular (SANMAMED; CHEN, 2015). (Figura 4).

PD-L1 é geralmente expresso por macrófagos, algumas células T e células B ativadas, células dendríticas e algumas células epiteliais, principalmente sob condições inflamatórias. Além disso, o PD-L1 também é expresso pelas células tumorais como mecanismo de evasão da resposta imune. Ele está associado a um ambiente imunológico rico em células T CD8, produção de citocinas Th1 e fatores químicos, bem como interferons e características específicas de expressão gênica (JI et al., 2015). Foi demonstrado que IFN- γ causa aumento de PD-L1 em células de câncer de ovário, que é responsável pela progressão da doença, enquanto a inibição do receptor 1 de IFN- γ pode reduzir a expressão de PD-L1 em modelos de camundongos com leucemia mieloide aguda através do sinal MEK/extracelular quinase regulada (ERK) e vias MYD88/TRAF6. As células NK secretam IFN- γ através das vias Janus quinase (JAK)1, JAK2 e transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT)1, aumentando a expressão de PD-L1 na superfície das células

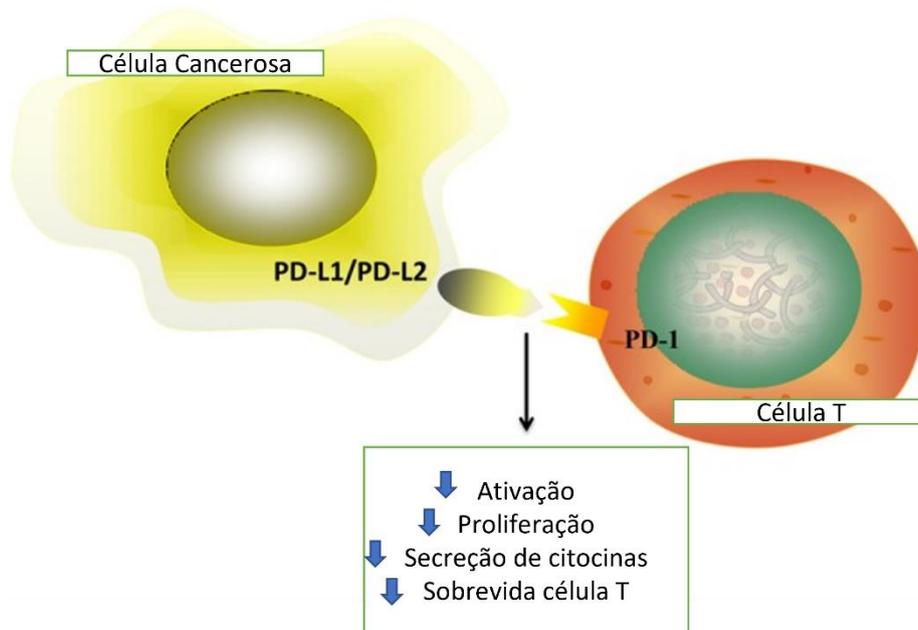
tumorais. Estudos em células de melanoma mostraram que IFN- γ secretado por células T através da via JAK1/JAK2-STAT1/STAT2/STAT3-IRF1 pode regular a expressão de PD-L1. As células T e NK parecem secretar IFN- γ , induzindo a expressão de PD-L1 na superfície das células alvo, incluindo células tumorais. (ABIKO et al., 2015; BELLUCCI et al., 2015; GARCIA-DIAZ et al., 2019)

PD-L1 é um ligante que possui atuação como um fator pró-tumorigênico em células cancerosas através da ligação aos seus receptores, ativando vias de sinalização proliferativas e de sobrevivência. Esta descoberta indicou ainda que PD-L1 está diretamente envolvido na progressão tumoral subsequente. Além disso, o PD-L1 demonstrou exercer efeitos proliferativos não imunes em uma variedade de tipos de células tumorais. Por exemplo, PD-L1 induziu a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e fenótipos semelhantes a células-tronco em células cancerígenas renais, indicando que a presença da via intrínseca de PD-L1 promove a progressão do câncer renal. (DONG et al., 2018; NUNES-XAVIER et al., 2019)

1.12.3 PD-L1 no câncer de pulmão

No estudo da imunologia do câncer, os mecanismos de resistência adaptativa no impedimento da execução da imunidade tumoral vem sendo objeto de estudo (WANG et al., 2019). A expressão da molécula B7-H1 (PD-L1), por exemplo, no microambiente tumoral é um mecanismo de grande importância na evasão imunológica pelo câncer em alguns pacientes e o bloqueio dessa associação através de anticorpos pode inibir a evasão imune (Figura 5).

Figura 5 – interação entre Célula tumoral e célula T, através de PD-1/PD-L1



Fonte: adaptado de (HAN; LIU; LI, 2020)

A descoberta desses dados já permitiu o desenvolvimento e uso de medicações que atuam no bloqueio PD-1/PD-L1, como o pembrolizumabe, que é aprovado como terapia de primeira linha para NSCLC avançado com níveis de PD-L1 $\geq 50\%$ e terapia de segunda linha com expressão de PD-L1 $\geq 1\%$. Atezolizumabe e nivolumabe são aprovados como terapia de segunda linha, independentemente do status PD-L1 (RAJU; JOSEPH; SEHGAL, 2018).

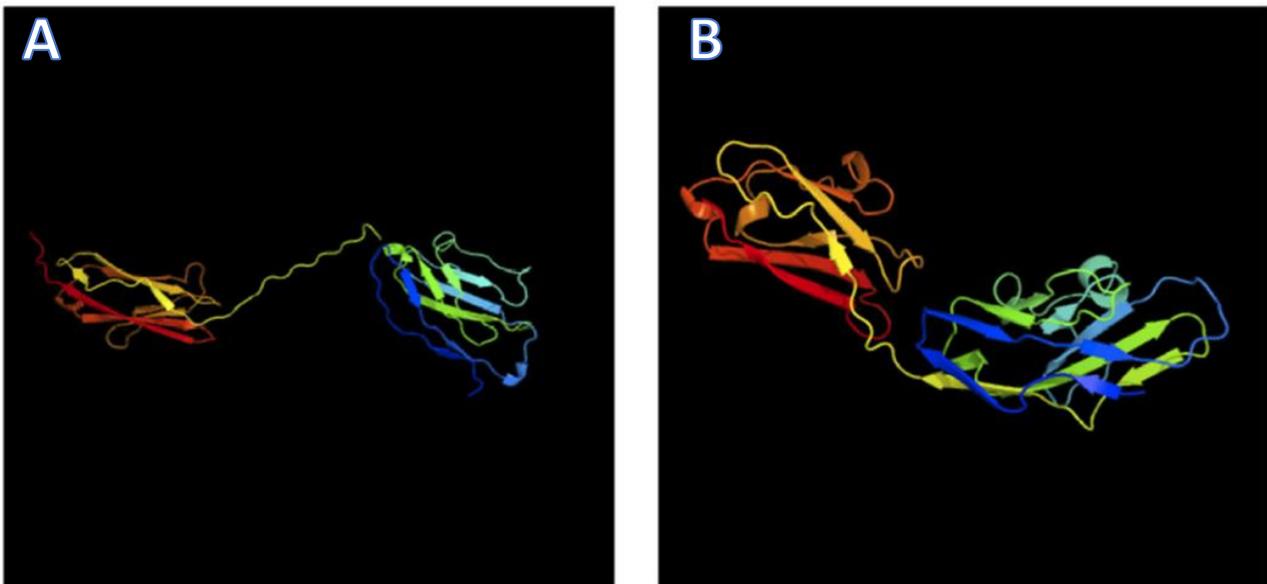
1.13 Siglec 15

Os Siglecs são uma família de receptores de membrana que participam na regulação de respostas imunes através de motivos inibidores de imunorreceptores e motivos ativadores de imunorreceptores, ambos à base de tirosina (COGNASSE et al., 2015). Esta família é composta por 16 receptores humanos e 9 em camundongos, que realizam ligações aos ácidos siálicos terminais em glicanos com diversas funcionalidades na imunidade (DALY; CARLSTEN; O'DWYER, 2019). Nessa família de receptores, o Siglec-15 possui destaque e é objeto de mais estudos, por dados obtidos mostrando interações na regulação da imunidade tumoral, por mecanismos não totalmente definidos (BORNHÖFFT et al., 2018).

Siglec-15 foi identificado e estudado por Takashi et al em 2007 (ANGATA et al., 2007). Estruturalmente (Figura 6), o Siglec-15, também conhecido como CD33L3 e HsT1361, possui diferenças dos outros membros da família (TAKAMIYA et al., 2013):

sua localização cromossomal, 18q12.3; compartilha 20% de similaridade dos aminoácidos dos domínios extracelulares com os da família B7, levantando a possibilidade de funções semelhantes na regulação imunológica, como os membros da família B7 (WANG et al., 2019). As funções e o mecanismo de regulação do Siglec-15 foram propostos recentemente, mostrando através da análise da matriz de atividade das células T em escala genômica, que o Siglec-15 pode ser outra molécula pra via de ação imunossupressora, potente, para uma futura terapia imunológica contra o câncer. (SANMAMED; CHEN, 2018). Entretanto, ainda permanece sem esclarecimentos a associação com outras alterações, mutações, perfil clínico e sobrevida de pacientes com a presença significativa de Siglec-15, principalmente nos pacientes com câncer de pulmão, que é a doença maligna mais comum no mundo. (ARAUJO et al., 2018).

Figura 6 – Estrutura tridimensional (a) e cristalina (b) Siglec-15



Fonte: adaptado de (RASHID et al., 2021)

1.14 Siglec-15 e a regulação imunológica

Dadas suas semelhanças estruturais com a família B7 e padrão de expressão dominante em células mieloides, existia hipótese inicial que Siglec-15 poderia estar envolvido na regulação da imunidade. No início de 2010, foi observado a inibição da atividade NF- κ B em células T Jurkat por HEK-293T em células com expressão de Siglec-15. Além disso, a proteína de fusão do ectodomínio Siglec-15, revestida em placas ou fornecida na forma solúvel, inibiu fortemente a proliferação de células T

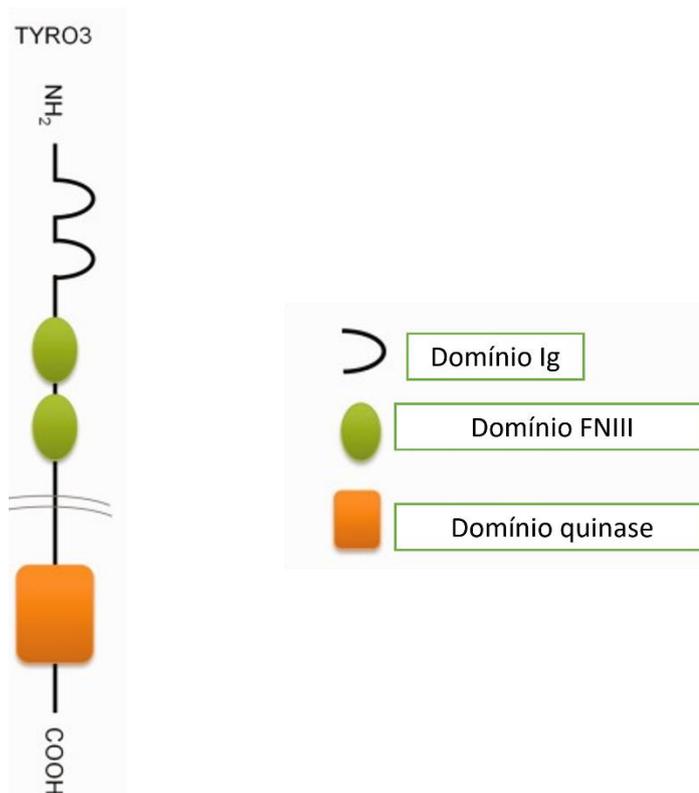
humanas induzidas por anti-CD3. Além disso, foi demonstrada que a expressão de siglec-15 em células apresentadoras de antígenos artificiais (APCs) suprimiu a proliferação de células T de camundongo e a secreção de citocinas. Esses dados *in vitro* sugeriram uma função semelhante do ligante de Siglec-15 que suprime células T humanas ou de camundongo através da sinalização do(s) receptor(es). A função *in vivo* de Siglec-15 em células T foi posteriormente validada usando um modelo experimental de camundongo com encefalomielite autoimune (EAE). (SATO et al., 2018). Foi demonstrado que a EAE foi significativamente agravada em camundongos com deficiência de siglec-15 ou pela injeção de proteína de fusão de ectodomínio siglec-15 e células T, sendo a resposta notavelmente amplificada em comparação com grupos controle. (WANG et al., 2019).

Os estudos sugerem que o mRNA de siglec-15 é expresso exclusivamente por macrófagos entre os principais subconjuntos imunológicos e tecidos normais. Usando anticorpo específico para siglec-15 desenvolvido internamente, foi demonstrado que a expressão de siglec-15 foi limitada a macrófagos peritoneais e macrófagos derivados de medula óssea, sem achados em outras células imunes importantes. Além disso, existe uma fisiopatologia mínima em camundongos com deficiência de siglec-15, sugerindo que siglec-15 não é crítico para desenvolvimento de camundongos ou para a homeostase do sistema imunológico em condições de estado estacionário. A expressão de siglec-15 ativada em macrófagos foi induzida principalmente pelo fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) possivelmente por outros mediadores inflamatórios inatos (WANG et al., 2019). Como o M-CSF pode ser liberado por vários tecidos, células epiteliais e hematopoiéticas em resposta a citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- α , uma maior expressão de siglec-15 em macrófagos pode representar uma via de feedback negativo na regulação da imunidade inata e adaptativa (KANG et al., 2020; WANG et al., 2019). A função supressora de células T do siglec-15 associado a macrófagos foi ainda validada por experimentos de co-cultura. Estudos mostraram que a superexpressão de siglec-15 em células THP-1 facilita a produção de TGF- β na interação com ligantes de glicano Sialil-Tn em células tumorais, que podem ser mediadas pela via DAP12-Syk. (ANGATA et al., 2007; TAKAMIYA et al., 2013). Devido a esses achados e semelhança com PD-L1, siglec-15 surge como potencial biomarcador e alvo terapêutico, com resultados potencialmente promissores.

1.15 TYRO3

Os receptores TYRO3 carregam dois domínios semelhantes a imunoglobulina (Ig) em seu terminal N, seguidos por duas repetições de fibronectina tipo III, uma região transmembranar e um domínio tirosina quinase na região intracelular C-terminal (figura 7).

Figura 7 – esquema de estrutura do receptor Tyro 3



Fonte: adaptado de (HSU; JOU; TSAI, 2019)

1.15.1 TYRO3 no câncer

A gênese tumoral é influenciada pela interação entre sinais entre células tumorais e o microambiente tumoral. Uma resposta imune anti-inflamatória do tipo 2 é estimulada com a ativação das tirosinas quinase da família TAM (TYRO3, AXL, MERTK), levando a uma indução de citocinas anti-inflamatórias, com supressão da imunidade no microambiente tumoral (SMART et al., 2018), (BISWAS; MANTOVANI, 2010). As tirosinas quinases da família TAM desempenham algumas funções em diversos processos: agregação plaquetária, regulação imunológica, migração celular, entre outros. Os estudos sobre a proteína TYRO3 são mais escassos.

O primeiro estudo que indica que o TYRO3 exerce capacidade oncogênica foi evidenciado ao mostrar que fibroblastos de Rat-2 transfectados com Tyro3 podem crescer em ágar. O estudo em tumores mamários humanos e de camundongos corroboram ainda mais essa noção.

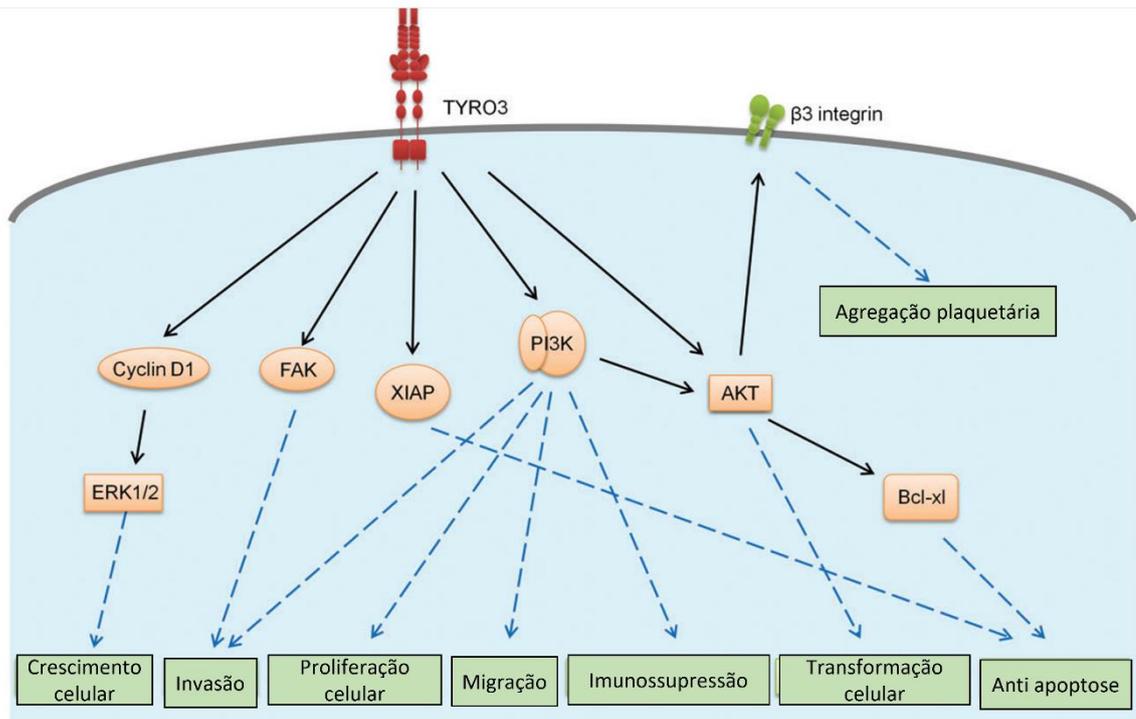
Dados revelaram papéis do TYRO3 no câncer, sugerindo como alvo terapêutico (SMART et al., 2018) (LEMKE, 2013). TYRO3 está superexpressado em muitos tipos de câncer e possui envolvimento na promoção na sobrevivência e na proliferação de células tumorais, promovendo metástases e resistência à quimioterapia, além da associação à diminuição da sobrevida global, quando encontrado em altos níveis (SMART et al., 2018). Os níveis de mRNA de TYRO3 foram aumentados em 2 vezes ou mais em aproximadamente 40% das amostras de pacientes com carcinoma hepatocelular em comparação com o tecido hepático normal adjacente e em um painel de linhas de células de câncer de fígado humano em relação a uma linha de células de hepatócito normal (DUAN et al., 2016). Expressão abundante de TYRO3 também foi demonstrado em tecido de câncer de mama murino, enquanto a expressão de TYRO3 foi mínima em tecido mamário normal de camundongos (TAYLOR et al., 1995a). Ausente no tecido normal da tireoide, TYRO3 foi expresso ectopicamente em todos os carcinomas de tireoide humanos de linhagens celulares testadas (AVILLA et al., 2011). TYRO3 também foi expresso em células B e T de linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e amostras de pacientes com leucemia linfocítica crônica (SINHA et al., 2015; TAYLOR et al., 1995). TYRO3 também foi expresso em metástases hepáticas em pacientes com câncer colorretal e em lesões ósseas metastáticas em camundongos com um xenoinxerto de câncer de próstata (JANSEN et al., 2012; SCHMITZ et al., 1991; TAICHMAN et al., 2013).

1.15.2 Principais sinalizações TYRO3 no câncer

Por meio da sinalização AKT/NFjB, o TYRO3 exerce efeitos pró-sobrevivência e promove o crescimento de células cancerígenas. O TYRO3 também desencadeia a tirosilfosforilação de ACTN4, um membro da família de proteínas de ligação à actina envolvidas na motilidade. A eliminação de Tyro3 por siRNA previne a migração e invasão de células de melanoma. (HSU; JOU; TSAI, 2019; SMART et al., 2018). TYRO3 regula vias importantes para a proliferação celular e sobrevivência, (por exemplo, sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK), migração e invasão, transição epitelial para mesenquimal (EMT), regulação do ciclo celular, regulação transcricional, modulação imune e transformação oncogênica. A heterodimerização de TYRO3 e

AXL foi relatada, embora seu significado funcional é desconhecido, e o crosstalk entre o TYRO3 e os receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR) e/ou receptores HER2 foram implicados em células de câncer de mama. A função do TYRO3 nuclear é desconhecida. (SMART et al., 2018). Na figura 8 é destacado um esquema resumindo as principais funções e vias de sinalização do TYRO3

Figura 8 – Representação esquemática vias de sinalização TYRO3



Fonte: adaptado de (HSU; JOU; TSAI, 2019)

Sinalizações cruzadas entre as células tumorais e os macrófagos MAT, podem induzir a expressão de ligantes da família TAM (SCHMIDT et al., 2012). As células tumorais estimulam TYRO3 em macrófagos através de citocinas, com a promoção do fenótipo M2, favorecendo a resposta inibitória da imunidade inata no microambiente tumoral. As tirosinas quinases TAM estão envolvidas na diminuição da resposta imune inflamatória, com estímulo de proteína S (PROS1) secretada pelo tumor, através da diminuição de citocinas M1 em macrófagos in vitro e in vivo (WIMMEL et al., 1999) (SMART et al., 2018).

1.16 Semelhanças entre Siglec-15 e TYRO 3 na imunologia tumoral

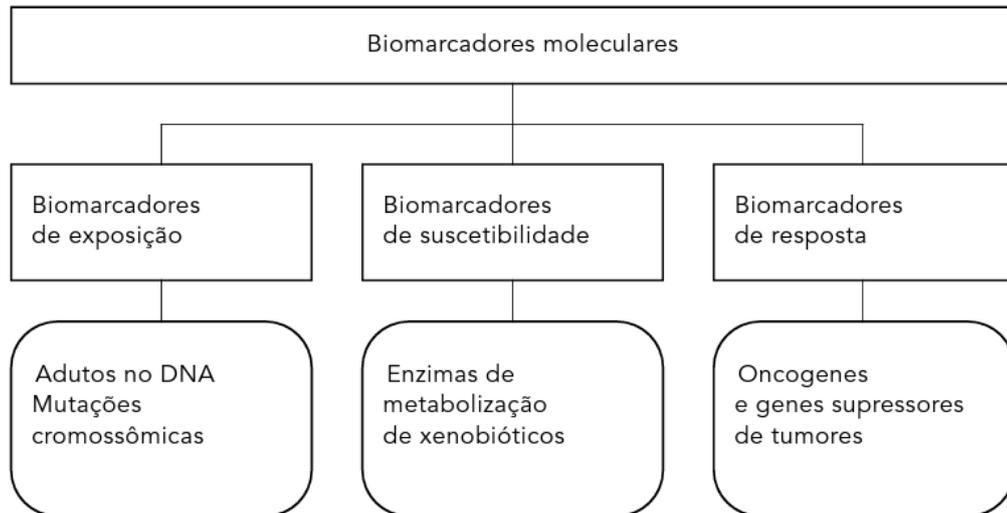
Nesse campo, os macrófagos possuem papéis centrais no desenvolvimento da resposta imune adaptativa e inata, através de apresentação de antígenos e produção de uma numerosa variedade de citocinas (TAKAMIYA et al., 2013), (WANG et al., 2019).

Nos tumores sólidos pode ocorrer infiltração dos macrófagos associados (MATs) e estes estão associados à progressão de doença e metástases (MANTOVANI; LOCATI, 2013). Assim, as funções dos MATs envolvem a promoção de migração de células tumorais, infiltração, supressão antitumorais, entre outras (MANTOVANI; LOCATI, 2013; TAKAMIYA et al., 2013). Alguns estudos já vêm mostrando que associações lectinas-glicanos contribuem para a regulação dos microambientes imune e tumoral (RABINOVICH; CROCI, 2012) . Nesse grupo de lectinas endógenas estão lectinas tipo C, Siglecs e gelectinas (RABINOVICH; CROCI, 2012). Destacam-se os Siglecs, que constituem o tipo principal com funções promotoras das características já citadas dos MATs, no microambiente tumoral (TAKAMIYA et al., 2013). Nas vias de sinalização e atuação através dos macrófagos associados ao tumor (MATs), Siglec-15 e TYRO3 possuem semelhanças de atuação, motivo para escolha como possíveis marcadores prognóstico, terapêutico e potencial biomarcador em câncer de pulmão.

1.17 Siglec-15 e TYRO3 como potenciais biomarcadores em câncer de pulmão

Qualquer tentativa de sistematizar uma classificação dos biomarcadores moleculares será inevitavelmente simplificada e estará sempre distante de apreender o verdadeiro papel que cada alteração molecular exerce na carcinogênese. Os biomarcadores têm sido categorizados em três tipos principais: de exposição, de suscetibilidade e de resposta (WÜNSCH FILHO, V., et al 2001). Os biomarcadores de exposição correspondem à expressão de um agente ambiental ou de seus metabólitos no meio interno dos indivíduos. Os de suscetibilidade indicam indivíduos mais ou menos propensos a desenvolver câncer quando expostos a substâncias cancerígenas. Os biomarcadores de efeito ou de resposta indicam alterações presentes em tumores; são tardios e permitem avaliar o prognóstico da doença (figura 9).

Figura 9 – classificação de biomarcadores moleculares



Fonte: adaptado de (WÜNSCH FILHO; GATTÁS, 2001)

No câncer de pulmão, a caracterização molecular do câncer mudou consideravelmente a classificação e o tratamento desses tumores, tornando-se um componente essencial do diagnóstico e tratamento. Através do reconhecimento de novos biomarcadores, como mutações do receptor do fator de crescimento epidérmico, presença de PD-L1, entre outros, foi possível identificar subgrupos de pacientes que se beneficiam de terapias moleculares direcionadas. As novas abordagens de imunoterapia criaram um novo paradigma de terapia personalizada e também levaram ao desenvolvimento acelerado de novos medicamentos para o tratamento do câncer de pulmão (VILLALOBOS; WISTUBA, 2018). Siglec-15 e TYRO3 possuem semelhanças entre si, em seu mecanismo de sinalização e evasão tumoral através da interação com macrófagos MAT. Além disso, Siglec-15 possui características estruturais semelhantes ao PD-L1, o qual mostrou resultados excelentes como alvo terapêutico, marcador prognóstico. Alguns estudos destacaram Siglec-15 com maior expressão em tumores hepáticos, esplênicos, com sugestão para pior prognóstico na evolução (WANG et al., 2019). Tyro3 também foi destacado com associação a pior prognóstico e aumento das chances de invasão tumoral e metástase para tumores hepáticos, melanoma, tumores de tireoide (HSU; JOU; TSAI, 2019). Destaca-se o comportamento dessas moléculas com dados sugerindo maior expressão no microambiente tumoral e baixa expressão em outras regiões do corpo, além de dados sobre a participação dessas moléculas em meios de sinalização ainda não bem definidos no microambiente tumoral, mas presente em outros tipos de

neoplasia. (HSU; JOU; TSAI, 2019; WANG et al., 2019). Diante disso, essas moléculas seriam boas candidatas a biomarcadores de efeito, ou resposta, ajudando a identificar melhor o prognóstico do câncer de pulmão, permitindo uma estratégia de precisão no tratamento, como alvos terapêuticos possíveis (figura 7).

A avaliação da expressão proteica de Siglec-15 e Tyro 3 em diversas células tumorais, estromais e imunes, mostra-se essencial para a caracterização do perfil dos pacientes com câncer de pulmão. Além disso, a análise de outras variáveis clínicas complementa essa abordagem, permitindo investigar a associação dessas proteínas com a sobrevida e a morbi-mortalidade dos pacientes. Essa investigação representa uma ferramenta valiosa na elaboração de estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer de pulmão. Ao se esperar resultados promissores, essa abordagem visa melhorar significativamente a sobrevida dos indivíduos afetados por essa doença maligna, que atualmente é considerada a mais letal em todo o mundo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar comparativamente a expressão de Siglec-15 e TYRO3 em tumores pulmonares do tipo não pequenas células, visando a utilização destas proteínas como potenciais marcadores prognósticos, através de uma análise *in vitro* e *in silico* e *ex vivo*

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de Siglec-15 e TYRO3, em amostras de tumores primários e metástases localizadas no pulmão *in silico*, *in vitro* e *ex vivo*
- Analisar possíveis associações entre os achados da expressão de Siglec-15 e Tyro 3 entre si e de ambos com os parâmetros clínicos para câncer de pulmão *in silico*, *in vitro* e *ex vivo*
- Avaliar possíveis associações entre os achados de expressão tecidual de Siglec-15 e Tyro 3 com curvas de sobrevida ajustadas aos estágios do câncer de pulmão *in silico*, *in vitro* e *ex vivo*

3 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do estudo, pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão não pequenas células foram incluídos conforme critérios de elegibilidade. Foram coletadas amostras de sangue para análise do soro – conforme descrito a seguir - amostras de blocos parafinizados dos arquivos de patologia dos hospitais participantes (Hospital do Câncer de Pernambuco, Hospital Universitário Oswaldo

Cruz e laboratório Adonis Carvalho), além de fragmentos de tecido fresco dos tumores primários e/ou metastáticos. Para as análises dos blocos, foi realizada reação por processo de imuno-histoquímica das lâminas, com uso dos anticorpos anti-Siglec-15 e anti-TYRO3. Trata-se de um estudo observacional, transversal, analítico e retrospectivo.

Todos os procedimentos realizados em estudos envolvendo participantes humanos estavam de acordo com os padrões éticos do comitê de pesquisa institucional e/ou nacional e com a Declaração de Helsinki de 1964 e suas emendas posteriores ou padrões éticos comparáveis. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética com CAAE 40936420.9.0000.5205

3.1 Critérios de elegibilidade

3.1.1 Inclusão: Pacientes com diagnóstico clínico de neoplasia pulmonar (carcinoma pulmonar não pequenas células) com ou sem metástase, com indicação cirúrgica, virgens de tratamento com quimioterápicos e/ou radioterapia. As amostras coletadas foram classificadas quanto ao tipo histológico pelos serviços de patologia das instituições participantes. Todo material coletado teve origem de espécimes pulmonares (lobectomias, segmentectomias), linfonodos mediastinais (mediastinoscopia), pleura parietal (videotoracoscopia). Independente do estágio da doença dos pacientes, todos os candidatos a procedimento cirúrgico com material para análise histológica foram incluídos na pesquisa. Amostras extraídas por broncoscopia foram aceitas quando a quantidade de material obtido foi suficiente para análise patológica, imuno-histoquímica e outros testes. O seguimento dos pacientes ocorreu com equipe clínica assistente, por oncologista-clínico responsável. Todas as variáveis clínicas importantes para as análises *a posteriori*, foram coletadas e registradas em uma ficha clínica padrão (anexo B). Dentre as variáveis epidemiológicas e clínicas que foram coletadas destacamos: idade do paciente, idade de diagnóstico do câncer de pulmão/metástase; sexo; exposição a fatores de risco, incluindo tabagismo, elitismo, arsênio dentre outros; tipo de tumor; estadiamento (Ia, Ib, II, III, IV); tratamento pós- diagnóstico (quimioterapia, radioterapia).

3.1.2 Exclusão: Pacientes com outros tipos de neoplasias, e em vigência de tratamento quimioterápico ou radioterápico.

3.2 Coleta de amostra e dosagem de moléculas no soro

De cada paciente submetido ao processo cirúrgico, foram coletadas pequenas amostras do pulmão acometido pela neoplasia (tecido fresco, estabilizado na solução

RNAlater®ThermoFisher) para posterior análise da expressão gênica e proteica. Além disso, foram coletados 4 ml de sangue total à vácuo em tubo a seco com gel Separador por profissional habilitado em flebotomia. Para obtenção do soro, as amostras serão submetidas à centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. O soro obtido será aliqotado em microtubos de fundo cônico de 1,5 mL e armazenado a temperatura de -80°C.

3.3 Amostras clínicas: Amostras parafinizadas de câncer de pulmão não pequenas células foram selecionadas do arquivo do Serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Pernambuco- HCP e laboratório Adonis Carvalho. Foram incluídos no estudo apenas casos diagnosticados, confirmados como tumores primários e/ou metastáticos de câncer de pulmão. Dos prontuários médicos foram obtidas as seguintes variáveis: idade, sexo, tamanho do tumor no momento do diagnóstico, número de linfonodos mediastinais, estadiamento clínico/patológico, recorrência e óbito.

3.4 Imuno-histoquímica: Inicialmente foi realizada uma padronização do protocolo com os anticorpos anti-siglec-15 (CSB-PA975446 CUSABIO Technology LLC) e Tyro-3 (CSB-PA006534 CUSABIO Technology LLC). O protocolo inicial consistia em desparafinização dos blocos em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100, 95, 80, e 75%). Em seguida foi feita a recuperação antigênica em tampão Tris/EDTA, pH 9.0 ou pH 6.0 e incubação dos anticorpos primários por 2 horas. Como a marcação não ficou satisfatória, foi adequado o protocolo para recuperação antigênica em tampão citrato 100mM, pH 6.0 em micro-ondas 300W por 15 mim. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas com bloqueador de peroxidase endógena por 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com bloqueador proteico por 10 minutos, a temperatura ambiente. Os anticorpos foram diluídos em PBS-BSA 5% (p/v 1:50) overnight, a 4°C. Em seguida, os anticorpos secundários foram aplicados (Dako EnVSION Duoflex-HRP) por 60 minutos, a temperatura ambiente e o sistema de amplificação do kit comercial *Easylink One* foi aplicado, por 10 a 25 minutos, a temperatura ambiente, e revelados com DAB-H₂O₂. Os controles positivos foram utilizados segundo indicação do fabricante e os controles negativos foram estabelecidos através da substituição do anticorpo primário por anticorpo anti-IgG humana (DAKO).

3.5 Análise de Imagens: A análise morfológica foi realizada com a utilização sistema integrado de análise de imagens EVOS® FL que utiliza software e câmera monocromática sensível Sony ICX445 (resolução de 1280 x 960 pixels) disponível no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT. A análise semi-quantitativa das células marcadas foi feita analisando dez campos aleatórios em cada caso.

3.6 Avaliação *in silico*: As coortes de validação analisadas neste estudo foram extraídas da genômica cBioPortal PC (<http://www.cbioportal.org>). Foram utilizados dados da expressão do mRNA no câncer de pulmão não pequenas células (TCGA Firehose Lung adenocarcinoma, TCGA Pancancer Atlas Lung Squamous cell cancer) para Siglec 15, compreendendo 515 e 482 pacientes, respectivamente (CANCER et al., 2013; DENG et al., 2016; LI et al., 2022). Para Tyro 3 foram utilizados dados da expressão do mRNA em adenocarcinoma pulmonar (ONCOSG Nat genet Lung adenocarcinoma; CPTAC lung adenocarcinoma e TCGA Firehose Lung adenocarcinoma) com 169, 110 e 515 pacientes respectivamente (CHEN et al., 2020, WEBSTER et al., 2020). O valor da expressão de mRNA de Siglec 15 e TYRO 3 foram comparados com dados clínicopatológicos (idade, sexo, envolvimento linfonodal, grau histológico, estadiamento) com parâmetros de desfecho (sobrevida global e sobrevivida livre de doença) com uso de valor de p significativo para valores inferiores a 0,05. A associação estatística foi realizada usando o teste exato de Fisher e as curvas de kaplan-meyer com log-rank usando o GraphPad Prism versão 5.0.

3.7 Criação do banco de dados para análises de expressão gênica

Para criação do banco de dados, foi utilizado informações do TCGA (The Cancer Genome Atlas Program) para pacientes com adenocarcinoma pulmonar (LUAD, n = 517) e carcinoma pulmonar de células escamosas (LUSC, n = 501). O banco de dados foi montado através do Rstudio (RSTUDIO TEAM, 2020), com o pacote do TCGAAbiolinks (MOUNIR et al., 2019), utilizando as funções GDCquery_clinic () e get_OmicsData (), para a criação da matriz de dados com as informações clínicas dos pacientes, dados de sequenciamento de RNAm, níveis de metilação, mutações, dentre outros.

Os genes referentes ao genoma humano hg38 (*Homo sapiens* – RefSeq assembly: GCF_000001405.26) foram correlacionados aos pacientes, formando a matriz de dados principal com valores de *counts* (número total de moléculas detectadas dentro de uma célula) para as análises de expressão gênica. A matriz de

counts foi normalizada usando a função `TCGAanalyze_Normalization()` e convertida em *TPM* (Transcript Per Million) pelo pacote `caret` (KUHN, 2008) através da função `calculateTPM()`. Por fim, os genes foram anotados usando o pacote `org.Hs.eg.db` (CARLSON M, 2019), utilizando a função `mapIds()`.

3.8 Análises de fold-change / DEGs (expressão diferenciada entre genes) entre amostras tumorais e normais

Inicialmente foram criados dois subgrupos para amostras tumorais e normais utilizando a função `TCGAquery_SampleTypes()`. Para análises de fold-change / DEGs entre os subgrupos, foi utilizada a função `TCGAanalyze_DEA()` com o método estatístico "glmLRT", gerando uma tabela de dados com valores de logFC (fold-change convertido para log), FDR (taxa de descoberta falsa, provinda do p-value) e diferença de expressão gênica entre os dois subgrupos. Para visualização dos resultados, foi utilizado o pacote `ggplot2` (WICKHAM, 2016).

3.9 Análise de sobrevida (Overall Survivor) Kaplan-meier

Para as análises de sobrevida, foi criado um objeto com junção dos dados clínicos dos pacientes e da matriz de dados de expressão gênica da paciente pela função `DESeqDataSetFromMatrix()` do pacote `DESeq2` (LOVE et al., 2014). A função `survfit()` do pacote `survival` (THERNEAU et al., 2000) foi utilizada para calcular a sobrevida a partir da expressão de genes de Siglec e Tyro-3.

3.10 Expressão gênica nas células neoplásicas (in vitro)

3.10.1 Confecção da Cultura celular

As linhagens de carcinoma pulmonar de não pequenas células H1299 e A549, e a linhagem MCR-5 de fibroblasto pulmonar, foram cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN-F12 suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal – a depender das especificações da linhagem, 10 mM de HEPES e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina em estufa de CO₂ 5% a 37°C. As células foram semeadas em placas de 6 poços (3x10⁵ /poço) e após atingirem uma confluência de 70%, foram submetidas por 6 horas às concentrações de cisplatina (Accord®) ou Etoposídeo (Accord®). Essas concentrações foram determinadas pelo IC⁵⁰ no ensaio de viabilidade - previamente realizado por um trabalho de iniciação científica (H1299 40µM, A549 33 µM). Os fibroblastos foram tratados com 10 µM. As células pós-tratamento com cisplatina foram posteriormente adicionadas ao Trizol® (Invitrogen, UK), e armazenadas em freezer a -80°C até a realização da extração do RNA.

3.10.2 Extração de RNA e Síntese de cDNA

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

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

3.10.3 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

A expressão genética foi realizada pela reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizando o método TaqMan (AppliedBiosystems) em um termociclador QuantStudio™ 5 (AppliedBiosystems). As condições de ciclagem foram de 95°C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C a 3 seg e 60°C por 20 seg. Os primers para os genes Siglec-15 (F CAGCCACCAACATCCATTTC) (R CGCTCAAGCTAATGCGTGTA); Tyro 3 (F GAGGATGGGGGTGAAACC) (R ACTGTGAAAATGGCACACCT) e GADPH e actina foram utilizados.

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 $FC = 2^{-[(\text{gene Cq de interesse} - \text{controle interno Cq}) \text{ amostra A} - (\text{Gene Cq de interesse} - \text{controle interno Cq}) \text{ amostra B}]}$.

Análise Estatística

A expressão dos resultados das variáveis contínuas foi realizada por meios e desvios-padrão. Para verificar possíveis diferenças entre os meios, foi utilizado o teste

"t" do Student para amostras independentes, quando a distribuição foi gaussiana. Nos casos em que o conjunto amostral não passou no teste de normalidade, utilizei o teste t não paramétrico de Mann-Whitney. A análise multivariada foi realizada por análise de regressão logística. O software utilizado para essas análises foi o GraphPad Prism 5.

3.10.4 Análise estatística: Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPadPrism versão 5.00. Para avaliação de dados paramétricos, será utilizado o teste-t (Student). Já para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste do qui-quadrado (χ^2). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$. Para análise dos parâmetros de sobrevivência, foram utilizadas curvas de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier com Log-Rank.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados ex-vivo em amostras de pacientes com neoplasia pulmonar

4.1.1 Caracterização clínico-epidemiológica

Foram coletados dados de 145 pacientes para o banco de dados do biorrepositório em câncer de pulmão da Universidade Federal de Pernambuco, dos quais 51 possuíam critérios para inclusão no estudo. Os dados foram coletados e obtidos dos serviços participantes. Os pacientes excluídos não possuíam diagnóstico de câncer de pulmão não pequenas células, sendo casos de metástase pulmonar de outros cânceres, câncer primário pulmonar pequenas células, lesões benignas e lesões sem achados de malignidade no estudo anatomopatológico.

Cerca de 66% dos pacientes possuem idade superior a 60 anos. A maioria absoluta dos pacientes era tabagista, cerca de 74%, com uma média de carga tabágica alta, de 53,6 maços/ano. Conforme descrito na Tabela 1, destaca-se diagnóstico semelhante em número para os tipos células escamosas e adenocarcinoma, ambos representando mais de 60% do total de casos. Além disso, 80% dos pacientes foram diagnosticados com câncer de pulmão não pequenas células em estágio mais avançado (III e IV), sendo que a maioria dos subtipos III-a e III-b foram submetidos ao tratamento cirúrgico, com tratamento quimioterápico adjuvante.

Tabela 1 – Características dos pacientes com câncer de pulmão não pequenas células.

Variáveis	Número	%
<i>Idade (anos)</i>		
Intervalo	23-84	
Média	63,1	
<60	17	33,3
>60	34	66,7
<i>Gênero</i>		
Masculino	23	45
Feminino	28	55
<i>Tabagismo</i>		
Tabagistas	38	74,5
Não-tabagistas	13	25,5
<i>Carga Tabágica (maços/ano)</i>		
Média	53.6	
<i>Estágio</i>		
I	4	13,4
II	0	0
III	18	60
IV	6	20
<i>Histologia</i>		
Adenocarcinoma	20	38,4
Carcinoma de células escamosas	20	38,4
Carcinoma de células gigantes	1	2
Carcinoma neuroendócrino	6	11,5
<i>Tratamento</i>		
Cirúrgico	32	62,7
Não-cirúrgico	19	37,3

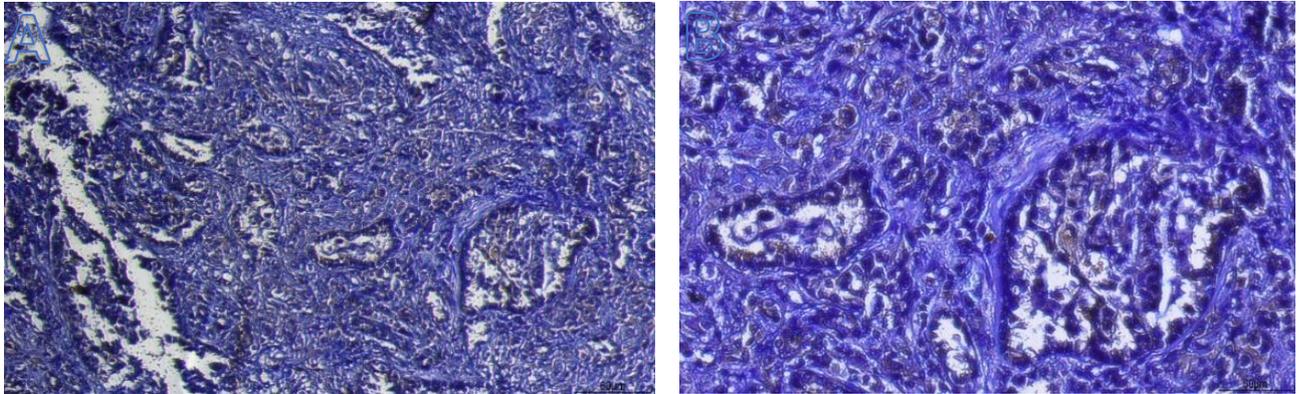
Fonte: o autor (2023)

4.1.2 Análise por Imuno-histoquímica

Na análise realizada por imuno-histoquímica, foi realizado um teste piloto para padronização da marcação dos anticorpos. As figuras abaixo foram obtidas de

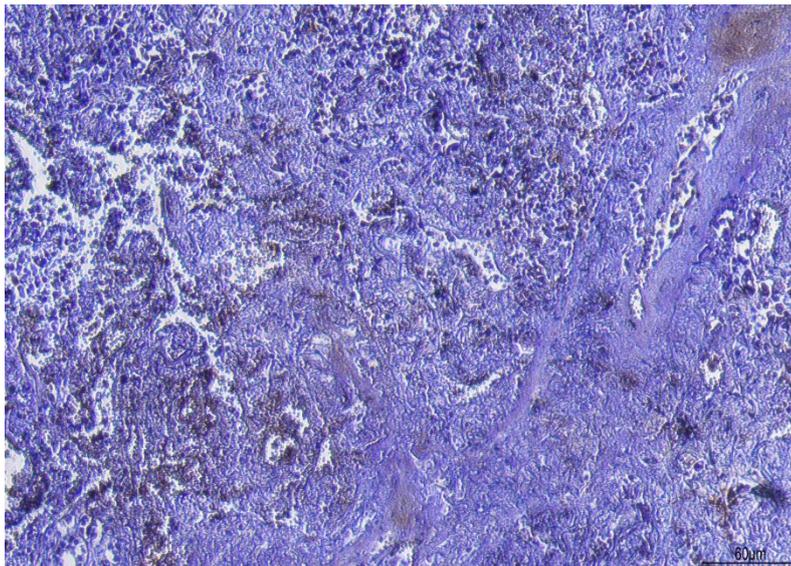
pacientes controle para Siglec-15 e Tyro 3, em tecidos de pulmão com adenocarcinoma e tecido de adenocarcinoma de próstata. (figuras 10 e 11).

Figura 10 – Controle positivo para Siglec 15 em tecido de pulmão com adenocarcinoma (A – aumento de 20x; B aumento de 40x)



Fonte: o autor (2023)

Figura 11 – Controle positivo Tyro 3, aumento 20x, adenocarcinoma próstata



Fonte: o autor (2023).

4.1.3 Análise por imuno-histoquímica de Siglec-15

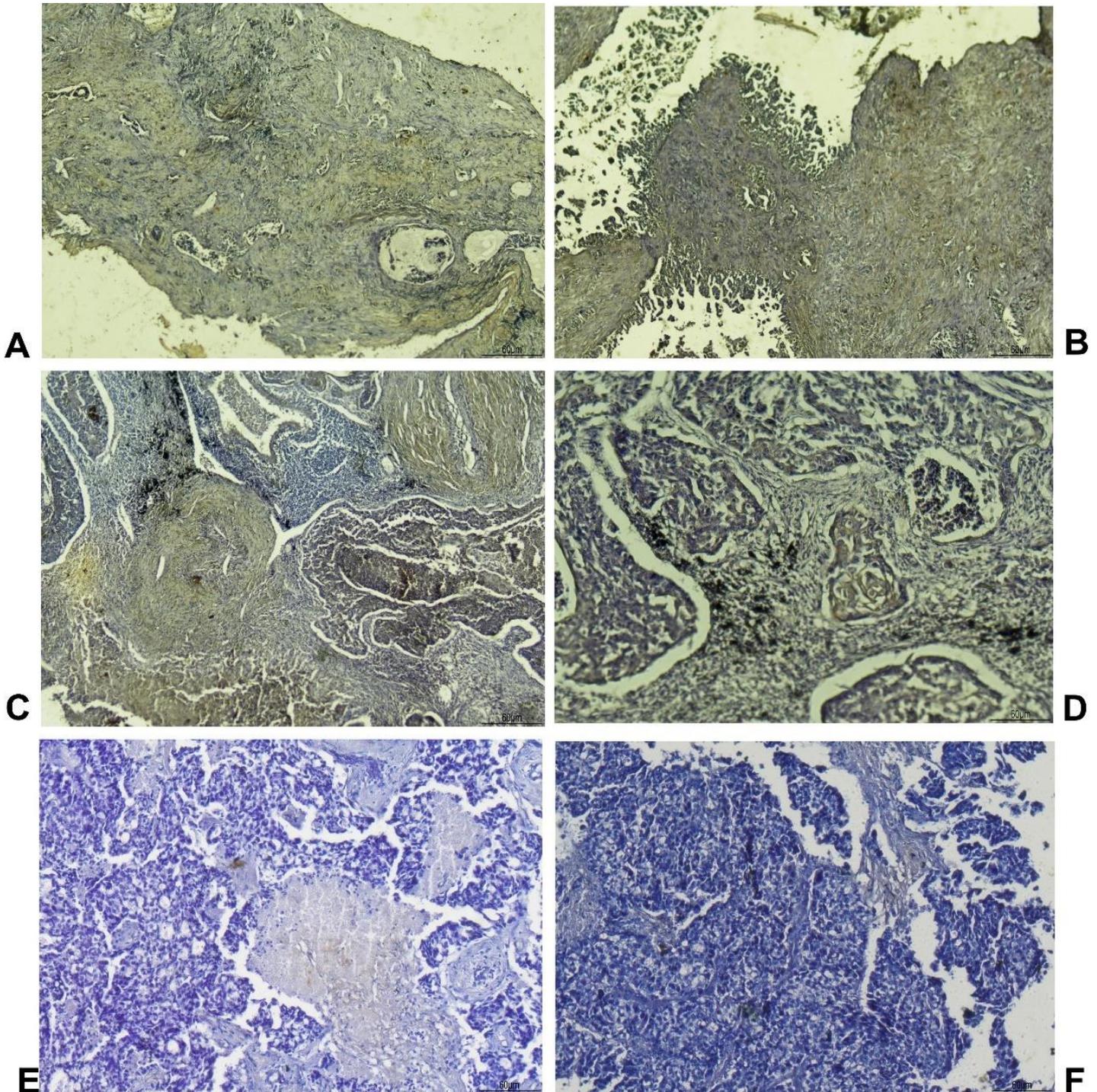
Foram avaliados 9 pacientes para análise por imuno-histoquímica para Siglec-15, com os dados descritos na tabela 3. Dos nove pacientes analisados, apenas 1 foi encontrado marcação média, sendo a maioria marcação fraca. Todos os casos com marcação fraca ou média possuíam marcação predominando nas células tumorais.

Tabela 2 – Perfil de marcação de imuno-histoquímica para Siglec-15

SIGLEC 15	
	Número de
Intensidade	pacientes
0 (negativo)	3
1 (fraco)	5
2 (médio)	1
3 (forte)	0
Marcação predominante	
Estromal	0
Tumoral	6
Localização celular de marcação	
Citoplasma	4
Nuclear	2
Membranosa	0

Fonte: o autor (2023)

Figura 12 – Avaliação por imuno-histoquímica de subtipos de câncer de pulmão para Siglec-15



A e B – adenocarcinoma pulmonar; C e D subtipo escamoso; E e F subtipo neuroendócrino. Coluna à direita com aumento de 10x; coluna à esquerda com aumento 5x. Presença de marcação média intensidade para subtipo escamoso, forte intensidade para subtipo adenocarcinoma, com predomínio tumoral e citoplasmática

Fonte: o autor (2023).

4.1.4 Análise por imuno-histoquímica de Tyro-3

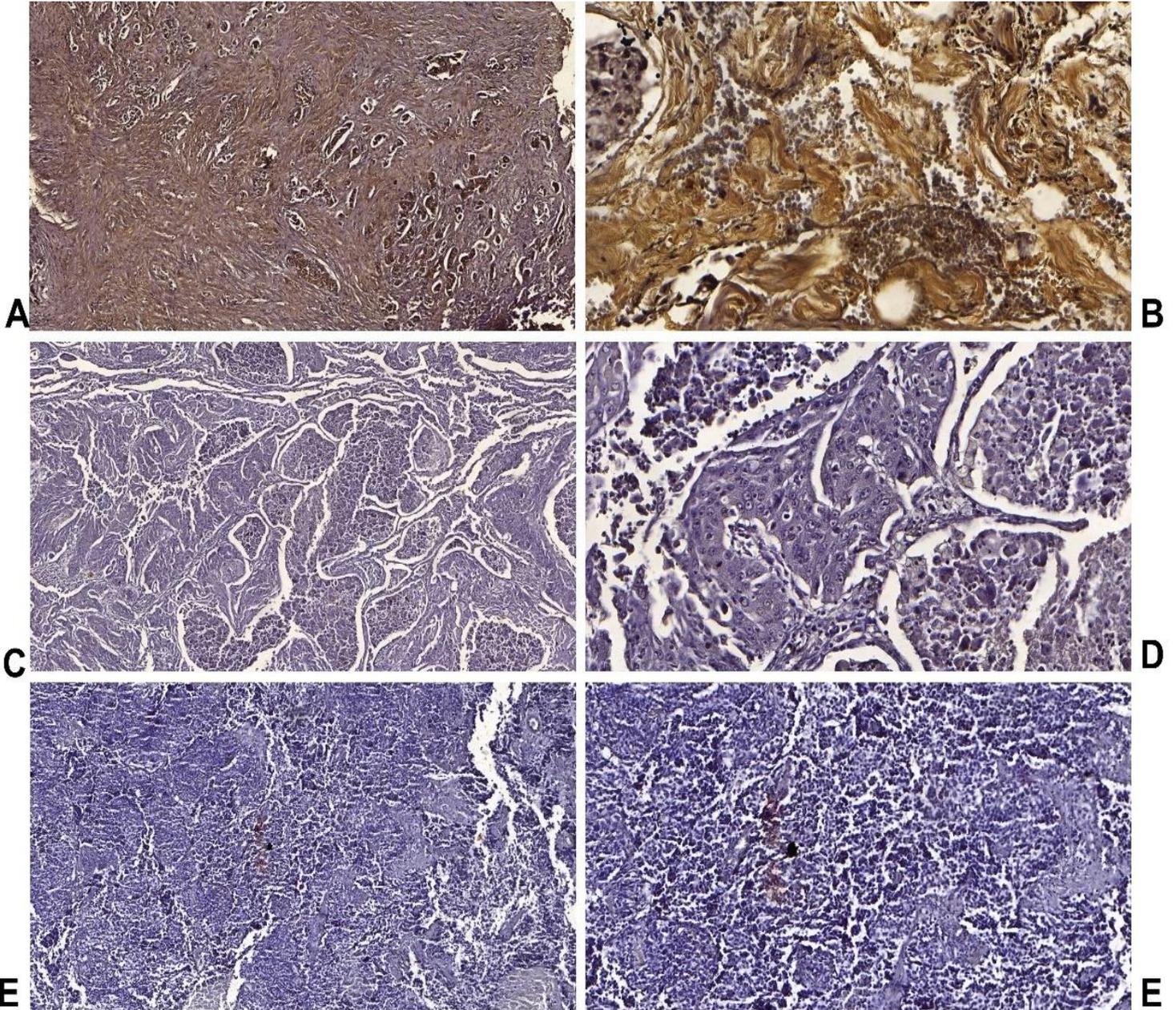
Foram avaliados 13 pacientes com análise das lâminas para imuno-histoquímica com marcação para Tyro-3, como descrito na tabela 4. 4 pacientes tiveram marcação sendo 1 média e 1 forte, com predominância em células tumorais, com localização citoplasmática.

Tabela 3 – perfil de marcação de imuno-histoquímica para Tyro-3

TYRO 3	
Intensidade	Número de pacientes
0 (negativo)	9
1 (fraco)	2
2 (médio)	1
3 (forte)	1
Marcação predominante	
Estromal	0
Tumoral	4
Localização celular de marcação	
Citoplasma	4
Nuclear	0
Membranosa	0

Fonte: o autor (2023)

Figura 13 - Avaliação por imuno-histoquímica de subtipos de câncer de pulmão para Tyro-3



A e B – adenocarcinoma pulmonar; C e D subtipo escamoso; E e F subtipo neuroendócrino. A, C, E com aumento de 5x; B, D com aumento de 20x; E com aumento de 10x. Presença de marcação de forte intensidade para subtipo adenocarcinoma, com padrão tumoral e estromal fortemente marcado, forte intensidade fraca para subtipo escamoso.

Fonte: o autor (2023).

4.2 Análise *in silico* Siglec-15 e TYRO 3.

Coortes de validação também foram analisadas neste estudo, extraídas da genômica cBioPortal PC (<http://www.cbioportal.org>). Foram utilizados dados da expressão do mRNA no câncer de pulmão não pequenas células (TCGA Firehose Lung adenocarcinoma, TCGA Pancancer Atlas Lung Squamous cell cancer) para Siglec 15, compreendendo 515 e 482 pacientes, respectivamente. Para Tyro 3 foram utilizados dados da expressão do mRNA em adenocarcinoma pulmonar (ONCOSG Nat genet Lung adenocarcinoma; CPTAC lung adenocarcinoma e TCGA Firehose Lung adenocarcinoma) com 169, 110 e 515 pacientes respectivamente.

Para essa análise, os dados obtidos dos bancos de dados foram de mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) para Siglec 15 e Tyro 3 presentes no banco de dados citado anteriormente, nos estudos destacados. Os mRNA derivados de tumores existem no sangue e em outros fluidos biológicos, que estão relacionados à tumorigênese e progressão de doença (WILLIAMS et al., 2021).

Os dados para número de pacientes com Siglec-15 e Tyro 3 e suas associações com as variáveis clínicas selecionadas estão nos quadros 2, 3 e 4. Os valores de p são considerados significativos quando inferiores a 0,05.

Quadro 2: associação de variáveis clínicas e Siglec-15 (+) e Siglec-15 (-).

Variáveis clínicas	TCGA PANCANCER ATLAS Lung Squamous Cell Carcinoma SIGLEC15 n=482			TCGA, FIREHOSE Lung Adenocarcinoma SIGLEC15 n=515		
	SIGLEC15 (+)	SIGLEC15 (-)	P Valor	SIGLEC15 (+)	SIGLEC15 (-)	P Valor
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Idade (anos)						
<60	42 (8.88)	45 (9.51)	0,8135	66(13,31)	70(14.11)	0,2660
≥60	181 (38.27)	205(43.34)		154(31.05)	206(41.53)	
Gênero						
Feminino	68 (14.11)	58 (32.78)	0,0773	126(24.47)	151(29.32)	0,5936
Masculino	158 (32.78)	198(41.08)		102(19.81)	136(26.41)	

Estágio (TNM)						
(I and II)	182 (37.84)	210(43.66)	0,8141	169(33.33)	228(44.97)	0,1296
(III and IV)	43 (8.94)	46(9.56)		56(11.05)	54(10.65)	
Invasão nodal						
0	148(47.44)	164(52.56)	0,7749	147(28.60)	195(37.94)	0,3761
>1	78(45.88)	92(54.12)		81(15.76)	91(17.70)	

Fonte: o autor (2023)

Quadro 3: associação de variáveis clínicas e Tyro 3 (+) e Tyro 3 (-).

Variáveis clínicas	ONCOSG, NAT GENET Lung Adenocarcinoma TYRO3 n=169		P Valor	CPTAC, Cell Lung Adenocarcinoma TYRO3 n=110		P Valor
	TYRO3 (+)	TYRO3 (-)		TYRO3 (+)	TYRO3 (-)	
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Idade (anos)						
<60	35 (20.71)	17 (10.06)	0,0440	11 (10.00)	34 (30.91)	0,5231
≥60	58 (34.32)	59(34.91)		20 (18.18)	45(40.91)	
Gênero						
Feminino	51 (30.18)	43 (25.44)	0,8769	9(8.18)	29(26.36)	0,5092
Masculino	42 (24.85)	33(19.53)		22(20.00)	50(45.45)	
Estágio (TNM)						
(I and II)	71(42.51)	61(36.53)	0,5695	19(25.00)	44(57.89)	0,1644
(III and IV)	21(12.57)	14(8.38)		1(1.32)	12(15.79)	
Invasão nodal						
0	-	-	-	-	-	-
>1						

Tabagismo						
Sim	37(21.89)	24(14.20)	0,3343	16(15.69)	40(39.22)	0,4382
Não	56(33.14)	52(30.77)		10(9.80)	36(35.29)	

TCGA, FIREHOSE			
Lung Adenocarcinoma			
TYRO3			
n=515			
Variáveis clínicas	TYRO3 (+)	TYRO 3 (-)	P
	n (%)	n (%)	Valor
Idade (anos)			
<60	66(13,31)	70(14.11)	0,9999
≥60	174(35.08)	186(37.50)	
Gênero			
Feminino	141(27.38)	136(26.41)	0,3767
Masculino	111(26.41)	127(24.66)	
Estágio (TNM)			
(I and II)	189(37.28)	208(41.03)	0,1616
(III and IV)	61(12.03)	49(9.66)	
Invasão nodal			
0	159(30.93)	183(35.60)	0,1343
>1	92(17.90)	80(15.56)	
Tabagismo			
Sim	-	-	-
Não			

Fonte: o autor (2023)

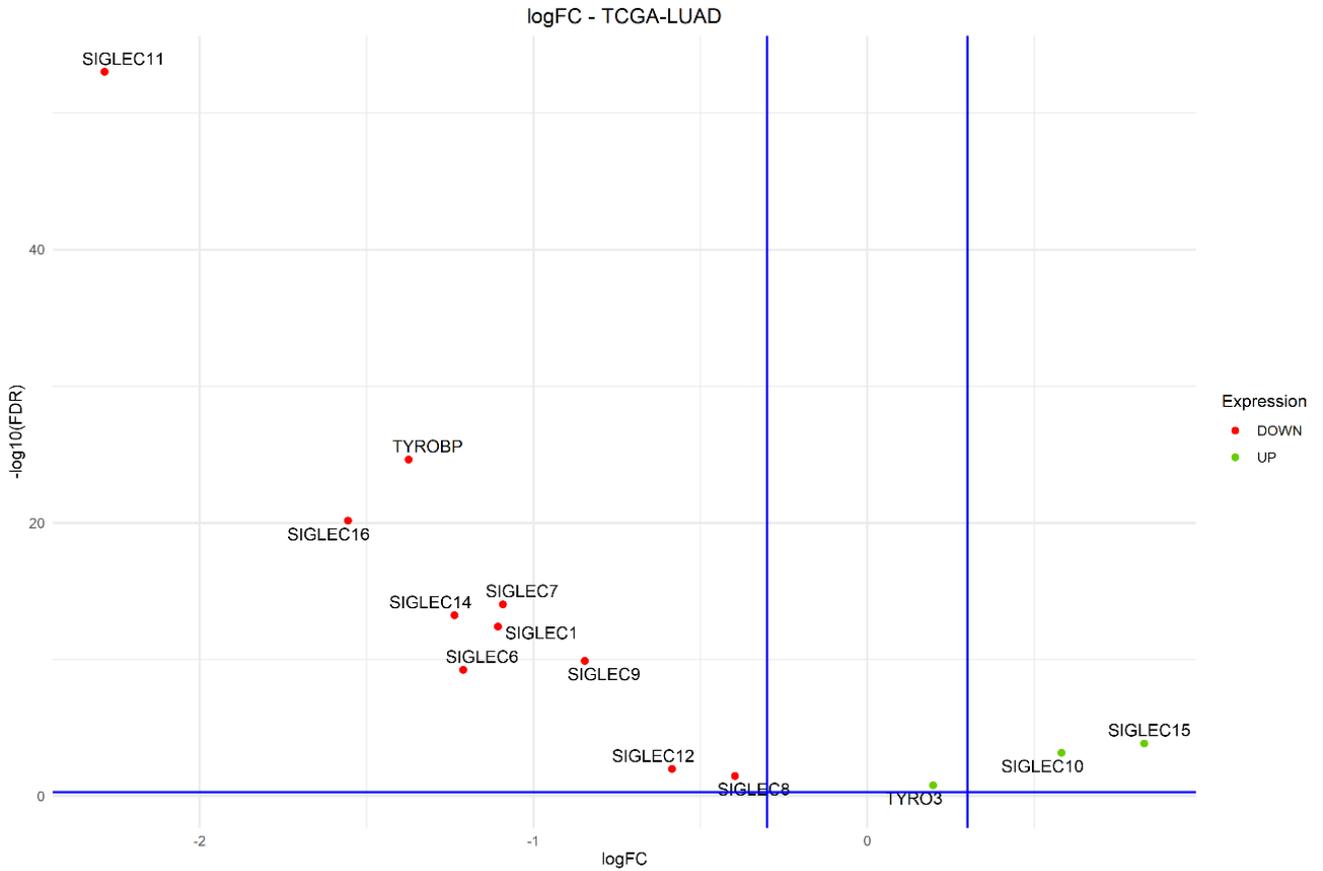
Quadro 4: Associação sobrevida média e Siglec-15 e Tyro 3.

	Lung Adenocarcinoma (TCGA, Firehose Legacy) SIGLEC15 n=265			Lung Adenocarcinoma (TCGA, Firehose Legacy) TYRO3 n=506		
	SIGLEC15 (+)	SIGLEC15 (-)	<i>P</i> Valor	TYRO3 (+)	TYRO3(-)	<i>P</i> Valor
	Meses	Meses		Meses	Meses	
Sobrevida média	23.06	19.81	0,0002	22,46	20,57	0,9994

Fonte: o autor (2023)

Na figura 13 são destacadas as análises de Fold Change para expressão dos genes Siglec e Tyro-3 entre pacientes com adenocarcinoma pulmonar e em pacientes saudáveis do banco de dados do TCGA (TCGA-LUAD). Na figura 14 são destacadas as análises de Fold Change para expressão dos genes Siglec e Tyro-3 entre pacientes com subtipo escamoso e em pacientes saudáveis do banco de dados do TCGA (TCGA-LUAD).

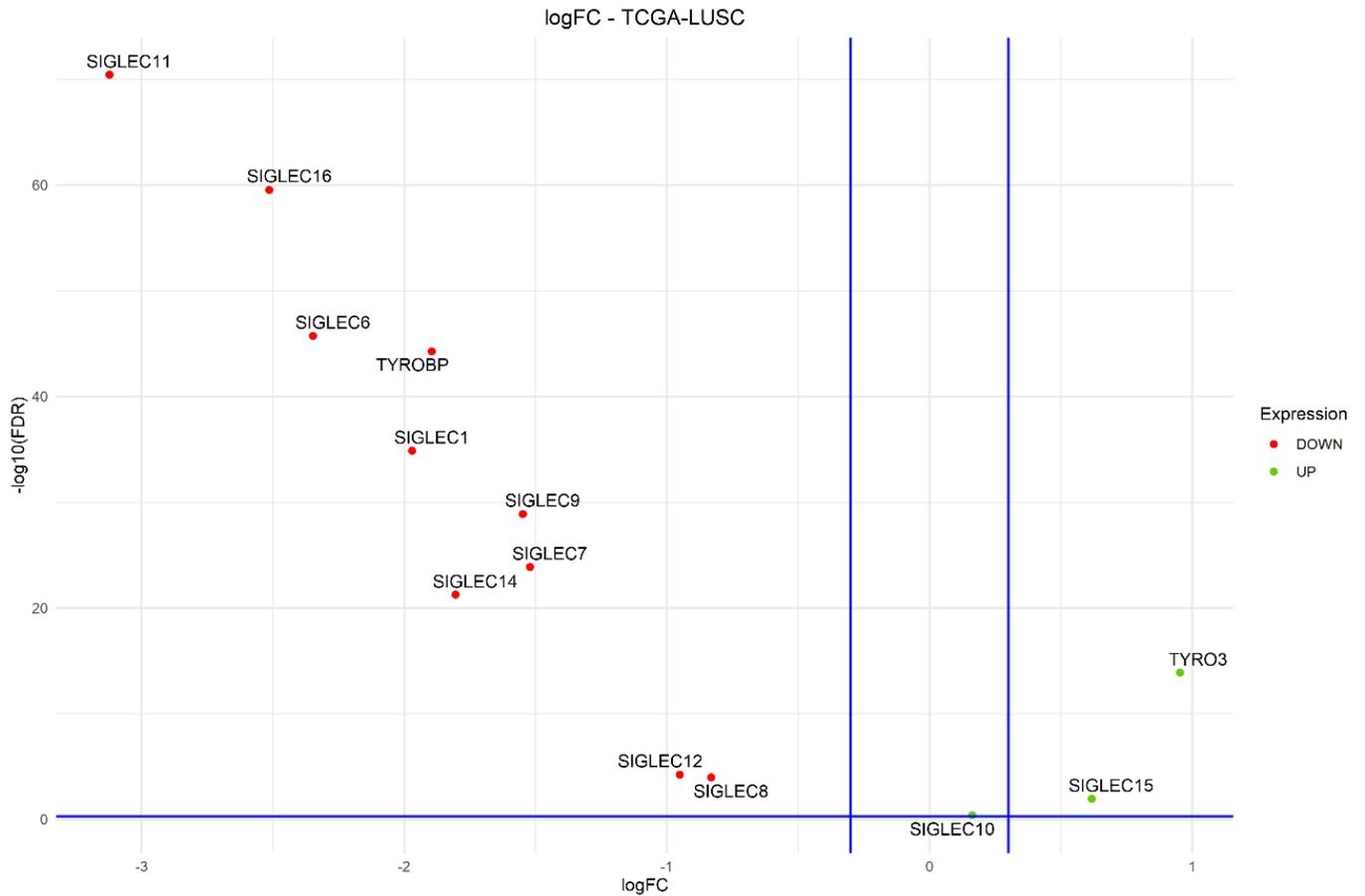
Figura 14 - Análise de *Fold Change* para expressão dos genes SIGLEC e TYRO entre pacientes com Adenocarcinoma pulmonar e pacientes saudáveis do banco de dados do TCGA (TCGA-LUAD).



LUAD – Adenocarcinoma pulmonar; “*Lung Adenocarcinoma*”, em inglês.

Fonte: o autor (2023)

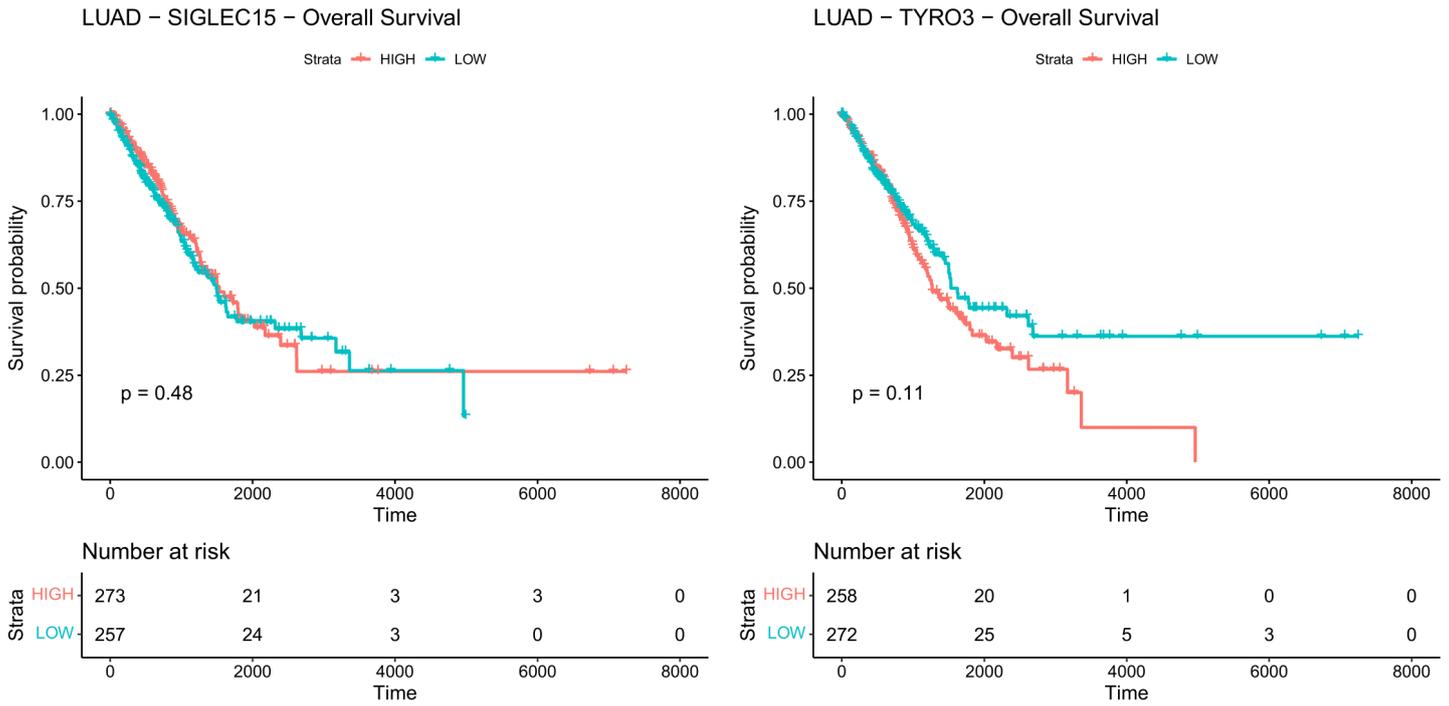
Figura 15 - Análise de *Fold Change* para expressão dos genes SIGLEC e TYRO entre pacientes com Carcinoma de pulmão de células escamosas e pacientes saudáveis do banco de dados do TCGA(TCGA-LUSC).



LUSC – Carcinoma de células escamosas pulmonar. Em inglês “*Lung Squamous Cell Carcinoma*”

Fonte: o autor (2023)

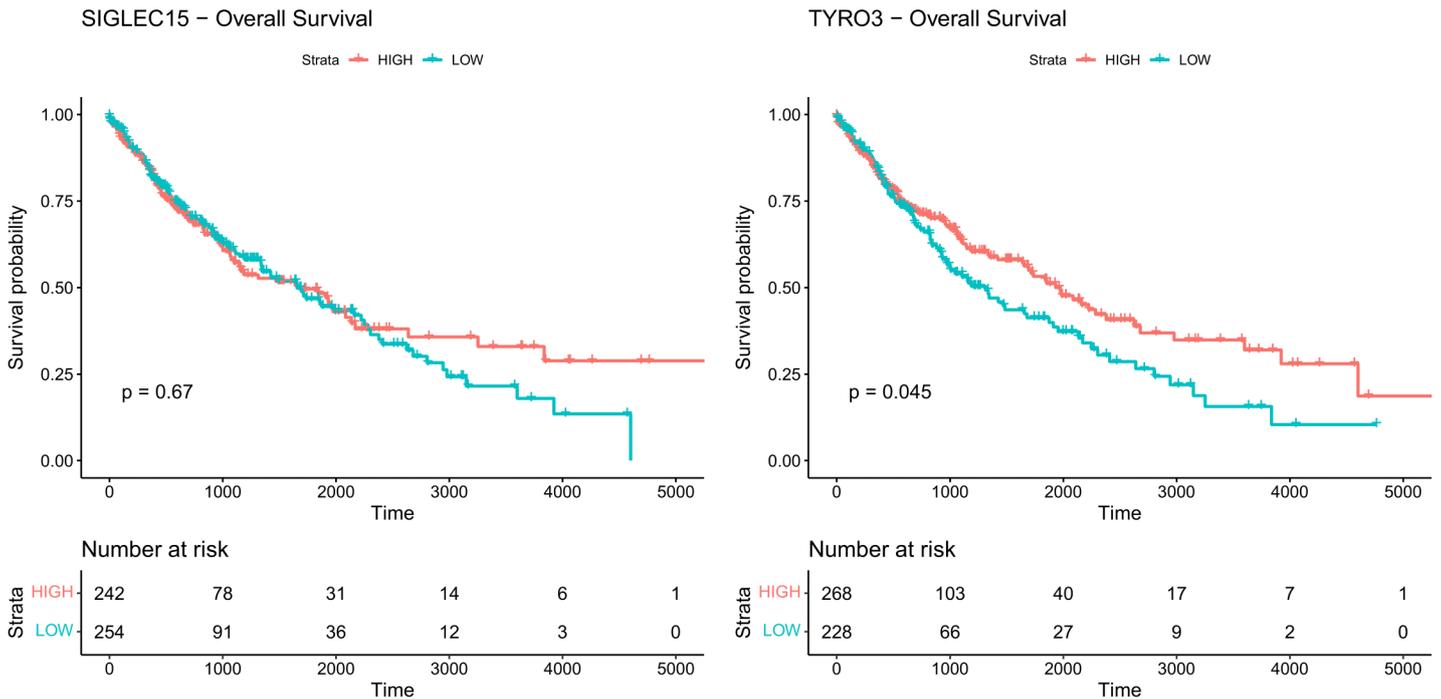
Figura 16 – Curva de probabilidade para sobrevida global para níveis de expressão alta ou baixa de Siglec 15 e Tyro 3, em pacientes com Adenocarcinoma pulmonar.



LUAD – Adenocarcinoma pulmonar; “Lung Adenocarcinoma”, em inglês.

Fonte: o autor (2023)

Figura 17 – Curva de probabilidade para sobrevida global para níveis de expressão alta ou baixa de Siglec 15 e Tyro 3, em pacientes com carcinoma escamoso pulmonar.



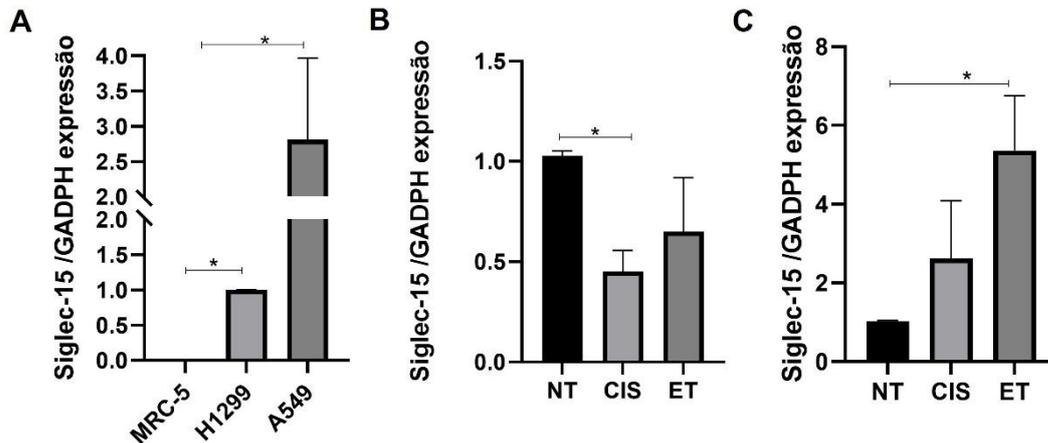
4.3 Expressão gênica nas células neoplásicas (*in vitro*)

4.3.1 Avaliação da expressão de Siglec 15 nas células neoplásicas de pulmão.

Foi observado que a expressão gênica de Siglec-15 está aumentada nas células neoplásicas H1299 (média 1.003 ± 0.004) e A549 (2.811 ± 2.3), comparado a célula não transformada MRC-5 (0.0022 ± 0.004) (Figura 17 A). Adicionalmente, verificou-se que o quimioterápico cisplatina reduz a expressão de Siglec-15 nas células H1299 (Figura 17 B) enquanto que nas células A549 houve um aumento, porém não significativo, comparado as células não tratadas (Figura 17 C). Em relação ao Etoposídeo, observou-se que apenas nas células A549 houve uma modulação

positiva significativa da expressão gênica de siglec-15, após o tratamento com este quimioterápico (Figura 17 C).

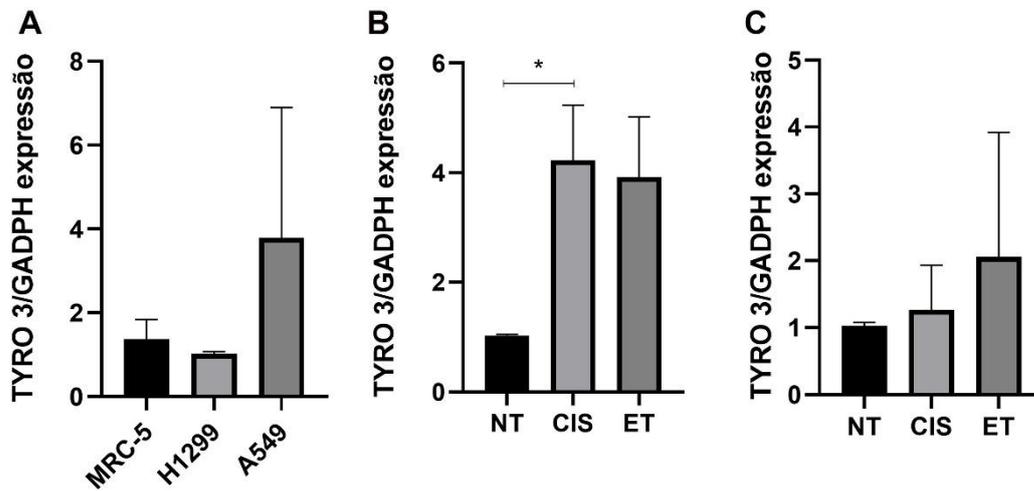
Figura 18 – Expressão gênica de Siglec 15 em células neoplásicas de pulmão e células não neoplásicas, antes e após uso de Cisplatina e Etoposídeo.



4.3.2 Avaliação da expressão de Tyro-3 nas células neoplásicas de pulmão.

Em relação a expressão gênica de Tyro 3 in vitro, observou-se um aumento de expressão nas células A549 (3.791 ± 3.10) e uma redução nas células neoplásicas H1299 (1.028 ± 0.024) comparado as células não transformadas MRC-5 (1.369 ± 0.23), porém sem significância estatística. Verificou-se uma modulação positiva da expressão de Tyro-3 após tratamento com cisplatina e etoposídeo, mas apenas nas células H1299 houve significância, em relação ao tratamento com cisplatina (Figura 18 B). Novos ensaios serão realizados para confirmar a modulação da expressão de Tyro-3 nas linhagens celulares.

Figura 19 – Expressão gênica de Tyro em células neoplásicas de pulmão e células não neoplásicas, antes e após uso de Cisplatina e Etoposídeo.



5. DISCUSSÃO

O câncer de pulmão apresentou diferentes subtipos predominantes ao longo do tempo. Antes da década de 1990, o subtipo mais comum era o de células escamosas, especialmente entre homens. No entanto, o cenário mudou, e atualmente, o subtipo adenocarcinoma tornou-se o mais prevalente tanto em homens quanto em mulheres (BARTA; POWELL; WISNIVESKY, 2019). No nosso estudo também foi constatado que o adenocarcinoma foi o subtipo predominante. Nos Estados Unidos, o subtipo de células escamosas ainda representa cerca de 20% dos casos (BARTA; POWELL; WISNIVESKY, 2019). Essa prevalência do adenocarcinoma foi observada mesmo em pacientes com histórico significativo de tabagismo, o que é surpreendente, pois o subtipo escamoso costuma estar mais associado ao tabagismo.

De modo geral, aproximadamente 80% dos casos de câncer de pulmão em homens e 90% dos casos em mulheres estão relacionados ao tabagismo, sendo o subtipo de células escamosas o mais fortemente associado ao hábito de fumar em comparação com outros tipos de câncer de pulmão não pequenas células (JEMAL, A., et al., 2012).

É interessante notar que países desenvolvidos, como os EUA e o Reino Unido, têm observado uma redução nas taxas de mortalidade e incidência de câncer de

pulmão desde a década de 1990. Por outro lado, em nações emergentes, como Brasil, Índia, China, Rússia e África do Sul, onde o tabagismo ainda é elevado, embora a incidência de câncer de pulmão seja menor, a mortalidade é maior em comparação com países desenvolvidos. Esses padrões epidemiológicos podem ser atribuídos a um acesso desigual aos cuidados de saúde, resultando em diagnósticos tardios e tratamentos menos eficazes (BARTA; POWELL; WISNIVESKY, 2019).

Com os dados encontrados na primeira avaliação *in sílico*, não foram encontradas associações com significância estatística para as variáveis analisadas e os níveis de mRNA de Siglec-15. Já para Tyro 3, destaca-se a associação entre a idade de diagnóstico inferior a 60 anos e a presença de Tyro 3, em 20,3% dos pacientes com adenocarcinoma ($p = 0,044$).

O quadro 4 mostra a associação entre a sobrevida média e os valores de mRNA para Siglec-15 e Tyro 3. Destaca-se a associação com significância estatística com maior sobrevida para pacientes com adenocarcinoma de pulmão com Siglec-15 (+). Esse resultado não seria esperado para as análises feitas para Siglec-15 em tecidos tumorais como participante de mecanismos de evasão tumoral, semelhante ao PD-L1, como citado anteriormente.

As curvas de sobrevida global para os casos analisados em adenocarcinoma para Siglec 15 e Tyro 3 mostraram distanciamento entre as curvas entre baixa expressão e alta expressão. Para análise em subtipo escamoso, a sobrevida global com níveis elevados e baixos de Siglec 15 houve distanciamento das curvas, a partir de 5 anos. Para Tyro 3, o distanciamento das curvas fica evidente com pouco mais de 2 anos. Entretanto, os dados analisados de sobrevida global sugeriram tendência de maior sobrevida em pacientes com maior expressão gênica de Siglec-15 e Tyro 3 (figura 15).

Para análise no subtipo escamoso, pacientes com níveis elevados de expressão gênica de Siglec 15 e Tyro 3 tiveram menor sobrevida global (figura 16) com comportamento oposto às curvas de sobrevida para o subtipo escamoso. Assim, a análise periférica através de mRNA para Siglec-15 e Tyro 3 poderia se mostrar promissora para um biomarcador prognóstico para melhor sobrevida em pacientes com subtipo escamoso e pior prognóstico em pacientes com subtipo adenocarcinoma. Além disso, mais estudos necessitam ser realizados, para um melhor esclarecimento acerca da fisiopatologia de envolvimento do Siglec-15 e Tyro 3 em câncer de pulmão não pequenas células.

A análise por imuno-histoquímica realizada em 9 pacientes para Siglec 15 e 13 pacientes para Tyro 3 trouxe resultados sugestivos para um papel de validação prognóstica em câncer de pulmão não pequenas células.

Para os pacientes avaliados, 1 caso foi destacado com maior intensidade de marcação dos anticorpos Anti Siglec 15 e Anti Tyro 3, com notas de intensidade 2 e 3, respectivamente, em uma escala de 0 a 3. O paciente em questão possui diagnóstico através de biópsia pleural confirmando quadro de estágio avançado, com metástase pleural do subtipo adenocarcinoma. (tabelas 3 e 4). Para o subtipo escamoso, a marcação foi de fraca intensidade para ambas as moléculas, mas presente em praticamente todas as amostras de subtipo escamoso. O subtipo neuroendócrino pequenas células foi avaliado, apesar de não estar entre os objetivos iniciais do estudo. A sua marcação trouxe resultado a se destacar, com ausência de marcação para siglec 15 e Tyro 3 nas amostras avaliadas, mesmo em estágio avançado de doença.

Assim, os dados preliminares sugerem uma associação entre marcação mais intensa na imuno-histoquímica para ambas moléculas Siglec 15 e Tyro 3 com estágio mais avançado do câncer de pulmão, em subtipo adenocarcinoma, com associação a pior curva de sobrevida global (tabelas 3 e 4) (figura xxx).

Na análise da expressão gênica foram utilizadas as linhagens H1299, A549 e MRC-5. NCI-H1299 é uma célula do tipo epitelial que foi isolada de metástase pulmonar para linfonodo de CPNPC, de um paciente homem branco de 43 anos, com expressão nula para TP53. S células A549 foram isoladas do tecido pulmonar do tumor primário de um paciente homem branco de 58 anos com CPNPC, com expressão tipo selvagem sem mutações para TP53. MRC-5 é uma linha celular diplóide d na produção de vacinas, incluindo hepatite A, poliomielite e MCR-5, e é constituída por fibroblastos isolados do tecido pulmonar derivado de um embrião branco, masculino, de 14 semanas.

Foi observado que Siglec-15 está com expressão aumentada nas células neoplásicas H1299 e A549, comparado a célula não transformada MRC-5. Após tratamento com o quimioterápico cisplatina, a expressão de Siglec-15 foi reduzida nas células H1299 enquanto que nas células A549 houve um aumento, porém não significativo, comparado as células não tratadas. Em relação ao Etoposídeo, observou-se que apenas nas células A549 houve uma modulação positiva significativa da expressão gênica de siglec-15, após o tratamento com este quimioterápico. Tal

variabilidade pode ter ocorrido devido ao perfil mutacional presente nas linhagens. Últimos estudos com achados para mutação em TP53 em CPNPC foram relacionados a um crescimento sustentado das células tumorais e maior resistência ao tratamento quimioterápico (MOGI et al., 2011; WANG Y et al., 2022).

Na análise da expressão gênica de Tyro 3 in vitro, foram observadas diferenças nos níveis de expressão em diferentes linhagens celulares. Nas células A549, houve um aumento na expressão, enquanto nas células neoplásicas H1299, houve uma redução em comparação com as células não transformadas MRC-5. No entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Além disso, ao analisar o efeito do tratamento com cisplatina e etoposídeo, verificou-se uma modulação positiva da expressão de Tyro-3, mas essa modulação foi significativa apenas nas células H1299 em relação ao tratamento com cisplatina, achados que também podem sofrer interferência do perfil mutacional das linhagens.

Novos ensaios serão conduzidos para confirmar e aprofundar a compreensão da modulação da expressão de Tyro-3 nessas diferentes linhagens celulares

É importante ressaltar que esses resultados são baseados em um número limitado de pacientes analisados e, portanto, são necessários mais estudos com maior amostra de pacientes, favorecendo o entendimento do papel de Siglec-15 e Tyro 3 em câncer de pulmão de não pequenas células.

6. CONCLUSÃO

As análises de sobrevida global mostraram curvas distintas entre baixa e alta expressão de Siglec-15 e Tyro 3, sugerindo que a análise periférica através de mRNA para essas moléculas pode ser promissora como biomarcador prognóstico. No subtipo adenocarcinoma, a alta expressão gênica de Siglec-15 e Tyro 3 esteve associada a pior sobrevida global, em contraste com o subtipo escamoso. A análise por imunohistoquímica também mostrou um papel potencial de validação prognóstica para Siglec-15 e Tyro 3 em câncer de pulmão não pequenas células, com marcação mais intensa relacionada a estágios avançados da doença e pior sobrevida global no subtipo adenocarcinoma. Em suma, foi possível destacar características valiosas sobre o câncer de pulmão e a análise de biomarcadores prognósticos. Espera-se que essas descobertas estimulem pesquisas futuras e contribuam para o avanço no tratamento e prognóstico dessa doença devastadora.

REFERÊNCIAS

ABIKO, K. et al. IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. **British journal of cancer**, v. 112, n. 9, p. 1501–1509, 2015.

AHMADZADEH, M. et al. Tumor antigen–specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. **Blood**, v. 114, n. 8, p. 1537–1544, 2009.

ANGATA, T. et al. Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 838–846, 2007.

ANGATA, T. Siglec-15: a potential regulator of osteoporosis, cancer, and infectious diseases. **Journal of biomedical science**, v. 27, n. 1, 2020.

ANGATA, T.; VARKI, N. M.; VARKI, A. A second uniquely human mutation affecting sialic acid biology. **The journal of biological chemistry**, v. 276, n. 43, p. 40282–40287, 2001.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts and Figures 2015**. 2015. <https://www.cancer.org/cancer-facts-and-figures-2015.pdf>

ARAUJO, L. H. et al. Lung cancer in Brazil. *Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, v. 44, n. 1, p. 55–64, 2018.

AROS, C. J. et al. High-throughput drug screening identifies a potent wnt inhibitor that promotes airway basal stem cell homeostasis. *Cell reports*, v. 30, n. 7, p. 2055–2064.e5, 2020.

AVILLA, E. et al. Activation of TYRO3/AXL tyrosine kinase receptors in thyroid cancer. *Cancer research*, v. 71, n. 5, p. 1792–1804, 2011.

BARTA, J. A.; POWELL, C. A.; WISNIVESKY, J. P. Global epidemiology of lung cancer. *Annals of global health*, v. 85, n. 1, 2019.

BELLUCCI, R. et al. Interferon- γ -induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression. ***Onc Immunology***, v. 4:6, n. June, p. 1–10, 2015.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. ***Nature immunology***, v. 11, n. 10, p. 889–896, 2010.

BOCHNER, B. S. et al. Glycan array screening reveals a candidate ligand for siglec-8. ***The journal of biological chemistry***, v. 280, n. 6, p. 4307–4312, 2005.

BOLOKER, G.; WANG, C.; ZHANG, J. Updated statistics of lung and bronchus cancer in United States (2018). ***Journal of thoracic disease***, v. 10, n. 3, p. 1158–1161, 2018.

BORNHÖFFT, K. F. et al. Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins. ***Developmental and comparative immunology***, v. 86, p. 219–231, 2018.

BRADLEY, J. D. et al. Long-term results of NRG oncology RTOG 0617: Standard-versus high-dose chemoradiotherapy with or without cetuximab for unresectable stage III non-small-cell lung cancer. ***Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology***, v. 38, n. 7, p. 706–714, 2020.

BRAY, F. I.; WEIDERPASS, E. Lung cancer mortality trends in 36 European countries: secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970–2007. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 126, n. 6, p. 1454–1466, 2010.

BRAMBILLA, E. P. B., GEISINGER K, et al. Large cell carcinoma. In: Travis WBE, Müller-Hermelink H, et al., editors. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Lung. Pleura, Thymus and Heart Geneva: **WHO Press**; 2004. p. 45–50

CANCER RESEARCH UK. **Lung cancer incidence statistics**. Disponível em: <<https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/lung-cancer/incidence#heading-Zero>>.

CARLSON M. org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for human. 2019. R package version 3.10.0. <https://bioconductor.org/packages/release/data/annotation/html/org.Hs.eg.db.html>. <acessado agosto de 2023>

CHANSKY, K. et al. The international association for the study of lung cancer staging project: Prognostic factors and pathologic TNM stage in surgically managed non-small cell lung cancer. **Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**, v. 4, n. 7, p. 792–801, 2009.

CHEN, J. et al. Genomic landscape of lung adenocarcinoma in East Asians. **Nature genetics**, v. 52, n. 2, p. 177–186, 2020.

COGNASSE, F. The inflammatory role of platelets via their TLRs and Siglec receptors. **Frontiers in immunology**, v. 6, 2015.

COURAUD, S. et al. Lung cancer in never smokers – A review. **European journal of cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 48, n. 9, p. 1299–1311, 2012.

DAKUBO, G. D. et al. Clinical implications and utility of field cancerization. **Cancer cell international**, v. 7, n. 1, p. 2, 2007.

DALY, J.; CARLSTEN, M.; O'DWYER, M. Sugar free: Novel immunotherapeutic approaches targeting siglecs and sialic acids to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer. **Frontiers in immunology**, v. 10, 2019.

DENG, M. et al. Web-TCGA: an online platform for integrated analysis of molecular cancer data sets. **BMC bioinformatics**, v. 17, n. 1, 2016.

DONG, P. et al. Tumor-intrinsic PD-L1 signaling in cancer initiation, development and treatment: Beyond immune evasion. **Frontiers in oncology**, v. 8, 2018.

DUAN, Y. et al. Overexpression of Tyro3 and its implications on hepatocellular carcinoma progression. **International journal of oncology**, v. 48, n. 1, p. 358–366, 2016.

DYER, O. US task force recommends extending lung cancer screenings to over 50s. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 372, p. n698, 2021.

FAIVRE-FINN, C. et al. Four-year survival with durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC—an update from the PACIFIC trial. **Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**, v. 16, n. 5, p. 860–867, 2021.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 136, n. 5, 2015.

FRANCISCI, S. et al. Survival patterns in lung and pleural cancer in Europe 1999–2007: Results from the EURO CARE-5 study. **European journal of cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 51, n. 15, p. 2242–2253, 2015.

FRENCH, L. E.; TSCHOPP, J. Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. **Seminars in cancer biology**, v. 12, n. 1, p. 51–55, 2002.

GABRILOVICH, D. I. et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. **Nature medicine**, v. 2, n. 10, p. 1096–1103, 1996.

GARCIA-DIAZ, A. et al. Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression. **Cell reports**, v. 19, n. 6, p. 1189–1201, 2017.

GONZALEZ-GIL, A. et al. Sialylated keratan sulfate proteoglycans are Siglec-8 ligands in human airways. **Glycobiology**, v. 28, n. 10, p. 786–801, 2018.

GULLEY, J. L. et al. Avelumab (MSB0010718C), an anti-PD-L1 antibody, in advanced NSCLC patients: A phase 1b, open-label expansion trial in patients progressing after platinum-based chemotherapy. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 15_suppl, p. 8034–8034, 2015.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: New dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HSU, P.-L.; JOU, J.; TSAI, S.-J. TYRO3: A potential therapeutic target in cancer. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 244, n. 2, p. 83–99, 2019.

INAMURA, K. Lung cancer: Understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. **Frontiers in oncology**, v. 7, 2017.

INCA, I. N. DE C. J. A. G. DA S.; MS, M. DA S. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / INCA**. Rio de Janeiro, 2020

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : INCA, 2022

ISHIDA, Y. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO journal**, v. 11, n. 11, p. 3887–3895, 1992.

JACOBS, J. F. M. et al. Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? **The lancet oncology**, v. 13, n. 1, p. e32–e42, 2012.

JANSEN, F. H. et al. Profiling of antibody production against xenograft-released proteins by protein microarrays discovers prostate cancer markers. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 2, p. 728–735, 2012.

JEMAL, A. et al. Cancer burden in Africa and opportunities for prevention: Cancer in Africa. **Cancer**, v. 118, n. 18, p. 4372–4384, 2012.

JI, M. et al. PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. **Journal of translational medicine**, v. 13, n. 1, 2015.

KANG, F.-B. et al. The diverse functions of Siglec-15 in bone remodeling and antitumor responses. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 155, n. 104728, p. 104728, 2020.

KHANNA, P. et al. Immunotherapy comes of age in lung cancer. **Clinical lung cancer**, v. 18, n. 1, p. 13–22, 2017.

KUHN, M. Building predictive models in R using the caret Package. **Journal of statistical software**, v. 28, n. 5, 2008.

LARSEN, J. E.; MINNA, J. D. Molecular biology of lung cancer: Clinical implications. **Clinics in chest medicine**, v. 32, n. 4, p. 703–740, 2011.

LEE, I. et al. Recruitment of Foxp3⁺ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. **The journal of experimental medicine**, v. 201, n. 7, p. 1037–1044, 2005.

LEMKE, G. Biology of the TAM receptors. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 11, p. a009076–a009076, 2013.

LI, C. et al. ADAP and SKAP 55 deficiency suppresses PD -1 expression in CD 8⁺ cytotoxic T lymphocytes for enhanced anti-tumor immunotherapy. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 6, p. 754–769, 2015.

LI, H. et al. Integrative analyses of circulating mRNA and lncRNA expression profile in plasma of lung cancer patients. **Frontiers in oncology**, v. 12, 2022.

LI, Q. et al. A new hope: the immunotherapy in small cell lung cancer. **Neoplasma**, v. 63, n. 03, p. 342–350, 2016.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, 2014.

MAEURER, M. J. et al. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. **The journal of clinical investigation**, v. 98, n. 7, p. 1633–1641, 1996.

MALVEZZI, M. et al. European cancer mortality predictions for the year 2014. **Annals of oncology**, v. 25, n. 8, p. 1650–1656, 2014.

MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: Lessons and open questions. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 33, n. 7, p. 1478–1483, 2013.

MOGI, A.; KUWANO, H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

MOUNIR, M. et al. New functionalities in the TCGAblinks package for the study and integration of cancer data from GDC and GTEx. **PLoS computational biology**, v. 15, n. 3, p. e1006701, 2019.

MURDOCH, C. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 8, p. 618–631, 2008.

MUSIELAK, B. et al. Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. **Structure (London, England: 1993)**, v. 23, n. 12, p. 2341–2348, 2015.

NEEL, B. G.; GU, H.; PAO, L. The ‘Shp’ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. **Trends in biochemical sciences**, v. 28, n. 6, p. 284–293, 2003.

NUNES-XAVIER, C. E. et al. A critical insight into the clinical translation of PD-1/PD-L1 blockade therapy in clear cell renal cell carcinoma. **Current urology reports**, v. 20, n. 1, 2019.

OTA, T. et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. **Nature genetics**, v. 36, n. 1, p. 40–45, 2004.

PISTERS, K. M. W. et al. Cancer care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non-small-cell lung cancer guideline. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 34, p. 5506–5518, 2007.

PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 1, p. 33–45, 2003.

RABINOVICH, G. A.; CROCI, D. O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 322–335, 2012.

RAJU, S.; JOSEPH, R.; SEHGAL, S. Review of checkpoint immunotherapy for the management of non-small cell lung cancer. **ImmunoTargets and therapy**, v. 7, p. 63–75, 2018.

RASHID, S. et al. Molecular structure, expression, and the emerging role of Siglec-15 in skeletal biology and cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 237, n. 3, p. 1711–1719, 2022.

REN, X. Immunosuppressive checkpoint Siglec-15: a vital new piece of the cancer immunotherapy jigsaw puzzle. **Cancer Biology and Medicine**, v. 16, n. 2, p. 205–210, 2019.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA, 2020. URL <http://www.rstudio.com/>.

SANMAMED, M. F.; CHEN, L. Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. **Cancer journal (Sudbury, Mass.)**, v. 20, n. 4, p. 256–261, 2014.

SANMAMED, M. F.; CHEN, L. A paradigm shift in cancer immunotherapy: From enhancement to normalization. **Cell**, v. 175, n. 2, p. 313–326, 2018.

SATO, D. et al. Siglec-15-targeting therapy increases bone mass in rats without impairing skeletal growth. **Bone**, v. 116, p. 172–180, 2018.

SCHMIDT, T. et al. Macrophage–tumor crosstalk: role of TAMR tyrosine kinase receptors and of their ligands. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 69, n. 9, p. 1391–1414, 2012.

SCHMITZ, R. et al. TAM receptors Tyro3 and Mer as novel targets in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 56355–56370, 2016.

SHAY, J. W.; RONINSON, I. B. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2919–2933, 2004.

SHIELDS, M. D.; MARIN-ACEVEDO, J. A.; PELLINI, B. Immunotherapy for advanced non–small cell lung cancer: A decade of progress. **American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Meeting**, v. 41, n. 41, p. e105–e127, 2021.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020.

SINHA, S. et al. Targeted Axl inhibition primes chronic Lymphocytic leukemia B cells to apoptosis and shows synergistic/additive effects in combination with BTK inhibitors. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 21, n. 9, p. 2115–2126, 2015.

SMART, S. et al. The emerging role of TYRO3 as a therapeutic target in cancer. **Cancers**, v. 10, n. 12, p. 474, 2018.

STELLMAN, S. D. et al. Impact of filter cigarette smoking on lung cancer histology. **Preventive medicine**, v. 26, n. 4, p. 451–456, 1997.

TAICHMAN, R. S. et al. GAS6 receptor status is associated with dormancy and bone metastatic tumor formation. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61873, 2013.

TAKAHATA, M. et al. Sialylation of cell surface glycoconjugates is essential for osteoclastogenesis. **Bone**, v. 41, n. 1, p. 77–86, 2007.

TAKAMIYA, R. et al. The interaction between Siglec-15 and tumor-associated sialyl-Tn antigen enhances TGF- secretion from monocytes/macrophages through the DAP12-Syk pathway. **Glycobiology**, v. 23, n. 2, p. 178–187, 2013.

THERNEAU, T. M.; GRAMBSCH, P. M. **Modeling survival data: Extending the cox model**. New York, NY: Springer New York, 2000.

TOPALIAN, S. L.; DRAKE, C. G.; PARDOLL, D. M. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 2, p. 207–212, 2012.

TORRE, L. A. et al. International variation in lung cancer mortality rates and trends among women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 23, n. 6, p. 1025–1036, 2014.

TOYODA, Y. et al. Trends in lung cancer incidence by histological type in Osaka, Japan. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 38, n. 8, p. 534–539, 2008.

VILLALOBOS, P.; WISTUBA, I. I. Lung cancer biomarkers. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 31, n. 1, p. 13–29, 2017.

VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in cancer biology**, v. 35, p. S185–S198, 2015.

WALTERS, S. et al. Lung cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK: a population-based study, 2004–2007. **Thorax**, v. 68, n. 6, p. 551–564, 2013.

WANG, J. et al. Siglec-15 as an immune suppressor and potential target for normalization cancer immunotherapy. **Nature medicine**, v. 25, n. 4, p. 656–666, 2019.

WANG, Y. et al. A novel TP53 gene mutation sustains non-small cell lung cancer through mitophagy. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 22, p. 3587, 2022.

WEBSTER, A. et al. HHS Public Access. v. 182, n. 1, p. 200–225, 2020.

WILLIAMS, M. et al. Immunopositivity for Siglec-15 in gastric cancer and its association with clinical and pathological parameters. **European journal of histochemistry: EJH**, v. 65, n. 1, 2021.

WEINSTEIN, J. N. et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. **Nature genetics**, v. 45, n. 10, p. 1113–1120, 2013.

WICKHAM, H. **ggplot2**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

WIMMEL, A. et al. Synthesis and secretion of the anticoagulant protein S and coexpression of the Tyro3 receptor in human lung carcinoma cells. **Cancer**, v. 86, n. 1, p. 43–49, 1999.

WOO, T. et al. Prognostic value of the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in stage I disease of Japanese cases. **Pathology international**, v. 62, n. 12, p. 785–791, 2012.

WU, H.-R. et al. Expedient assembly of Oligo-LacNAcs by a sugar nucleotide regeneration system: Finding the role of tandem LacNAc and sialic acid position towards siglec binding. **European journal of medicinal chemistry**, v. 180, p. 627–636, 2019.

WU, Y.-L. et al. Osimertinib in resected *EGFR*-mutated non-small-cell lung cancer. **The New England journal of medicine**, v. 383, n. 18, p. 1711–1723, 2020.

WÜNSCH FILHO, V.; GATTÁS, G. J. F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cadernos de saúde publica**, v. 17, n. 3, p. 467–480, 2001.

WYANT, T., ALTERI, R., KALIDAS, M. About Lung Cancer What Is Lung Cancer ? **American Cancer Society**, p. 1–15, 2022.

XIAO, G. et al. Activator protein 1 suppresses antitumor T-cell function via the induction of programmed death 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 38, p. 15419–15424, 2012.

YASUMOTO, K.; HANAGIRI, T.; TAKENOYAMA, M. Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer. **General thoracic and cardiovascular surgery**, v. 57, n. 9, p. 449–457, 2009.

ZÖLLER, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 4, p. 254–267, 2011.

ZOU, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 4, p. 295–307, 2006.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) Senhor está sendo convidado como voluntário a participar da pesquisa “Avaliação de SIGLEC-15 e TYRO3 como possíveis biomarcadores de prognóstico e resposta terapêutica em câncer de pulmão não pequenas células”. Neste estudo pretendemos investigar as proteínas que podem estar presentes no sangue chamadas SIGLEC-15 e TYRO-3 em pacientes com câncer de pulmão, analisando suas características e funções. O motivo que nos leva a estudar é a necessidade de ser criado um maior conhecimento sobre a área do câncer de pulmão, para que os pacientes, como o(a) senhor(a), possam ser melhor tratados pela equipe médica. O presente estudo está sob a responsabilidade de **César Freire De Melo Vasconcelos**, residente na Rua Dezessete de Agosto N 1845 - Casa forte – Recife- PE telefone (81) 988998677, e-mail: vasconceloscfm@gmail.com e dos seguintes colaboradores:

Michelly Cristiny Pereira (UFPE), residente na Rua José Augusto da Silva Braga, 555- Bairro Novo, Olinda-PE; tel. (81) 998274256, e-mail: michelly2305@yahoo.com.br

Cinthia Martins Menino Diniz, residente na Rua Cônego Lira, 402 - Imbiribeira, Recife-PE; telefone (81) 99216-9697 e email: cinthiamartinsm@yahoo.com.br

Rafaella Ferreira das Neves, residente na Rua Artur Vanderlei, 450 - Várzea, Recife- PE; telefone (81) 99904-6133 e email: rafaella.neves@ufpe.br;

Thiago Douberin da Silva, residente na Avenida Afonso Olindense, 730 - Várzea, Recife; telefone (81) 99671-7806 e email: thiagodouberin@gmail.com

Assistentes de pesquisa: Ana Carolina Branco Neves Silva, CPF: 060.898.374-82; Celine Beatriz Swollon Pegado, CPF: 707.456.154-14; Cinthia Martins Menino Diniz, CPF: 038.750.444-36, Doralice Conceição da Paz Neta, CPF:118.896.314-77; Gabriel Guerra Cordeiro, CPF: 112.925.784-32; Gardenia Carmen Gadelha Militão, CPF: 838.608.003-53; Heloíza Cristina Soares Ferreira, CPF 124.321.974-29; João Pedro Alves Gomes, CPF: 709.886.944-92; José Rafael Soares da Silva, CPF: 702.632.394-62; Maira Galdino Da Rocha Pitta CPF: 039.972.064-22; Michelly Cristiny Pereira, CPF: 067.369.646-44; Moacyr Barreto de Melo Rego, CPF: 051.890.774-03; Priscilla Stela Santana De Oliveira, CPF: 090.142.854-00; Rafaella Ferreira das Neves, CPF 416.429.198-29; Renata Virginia Cavalcanti Santos, CPF: 014.130.594-06; Rhayssa Mendes de Lucena, CPF: 708.291.074-60; Rodrigo Santiago Moreira, CPF: 043.990.633-43; Silvia Maria de Souza, CPF 087.150.434-01; Thiago Douberin da Silva, CPF: 056.102.564-96; Yasmin Barreto Franca De Farias; CPF: 120.733.074-42.

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja

bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

Para este estudo adotaremos os seguintes procedimentos:

1. - Preenchimento de questionário com o dados gerais do(a) senhor(a), como idade, sexo, procedência, ocupação e histórico pessoal de etilismo, tabagismo e outras neoplasias (não pulmonares), bem como histórico de neoplasias na família;
- 2.– Coleta de amostra de sangue. Coleta de apenas uma parte do sangue do(a) senhor(a) que já será analisado como protocolo de rotina do procedimento ao qual o(a) senhor(a) será submetido(a). Será extraído um volume de apenas 4ml de sangue, que é equivalente a pouco menos de uma colher de chá.
3. – Extração de fragmento de tecido pulmonar. Retirada de uma pequena porção da amostra já retirada na cirurgia do(a) senhor(a).
4. – Armazenamento dos seus dados em computador pessoal da equipe de pesquisa, protegido com senha. Todos os dados do senhor estarão protegidos e serão utilizados de forma anônima apenas em eventos e artigos científicos, cujo principal intuito é a divulgação dos resultados obtidos para atualização de equipes médicas em todo o mundo.

RISCOS: Quanto à coleta das amostras de sangue e parênquima pulmonar, a aplicação da presente pesquisa não trará riscos adicionais ao paciente, tendo em vista que tais medidas já são inerentes ao tratamento cirúrgico ao qual o paciente será submetido. A proposta será de coletar uma parte das amostras de sangue e pulmão que já são extraídas rotineiramente como protocolo dos procedimentos de cirurgia torácica. O risco cirúrgico será explicado ao(à) senhor(a) pela equipe médica, de acordo com a cirurgia, e o termo livre esclarecido do hospital do câncer será assinado caso o(a) senhor(a) concorde com a proposta de tratamento ciente dos riscos do procedimento proposto. Os riscos da pesquisa serão constrangimento durante a entrevista para preenchimento do termo para participação da pesquisa e a ficha de coleta de dados gerais do(a) senhor(a), que será reduzido pois o(a) senhor(a) poderá deixar de participar a qualquer momento caso prefira, e o risco de vazamento de dados, que será minimizado pois os guardaremos em arquivos pessoais protegidos por senha. Caso haja algum dano decorrente da pesquisa, o pesquisador principal se compromete a fornecer ressarcimento e indenização aos indivíduos relativos aos danos causados pela participação na pesquisa.

BENEFÍCIOS: Esta pesquisa trará benefícios para pacientes com câncer de pulmão,

como o(a) senhor(a), uma vez que trará no futuro possibilidades para a busca de novos biomarcadores e desenvolvimento de novos medicamentos. Será, também, de extrema importância para formação de um banco de tumores de câncer de pulmão que atenderá no futuro, vários projetos de pesquisa além do presente projeto proposto. A concretização deste banco de tumores contribuirá para o desenvolvimento científico da região Nordeste, enriquecendo a pesquisa na área de Oncologia. O preenchimento da ficha de dados gerais do(a) senhor(a), irá contribuir com a construção de um perfil de pessoas que apresentam um maior risco de desenvolver neoplasias pulmonares. Dessa forma, as equipes médicas poderão tomar decisões e atentar precocemente a esse grupo mais vulnerável, no intuito de prevenir o surgimento ou agravamento dessas neoplasias. A maior contribuição que poderemos levar desse projeto será a possível melhora da qualidade de vida dos pacientes com câncer de pulmão, através do fornecimento de um maior conhecimento das equipes de saúde sobre o assunto.

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

O procedimento médico poderá ser interrompido ante qualquer intercorrência adversa. E, neste caso, pesquisador responsável, ao perceber qualquer risco ou dano significativos ao participante da pesquisa, previstos ou não neste Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido, comunicará o fato, imediatamente, ao Sistema CEP/ CONEP, que avaliará, em caráter emergencial, a necessidade de adequar ou suspender o estudo.

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

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

BASES DA PARTICIPAÇÃO: É importante que o(a) senhor(a) saiba que sua participação nesta pesquisa é completamente voluntária e que pode recusar a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda dos benefícios que tem direito. Os dados coletados nesta pesquisa, ficarão armazenados em (pastas de arquivo e computador pessoal), sob a responsabilidade do pesquisador, no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG) da UFPE, pelo período de mínimo 5 anos.



Assim como está previsto na Resolução CNS nº466/2012, para participar deste estudo o(a) senhor(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. O(A) senhor(a) será esclarecido sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se em qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O Sr. não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável César Freire de Melo Vasconcelos (residente na Rua Dezessete de Agosto N 1845 - Casa forte – Recife- PE – CEP 52061540 – telefone para contato (81) 988998677) e a outra será fornecida ao(à) senhor(a).

Eu,, portador do documento de _____

Identidade fui informado dos objetivos da pesquisa “Avaliação de SIGLEC-15 e TYRO3 como possíveis biomarcadores de prognóstico e resposta terapêutica em câncer de pulmão não pequenas células”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Recife, _____ de _____ de _____.

Nome e Assinatura participante: _____

Nome Assinatura pesquisador: _____

Nome Assinatura testemunha _____

Nome Assinatura testemunha _____

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, o(a) senhor(a) poderá consultar:
CEP / HCP– Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco Av.
Cruz Cabugá, 1597 Santo Amaro – Recife PE. CEP: 50040000
E-mail: cep@hcp.org.br Contato: 3217-8005

ANEXO B – FICHA CLÍNICA

FICHA CLÍNICA - Projeto Biomarcadores no Câncer de Pulmão

Título: "AVALIAÇÃO DE SIGLEC-15 E TYRO3 COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE PROGNÓSTICO E RESPOSTA TERAPÊUTICA EM CÂNCER DE PULMÃO NÃO PEQUENAS CÉLULAS"

CAAE: 40936420.9.0000.5205

FICHA Nº CAP _____

Paciente nº: _____

Nome do Paciente:

Sexo	Masc []	Fem []	Data de Entrada:
Naturalidade:			Data de Nascimento:
Residência (cidade e estado):			Data da Biópsia:
Telefone (paciente):			Telefone familiar:
COR: Branca []	Parda []	Negra []	
Ocupação: empregado []	desempregado []	licença de saúde []	aposentado []
	trabalho doméstico []	Outro: _____	

Emprego:	Trabalhava no turno da noite? Sim [] Não []				
Escolaridade	Básico	Médio	Superior	Completo	Incompleto
Tabagismo	Sim []	Não []	Ex []	Passivo	Tipo/Dose: Tempo de exposição/fumo:
Etilismo	Sim []	Não []	Ex []		Tipo/Dose: Tempo de exposição:
Exposição a outros fatores de risco	Sim []	Não []	Qual? _____ (amianto, cimento)...		

INFORMAÇÃO SOBRE A DOENÇA E TRATAMENTO

Outros Tumores	Sim []	Não []	Qual:
----------------	---------	---------	-------

História Familiar de Neoplasia	Sim []	Não []	Qual: _____ Grau de parentesco: _____
--------------------------------	---------	---------	--

Outras Informações – Comorbidades

Diabetes – S / N

Hipertensão – S / N

Doenças Auto-imunes – S / N

Doenças Pulmonares: S/N

Infecções Crônicas – S / N

Pneumonia DPOC

Uso de medicações – S / N : quais:

Asma Bronquite

Passado cirúrgico – S / N

Biomarcadores Ca de Pulmão:

Métodos de dosagem

Descrição da Lesão:	cTNM:
	cEstádio:

Localização	lobo superior direito	lobo superior esquerdo	Lobo Médio	LINFONODOS
	Lobo Inferior direito	Lobo inferior esquerdo	Outra informação relevante: _____	
	Metastase	Sítio? _____	OUTROS	Qual:

Tratamento Inicial		Tratamento Adjuvante (Pós)		Data do tratamento inicial:
Cirurgia	Quimioterapia	Radioterapia		
Radioterapia	Suporte (CSTO)	Quimioterapia		

INFORMAÇÕES SOBRE PACIENTES COM INDICAÇÃO DE CIRURGIA

Resposta estável Parcial Completa Progressão

HISTOPATOLOGIA

Nº Cirurgia:

OUTRAS INFORMAÇÕES

Tipo de Cirurgia	Lobectomia		Bilobectomia	TNM– ESTADIAMENTO:
	pneumonectomia		Segmentomia	
Margens Livres	Sim Não	Linfadenectomia	Número de Linfonodos	Número de linfonodos:
Tratamento adjuvante	Sim Não	Tto adjuvante instituído		Cisplatina/derivados <input type="checkbox"/> Outros _____

RESPOSTA TERAPÊUTICA – Para pacientes com adenocarcinomas metastático

Recidiva