

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

BRYAN ÔRTERO PEREZ GONÇALVES

**PAPEL DA ATIVIDADE NEURONAL SENSORIAL E RESPOSTA
QUIMIOTERÁPICA À CISPLATINA NO FENÔMENO DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-
MESENQUIMAL (EMT) NO CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-
PEQUENAS (NSCLC)**

BRYAN ÔRTERO PEREZ GONÇALVES

**PAPEL DA ATIVIDADE NEURONAL SENSORIAL E RESPOSTA
QUIMIOTERÁPICA À CISPLATINA NO FENÔMENO DETRANSIÇÃO
EPITÉLIO-MESENQUIMAL (EMT) NO CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS
NÃO-PEQUENAS (NSCLC)**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas

- Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Birbrair

043

Gonçalves, Bryan Ôrtero Perez.

Papel da atividade neuronal sensorial e resposta quimioterápica à cisplatina no fenômeno de transição epitélio-mesenquimal (EMT) no câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) [manuscrito] / Bryan Ôrtero Perez Gonçalves. – 2022.

150 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Birbrair.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Neoplasias Pulmonares. 3. Transição Epitelial-Mesenquimal. 4. Euphorbia resinífera. 5. Cisplatino. 6. Sistema Nervoso. I. Birbrair, Alexander. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA TESE N° 368 DE BRYAN ÔRTERO PEREZ GONÇALVES

Às 14:00 horas do dia 19 do mês de dezembro de 2022, transmitida através da plataforma de webconferência Skype, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Bryan Ôrtero Perez Gonçalves**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Alexander Birbrair**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Dra. Luciana Maria Silva**, Fundação Ezequiel Dias, **Prof. Dr. Pedro Pires Goulart Guimarães**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Remo de Castro Russo**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Letícia da Conceição Braga**, NEP/Instituto Mário Penna, e **Prof. Dr. Alexander Birbrair**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Papel da Atividade Neuronal Sensorial e Resposta Quimioterápica À Cisplatina, no Fenômeno de Transição Epitélio-mesenquimal (EMT) no Câncer de Pulmão de Células Não-pequenas (NSCLC)**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Remo de Castro Russo**, Professor do Magistério Superior, em 20/12/2022, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Pires Goulart Guimaraes**, Professor do Magistério Superior, em 20/12/2022, às 15:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexander Birbrair**, Professor do Magistério Superior, em 21/12/2022, às 13:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia da Conceição Braga, Usuária Externa**, em 23/12/2022, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2112838&infra_sistema... 1/2

26/01/2023 15:23

SEI/UFMG - 1963204 - Ata de defesa de Dissertação/Tese



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Maria Silva Lopes, Usuário Externo**, em 10/01/2023, às 15:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1963204** e o código CRC **C48032D7**.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço primeiramente ao criador do universo, ao senhor Deus, pela minha vida e por estar ao meu lado todo este tempo.

Aos meus pais, Ana Alice Perez e Luiz Antônio Gonçalves Neto, que infelizmente não estão mais presentes fisicamente neste plano, mas aonde quer que estejam saibam que sou grato por tudo que fizeram por mim. Ao meu namorado, Eduardo Resende, por estar ao meu lado durante esses quase cinco anos juntos, pela sua paciência e encorajamento, pela sua sabedoria em me guiar e mostrar qual caminho devo tomar quando nem eu mesmo sei, pelos momentos que passamos e ainda vamos passar juntos, enfim, por ter feito de mim uma nova pessoa desde quando o conheci.

À minha amiga Gabryella Soares Pinheiro dos Santos, alguém que chegou na minha vida de uma maneira tão inesperada há oito anos atrás e que mudou a forma como eu enxergava o mundo e a mim mesmo. Gaby (tritão para os mais íntimos), obrigado por sempre estar ao meu lado!

Aos amigos Anderson Santos, Bianca Bastos, Julia Andreotti, Luiza Lousado e Patrick Azevedo, obrigado pelos bons momentos que passamos juntos!

Agradeço aos membros do Birbrair Lab, em especial à Alinne Costa, Beatriz Rocha, Caroline Picoli, Milla Almeida, Paulo Lumar e Patrícia Martins. Ao professor Alexander Birbrair por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e pelas oportunidades que me deu.

Ao professor Enio Ferreira (Laboratório de Comportamento Celular) pela doação de primers e anticorpos. Ao professor Geovanni Dantas Cassali (Laboratório de Patologia Comparada) por ter nos auxiliado com as análises histológicas. À professora Paula Peixoto (Laboratório de Apoptose e Angiogênese) e seus alunos Igor Fontes e Letícia Cristina, pela ajuda com a coloração de Picrosirius Red.

Agradeço a duas grandes figuras na minha vida acadêmica que me ensinaram muito do que sei e que fizeram parte de momentos importantes da minha vida, Luciana Maria Silva e Letícia da Conceição Braga.

Agradeço a cada professor que passou pela minha vida, desde o ensino básico, fundamental, médio e superior, pois esta linda profissão a qual eu desejo seguir é a base para formação de

qualquer outro profissional.

Por fim, meus sinceros agradecimentos a todos que acreditaram em mim e contribuíram de alguma forma para que este momento acontecesse.

“O conhecimento é uma ferramenta, e como todas as ferramentas, o seu impacto está nas mãos de quem o usa”

(Dan Brown)

RESUMO

O fenômeno de transição epitélio-mesenquimal (EMT) é tradicionalmente associado à migração celular durante o desenvolvimento embrionário ou na cicatrização de feridas, entretanto, hoje sabe-se que este mecanismo possui um papel fundamental na invasão e metástase de tumores sólidos. Assim, utilizando-se do estado da arte, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a participação deste evento *in-vitro*, na linhagem celular de câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC), LLC1, nos modelos monocamada (MN) e de enriquecimento de células tronco do câncer (CSC's) por meio da formação de tumoresferas (TE). Além disso, buscamos elucidar como o tratamento com cisplatina ou a depleção de neurônios sensoriais podem modular o evento EMT no câncer de pulmão *in vivo*. Para alcançar os objetivos aqui propostos, determinamos o IC₅₀ para células LLC1 tratadas com o quimioterápico cisplatina. O estado transcricional dos genes reguladores de EMT (*Zeb1*, *Zeb2*, *Twist*, *Snail* e *FoxA2*) e os alvos a jusante desses fatores de transcrição (*E-caderina*, *Tgfb1*, *Vimentina*, *Fibronectina* e *N-caderina*), além dos genes de pluripotência (*Sox2*, *Oct-4* e *Nanog*), foram avaliados por qPCR. Avaliamos a expressão do marcador epitelial E-caderina e das proteínas mesenquimais fibronectina, vimentina e N-caderina pela técnica de imunofluorescência. Para caracterizar subpopulações celulares com perfis de *CSCs-like* (CD44⁺ / CD133⁺ / ALDH⁺ / CD24⁺) e o estado proliferativo (Ki-67⁺) realizamos imunofenotipagem por citometria de fluxo. As células LLC1 foram tratadas com o meio condicionado isolado a partir do cultivo *in-vitro* de neurônios sensoriais extraídos do gânglio da raiz dorsal de animais C57Bl/6J, ou colocadas em co-cultura no sistema transwell. Finalmente, células LLC1 foram inoculadas via subcutânea (S.C) em animais C57Bl/6J que tiveram seus neurônios sensoriais depletados por meio do tratamento farmacológico com a resiniferotoxina (RTX) ou que foram tratados somente com o quimioterápico cisplatina. Desta forma, caracterizamos o microambiente dos tumores oriundos do crescimento das células LLC1 por meio da imunofenotipagem para CSCs de pulmão e células imunes, além da avaliação do perfil transcriptômico dos genes envolvidos no fenômeno EMT, pluripotência e morte celular programada por apoptose. Entre os resultados obtidos destacam-se: (I) regulação positiva da expressão dos transcritos reguladores do fenômeno EMT e dos genes de pluripotência após tratamento com cisplatina *in-vitro* e presença de células com perfil de CSCs mesmo após o tratamento com cisplatina; (II) aumento do IC₅₀ na MN e TE tratada com cisplatina diluída em meio condicionado; (III) presença de um fenótipo híbrido nas células LLC1 em co-cultura com neurônios sensoriais, com expressão da proteína epitelial E-caderina e mesenquimal, vimentina, nas células tumorais; (IV) ausência de fibras sensoriais no

tumor primário de animais tratados com cisplatina, semelhante a depleção com RTX; (V) aumento do volume, peso e área dos tumores de animais que tiveram os neurônios sensoriais depletados com RTX; (VI) diminuição das proteínas E-caderina, N-caderina, fibronectina e vimentina, redução de células com perfil *CSCs-like* e de células do sistema imunológico, nos tumores primários de animais tratados com cisplatina ou que tiveram os neurônios depletados com RTX. Sendo assim, nossos achados dão forte suporte a ideia de que fibras nervosas sensoriais estabelecem um crosstalk com o microambiente tumoral e que o tratamento com cisplatina pode afetar a presença dessas fibras no tumor primário. Desta forma, espera-se que os dados gerados possam contribuir para o entendimento de como as fibras nervosas sensoriais podem modular a complexidade celular do tumor, abrindo espaço para potenciais abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: câncer de pulmão; cisplatina; inervação sensorial; *emt*; *rtx*

ABSTRACT

The phenomenon of epithelial-mesenchymal transition (EMT) is traditionally associated with cell migration during embryonic development or wound healing, however, today it is known that this mechanism plays a key role in the invasion and metastasis of solid tumors. Thus, using the state of the art, the main objective of this study was to evaluate the *in-vitro* participation of this event, in the non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, LLC1, in the monolayer (MN) and cancer stem cells enrichment model (CSC's) through the tumorspheres (TE) assay. Furthermore, we seek to elucidate how cisplatin treatment or sensory neuron depletion can modulate the EMT in lung cancer *in-vivo*. To achieve the objectives proposed here, we determined the IC₅₀ for LLC1 cells treated with cisplatin. The transcriptional state of the EMT regulatory genes (*Zeb1*, *Zeb2*, *Twist*, *Snail*, and *FoxA2*) and the downstream targets of these transcription factors (*E-cadherin*, *Tgfb1*, *Vimentin*, *Fibronectin*, and *N-cadherin*), in addition to pluripotency genes (*Sox2*, *Oct-4*, and *Nanog*), were evaluated by qPCR. We evaluated the expression of the epithelial marker E-cadherin and the mesenchymal proteins fibronectin, vimentin, and N-cadherin by immunofluorescence. To characterize cell subpopulations with CSCs-like profiles (CD44⁺/CD133⁺/ALDH⁺/CD24⁺), and the proliferative state (Ki-67⁺) we performed immunophenotyping by flow cytometry. LLC1 cells were treated with the conditioned medium isolated from the *in-vitro* culture of sensory neurons extracted from the dorsal root ganglion of C57BL/6J animals, or placed in co-culture in the transwell system. Finally, LLC1 cells were inoculated subcutaneously (S.C) in C57Bl/6J animals that had their sensory neurons depleted through pharmacological treatment with resniferotoxin (RTX) or that were treated only with the chemotherapy drug cisplatin. Thus, we characterized the microenvironment of tumors arising from the growth of LLC1 cells through immunophenotyping for lung CSCs and immune cells, in addition to evaluating the transcriptomic profile of the genes involved in the EMT phenomenon, pluripotency and programmed cell death by apoptosis. Among the results obtained, the following stand out: (I) positive regulation of the expression of regulatory transcripts of the EMT phenomenon and pluripotency genes after treatment with cisplatin *in-vitro* and presence of cells with a CSC profile even after treatment with cisplatin; (II) increase in IC₅₀ in MN and TE treated with cisplatin diluted in conditioned medium; (III) presence of a hybrid phenotype in LLC1 cells in co-culture with sensory neurons, with expression of the epithelial E-cadherin and mesenchymal protein, vimentin, in tumor cells; (IV) absence of sensory fibers in the primary tumor of animals treated with cisplatin, similar to RTX depletion; (V) increase in volume, weight and area of

tumors in animals that had sensory neurons depleted with RTX; (VI) decrease of E-cadherin, N-cadherin, fibronectin, and vimentin proteins, reduction of CSCs-like profile and of immune system cells, in primary tumors of animals treated with cisplatin or whose neurons were depleted with RTX. Thus, our findings strongly support the idea that sensory nerve fibers establish a crosstalk with the tumor microenvironment and that cisplatin treatment can affect the presence of these fibers in the primary tumor. In this way, it is expected that the data generated may contribute to the understanding of how sensory nerve fibers can modulate the cellular complexity of the tumor, opening space for potential therapeutic approaches.

Keywords: lung cancer; cisplatin; sensory innervation; *emt*, *rtx*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, excluindo os casos de pele não melanoma.....	17
Figura 2. As características do câncer.	18
Figura 3. Transição epitélio-mesenquimal (EMT)	20
Figura 4. Ativação da cisplatina e indução de danos ao DNA.	26
Figura 5. Visão geral do sistema nervoso.....	31
Figura 6. Fotomicrografia da linhagem celular LLC1 cultivada em monocamada (MN) e tumoresfera (TE).....	55
Figura 7. Análise da curva de sobrevida da linhagem celular LLC1 nos modelos monocamada (MN) e tumoresfera (TE) tratados com cisplatina.....	57
Figura 8. Tratamento com cisplatina promove superexpressão dos genes de pluripotência e do fenômeno EMT.....	58
Figura 9. Perfil e distribuição dos marcadores mesenquimais fibronectina e vimentina, e da proteína do citoesqueleto F-actina na linhagem celular LLC1	60
Figura 10. Perfil e distribuição do marcador epitelial E-caderina na linhagem celular LLC1.	61
Figura 11. Perfil e distribuição do marcador mesenquimal N-caderina na linhagem celular LLC1.....	62
Figura 12. O tratamento com o quimioterápico cisplatina afetou a expressão dos marcadores mesenquimais na linhagem LLC1	63
Figura 13. Estratégia de gates utilizada para identificação de células CD44 ⁺ /CD133 ⁺ totais ou dentro dos grupos Ki-67 ⁻ / Ki-67 ⁺	65
Figura 14. Análises estatísticas do perfil de células com características CSCs-like (CD44 ⁺ / CD133 ⁺) e do estado proliferativo (Ki-67 ⁺)	66
Figura 15. Estratégia de gates utilizada para identificação de células CD24 ⁺ e ALDH ⁺	67
Figura 16. (A) Representação do animal NaV 1.8cre / tdTomato.	70
Figura 17. Neurônios sensoriais cultivados <i>in-vitro</i> são positivos para CGRP e negativos para SP e VIP.....	71
Figura 18. Micrografia das células L929 (A) e LLC1 em monocamada (MN-B) e tumoresfera (TE-C) tratadas com meio condicionado.....	72
Figura 19. Análise da viabilidade das células L929 (A) e LLC1 em monocamada (MN-B) e tumoresfera (TE-C) tratadas com meio condicionado.....	73
Figura 20. Análise das curvas de sobrevida e IC ₅₀ das linhagens celulares L929 e LLC1 nos	

modelos monocamada (MN) e tumoresfera (TE), tratadas com cisplatina diluída no meio próprio de cultivo de cada célula, meio neurobasal ou meio condicionado.	74
Figura 21. Ensaio clonogênico da linhagem LLC1 nos modelos monocamada (MN) e tumoresfera (TE).....	75
Figura 22. Co-cultura da linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas, LLC1, com neurônios sensoriais.....	76
Figura 23. A expressão do neuropeptídeo CGRP não foi afetada nos neurônios sensoriais quando colocados em co-cultura com a linhagem celular LLC1 nos modelos monocamada (MN) ou tumoresfera (TE)	77
Figura 24. Depleção farmacológica dos nervos sensoriais com resiniferatoxina (RTX) promoveu aumento do volume, peso e área tumoral.	79
Figura 25. Gânglios da raiz dorsal (DRGs) de animais tratados com RTX ou cisplatina são negativos para o canal de sódio NaV 1.8 e para o neuropeptídeo CGRP.....	80
Figura 26. Gânglios da raiz dorsal (DRGs) de animais tratados com RTX ou cisplatina são negativos para o canal de sódio NaV 1.8 e positivos para o neuropeptídeo SP	81
Figura 27. Gânglios da raiz dorsal (DRGs) de animais tratados com RTX ou cisplatina são negativos para o canal de sódio NaV 1.8 e para o neuropeptídeo VIP.....	82
Figura 28. Fibras de neurônios sensoriais estão presentes em diferentes momentos durante o desenvolvimento do câncer de pulmão.....	83
Figura 29. O tratamento com RTX promoveu a depleção de fibras sensoriais e do neuropeptídeo CGRP no tumor primário.	84
Figura 30. Depleção dos nervos sensoriais promoveu a expressão do neuropeptídeo SP por outras células no tumor primário.	85
Figura 31. O tratamento com RTX ou cisplatina promoveu a depleção de fibras sensoriais e do neuropeptídeo VIP no tumor primário.....	86
Figura 32. Depleção farmacológica dos neurônios sensoriais com RTX impulsionou a migração de células do tumor primário para o pulmão.	87
Figura 33. Estratégia de gates utilizada para identificação de infiltrado de linfócitos no tumor.	89
Figura 34. Depleção dos neurônios sensoriais com RTX ou o tratamento com cisplatina diminuiu a subpopulação de CSCs CD44 ⁺ /CD133 ⁺ dentro da população de células não proliferativas (Ki-67 ⁻) e em proliferação (Ki-67 ⁺)	90
Figura 35. A depleção dos neurônios sensoriais com RTX ou o tratamento com cisplatina afetaram as subpopulações de células do sistema imunológico.	91

Figura 36. Análise do mRNA dos genes associados ao evento EMT, pluripotência e células do sistema imunológico nos tumores de animais com nervos sensoriais depletados com RTX ou tratados com cisplatina	93
Figura 37. Análise estatística da expressão dos transcritos associados à morte celular programada por apoptose, nos tumores de animais com nervos sensoriais depletados com RTX ou tratados com cisplatina	95
Figura 38. Heatmap dos 41 genes envolvidos na via da apoptose e que foram diferencialmente expressos entre os animais tratados com cisplatina ou aqueles que tiveram os neurônios sensoriais depletados.	97
Figura 39. Perfil e distribuição dos marcadores mesenquimais fibronectina e vimentina nos tumores primários oriundos do inóculo de células de câncer de pulmão LLC1.....	97
Figura 40. Perfil e distribuição do marcador epitelial E-caderina, nos tumores primários oriundos do inóculo de células de câncer de pulmão LLC1.....	98
Figura 41. Perfil e distribuição do marcador mesenquimal N-caderina, nos tumores primários oriundos do inóculo de células de câncer de pulmão LLC1.....	99
Figura 42. Perfil e distribuição do marcador de vasos sanguíneos CD31, nos tumores primários oriundos do inóculo de células de câncer de pulmão LLC1.....	100
Figura 43. Análises estatísticas de E-caderina, N-caderina, vimentina, fibronectina e CD31 nos tumores primários.	101
Figura 44. Análise de fibras de colágeno do tipo I e do tipo III dentro dos tumores primário	102
Figura 45. Modelo esquemático I.....	115
Figura 46. Modelo esquemático II.....	116
Figura 47. Modelo esquemático III	117
Figura 48. Modelo esquemático IV.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações sobre os anticorpos primários utilizados na imunofluorescência	52
--	----

LISTA DE SIGLAS

Ach	Acetilcolina
ACK	Tampão de lise de eritrócitos
ALDH	<i>Aldehyde dehydrogenase</i>
Anti-Anti	Antibiótico-Antimicótico
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CASP	Caspase
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
DAPI	<i>4,6-diaminidino-2-phenylindole</i>
DCX	<i>Doublecortin</i>
DEAB	<i>N,N-diethylaminobenzaldehyde</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's modified eagle's medium/nutriente mixture f-12 ham</i>
DNT	Doenças não transmissíveis
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i>
EGF	<i>Epidermal growth fator</i>
EMT	<i>Epithelial-to-mesenchymal transition</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IAP	Proteínas inibidoras da apoptose
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LLC	Carcinoma Pulmonar de Lewis
MEC	Matriz Extra Celular
miRNAs	microRNAs
MMPs	Metaloproteinases
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

NaV	Canal de sódio voltagem-dependente
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NE	Norepinefrina / Noradrenalina
NGF	Fator de crescimento de nervo
NPC	<i>Neural Progenitor Cell</i>
NSC	<i>Neural Stem Cell</i>
NSCLC	<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PanIN	Neoplasia Intraepitelial Pancreática
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato-salino)
PDAC	Adenocarcinoma ductal pancreático
PFA	Paraformaldeído
PIN	Neoplasia Intraepitelial de Próstata
PNI	<i>Perineural Invasion</i>
RTX	Resiniferatoxina
SCLC	<i>Small Cell Lung Cancer</i>
SFB	Soro fetal bovino
SGZ	Zona Subgranular
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
SVZ	Zona Subventricular
T.A	Temperatura ambiente
TNF	Fator de necrose tumoral
T_{reg}	Linfócito T regulador
TRK	Receptor tirosina-quinase
TRP	Potencial Receptor Transitório
TRPA1	Potencial Receptor Transitório Anquirina 1
TRPM8	Potencial Receptor Transitório Canal Catiônico Subfamília M membro 8
TRPV1	Potencial Receptor Transitório Vaniloide 1
VIP	Peptídeo Vasoativo Intestinal
WHO	<i>World Health Organization</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Câncer	17
1.2 Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT)	19
1.3 Células-Tronco do Câncer	22
1.4 Câncer de pulmão	23
1.5 Apoptose	26
1.6 Fibras nervosas e câncer	30
1.7 Invasão perineural (PNI), uma rota de disseminação de tumores sólidos	34
1.8 Sistema Nervoso Sensorial	35
1.9 Neuromediadores sensoriais	36
1.10 Cisplatina e sistema nervoso sensorial	40
1.11 Resiniferatoxina e canal iônico TRPV1	41
1.12 Utilização do modelo murino de Lewis para estudos do microambiente dos tumores de pulmão	42
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral	44
3.1.1 Objetivos específicos	44
4. METODOLOGIA	45
4.1 Cultivo <i>in vitro</i>	45
4.2 Ensaio de viabilidade celular	45
4.3 Experimentação <i>in vivo</i> - aspectos éticos	46
4.4 Isolamento e cultivo de neurônios sensoriais extraídos do gânglio da raiz dorsal (DRG)	46
4.5 Tratamento das linhagens LLC1 e L929 com o meio condicionado dos neurônios	47
4.6 Co-cultivo da linhagem de câncer de pulmão com neurônios sensoriais	47
4.7 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais utilizando resiniferotoxina (RTX)	48
4.8 Inoculação da linhagem LLC1 e análise do crescimento tumoral <i>in vivo</i>	48
4.9 Extração de RNA total	49
4.10 Tratamento do RNA total com DNase e síntese de cDNA	50
4.11 Análise de alvos por qPCR utilizando SYBR™	50
4.12 Caracterização morfológica por microscopia	51
4.13 Caracterização celular por citometria de fluxo	52
4.13.1 Citometria das células cultivadas <i>in-vitro</i>	53
4.13.2 Citometria das amostras de tumores de animais C57BL/6J	54
4.14 Análise de dados	55
5. RESULTADOS	55

5.1 O modelo de enriquecimento de CSCs demonstrou-se mais resistente ao tratamento com cisplatina.....	56
5.2 O tratamento com cisplatina regulou positivamente genes de pluripotência e marcadores EMT nos modelos 2D e 3D	58
5.3 Cisplatina afeta a expressão dos marcadores mesenquimais na linhagem celular LLC1 cultivada em 2D e 3D	59
5.4 O tratamento com cisplatina não alterou o perfil de células <i>CSCs-like</i> ou aquelas em estado proliferativo	64
5.5 Meio condicionado dos neurônios sensoriais altera a viabilidade celular, capacidade clonogênica e a expressão de marcadores do evento EMT.....	67
5.6 Depleção química dos nervos sensoriais aumenta o crescimento do tumor primário.....	78
5.7 Depleção química dos nervos sensoriais ou tratamento com cisplatina afeta produção de neuropeptídeos nos DRGs e no tumor primário	80
5.8 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais aumenta o número de metástases no pulmão	86
5.9 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais ou tratamento com cisplatina afetou subpopulações celulares com características de CSCs ou de células imunes	88
5.10 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais ou tratamento com cisplatina afetou o perfil transcriptômico de genes reguladores do fenômeno EMT, pluripotência e apoptose.....	92
5.11 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais ou tratamento com cisplatina afetou a expressão tecidual de marcadores EMT	97
5.12 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais aumentou a expressão do marcador de vasos sanguíneos CD31	99
5.13 O tratamento com cisplatina ou a depleção farmacológica das fibras neuronais sensoriais com RTX, promoveram alterações nas fibras de colágeno do tipo I e do tipo III	101
6. DISCUSSÃO	103
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
8. CONCLUSÃO.....	118
REFERÊNCIAS.....	120
ANEXOS.....	141

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Atualmente, a definição científica de câncer enquadra as neoplasias malignas, caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem cerca de 200 tipos de cânceres, correspondentes aos vários tipos de células do corpo, e que se diferenciam entre si pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, sejam vizinhos ou distantes (NCI, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde, OMS (*World Health Organization – WHO*), o câncer faz parte do grupo de doenças não transmissíveis (DNT). Além do câncer, as doenças cardiovasculares, respiratórias e diabetes também fazem parte deste grupo. Esta classe de doenças corresponde à principal causa de óbitos no mundo, sendo responsável por cerca de 41 milhões de óbitos (equivalente a 71% de todas as mortes anuais). O câncer é uma das disfunções patológicas que mais causam temor na sociedade, perdendo somente para as doenças cardiovasculares em relação ao número de mortes (17.9 e 9 milhões de pessoas por ano, respectivamente) (WHO, 2018).

A estimativa para o Brasil triênio 2020-2022, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), apontou a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer a cada ano. O perfil epidemiológico no Brasil é parecido com os demais países da América Latina, onde cânceres de próstata em homens e de mama nas mulheres são os mais frequentes (INCA, 2020) (Figura 1). A estimativa mundial para o ano de 2025 realizada pelo projeto GLOBOCAN/*International Agency for Research on Cancer* (IARC), foi de 21.9 milhões de novos casos e 11.4 milhões de mortes, indicando um acentuado aumento na incidência e mortalidade provocados pelo câncer (IARC, 2022).



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

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, excluindo os casos de pele não melanoma. FONTE: INCA, 2020.

Acredita-se que a iniciação e progressão do câncer, processo conhecido como carcinogênese, é resultado da aquisição de múltiplas alterações genômicas em células normais (YAO; DAI, 2014). A manutenção da estabilidade genômica é fundamental para a integridade celular, prevenindo, desta forma, erros que normalmente acontecem durante a replicação do DNA, advindos de estresses genotóxicos endógenos como aqueles causadas por espécies reativas de oxigênio (ROS), ou exógenos, como radiação ultravioleta (UV), radiação ionizante, e produtos químicos conhecidos como xenobióticos, dentre estes: o álcool, o tabaco e pesticidas (ALI; BHATTACHARYA, 2014).

Além da perda da estabilidade genômica, outras características são essenciais durante a carcinogênese e contribuem para a formação de um microambiente tumoral (CASEY *et al.*, 2015). Hanahan e Weiberg (2011) propuseram algumas características para que células normais evoluam para um estado neoplásico, dentre elas: 1) sustentação da sinalização proliferativa; 2) resistência à morte celular programada, a apoptose; 3) evasão dos supressores tumorais; 4) capacidade de invadir tecidos adjacentes e colonizar locais diferentes do tumor primário, processo conhecido como metástase; 5) capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos, processo conhecido como angiogênese e 6) escape do sistema imunológico (Figura 2) (HANAHAN; WEIBERG, 2011).

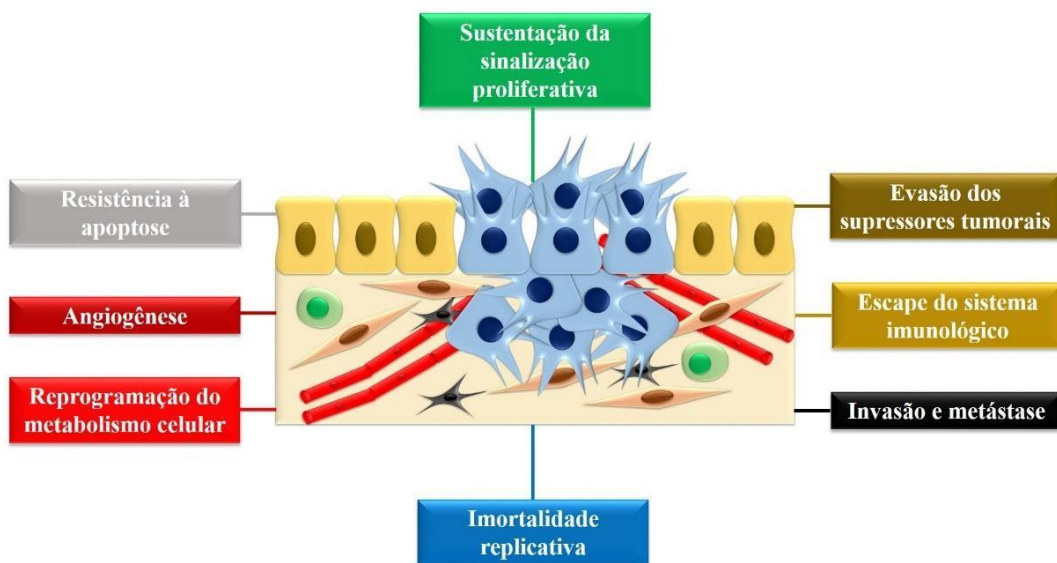


Figura 2. As características do câncer. FONTE: HANAHAN; WEIBERG, 2011.

A progressão do câncer frequentemente é vista como um modelo de evolução Darwiniana. Neste contexto, forças atuando sobre as células cancerosas selecionam aquelas com fenótipos necessários para sobreviver, proliferar, disseminar e sobretudo resistir às

abordagens terapêuticas. As variações no fenótipo celular e no potencial adaptativo contribuem para a heterogeneidade intratumoral (dentro do tumor) e intertumoral (entre pacientes diagnosticados com o mesmo subtipo tumoral) (WAHL; SPIKE, 2017). O termo heterogeneidade tumoral é definido pela presença de diferentes populações celulares ou clones que abrigam perfis genotípicos e fenotípicos distintos. Essa heterogeneidade tumoral desempenha papel fundamental no crescimento, progressão e resistência à terapia além de confundir o diagnóstico do tumor (INDA *et al.*, 2014).

Um dos modelos que melhor explica a heterogeneidade celular observada em diferentes tipos de tumores é a presença de células-tronco do câncer (CSCs). Neste modelo, é proposto uma organização hierárquica na qual uma subpopulação de células-tronco com capacidade de auto-renovação e diferenciação em tipos celulares distintos é responsável pela sustentação do crescimento do tumor (VISVADER; LINDEMAN, 2008; REYA *et al.*, 2001). CSCs podem se originar de células-tronco mutadas ou células adultas diferenciadas que retornam a um estágio indiferenciado através do mecanismo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (EMT). EMT em câncer dá origem a células com características metastáticas tais como: perda de adesão à matriz extracelular (MEC) e contato célula-célula, aumento da capacidade de migração e invasão celular, além da resistência a morte celular programada, a apoptose (DONGRE; WEIBERG, 2018; KIM *et al.*, 2017).

1.2 Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT)

O fenômeno de transição epitélio-mesenquimal (EMT) (Figura 3), é um evento altamente orquestrado e que envolve uma série de mudanças que levam à perda das características de células epiteliais como a diminuição de moléculas de adesão (EpCAM, E-caderina, claudina e ocludina) e de filamentos intermediários de citoqueratina, bem como um rearranjo na polaridade apical-basal, conduzindo à aquisição de propriedades de células mesenquimais, como formato fusiforme semelhante a fibroblastos e capacidade de invasão e migração por meio do remodelamento da matriz extracelular (MEC) com liberação de metaloproteases e expressão de fibronectina, N-caderina, vimentina, laminina e colágeno do tipo I. Durante a EMT, a formação de projeções ricas em filamentos de actina conhecidas como filopódios eleva a capacidade de invasão e motilidade de células mesenquimais (KIM *et al.*, 2017).

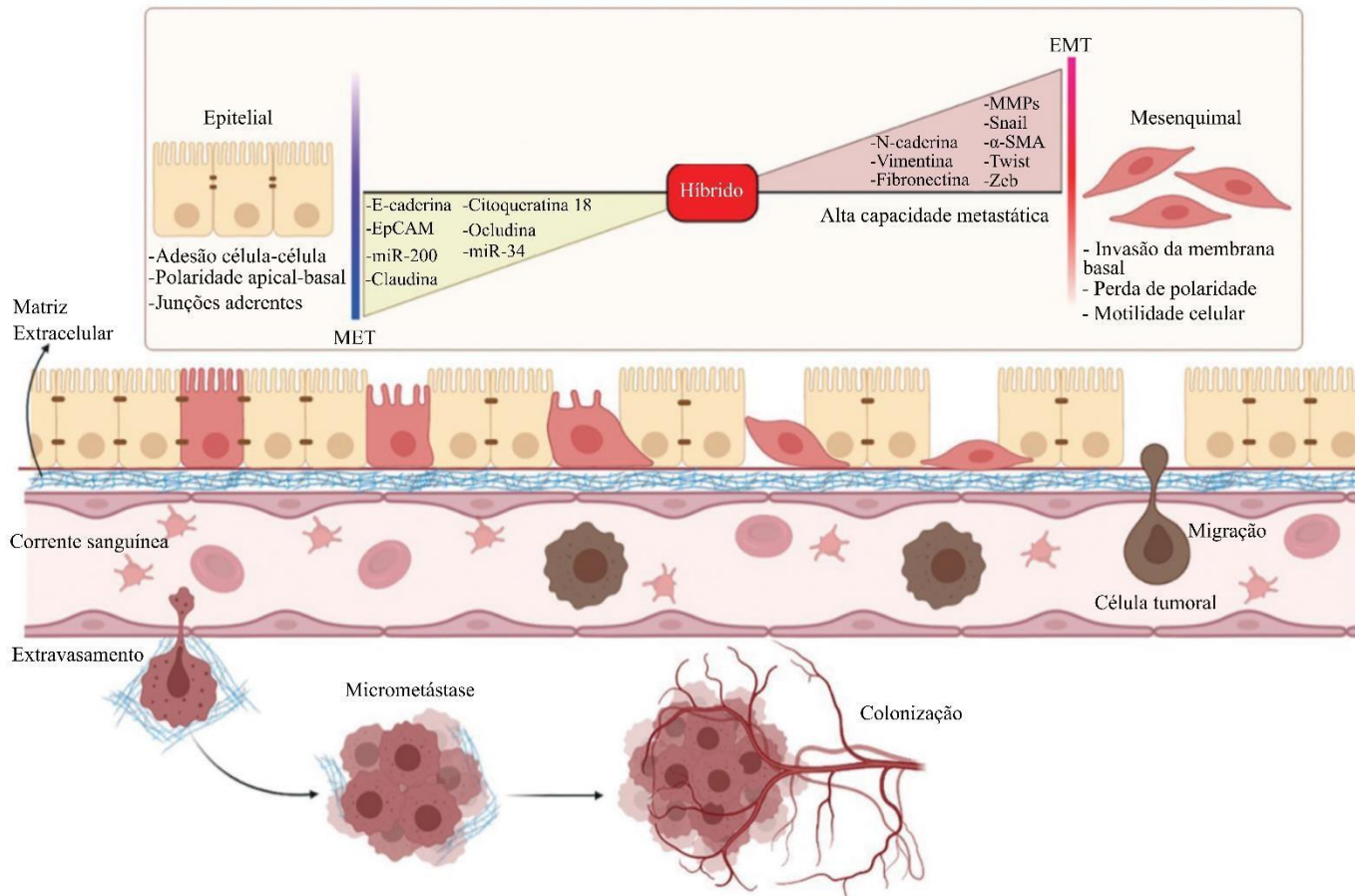


Figura 3. Transição epitélio-mesenquimal (EMT). Algumas proteínas são tipicamente expressas por células epiteliais, como E-caderina, claudina, occludina, citoqueratina 18 e EpCAM, e são responsáveis por promoverem adesão célula-célula e célula membrana basal, além de manterem uma polaridade apical-basal. Além disso, RNAs não-codificantes como os microRNAs (miRNAs) também estão envolvidos na manutenção do fenótipo epitelial, como o miR-34 e o miR200. Durante o evento EMT, as células tumorais perdem a expressão dessas proteínas epiteliais e adquirem a expressão de proteínas mesenquimais clássicas como fibronectina, vimentina, N-caderina e alpha actina do músculo liso (α -SMA). Além disso, proteínas que promovem a degradação da matriz extracelular (MEC), como as metaloproteínas (MMPs), são expressas por células tumorais que alcançaram o fenótipo mesenquimal. Esse fenômeno é orquestrado por diferentes fatores de transcrição intracelulares como ZEB, TWIST e SNAIL, além da proteína TGFB. Consequentemente, as células epiteliais perdem a polaridade apical-basal e adquirem uma morfologia fusiforme, semelhante a fibroblastos. Desta forma, células tumorais com fenótipo mesenquimal e mobilidade celular aumentada conseguem migrar e alcançar a corrente sanguínea, promovendo metástases em diferentes órgãos. As células tumorais podem ainda apresentar um fenótipo híbrido, expressando marcadores epiteliais e mesenquimais, portanto, não associadas estritamente a um estado epitelial ou mesenquimal. FONTE: adaptado de Zhang *et al.*, 2021.

A perda da expressão de E-caderina e consequente desestabilização das junções de adesão célula-célula é um evento importante durante a EMT. Os fatores que induzem o fenômeno EMT podem ser classificados quanto à habilidade de reprimir direta ou indiretamente

o gene de E-caderina. Proteínas “dedos de zinco” ou *Zinc finger* das superfamílias *Snail* e *Zeb* são repressores diretos do gene de E-caderina, estes fatores de transcrição incluem *Snail1*, *Snail2* (*Slug*) e *Zeb1/2*. Já os fatores de transcrição da família bHLH (*basic helix-loop-helix*), que incluem *Twist1/2*, são repressores indiretos do gene de E-caderina. Todos os fatores de transcrição citados acima possuem a capacidade de se ligarem a uma sequência na região promotora do gene da E-caderina, conhecida como E-box. Desta forma, alteram os perfis de metilação e acetilação e inibem a transcrição gênica (SERRANO; MAZIVEYI; ALAHARI, 2016; GARG, 2013).

Células epiteliais podem migrar ativamente durante condições fisiológicas ou patológicas. Desta forma, o evento EMT pode ser classificado de acordo com as circunstâncias em que ocorre e ser dividido em três tipos. O tipo 1 possui importante papel durante a embriogênese, especialmente na gastrulação, processo que origina as três camadas germinativas (endoderma, ectoderma e mesoderma), como também na formação do coração e da crista neural. Defeitos durante EMT tipo 1 na embriogênese estão relacionados a uma condição patológica em recém-nascidos conhecida como fenda palatina (KIM *et al.*, 2017; BARRIERE *et al.*, 2015).

EMT tipo 2 está relacionado à cicatrização de feridas, regeneração tecidual e fibrose. Durante a cicatrização de feridas e regeneração tecidual, EMT estimula a geração de fibroblastos, células clássicas do tecido conjuntivo, para substituírem a parte lesionada. O principal fator de crescimento que desencadeia este processo é o fator de transformação do crescimento beta (TGFB) (KIM *et al.*, 2017; BARRIERE *et al.*, 2015).

Durante a carcinogênese, o processo EMT tipo 3 pode converter células epiteliais cancerosas primárias em células mesenquimais invasivas e com mobilidade aumentada, podendo causar metástases. EMT tipo 3 é essencial para que células tumorais escapem do processo de morte celular desencadeada pela apoptose, *anoikis* (um tipo particular de morte celular que ocorre devido à perda de ancoragem à MEC) e senescência celular, além de contribuir para o escape do sistema imunológico. Além disso, EMT tem sido fortemente relacionado à formação e manutenção de células-tronco tanto na embriogênese quanto no câncer. Na literatura casos de quimio/radioresistência estão associados à presença de subpopulações enriquecidas de CSCs oriundas do fenômeno EMT (KIM *et al.*, 2017; JOLLY *et al.*, 2015; SINGH; SETTLEMAN, 2010).

Em câncer, o evento EMT não é estritamente definido por estados epiteliais ou mesenquimais, mas sim por um espectro onde as células em transição exibem fenótipos híbridos com características que permeiam os dois estados. Este fenótipo híbrido, observado em diferentes subtipos histológicos de tumores humanos e murinos, tem sido correlacionado negativamente com a sobrevida. Além disso, estudos mostram que células que estão parcialmente em estado EMT são mais susceptíveis a promoverem metástases e resistirem a terapias, em contrapartida daquelas que apresentam fenótipo claramente definido (epitelial ou mesenquimal) (KARACOSTA *et al.*, 2019).

1.3 Células-Tronco do Câncer

Um evento importante a ser considerado no tratamento do câncer de pulmão e que reflete na resistência à morte celular frente às abordagens terapêuticas é a heterogeneidade celular. A presença de células tronco do câncer (*cancer stem cells* – CSCs) é um modelo atrativo e que melhor explica a heterogeneidade comumente observada no câncer de pulmão. Neste modelo, uma organização hierárquica de células com capacidade de auto-renovação e diferenciação em tipos celulares diferentes por divisão assimétrica é responsável pela sustentação do crescimento do tumor. CSCs foram inicialmente descritas em leucemia mieloide aguda por Lapidot e colaboradores (1994) que mostraram um raro subtipo celular CD34⁺CD38⁻, compreendendo entre 0.01-1% da população total do tumor, capaz de induzir leucemia quando transplantado em camundongos imunodeficientes (VISVADER; LINDEMAN, 2008).

As CSCs são capazes de crescer *in vitro* em circunstâncias especiais sob as quais outras células do tumor tendem a morrer. CSCs são capazes de se expandir quando cultivadas em superfícies de baixa adesão em meio sem soro, suplementado com fatores de crescimento específicos como: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e o suplemento B-27. Desta forma, a expansão e o crescimento de CSCs são melhorados utilizando esta abordagem, e tais células são capazes de proliferar em aglomerados celulares em suspensão, conhecidos como tumoresferas (GONÇALVES *et al.*, 2020).

Desde sua descoberta, CSCs têm sido frequentemente isoladas e estudadas em diferentes tumores como nos de mama, próstata, melanoma e pulmão. A combinação de diferentes marcadores presentes na superfície da membrana celular como CD133, CD44, CD24, ou moléculas de adesão celular como EpCAM, transportadores da família ABC e até a expressão da enzima Aldeído Desidrogenase (ALDH), tem sido utilizados para isolar subpopulações

celulares enriquecidas de CSCs (AYOB; RAMASAMY, 2018; VISVADER; LINDEMAN, 2008). No câncer de mama triplo-negativo, células tronco são fenotipicamente identificadas pelo perfil CD44^{High}/CD24^{low}, juntamente com a detecção da enzima ALDH (MOREIRA *et al.*, 2018).

No câncer de pulmão, o perfil CD144⁺/CD133⁺ é considerado uma combinação clássica para detecção de CSCs. Além disso, a expressão de fatores de transcrição intracelulares envolvidos na manutenção de células tronco/pluripotentes, como SOX2, OCT-4 e NANOG, já foram associados às células tronco no câncer de pulmão (GREEN *et al.*, 2019; PRABAVATHY; SWARNALATHA; RAMADOSS, 2018; ERAMO; HAAS; DE MARIA, 2010). A glicoproteína de membrana, CD24, também já foi descrita como um marcador de células tronco no câncer de pulmão (KARIMI-BUSHERI *et al.*, 2013; KRISTIENSEN *et al.*, 2003).

1.4 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é a principal causa de morte relacionada ao câncer no mundo, tanto em homens quanto em mulheres (BRAY *et al.*, 2018). As neoplasias pulmonares são categorizadas dentro de dois principais grupos histológicos: os carcinomas de células pequenas (*SCLCs*), representado por 15% de todos os casos de câncer de pulmão, e os carcinomas de células não-pequenas (*NSCLCs*), responsável por 85% dos casos de câncer de pulmão. *NSCLCs* são geralmente subdivididos em adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas (*SqCC*) e carcinomas de grandes células. Evidências na literatura reforçam que o câncer de pulmão representa um grupo de doenças molecularmente e histologicamente heterogêneo (RIZVI *et al.*, 2015; GEORGE, *et al.*, 2015; TRAVIS *et al.*, 2015; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.*, 2014; RUDIN *et al.*, 2012; PEIFER *et al.*, 2012; PAEZ *et al.*, 2004; LYNCH *et al.*, 2004; BEER *et al.*, 2002).

A taxa de sobrevida de cinco anos para pacientes com câncer de pulmão é aproximadamente 20% e é considerada baixa comparada a outros tipos de neoplasias. Entretanto, se o câncer de pulmão é detectado precocemente, a taxa de sobrevida de cinco anos sobe para 56%, mas apenas 16% dos casos de câncer de pulmão são detectados ainda na fase inicial. Quando detectado em estágios mais avançados a taxa de sobrevida de cinco anos é extremamente baixa e está em torno de 5% (FRANKLIN, 2019).

Após o diagnóstico, o tratamento para as neoplasias pulmonares depende de diferentes

fatores como o tipo de câncer (*SCLC* ou *NSCLC*), o tamanho e localização da massa tumoral, além do estágio em que o tumor se encontra (se metastático ou não). Os tratamentos incluem remoção cirúrgica, quando cabível, para tentar remover a maior parte do tumor, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, ou até mesmo a combinação de um ou mais esquemas terapêuticos. A quimioterapia pode ser utilizada antes da cirurgia para tentar diminuir o tumor e facilitar sua remoção. Já para alguns grupos de risco, quimio/radioterapia se tornam necessárias após o procedimento cirúrgico (CANCER RESEARCH UK, 2022).

A subclassificação e o estágio do *NSCLC* ditam a estratégia de intervenção terapêutica. A ressecção cirúrgica é uma escolha comum de tratamento para *NSCLC* em estágio inicial e pode ser combinada com quimioterapia e ou radioterapia. Para estágios avançados de *NSCLC*, os pacientes geralmente são tratados com medicamentos direcionados e quimioterapia (MARSHALL *et al.*, 2016).

O tratamento oncológico de pacientes com *NSCLC* é dado de acordo com o estágio do tumor. No estágio I os tumores encontram-se localizados no sítio primário não havendo focos metastáticos nos linfonodos. Nesse caso, a cirurgia é passível de ser realizada para remoção de uma parte do pulmão (lobectomia) ou de todo o órgão (pneumectomia). Após o procedimento cirúrgico, os pacientes podem ser submetidos à quimioterapia ou tratamento molecular alvo para reduzir a chance de recidiva (CANCER RESEARCH UK, 2022).

O estágio II pode ser subdividido em IIA e IIB, sendo que no primeiro, o câncer possui entre 4-5cm de tamanho, mas não se espalhou para os linfonodos. Já no estágio IIB, o tumor possui entre 5 e 7 cm e há presença de células tumorais nos linfonodos próximos. Em ambos os casos a cirurgia é o principal tratamento e o paciente poderá ser submetido a quimio/radioterapia, bem como o uso de drogas alvos (CANCER RESEARCH UK, 2022).

No estágio III o câncer está presente em mais de um lobo do pulmão ou se espalhou para os linfonodos ou estruturas próximas ao tórax. Neste caso, há diferentes abordagens terapêuticas, incluindo quimioradioterapia seguida de cirurgia ou o esquema inverso, bem como o tratamento molecular alvo após a cirurgia (CANCER RESEARCH UK, 2022).

No estágio IV, comumente encontra-se tumores nos dois pulmões, além disso, metástases para órgãos distantes como fígado e ossos são frequentes. Uma vez que a remoção cirúrgica não é possível, a combinação de diferentes esquemas terapêuticos como quimio/radioterapia e imunoterapia é utilizada para melhorar a respiração do paciente e

controlar o crescimento/metástase das células cancerosas (CANCER RESEARCH UK, 2022).

Em todos os estágios, observa-se a possibilidade de tratamento à base de quimioterapia citotóxica. Os esquemas quimioterapêuticos em câncer de pulmão usualmente incluem uma combinação de drogas citotóxicas, dentre elas: ciclofosfamidás, vincristina, doxorubicina, etoposídeo, topotecano, carboplatina ou cisplatina (CANCER RESEARCH UK, 2022).

O quimioterápico cisplatina ou cis-diaminodicloroplatina (II), fórmula molecular $PtCl_2N_2H_6$, foi sintetizada pela primeira vez por M. Peyrone em 1844, tendo sua estrutura química esclarecida por Alfred Werner no ano de 1893. No entanto, o novo composto não despertou muito interesse até 1960, quando as observações iniciais de Rosenberg apontaram que produtos de eletrodos de malha de platina apresentaram-se capazes de realizar a inativação da divisão celular em *Escherichia coli* (ROSENBERG; VANCAMP, 1970).

Os dados obtidos por Rosenberg despertaram interesse na possibilidade do uso dos derivados de platina na área oncológica, sendo a cisplatina um composto que demonstrou ação citotóxica em vários tipos de neoplasias como as de ovário, testículo e tumores sólidos da cabeça e pescoço. No final da década de 1970, a droga ganhou renome como peça-chave no tratamento sistêmico dos cânceres de células germinativas (ROCHA, 2018).

Ao se ligar ao DNA, a cisplatina promove ligações cruzadas (*crosslinks*) mono, inter ou intrafitas (Figura 4). O meio intracelular promove a dissociação dos cloretos da estrutura molecular da cisplatina. O produto hidrolisado é um importante eletrófilo que possui a capacidade de reagir com nucleófilos como grupos sulfidrilas em proteínas e átomos doadores de nitrogênio nos ácidos nucléicos. A ligação da cisplatina ao nitrogênio 7 (N7) nos anéis de purinas resulta na formação de adultos de DNA interrompendo desta forma a dinâmica do ciclo celular e induzindo a morte celular programada, conhecida como apoptose (ALDOSSARY, 2019; ROCHA *et al.*, 2018). No entanto, a quimioterapia com cisplatina também está associada a notáveis casos de efeitos colaterais que incluem hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, neurotoxicidade e/ou danos às células hematológicas (DASARI *et al.*, 2015).

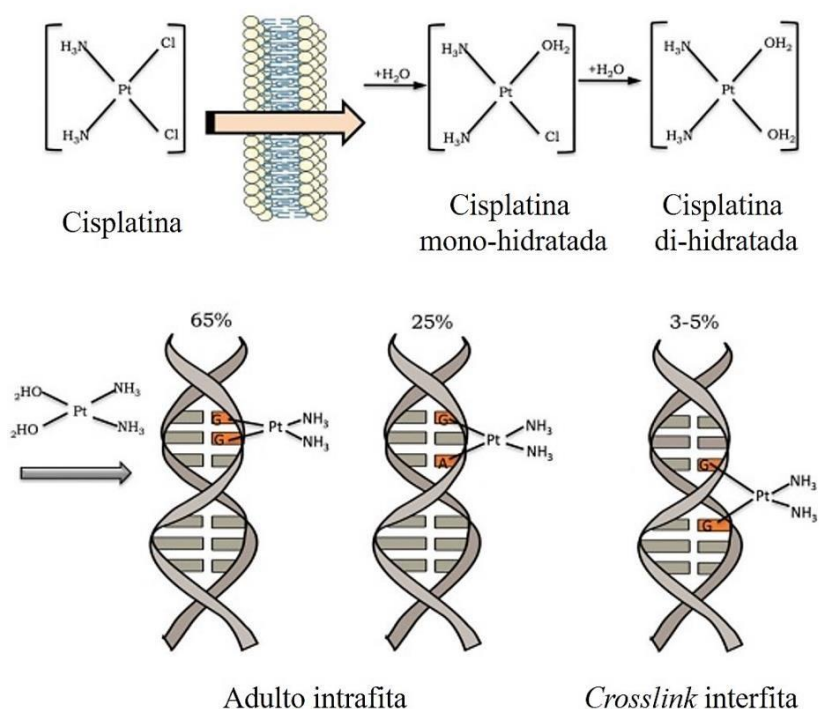


Figura 4. Ativação da cisplatina e indução de danos ao DNA. No meio intracelular, a cisplatina perde seus átomos de cloro e ganha duas moléculas de água se tornando um composto capaz de interagir com bases púricas (Adenina e Guanina), formando adultos de DNA ou ligações cruzadas entre as duas fitas (crosslink). FONTE: ROCHA *et al.*, 2018.

1.5 Apoptose

Os processos de crescimento e manutenção de organismos multicelulares são cuidadosamente regulados por um balanceamento entre o nascimento e a morte celular. Até mesmo no desenvolvimento embrionário, a morte de células específicas é fundamental para que órgãos e tecidos sejam formados com o tamanho e a morfologia correta. A morte celular programada e regulada tem um papel muito importante na manutenção e reposição fisiológica de tecidos adultos, na maturação de células do sistema imunológico e na eliminação de células danificadas ou infectadas, antes que estas causem maior dano ao organismo (ALBERTS *et al.*, 2017; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

O microambiente tumoral contribui para a resistência à morte celular por meio da produção de fatores solúveis que promovem a sobrevivência das células tumorais, ativação do fenômeno EMT, aumento do estresse oxidativo, alteração da MEC, assim como modificações no metabolismo celular. Estes eventos auxiliam as células tumorais a escaparem dos mecanismos de morte celular, o que acaba desencadeando a sobrevivência, proliferação e metástase (KUOL

et al., 2018; PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013).

Diminuição no tamanho da célula, protusões na membrana plasmática, fragmentação nuclear (cariorrexe), condensação irreversível da cromatina (picnose) e fragmentação do DNA são algumas características das células que estão passando pelo processo de apoptose (NUNEZ *et al.*, 2010; ERNEST; HABELA; SONTHEIMER, 2008; COLEMAN *et al.*, 2001). Antes das características supracitadas, a apoptose pode ser iniciada por meio das vias extrínseca, intrínseca ou perforina/granzimas A/B. A via da granzima A induz danos à mitocôndria após o estresse celular. A granzima B é capaz de clivar algumas proteínas da matriz extracelular incluindo laminina, fibronectina e vitronectina, para induzir a perda de adesão, *anoikis* e inibição da migração celular (ADESHAKIN *et al.*, 2021; ELMORE, 2007; BUZZA *et al.*, 2005; MARTINVALET; ZHU; LIEBERMAN, 2005).

As vias extrínseca e intrínseca da apoptose são dependentes de proteínas chamadas caspases. As caspases são sintetizadas nas células como precursores inativos, chamados zimogênios, e podem ser divididas em dois grandes grupos, de acordo com a sua função. O primeiro grupo, que engloba as caspases relacionadas à caspase 1 (1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14), são proteases envolvidas no processamento e maturação de citocinas em respostas inflamatórias, enquanto o segundo grupo corresponde às caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10, envolvidas na apoptose. As caspases apoptóticas podem ainda ser classificadas, de acordo com a sua função, em iniciadoras (2, 8, 9 e 10) e executoras / efetoras (3, 6 e 7) (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; FINK; COOKSON, 2005).

Caspases executoras são as proteases que participam ativamente na clivagem de proteínas celulares, resultando na morte celular, enquanto caspases iniciadoras são aquelas que ativam as caspases executoras. Caspases iniciadoras geralmente são monômeros solúveis e inativos no citosol, que possuem um domínio de protease na região carboxiterminal e um domínio de interação com uma proteína na região aminoterminal. Quando sinais apoptóticos promovem a dimerização das caspases iniciadoras, estas são ativadas e passam a ser capazes de clivar um sítio do domínio da protease das caspases executoras. Caspases executoras, que são inicialmente formadas como dímeros inativos, sofrem uma mudança conformacional quando clivadas por caspases iniciadoras e se ativam, adquirindo a capacidade de clivar diversas proteínas celulares e levar à morte celular controlada (ALBERTS *et al.*, 2017; FINK; COOKSON, 2005).

A via intrínseca da apoptose é um evento induzido por uma variedade de perturbações,

incluindo a falta de fatores de crescimento celular, danos ao DNA, estresse do retículo endoplasmático (RE), aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), problemas durante a replicação do DNA, alterações nos microtúbulos e defeitos na mitose. O passo crítico para o início da apoptose intrínseca é a permeabilização irreversível e generalizada da membrana mitocondrial externa. Este processo é controlada por membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos da família de proteínas BCL2, um grupo de proteínas que compartilham entre um a quatro domínios de homologia BCL2 (BH), isto é, BH1, BH2, BH3 e BH4. Em resposta a estímulos apoptóticos, as alterações na permeabilidade da membrana externa da mitocôndria são mediadas pela proteína X associada a BCL2 (BAX) e ou pela proteína BAK1. Juntamente com BOK, BAX e BAK1, são os únicos membros da família BCL2 caracterizados até o momento em células de mamíferos que são capazes de formar poros na membrana externa da mitocôndria. Após indução da apoptose, proteínas pró-apoptóticas contendo apenas um domínio BH3 são ativadas. Essas proteínas BH3- apenas incluem: PUMA, BCL2L11 (também conhecida como BIM), NOXA e BID (GALLUZI *et al.*, 2018).

As proteínas BID, BIM, PUMA e NOXA, compartilham a capacidade de interagir fisicamente (mas transitoriamente), com o *pool* mitocondrial de BAX e ou BAK, promovendo uma série de alterações conformacionais que culminam na formação de homodímeros e heterodímeros, resultando na liberação das proteínas BH3- apenas e mais oligomerização de BAX e BAK. A oligomerização leva à montagem de um poro lipídico que altera a permeabilidade mitocondrial (GALLUZI *et al.*, 2018). A permeabilização da mitocôndria por meio da formação de poros na membrana externa conduz à liberação de proteínas apoptóticas como o citocromo C, segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria (SMAC/DIABLO) e serino-proteases. O citocromo C liga-se ao fator 1 ativador de protease apoptótica (Apaf-1) e a pró-caspase 9, para formar um complexo apoptossômico, que induz o sinal de morte por meio da clivagem de pró-caspase 9 em caspase 9. Esta última promove ativação das caspases efetoras 3 e 7, as principais responsáveis pelo desencadeamento da apoptose tanto pela via intrínseca, quanto a extrínseca, esta última que será abordada com mais detalhes a seguir (ADESHAKIN *et al.*, 2021; OLA; NAWAZ; AHSAN, 2011; ELMORE, 2007).

A proteína SMAC/DIABLO antecipa a apoptose associando-se a membros da família de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), incluindo o inibidor da apoptose ligado ao cromossomo X (XIAP). XIAP é o único membro da família de proteínas IAP que neutraliza a cascata apoptótica ligando-se de forma estável às caspases 3, 7 e 9 e bloqueando-as fisicamente. Desta forma, SMAC/DIABLO previne a ligação de XIAP às caspases. Por outro lado, outros

membros da família das proteínas IAP, BIRC2 e BIRC3, impulsionam a regulação positiva de fatores anti-apoptóticos como C-FLAR (também chamado de c-FLIP), além de promoverem a inativação de caspases em virtude da atividade ubiquitina ligase, regularem a via de sinalização NF- κ B e promoverem a degradação de SMAC/DIABLO nas mitocôndrias por meio de um mecanismo dependente de proteínas BCL2 (GALLUZI *et al.*, 2018).

As alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial externa podem ser antagonizadas por membros anti-apoptóticos da família BCL2, incluindo a própria proteína BCL2, BCL2L1 (também conhecido por BCL-X_L), MCL1, BCL2L2 (ou BCL-W) e BCL2A1 (mais conhecida como BFL-1 em humanos). Essas proteínas contêm os quatro domínios BH e geralmente estão inseridas na membrana mitocondrial externa ou na membrana do retículo endoplasmático, e exercem suas funções ligando-se diretamente aos membros pró-apoptóticos da família BCL2, como BAX e BAK e prevenindo a oligomerização e a formação dos poros mitocondriais, ou inibindo indiretamente a apoptose por sequestrar os ativadores BH3- apenas (GALLUZI *et al.*, 2018).

A via extrínseca da apoptose é ativada por perturbações no microambiente extracelular e pode ser conduzida por pela ativação de receptores de morte presentes na membrana plasmática: e cuja ativação depende da ligação do(s) ligante(s) cognato(s). Dentre os receptores de morte da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), estão os receptores tipo TRAIL, TNFR e o FasR. Quando os receptores de morte reconhecem seus ligantes específicos, o domínio intracelular desses receptores recruta proteínas adaptadoras como a TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) e FADD (*Fas-associated death domain*) que se ligam às caspases iniciadoras. O complexo formado pelo ligante, o receptor de morte e a proteína adaptadora é chamado de complexo de sinalização indutor de morte ou DISC (*death-inducing signalling complex*). DISC ativa caspase-8, a qual ativa as caspases efetoras 3 e 7 para induzir a morte celular (WAJANT, 2022; ADESHAKIN *et al.*, 2021; ELMORE, 2007).

A atividade catalítica das caspases executoras é responsável por muitos dos correlatos morfológicos e bioquímicos da apoptose, incluindo a fragmentação do DNA, exposição da fosfatidilserina e formação dos corpos apoptóticos. CASP3 favorece a fragmentação do DNA catalisando a inativação proteolítica da subunidade alfa do fator de fragmentação do DNA (DFFA), desta forma, levando a atividade catalítica de DFFB. Estudos na literatura mostraram que CASP3 promove a externalização de fosfatidilserina, um fosfolípídeo presente no lado interno das membranas celulares, mas que é translocado para a superfície da célula durante a

apoptose (GALLUZI *et al.*, 2018).

A aderência célula-célula e sua interação com a matriz extracelular (MEC) são passos cruciais para o crescimento e sobrevivência celular. A MEC é um *scaffold* tridimensional que fornece os sinais mecânicos e bioquímicos necessários para formação tecidual, crescimento, diferenciação e homeostase. A MEC é composta por uma variedade de moléculas, tais como: (I) glicosaminoglicanos; (II) proteoglicanos e (III) proteínas fibrosas (ADESHAKIN *et al.*, 2021; KUSIDARTA *et al.*, 2018; FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). Receptores de adesão como integrinas, caderinas, selectinas e moléculas de adesão do tipo imunoglobulinas, medeiam a adesão célula-MEC (PARDI *et al.*, 2010). Alterações na MEC frequentemente levam a disfunções e até a morte celular (ADESHAKIN *et al.*, 2021; IOZZO; GUBBIOTTI, 2018; SOLBOL, 2018).

A perturbação na adesão célula-célula ou célula-MEC leva à morte celular por *anoikis*. A *anoikis* é um mecanismo para eliminação de células que perderam a adesão com a MEC, conseqüentemente, retardando o processo de metástase. Entretanto, as células cancerosas tornam-se resistentes à *anoikis*, o que facilita a migração das células tumorais para outros locais. O início da *anoikis* é facilitado pela ativação de caspases, semelhante à cascata apoptótica (ADESHAKIN *et al.*, 2021; PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013; KIM *et al.*, 2012; ELMORE, 2007).

Assim como a apoptose intrínseca, a *anoikis* é marcada pela alteração na permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e ativação de caspases executoras, principalmente a CASP3. O desprendimento da MEC desencadeia a alteração na permeabilidade da membrana da mitocôndria após a ativação das proteínas BH3-apenas, BIM e BMF. As células neoplásicas podem escapar da *anoikis* após ativação da quinase 1 ativada por mitógeno (MAPK1), e conseqüente estabilização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mediada pelo receptor tirosina quinase 2 (ERBB2), ou degradação da proteína BRAP, que regula MAPK1 (GALLUZI *et al.*, 2018).

1.6 Fibras nervosas e câncer

O sistema nervoso regula as funções da maioria dos órgãos presentes no corpo humano. O sistema nervoso periférico (SNP), consiste em fibras eferentes motoras e autonômicas e fibras aferentes sensoriais. Desta forma, conectando os diferentes órgãos ao sistema nervoso central (SNC) (Figura 5). O SNP e SNC medeiam as alterações adaptativas em doenças crônicas como

o câncer. Essas alterações são denominadas de neuroplasticidade. Tal plasticidade neural refere-se às alterações morfológicas e/ou funcionais dos nervos, incluindo alterações na morfologia, densidade e qualidade das fibras nervosas, além de alterações das células de Schwann que são responsáveis por promover a mielinização das fibras nervosas no SNP (DEMIR; FRIESS; CEYHAN, 2015).

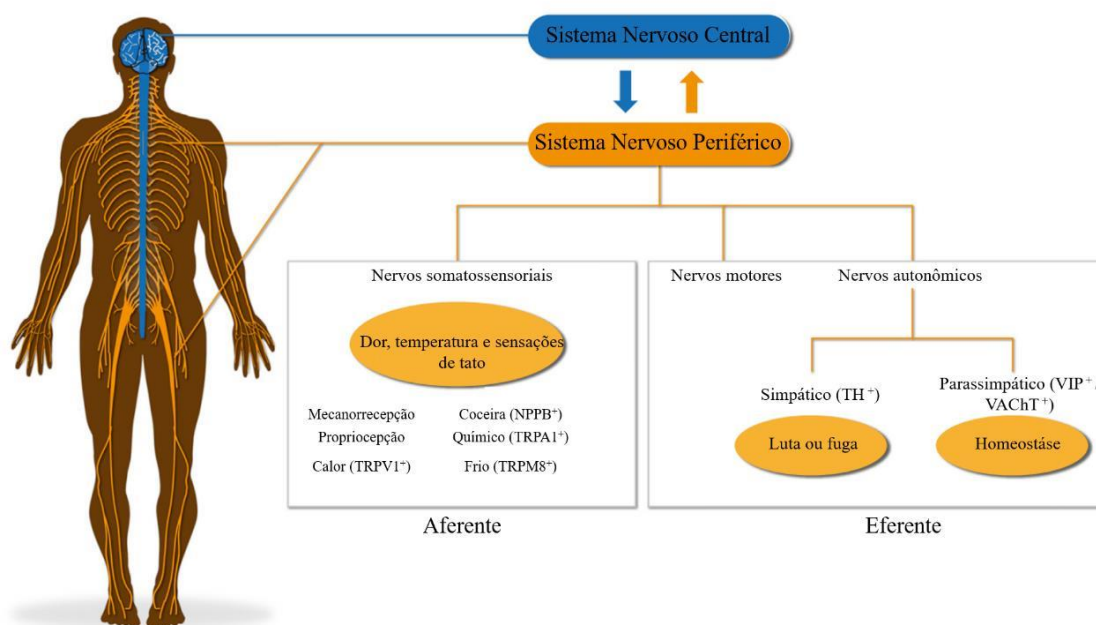


Figura 5. Visão geral do sistema nervoso. O sistema nervoso central (SNC) compreende o cérebro e medula espinhal (azul), os quais integram os sinais aferentes advindos do sistema nervoso periférico (SNP / laranja) e consequentemente disparam uma resposta por meio das fibras eferentes em direção a diferentes locais do corpo. Os nervos somatossensoriais no SNP podem ser estimulados pela ativação de mecanorreceptores, proprioceptores, peptídeo natriurético B (NPPB), canal catiônico de potencial receptor transitório, como TRPA1 (receptor para substâncias químicas), TRPV1 (receptor para calor) ou TRPM8 (receptor para frio). Os sinais eferentes consistem de fibras motoras e autonômicas. Os nervos autonômicos podem ser divididos em simpáticos, os quais controlam as respostas de luta ou fuga e são positivos para tirosina hidroxilase (TH⁺), ou nervos parassimpáticos, que são responsáveis por manter a homeostasia corporal e são positivos para o peptídeo vasoativo intestinal (VIP⁺) e para o transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT⁺). FONTE: adaptado de REAVIS; CHEN; DRAPKIN, 2020.

Evidências crescentes na literatura sugerem que o prognóstico do câncer está associado a infiltração de fibras nervosas no tumor. Esse fenômeno é mais comumente observado em cânceres que surgem em órgãos altamente inervados, incluindo quase todos os cânceres pancreáticos, 80% dos cânceres de cabeça e pescoço, 75% dos cânceres de próstata e 33% dos cânceres colorretais (BAPAT *et al.*, 2011). Estudos com amostras de tumores humanos revelaram que a densidade de fibras dentro do tumor está associada à metástase, morbidade e mortalidade aumentadas. Além disso, a presença de fibras nervosas é um fator prognóstico

independente para a sobrevida global em adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) (LEI *et al.*, 2017; DEMIR; FRIESS; CEYHAN, 2012; BAPAT *et al.*, 2011; DESHMUKH; WILLMANN; JEFFREY, 2010), carcinoma gástrico (ESPAÑA-FERRUFINO; LINO-SILVA; SALCEDO HERNÁNDEZ, 2018; DENG *et al.*, 2014), tumores do trato biliar (OVEN USTAALIOGLU *et al.*, 2019), câncer de cabeça e pescoço (SCHMITD; SCANLON; D'SILVA, 2019; CRACCHIOLO *et al.*, 2018; HUYETT *et al.*, 2018) e câncer cervical (ZHU *et al.*, 2018; CUI; SHI; ZHANG, 2015), e um indicador de risco de recidiva em câncer pancreático (OZAKI *et al.*, 1999), câncer de próstata (ZHU *et al.*, 2018; BEARD *et al.*, 2004), câncer gástrico (DURAKER; SISMAN; CAN, 2003) e câncer colorretal (CHEN *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2018; ZARE-BANDAMIRI *et al.*, 2017; JOBLING *et al.*, 2015; CEYHAN *et al.*, 2007). A inervação tumoral desempenha um papel importante na facilitação da metástase, pois os nervos associados ao tumor podem se estender para o sistema nervoso central e cultivar nichos pré-metastáticos (ZENG *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2018).

Estudos têm demonstrado que o sistema nervoso participa de todos os estágios do câncer, mesmo aqueles que precedem o seu desenvolvimento, como o que ocorre na neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) ou neoplasia intraepitelial de próstata (PIN) (FAULKNER *et al.*, 2019; KUOL *et al.*, 2018; COLE *et al.*, 2015; MAGNON, 2015; MAGNON *et al.*, 2013).

O sistema nervoso autônomo (SNA), composto por fibras nervosas simpáticas e parassimpáticas, possui importante papel na carcinogênese (ZHAO *et al.*, 2014). Por exemplo, pacientes com lesões na medula espinhal possuem menores incidência de câncer de próstata devido a denervação funcional da glândula, indicando uma dependência dos nervos no câncer de próstata (RUTLEDGE *et al.*, 2017).

Diferentes teorias têm sido discutidas a respeito do envolvimento do sistema nervoso na carcinogênese e tem sido demonstrado que o processo de neurogênese e axonogênese estão presentes em lesões pré-neoplásicas e provavelmente contribuem para a iniciação do câncer (MAUFFREY *et al.*, 2019; AYALA *et al.*, 2008). A neurogênese envolve a proliferação e diferenciação de células tronco neurais (NSCs) em células tronco progenitoras (NPCs), seguido pela diferenciação em células neurais maduras. A neurogênese ocorre principalmente durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal do cérebro. NSCs e NPCs persistem ao longo da vida na zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais e na zona subgranular (SGZ) do giro denteado no hipocampo, podendo originar novos neurônios (VENKATESH *et al.*, 2015; LOIS; ALVAREZ-BUYLLA, 1994). Um estudo retrospectivo, controlado e pareado por idade,

descobriu que o número de neurônios era maior nos gânglios prostáticos em pacientes com câncer de próstata do que no grupo controle. Desta forma, este resultado aponta a existência de neurogênese no câncer de próstata (AYALA *et al.*, 2008).

Magnon e colaboradores (2013) demonstraram que a inervação tumoral também pode ser oriunda do sistema nervoso central. Para isto, os autores propuseram um rastreamento de linhagem de células progenitoras neurais positivas para *doublecortin* (DCX⁺), uma proteína de migração neuronal. Os dados dos autores mostraram que NPCs derivadas da SVZ podem passar pela barreira hematoencefálica e migrar pela circulação até alcançarem o tumor de próstata. Após a chegada no microambiente tumoral, essas NPCs se diferenciam em neurônios simpáticos positivos para TH (tirosina hidroxilase). Esse mesmo grupo mostrou que a depleção dessas NPCs-DCX⁺ anula o início e a progressão do câncer de próstata, e que o transplante dessas células aumenta o crescimento do xenoinxerto tumoral, além do número de metástases *in-vivo* (MAUFFREY *et al.*, 2019).

Órgãos e glândulas são regulados pelo sistema nervoso periférico, especialmente o SNA. Por exemplo, o estômago é predominantemente innervado por fibras parassimpáticas, enquanto o pâncreas é regulado por ambas fibras simpáticas e parassimpáticas. Além disso, muitos tumores sólidos são innervados por fibras nervosas que partem do SNP. Desta forma, essas fibras acabam fazendo parte do microambiente tumoral. É postulado ainda que alterações na sinalização desencadeadas por fatores neurotróficos antes da tumorigênese podem impactar na progressão de lesões pré-cancerosas para uma neoplasia maligna, por influenciar células precursoras do tumor. Em um estudo utilizando um modelo murino de adenocarcinoma ductal pancreático, foram encontradas alterações na expressão de fatores neurotróficos e seus receptores (*Ngf*, *Gfra2* e *Nrtn*), na fase pré-maligna. Além disso, lesões do tipo PanIN foram causadas por um aumento da inervação em um microambiente rico de fatores neurotróficos (STOPCZYNSKI *et al.*, 2014; AYALA *et al.*, 2008).

As fibras nervosas que innervam os tecidos normais podem ser quimioatraídas para o microambiente tumoral e crescerem como resultado da liberação de fatores neurotróficos pelas células cancerosas. As células neoplásicas podem, portanto, promover o crescimento neuronal e darem início à sua própria inervação por meio da secreção parácrina, um fenômeno conhecido como efeito neurotrófico. Neurotrofinas como o fator de crescimento de nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) e NT-4/5 possuem importante destaque na axonogênese por estimular receptores tirosina-quinase (TRKs) expressos nos

terminais das fibras nervosas (LAGADEC *et al.*, 2009; AREVALO; WU, 2006; CHAO, 2003). Os papéis de NGF e seus receptores (TRKA e p75) no câncer são bem discutidos na literatura. Por exemplo, células de câncer de mama podem estimular o crescimento neuronal utilizando neurotrofinas como NGF, que são liberadas pela exocitose de vesículas contendo esta molécula (VORONINA *et al.*, 2020; DOLLÉ *et al.*, 2004). NGF também pode ser secretado por células imunes associadas ao tumor e fibroblastos. De forma similar, células de câncer de próstata induziram a diferenciação neuronal e axonogênese *in-vitro*, por meio da liberação do precursor do NGF (PUNDAVELA *et al.*, 2014).

Moléculas de orientação axonal, secretadas por células cancerosas atuam em sinergismo com os fatores de crescimento neurotróficos para aumentar o processo de axonogênese (MADEO *et al.*, 2018; BIANKIN *et al.*, 2012). Durante os estágios iniciais do câncer de pâncreas, alguns genes de orientação axonal, especialmente aqueles que codificam as proteínas envolvidas na via de sinalização SLIT/ROBO, exibem mutações recorrentes, além de variações no número de cópias (CNV). Alterações nesses genes também já foram identificadas em outros tipos de neoplasias malignas como as de pulmão, mama e rim. Portanto, o *crosstalk* entre as células tumorais e as células do sistema nervoso contribuem para a axonogênese (MADEO *et al.*, 2018).

1.7 Invasão perineural (PNI), uma rota de disseminação de tumores sólidos

Os nervos periféricos são constituídos por três camadas: (I) endoneuro; (II) perineuro e (III) epineuro (AMIT *et al.*, 2015). O termo invasão perineural (PNI) refere-se à invasão do perineuro de grandes nervos que circundam o tumor, por células cancerosas. A PNI é uma rota de disseminação de tumores sólidos frequentemente ignorada, exceto pela invasão direta dos tecidos circundantes, linfáticos e disseminação hematogênica (MARCHESI *et al.*, 2010). Por exemplo, a proximidade anatômica de alguns tipos de cânceres de cabeça e pescoço com alguns nervos craniais facilita a migração das células tumorais (LIU *et al.*, 2020). A PNI é comum entre tumores sólidos altamente inervados como os cânceres de próstata e pâncreas. Um estudo retrospectivo com 133 amostras de pacientes com colangiocarcinoma extra-hepático mostrou que 73,7% dos pacientes apresentaram PNI, além de uma baixa taxa de sobrevida de cinco anos (MURAKAMI *et al.*, 2013).

A PNI é mediada por uma diversidade de moléculas secretadas pelas células tumorais e nervos (BAPAT *et al.*, 2011). As fibras nervosas podem secretar vários neuropeptídeos e neurotransmissores no microambiente tumoral que ativam receptores de membrana envolvidos

na indução de vias relacionadas ao crescimento tumoral e metástase (LI *et al.*, 2014). No carcinoma adenoide cístico, derivado das glândulas salivares, a sinalização NE/ β 2-AR promove proliferação, migração e PNI, induzindo o fenômeno EMT e regulação positiva de metaloproteinases como MMP-2 e MMP-9 (MA *et al.*, 2019). No câncer pancreático, a ativação da via de sinalização β -AR/PKA/STAT3 pela norepinefrina, promoveu a regulação positiva de NGF e MMPs (GUO *et al.*, 2013). Já no câncer de próstata, os nervos parassimpáticos promoveram a proliferação e migração das células tumorais por meio da secreção de acetilcolina (Ach), a qual estimula o receptor colinérgico muscarínico do tipo 1 (MARCH *et al.*, 2020).

Diferentes estudos já descreveram uma possível participação de fatores neurotróficos na PNI. Uma correlação positiva foi observada entre os níveis de expressão de NGF, p75, TRKA, TRKB e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), com a PNI em amostras de tecidos de câncer pancreático ou linhagens celulares (WANG *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2008; SCLABAS *et al.*, 2005). Modelos de co-cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRGNs) e câncer de pâncreas sugeriram um tropismo mútuo entre nervos/DRG e as células cancerosas por meio de diferentes fatores como NGF e TRKA (CEYHAN *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2008).

1.8 Sistema Nervoso Sensorial

Os neurônios sensoriais são heterogêneos em relação à sua sensibilidade a estímulos, velocidade de condução e conteúdo de neuropeptídeos. Cada terminal nervoso sensorial expressa diferentes combinações de canais iônicos que possibilitam detectar uma variedade de estímulos. Esses canais iônicos incluem NaV1.7, NaV1.8, NaV1.9, potencial receptor transitório vaniloide 1 (TRPV1), potencial receptor transitório anquirina 1 (TRPA1) e potencial receptor transitório canal catiônico subfamília M membro 8 (TRPM8). O TRPV1 responde ao aumento de temperatura e à substância capsaicina, esta relação por sua vez será abordada com mais detalhes no decorrer deste trabalho. O TRPA1 responde ao estresse químico e mecânico bem como a irritantes químicos, incluindo o wasabi, um condimento utilizado na culinária japonesa e extraído da planta *Wasabia japonica*, e à temperatura fria (KANG *et al.*, 2010; KARASHIMA *et al.*, 2009). O TRPM8 responde à temperatura fria e ao mentol (BAUTISTA *et al.*, 2008).

As fibras dos neurônios sensoriais partem dos gânglios da raiz dorsal (DRG) onde encontram-se os corpos celulares desses neurônios. Os DRGs estão localizados no SNP, entre o corno dorsal da medula espinhal e os terminais nervosos periféricos e abrigam várias

subpopulações celulares não-neuronais e neuronais. Um subconjunto especializado de neurônios sensoriais que detectam estímulos nocivos ou potencialmente nocivos são chamados de nociceptores e inervam a pele, as articulações, o trato respiratório e gastrointestinal (KABATA *et al.*, 2019).

A maior parte dos nociceptores são nervos de pequeno diâmetro não mielinizados e de condução lenta, chamados de fibras C. Mais informações sobre as subdivisões desses neurônios serão abordadas a seguir. Nociceptores não expressam apenas canais iônicos, mas também receptores para citocinas, mediadores lipídicos e fatores de crescimento. Portanto, uma variedade de estímulos incluindo moléculas inflamatórias levam à ativação de nociceptores. Por exemplo, citocinas do tipo 2 como IL-4, IL-5 e IL-13 induzem a ativação de neurônios sensoriais e induzem coceira crônica (KABATA *et al.*, 2019).

Notavelmente, os terminais dos nociceptores liberam neuropeptídeos como CGRP, SP e VIP, os quais são rapidamente liberados em resposta a estímulos nocivos e durante processos inflamatórios. Esses neuropeptídeos atuam diretamente em várias células do sistema imunológico. O SP é conhecido por ser um neuropeptídeo pró-inflamatório que ativa múltiplas células imunes, incluindo células T, macrófagos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (LIM; CHUNG; SON, 2017; JANELSINS *et al.*, 2013; O'CONNOR *et al.*, 2004). VIP possui a capacidade de suprimir as citocinas inflamatórias derivadas de células dendríticas e macrófagos, ao passo que promove a diferenciação, sobrevivência e migração das células Th2 (ASSAS; PENNOCK; MIYAN, 2014; DELGADO; GANEA, 2013; GANEA; RODRIGUEZ; DELGADO, 2003), enquanto o CGRP induz a degranulação dos mastócitos e diferenciação de linfócitos T auxiliares no subtipo Th2 (GRANSTEIN *et al.*, 2015). Esses neuropeptídeos também afetam a permeabilidade vascular, evento importante no recrutamento de células imunes no câncer (KABATA *et al.*, 2019).

1.9 Neuromediadores sensoriais

Os neuropeptídeos são moléculas reguladoras amplamente distribuídas no corpo e regulam diversos processos fisiológicos por meio de receptores acoplados à proteína G. Alguns podem atuar como neurotransmissores ou até mesmo como fatores de crescimento autócrinos ou parácrinos em células tumorais (SASTRY *et al.*, 2017). Dentre os neuropeptídeos produzidos pelos nervos sensoriais, VIP, SP e CGRP são frequentemente associados às atividades imunomoduladoras e antitumorais. Além disso, metade das fibras do tipo C produzem CGRP e SP. Portanto, SP e CGRP desempenham papéis importantes na modulação da resposta

imunológica no câncer (ERIN *et al.*, 2022).

O neuropeptídeo Substância P (SP) é uma proteína formada por 11 aminoácidos e que pertence à família das taquicininas. O SP é amplamente expresso nos sistemas nervoso e imunológico e está sendo estudado como um potencial biomarcador prognóstico e alvo terapêutico no câncer. SP já foi descrito como superexpresso em diferentes tipos de câncer, como colorretal, pancreático, mama e carcinoma oral de células escamosas (CHEN *et al.*, 2016; MEHBOOB *et al.*, 2015; MUÑOZ *et al.*, 2014; GARCIA-RECIO *et al.*, 2013; PALMA *et al.*, 2006; FRIESS *et al.*, 2003; SINGH, *et al.*, 2000). Ao se ligar preferencialmente ao receptor de neurocinina 1 (NK1R), o SP participa de vários processos vitais na carcinogênese, incluindo proliferação, sobrevivência, angiogênese e metástase (GARNIER *et al.*, 2015; HARFORD-WRIGHT *et al.*, 2014; MUÑOZ *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2013; FRIESS *et al.*, 2003). Além disso, o bloqueio de NK1R por meio de antagonistas do receptor resultou na reversão dos efeitos tumorigênicos induzidos por SP *in-vitro* e *in-vivo* (BAYATI *et al.*, 2018; GARNIER *et al.*, 2015; HARFORD-WRIGHT *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2013).

O neuropeptídeo SP e seu receptor NK1R (um receptor acoplado à proteína G), estão envolvidos em uma diversidade de processos biológicos relacionados à oncogênese, tais como: (I) divisão celular; (II) angiogênese, migração celular e metástase. A ligação de SP ao NK1R leva à hidrólise de fosfoinosítídeos, mobilização de cálcio e ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Desta forma, SP estimula a proliferação celular por ativação da via de sinalização MAPK (ESTEBAN *et al.*, 2006). Em diferentes linhagens celulares derivadas de tumores cerebrais, a presença de NK1R foi estritamente correlacionado com os efeitos de SP no aumento da síntese de DNA e proliferação celular (PALMA *et al.*, 1999; LUO; SHARIF; SHARIF, 1996).

A ativação de NK1R pelo neuropeptídeo SP pode ainda modular a resposta imunológica. Fibras nervosas secretoras de SP inervam órgãos linfoides primários (timo e medula óssea) e secundários (baço, gânglios linfáticos, amígdalas e tecido linfóide associado ao intestino) (ERIN *et al.*, 2022). Na literatura, é descrito que as taquicininas modificam a resposta inflamatória em diferentes tipos celulares como células natural killer (NK), células dendríticas, mastócitos, granulócitos, linfócitos T e B, monócitos e macrófagos. Desta forma, a regulação da resposta imunológica por SP pode ser oriunda de nervos sensoriais como também de elementos não-neuronais, como eosinófilos e macrófagos, sendo a expressão de SP e seu receptor regulada positivamente durante a inflamação (ESTEBAN *et al.*, 2006).

Além da inflamação neurogênica, SP estimula uma resposta imunológica de fase aguda, induzindo a liberação de citocinas inflamatórias e aumentando a citotoxicidade mediada por neutrófilos de uma maneira dependente de NK1R. A ativação de NK1R em células dendríticas regula positivamente a produção de IL-12. Além disso, SP possui um papel importante na manutenção dessas células residentes em tecidos sob condições homeostáticas. Estudos *in-vitro* mostraram que SP estimula a proliferação de linfócitos T humanos por meio da regulação positiva da expressão de IL-2 e da expressão de NK1R induzida por IL-12, IL-18 e o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), em células T (ERIN *et al.*, 2022). Achados na literatura confirmam ainda que o efeito antitumoral de SP provavelmente se deve à diminuição de MDSCs infiltrantes no tumor, bem como a liberação de TNF- α enquanto aumenta a secreção de IFN- γ pelos leucócitos (ERIN *et al.*, 2015).

O CGRP é um peptídeo de 37 aminoácidos, membro da família de peptídeos da calcitonina. Este neuropeptídeo pode ser encontrado em duas isoformas em humanos: CGRP alpha (α -CGRP, CGRP1) e CGRP beta (β -CGRP, CGRP2). Os receptores da família CGRP são chamados de receptores de calcitonina (CTRs) e receptores semelhantes a receptores de calcitonina (CRLRs). Assim como SP, o CGRP pode ser encontrado tanto em neurônios do SNP quanto do SNC. Este neuropeptídeo está envolvido no suprimento vascular de nervos periféricos, nocicepção, homeostase cardiovascular, ingestão e modulação do sistema nervoso autônomo (ERIN *et al.*, 2022).

Os efeitos antiinflamatórios de CGRP são bem documentados na literatura. Este neuropeptídeo diminui acentuadamente a regulação positiva induzida por lipopolissacarídeo (LPS) de neutrófilos sanguíneos, secreção de TNF- α e acúmulo de neutrófilos nos tecidos, além de aumentar a produção de IL-10 por macrófagos peritoneais. O tratamento com CGRP inibe a produção de quimiocinas induzidas por LPS, como os fatores quimiotáticos de neutrófilos CXCL1 e CXCL8, e o fator quimiotático de monócitos e células dendríticas, CCL2. Tais efeitos se devem provavelmente pela inibição da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) ou pela inibição do inibidor fosforilado da quinase NF- κ B (p-I κ B). Os efeitos celulares do CGRP também podem ser mediados pela estimulação da adenilato ciclase e acúmulo de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) por meio do receptor de CGRP (ERIN *et al.*, 2022).

O CGRP derivado de neurônios sensoriais inibe a maturação das células dendríticas, o que leva à supressão da ativação das células T (KABATA *et al.*, 2019). Outro estudo mostrou que a transferência adotiva de células dendríticas tratadas previamente com CGRP diminui a

inflamação alérgica das vias aéreas *in-vivo*. Este resultado foi associado à redução da eosinofilia e elevação dos níveis de IL-10 no lavado broncoalveolar. Esses achados sugerem que o CGRP derivado de neurônios sensoriais possui um efeito supressor nas células dendríticas presentes no pulmão (ROCHLITZER *et al.*, 2011).

Altos níveis de CGRP já foram descritos em diferentes tipos de neoplasias como no câncer de pulmão de células não-pequenas (KELLEY *et al.*, 1994; GOADSBY; EDVINSSON; EKMAN, 1988), tumores neuroendócrinos (TAKAMI *et al.*, 1989), câncer de próstata (NAGAKAWA *et al.*, 1989) e carcinoma medular de tireoide (WIMALAWANSA, 1993). No carcinoma de células escamosas da boca, o CGRP foi relacionado à invasão perineural e metástases para linfonodos (ZHANG *et al.*, 2021). Uma maneira pela qual o CGRP é capaz de influenciar o desenvolvimento do câncer é por meio do seu potente efeito vasodilatador. Um estudo realizado por Toda e colaboradores (2008) utilizando camundongos *knockout* para CGRP, mostrou que o CGRP endógeno favorece a angiogênese e crescimento tumoral em animais que foram inoculados com o células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC).

O peptídeo vasoativo intestinal (VIP), é um neuropeptídeo composto por 28 aminoácidos em sua sequência primária, e compartilha 70% de identidade de sequência com o polipeptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase (PACAP). As funções biológicas do VIP são mediadas por três classes de receptores acoplados à proteína G, VPAC1, VPAC2 e PAC1, que são membros da família de receptores semelhantes a secretina (MOODY; NUCHE-BERENGUER; JENSEN, 2017). O VIP é produzido por neurônios sensoriais, células endócrinas e imunes, e está presente no SNC, coração, pulmão, tireoide, rins, trato urinário e gastrointestinal, órgãos genitais e sistema imunológico. Devido à sua ampla distribuição no organismo, o VIP participa de diferentes eventos fisiológicos, regulando o débito cardíaco, broncodilatação, relaxamento do músculo liso, processos secretores e motilidade do trato gastrointestinal (GANEVA; HOOPER; KONG, 2015).

O VIP já foi relacionado à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF α , IL-6 e IL-12, indução de iNOS e produção de IL-10 em macrófagos estimulados com LPS. Estes efeitos são mediados primariamente pelo receptor VPAC1. O VIP pode ainda reduzir a capacidade de células dendríticas e macrófagos de ativarem linfócitos T CD4⁺, principalmente por impedir a regulação positiva das moléculas co-estimulatórias CD40, CD80 e CD86, levando a uma redução da proliferação de células T CD4 *in-vivo* e *in-vitro*. Este neuropeptídeo também já foi associado à inibição da diferenciação de células T CD4 para o

fenótipo Th₁, favorecendo a diferenciação para o perfil Th₂, *in-vivo* e *in-vitro* (GANEVA; HOOPER; KONG, 2015).

A expressão de receptores para VIP já foi descrita em diferentes tipos de células tumorais. Em câncer de pulmão de células pequenas, o tratamento com antagonista para o receptor de VIP inibiu o crescimento celular (MOODY; NUCHE-BERENGUER; JENSEN, 2017). Sastry e colaboradores (2006) demonstraram que, o tratamento de células de câncer de próstata com VIP protegeu do processo de morte celular programada por apoptose. O mesmo grupo de pesquisa avaliou os efeitos do VIP em células com perfil de CSCs em linhagens celulares de câncer de mama e de próstata e os resultados dos autores mostraram que VIP induz uma sinalização anti-apoptótica (SASTRY *et al.*, 2017).

1.10 Cisplatina e sistema nervoso sensorial

As neuropatias periféricas associadas aos tratamentos quimioterápicos com cisplatina são um dos efeitos adversos mais comuns nos pacientes oncológicos, os sintomas incluem parestesia dolorosa nas extremidades, alodinia ou hiperalgesia térmica e tátil (HU *et al.*, 2019). Entretanto, os mecanismos pelos quais a cisplatina medeia tal neurotoxicidade ainda não são completamente estabelecidos, mas a literatura estabelece uma possível correlação com os neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRGNs) desta forma os DRGNs tornam-se alvos promissores dos efeitos neurotóxicos provocados pela cisplatina (FINNO *et al.*, 2022).

A diversidade de repercussões neuropáticas pode resultar da heterogeneidade dos DRGNs em propriedades, funções e suscetibilidade variável à toxicidade da cisplatina. Estudos mostraram que a degeneração da bainha de mielina dos DRGNs está relacionada à neuropatia periférica durante o tratamento dos pacientes oncológicos (MCDONALD *et al.*, 2005; KRARUP-HANSEN *et al.*, 1999; CAVALETTI *et al.*, 1992).

Os DRGNs são heterogêneos em tamanhos e propriedades neuroquímicas distintas e podem ser agrupados em até 13 diferentes clusters baseados no perfil de expressão gênica (RENTHAL *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2016; USOSKIN *et al.*, 2015). Dentre os neurônios presentes no DRG, destacam-se os neurônios sensoriais, que transmitem sinais da periferia para a medula espinhal. Um importante aspecto na diferenciação de neurônios sensoriais é a transição morfológica de células tronco neurais para neurônios bipolares, e por fim, pseudo-unipolares (WILSON, Rachel *et al.*, 2018).

Diferentes perfis de neurônios presentes no DRG são especializados para modalidades

perceptivas distintas. Neurônios do DRG de pequeno diâmetro dão origem a axônios não mielinizados (fibras do tipo C) e axônios finamente mielinizados (fibras do tipo A δ) que transmitem os sinais nociceptivos, térmicos e mecanorreceptores gerados nos terminais nervosos periféricos para os neurônios na lâmina I-II da medula espinhal. Grandes neurônios do DRG transmitem sinais mecanorreceptores e proprioceptivos por meio de fibras aferentes densamente mielinizadas (fibras do tipo A β) para a lâmina espinhal III-V1. Tradicionalmente, os neurônios pequenos têm sido classificados em três subgrupos: (I) Isolectina B4 (IB4) positivo (não peptidérgico); (II) os que expressam substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e (III) os que expressam a tirosina hidroxilase (TH), enquanto os grandes neurônios expressam o neurofilamento 200 (NF200) (LI *et al.*, 2016; MARMIGERE; ERNFORS, 2007).

1.11 Resiniferatoxina e canal iônico TRPV1

Algumas doenças, incluindo neuropatia diabética, enxaqueca, asma, doença inflamatória intestinal, cistite intersticial, tosse crônica, osteoartrite, bem como dores relacionadas à progressão do câncer, possuem um componente inflamatório neurogênico significativo (SZALLASI *et al.*, 2000; GEPPETTI; HOLZER, 1996). Esse tipo de dor é transmitida por fibras sensoriais do tipo C (não mielinizadas) e também por fibras sensoriais do tipo A δ (finamente mielinizadas), ambas fibras axonais sensíveis à capsaicina, uma substância presente nas pimentas do gênero *Capsicum* (JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016).

A capsaicina ativa especificamente os receptores TRPV1, presente nos neurônios nociceptivos. A ativação do TRPV1 promove a liberação de SP e CGRP, neuropeptídeos que estão envolvidos no desencadeamento da resposta inflamatória, a qual desempenha um papel central na dor neurogênica (JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016). Além disso, o receptor TRPV1 pode ser regulado positivamente na hiperalgesia (sensibilidade exagerada à dor ou sensação elevada a estímulos dolorosos) devido à lesão do nervo periférico e em alguns casos de neuropatia diabética. Desta forma, o canal TRPV1 é um importante alvo para o controle da dor em diferentes neuropatias periféricas (WILSON, Rachel *et al.*, 2018; MALMBERG; BLEY, 2005; GEPPETTI; HOLZER, 1996).

A capsaicina em baixas doses ativa fibras não mielinizadas, enquanto em altas doses induz a inativação das mesmas. A ativação do receptor TRPV1 leva a um influxo de cátions cálcio e sódio, e a superativação desses neurônios desencadeia a sua exaustão e morte celular (ERIN, 2020; ERIN *et al.*, 2006; HOLZER, 1988; KRUGER, 1988). Os receptores TRPV1 não são

encontrados em neurônios sensoriais de grande diâmetro, neurônios motores ou simpáticos (HELLIWELL *et al.*, 1998; CATERINA *et al.*, 1997). Portanto, apenas os neurônios sensoriais amielínicos e mielinizados de pequeno diâmetro são destruídos após a injeção de altas doses de capsaicina. Já os neurônios sensoriais de grande diâmetro, assim como as fibras simpáticas e motoras, não são afetados (BUCK, 1986; NAGY *et al.*, 1983; CERVERO; MCRITCHIE, 1982).

Saloman e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento neonatal com capsaicina pode ser utilizado para depletar neurônios sensoriais que inervam o pâncreas. Este procedimento pode prevenir a inflamação neurogênica e prolongar a sobrevivência de camundongos com PDAC de uma maneira dose-dependente. Em um modelo murino singênico de carcinoma de mama, a inativação sistêmica de neurônios sensoriais utilizando doses neurotóxicas de capsaicina, aumentou o número de focos metastáticos no coração e no pulmão (ERIN, 2020; ERIN *et al.*, 2006; ERIN *et al.*, 2004).

Uma vez que a modulação do canal TRPV1 em fibras nervosas sensoriais demonstra uma relação com a progressão do câncer em modelos murinos experimentais, optamos neste trabalho por utilizar um análogo da capsaicina, a resiniferatoxina (RTX), para depletar os neurônios sensoriais antes da inoculação da linhagem celular de câncer de pulmão, LLC1. O RTX é um agonista do canal TRPV1 isolado da planta *Euphorbia resinifera* e mais potente do que a capsaicina. Ao contrário da capsaicina, a interação entre RTX e TRPV1 é irreversível, levando a um influxo sustentado de sódio e cálcio e uma dessensibilização dos neurônios sensoriais presentes no DRG. Além disso, o RTX possui vantagens sobre a capsaicina pois induz uma menor irritação inicial e toxicidade sistêmica (KOH *et al.*, 2016).

1.12 Utilização do modelo murino de Lewis para estudos do microambiente dos tumores de pulmão

A linhagem celular LL/2, também conhecida como LLC1, foi desenvolvida a partir de um nódulo tumoral primário do modelo de carcinoma pulmonar de Lewis que se desenvolveu espontaneamente como um carcinoma epidermoide no pulmão de um camundongo C57BL/6. Os tumores formados pela inoculação de células LLC1 por via subcutânea têm sido amplamente utilizados para estudar o microambiente do câncer de pulmão, especificamente do *NSCLC*, além da resposta terapêutica a diferentes quimioterápicos utilizados no tratamento dessas neoplasias como os derivados do taxol, medicamentos da classe das antraciclínas e os derivados de platina.

Por se tratar de um modelo singênico, os animais são imunocompetentes, sendo possível avaliar o papel da resposta imunológica do hospedeiro no desenvolvimento do tumor (HSIAO *et al.*, 2020; DESKIN *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer faz parte do grupo de doenças não transmissíveis. Além do câncer, as doenças cardiovasculares, respiratórias e diabetes também fazem parte deste grupo. Este grupo de doenças corresponde à principal causa de óbitos no mundo, sendo responsáveis por cerca de 41 milhões de óbitos (equivalente a 71% de todas as mortes anuais). O câncer é uma das disfunções patológicas que mais causam temor na sociedade, perdendo somente para as doenças cardiovasculares em relação ao número de mortes (17.9 e 9 milhões de pessoas por ano, respectivamente) (WHO, 2018).

Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), apontou a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O perfil epidemiológico no Brasil é semelhante aos demais países da América Latina, onde cânceres de próstata em homens e mama nas mulheres são os mais frequentes (INCA, 2020). A estimativa mundial para o ano de 2020 realizada pelo projeto GLOBOCAN/*International Agency for Research on Cancer* (IARC), foi de 19.3 milhões de novos casos e 9.96 milhões de mortes, indicando um acentuado aumento na incidência e mortalidade provocados pelo câncer (FERLAY *et al.*, 2020).

A justificativa para a realização deste trabalho também está embasada no fato de que, dados recém publicados do nosso grupo (PRAZERES *et al.*, 2020), utilizando camundongos geneticamente modificados, mostraram que fibras nervosas sensoriais expressando canais de sódio dependentes de voltagem NaV1.8 estão presentes no microambiente tumoral de melanoma murino induzido pelo transplante ortotópico de células B16F10. Após depleção genética das fibras sensoriais utilizando toxina diftérica A (iDTA) em animais NaV1.8-Cre/iDTA observamos o aumento do crescimento do melanoma e angiogênese tumoral. Nossos dados mostraram ainda que a depleção farmacológica de nervos sensoriais utilizando resiniferatoxina (RTX), antes do inóculo das células de melanoma murino, também estimulou o crescimento tumoral e formação de vasos sanguíneos. Sendo assim, nossos resultados forneceram fortes evidências de que a presença de nervos sensoriais dentro do microambiente tumoral inibe a progressão do melanoma. Portanto, é fulcral entender como as fibras nervosas

sensoriais afetam o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, e como esses neurônios sensoriais interagem com outros componentes do microambiente tumoral, como células do sistema imunológico, células tronco do câncer e células passando pela EMT.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a heterogeneidade celular e participação do fenômeno de transição epitélio-mesenquimal (EMT) na linhagem celular de câncer de pulmão de células não-pequenas, LLC1, cultivada *in-vitro* nos modelos 2D (monocamada) e 3D (tumoresfera - enriquecimento de CSCs), e em *in-vivo* em tumores oriundos da inoculação das células LLC1 em camundongos C57Bl/6J com os nervos sensoriais depletados com resiniferatoxina (RTX) ou tratados com o quimioterápico cisplatina.

3.1.1 Objetivos específicos

- Comparar os valores de IC₅₀ do quimioterápico cisplatina em células LLC1 cultivadas em modelo 2D (monocamada) e 3D (tumoresfera / enriquecimento de CSCs);
- Compreender como o tratamento com cisplatina modula a expressão do mRNA dos fatores de transcrição (FTs) que controlam o evento EMT, bem como os alvos a jusante desses genes, nos modelos 2D e 3D;
- Entender como o tratamento com cisplatina modula o perfil das subpopulações celulares *CSCs-like* CD133⁺/CD44⁺/CD24⁺/ALDH⁺, e o estado proliferativo (células Ki-67⁺) em modelos 2D e 3D;
- Comparar se o tratamento com meio condicionado derivado do cultivo de neurônios sensoriais influencia na resposta terapêutica à cisplatina;
- Avaliar *in-vivo* como a depleção farmacológica dos nervos sensoriais ou o tratamento com o quimioterápico cisplatina afeta a progressão e composição celular do microambiente dos tumores oriundos do crescimento de células LLC1 em camundongos C57Bl/6J.
- Comparar os efeitos do tratamento *in-vivo* com o quimioterápico cisplatina e a depleção farmacológica dos neurônios sensoriais utilizando RTX, sobre os marcadores de transição epitélio-mesenquimal, apoptose, células tronco do câncer

e células do sistema imunológico;

- Avaliar se o tratamento com cisplatina ou a depleção prévia de neurônios sensoriais com RTX, impacta na formação de fibras de colágeno na MEC dos tumores primários.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo *in vitro*

A linhagem celular imortalizada de câncer de pulmão de células não-pequenas LLC1/LL2 (ATCC[®] CRL-1642[™]) bem como a linhagem celular de fibroblasto murino, L929 (ATCC[®] CCL-1[™]), foram cultivadas em meio DMEM Alta Glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico/antimicótico (anti-anti, GIBCO[™]). Para obtenção de tumoresferas, as células LLC1 foram semeadas em placas de baixa adesão e cultivadas no meio DMEM/F-12 suplementado com 2% de B-27 50x (Thermo Fisher Scientific[™] cat. 1750444), 20ng/mL de EGF (Sigma[®] cat. E1257), 20ng/mL de bFGF (ImmunoTools cat. 11343623) e hidrocortisona 0,5 µg/mL (Sigma cat. H0888). As células foram incubadas por 7 dias a 37°C com atmosfera enriquecida com 5% de CO₂. No terceiro dia de cultivo, metade do volume do meio de cultura foi substituído por um meio novo.

4.2 Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade celular mediante ao tratamento quimioterápico com cisplatina foi avaliada utilizando o reagente brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este ensaio baseia-se na capacidade das células viáveis reduzirem o reagente MTT por meio das enzimas desidrogenases mitocondriais. A redução deste composto origina o formazan, um cristal de cor violeta insolúvel em água, mas que pode ser solubilizado em solventes orgânicos possibilitando a leitura colorimétrica por espectrofotometria (LOBNER, 2000). A redução do MTT é diretamente proporcional à atividade mitocondrial, podendo desta forma determinar a viabilidade celular. As linhagens celulares foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $1,25 \times 10^4$ células / poço (concentração previamente determinada/dados não mostrados).

As células foram deixadas *overnight*, para aderirem no fundo do poço. O meio de cultivo foi então retirado de cada poço e as células foram incubadas com diferentes concentrações de

cisplatina. Após 24h, o meio de cultura foi retirado e adicionado o MTT em meio sem suplementação (100µL/poço) a 0,5 mg/mL. Seguindo uma nova incubação por 3hrs, e em seguida a placa foi centrifugada por 10 minutos a 2500 RPM, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 100 µL/poço do solvente orgânico DMSO (Merck cat. #K35781952610), a fim de solubilizar os cristais de formazan. Finalmente, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Varioskan™ LUX) a 550 nM. Após a leitura no equipamento, a sobrevivência dos poços tratados foi calculada dividindo o valor da absorbância das células tratadas pela média do controle de vida e multiplicando por 100. Vale ressaltar que o experimento foi realizado em triplicatas técnicas e biológicas. O valor de IC₅₀ (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células) foi estimado utilizando o programa Dr Fit versão 1.042 (DI VEROLI, 2015).

4.3 Experimentação *in vivo* - aspectos éticos

Os experimentos *in vivo* foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo 183/2021). Foram utilizados camundongos fêmeas *wild type* (WT) adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais, e camundongos transgênicos NaV1.8^{Cre}/tdTomato (GAUTRON *et al.*, 2011; STIRLING *et al.*, 2005) mantidos no *background* C57BL/6J. Os animais geneticamente modificados foram adquiridos do Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Os animais foram mantidos no biotério do departamento de Patologia no ICB bloco F3, alojados em gaiolas e alimentados com água e ração *ad libitum*, e controle artificial de ciclos de luminosidade (12 horas claro / 12 horas escuro). As ninhadas foram vermifugadas com ivermectina (Ivomec® - Boehringer Ingelheim). Para realização de todos os experimentos, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilasina (10mg/kg) e cloridrato de ketamina (80mg/kg), em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento da coluna cervical. A fenotipagem dos animais NaV1.8^{Cre}/tdTomato foi realizada através da análise de um pequeno fragmento tecidual dos animais, utilizando o microscópio de fluorescência EVOS™ FL Imaging System (Invitrogen™ / modelo: AMF4300). Os animais positivos possuem a fluorescência vermelha presente nos nervos sensoriais da pele.

4.4 Isolamento e cultivo de neurônios sensoriais extraídos do gânglio da raiz dorsal (DRG)

Neurônios sensoriais provenientes do gânglio da raiz dorsal de animais fêmeas C57BL/6J pesando aproximadamente 20g e com oito semanas de idade foram extraídos

conforme descrito na literatura (MIETTO *et al.*, 2021; PERNER; SOKOL, 2021; LIN; CHEN, 2018). A coluna vertebral foi coletada em meio L-15 (Leibovitz – Sigma, cat: L4386) gelado e suplementado com 1% de antibiótico/antimicótico (anti-anti), e em fluxo laminar, com auxílio de pinças e tesouras esterilizadas o DRG foi extraído e mantido em meio L-15 suplementado com 1% de anti-anti até o início do processo de dissociação. Após retirada dos DRGs, as amostras foram submetidas à lise de eritrócitos utilizando tampão ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium*) por cinco minutos à temperatura ambiente (T.A). Em seguida, os DRGs foram lavados com PBS 1x e centrifugados a 3500 RPM por cinco minutos. Após este passo, procedeu-se com a dissociação enzimática utilizando colagenase I (1.25 mg / mL, GIBCO™) diluída em meio L-15 suplementado com 1% de anti-anti e HEPES (Sigma cat. H3375). As amostras foram incubadas a 37°C durante 45 minutos, agitando os microtubos a cada 10 minutos no vórtex. Após a dissociação com colagenase, as amostras foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 3500 RPM por cinco minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os DRGs colocados em solução de tripsina/EDTA seguido por um período de incubação de 10 minutos na incubadora de células. Após completa dissociação, procedeu-se com uma nova centrifugação a 3500 RPM por cinco minutos e os neurônios obtidos foram transferidos para meio Neurobasal-A (GIBCO™) suplementado com 100 ng/mL de fator de crescimento de nervo (NGF), L-glutamina a 2mM, Soro Fetal Bovino a 10%, N-2 (Invitrogen) e anti-anti. As amostras foram então filtradas em um *cell-strainer* de 70 µm e os neurônios semeados em poços de placas de 24 wells (2×10^4 células / well) tratados previamente com Laminina (5 µg / mL) e Poli-D-Lisina (0,1 mg / mL).

4.5 Tratamento das linhagens LLC1 e L929 com o meio condicionado dos neurônios

O meio dos neurônios sensoriais cultivados *in vitro* foi coletado e centrifugado a 5000 RPM durante 10 minutos a 4°C e filtrado em membrana de 0.22 µm para remoção de qualquer debris celular. Em seguida, o meio condicionado foi armazenado a -80°C até sua utilização (JINESH; CHUNDURU; KAMAT, 2012; KITAZAWA; SHIMIZU, 2011; KITAZAWA; SHIMIZU, 2007). As linhagens celulares L929 (monocamada) e LLC1 (monocamada e tumoresfera) foram submetidas ao tratamento com cisplatina diluída em meio condicionado ou com o meio Neurobasal-A utilizado no cultivo dos neurônios (controle). A viabilidade celular foi mensurada conforme descrito no tópico 4.2.

4.6 Co-cultivo da linhagem de câncer de pulmão com neurônios sensoriais

Neste ensaio, utilizamos o sistema Transwell® da Corning (cat. 3462) com insertos de

24 mm de diâmetro e membrana de poliéster (PET) com poros de 3 μM . No compartimento inferior da placa, os neurônios sensoriais extraídos do DRG foram semeados na densidade de (2×10^4 células/well) e no compartimento superior, células LLC1 advindas da dissociação da monocamada ou tumoresfera, controle e tratada com cisplatina, foram semeadas na concentração celular de $7,62 \times 10^4$ células/inserto. As células tumorais foram mantidas 24 horas em contato com o meio dos neurônios e após esse período os meios de ambos compartimentos foram removidos, as membranas lavadas com PBS 1x por três vezes e as células fixadas com formaldeído 4% para microscopia de fluorescência.

4.7 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais utilizando resiniferotoxina (RTX)

A depleção farmacológica dos nervos sensoriais foi realizada utilizando Resiniferatoxina (RTX, Sigma) por via subcutânea por três dias consecutivos com doses crescentes de 30, 70 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dissolvido em PBS 1x, conforme descrito previamente por Prazeres *et al.*, 2020. Os camundongos do grupo controle foram tratados apenas com o veículo (PBS 1x). Nosso delineamento experimental está esquematizado na figura 24.

Para confirmar a eficiência da depleção dos nervos sensoriais, os camundongos foram submetidos a testes comportamentais para medir as respostas térmicas e mecânicas reduzidas. Para o calor nocivo, foi utilizado o teste de movimento da cauda (Tail Flick) (DA FONSECA PACHECO; ROMERO; DUARTE, 2019). Para o teste mecânico foi utilizado o teste Randall-Selitto (RANDALL, 1957) usando um analgesímetro com um prensador de pata em forma de cone com uma ponta arredondada para aplicar uma força linearmente crescente na pata traseira. O peso em gramas (g) e o tempo em segundos (s) necessários para desencadear a resposta nociceptiva foram determinados como o limiar nociceptivo.

4.8 Inoculação da linhagem LLC1 e análise do crescimento tumoral *in vivo*

Para o desenvolvimento do tumor de pulmão, células LLC1 foram inoculadas via subcutânea no flanco esquerdo dos animais na concentração de 5×10^5 células diluídas em 50 μL de PBS 1x. O comprimento (L) e a largura (W) dos tumores foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital (Western[®]) a cada dois dias a partir do desenvolvimento de um tumor palpável (9º dia), durante 22 dias. Para determinar o volume (V) tumoral utilizamos a fórmula: $V = 0,5 \times (L \times W^2)$ (FITZGERALD *et al.*, 2020; TANAKA *et al.*, 2000). A partir do 9º dia após o inóculo das células LLC1 (Figura 24 A), um grupo de animais que não tiveram os neurônios sensoriais depletados com RTX foram tratados com

o quimioterápico cisplatina (1 mg/kg) via intraperitoneal (I.P), até o 22º dia, com intervalo de 3 dias entre cada dose.

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e os pulmões coletados, para coloração com hematoxilina e eosina e identificação de metástases. Os tumores coletados foram divididos para imunofluorescência, qPCR, histologia (coloração por hematoxilina/eosina e Picrossirius Red) e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Para avaliar a presença dos nervos sensoriais em diferentes momentos do desenvolvimento tumoral, os tumores de animais transgênicos NaV1.8^{Cre}/tdTomato⁺ tratados somente com PBS 1X, foram removidos com 14 e 22 dias.

4.9 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído da linhagem celular LLC1 nos modelos monocamada e tumoresfera, antes e após o tratamento quimioterápico com o IC₅₀ determinado, e das amostras de tumores dos grupos controle (PBS), cisplatina e RTX. Para isto foi utilizado o reagente TRIzol® (SIGMA®) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada 1x10⁶ de células, ou 50-100 mg de tecido, foi adicionado 1 mL de TRIZOL. O reagente com as amostras foi homogeneizado até obter-se uma consistência com característica viscosa. O lisado foi transferido para microtubos de 1,5 mL e adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de trizol, sendo agitado vigorosamente no vórtex por 15 segundos. As amostras foram incubadas por 3 minutos a 30°C no banho seco centrifugando em seguida por 15 minutos - 12.000g - 4°C. Após a centrifugação, formou-se três fases: 1ª fase RNA; 2ª fase proteína e 3ª fase DNA. A primeira fase foi aspirada cuidadosamente e transferida para outro microtubo de 1,5 mL com 500 µL de isopropanol para cada 1 mL de Trizol, e então a amostra foi incubada por 10 minutos a 30°C em banho seco, centrifugando em seguida por 15 minutos - 12.000g - 4°C. Nesta fase ocorreu a sedimentação do RNA total. Em seguida foi adicionado 1 mL de etanol 75% e o RNA total foi centrifugado por 5 minutos - 10.000g - 4°C. Esta etapa foi repetida três vezes.

Após a terceira centrifugação, o etanol foi descartado e o sedimento seco à temperatura ambiente, sendo ressuspenso no final da extração em água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC). A quantificação do RNA total extraído foi realizada em espectrofotômetro de microvolume Nanovue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life, USA). Foram avaliados os seguintes parâmetros na quantificação: concentração, absorbâncias a 230 nm, 260 nm e 280 nm, além das razões entre as absorbâncias 260/280 e 260/230. A qualidade das amostras de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e a presença de duas bandas íntegras

e sem arrastes, correspondentes às subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal, foram determinantes para considerar as amostras com qualidade para continuidade dos experimentos.

4.10 Tratamento do RNA total com DNase e síntese de cDNA

O total de 2 µg de cada RNA total extraído foi tratado com o kit RNase-Free DNase Set® (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. Foram acrescentados em um microtubo 2 µg de RNA total, 2 µL de tampão e 0,2 µL de DNase. O volume foi completado com água DEPC para 20 µL. As amostras foram incubadas por 30 minutos, a 37°C, e em seguida, por 5 minutos a 65°C. O cDNA foi obtido utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) conforme instruções do fabricante.

4.11 Análise de alvos por qPCR utilizando SYBR™

Neste trabalho avaliamos um painel de 12 genes relacionados ao fenômeno de transição epitélio-mesenquimal/pluripotência, sendo estes: *E-caderina*, *N-caderina*, *Zeb1*, *Zeb2*, *Snail*, *Twist*, *Tgfb1*, *Vimentina*, *FoxA2*, *Nanog*, *Sox2*, *Oct-4* (Tabela Suplementar I). Além disso 9 genes relacionados ao perfil imunológico dos tumores oriundos da inoculação de células LLC1 em animais WT, sendo eles: *IL-12*, *TNF*, *IL-10*, *IL-6*, *IL-1B*, *IL-5*, *IFNG* e *CXCL10* (Tabela Suplementar I). Avaliamos também o perfil dos transcritos para *Colágeno-I* e *Colágeno-III* nos tumores. Como controles endógenos utilizamos primers para *Beta-actina* e *RPS26*. As análises dos transcritos foram realizadas utilizando o GoTaq qPCR MasterMix (Promega), conforme especificações do fabricante.

Para avaliar genes relacionados ao processo de morte celular programada por apoptose nas amostras de tumores, utilizamos um ensaio da Qiagen (Tabela Suplementar II - *Mouse Apoptosis* Cat. 330231 PAMM-012ZA) que reúne 85 genes essenciais na via de sinalização da Apoptose, além de 3 genes *housekeeping*. As análises dos transcritos foram realizadas utilizando o Power Up Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems™), conforme especificações do fabricante.

A concentração do cDNA em todas as reações foi de 50 ng. Para averiguar contaminação por DNA genômico, foi utilizado o RNA total tratado com DNase na mesma concentração que o cDNA, nos poços identificados como NoRT (No Reverse Transcriptase) e para monitorar contaminações dos reagentes, completou-se o volume da reação com Água Nuclease Free, nos poços identificados como NTC (No Template Control), para cada alvo. A ciclagem da PCR em tempo real foi realizada no equipamento

Step One Plus (Applied Biosystems™), nas seguintes temperaturas: 95°C por 2 minutos (ativação da enzima Taq DNA polimerase); 95°C por 15 segundos (desnaturação das fitas) e 60°C por 60 segundos (passo único para anelamento e extensão), os dois últimos passos repetidos por 45 vezes. Em seguida, foi realizada uma curva de *melting* para avaliar a dissociação dos primers em função da temperatura e excluir possíveis contaminações por dímeros de primers (dados não mostrados no manuscrito).

4.12 Caracterização morfológica por microscopia

A análise morfológica das linhagens celulares cultivadas nos modelos monocamada e tumoresfera foi realizada antes e após tratamento com cisplatina. Para isto, as células foram fixadas com formaldeído 4% (Sigma) por 1h à temperatura ambiente (T.A), em seguida as amostras foram permeabilizadas durante 20 minutos com Triton X-100 0,1%, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x e incubados com tampão de bloqueio (10% de SFB e 1% BSA em PBS 1x) por 60 minutos. As células foram incubadas com os anticorpos primários (tabela I) anti fibronectina, vimentina, N-caderina e E-caderina, diluídos em tampão de bloqueio. Em seguida, os poços foram lavados com PBS 1x por três vezes e aplicou-se os anticorpos secundários conjugados com fluorocromos específicos para cada Ac 1°. Além disso, as células foram marcadas por 20 minutos utilizando sondas Faloidina Alexa Fluor® 488 (Invitrogen™) que reconhecem filamentos de actina e em seguida, por cinco minutos utilizando sondas fluorescentes que marcam núcleo celular, DAPI (1µg / mL, Invitrogen™).

Para imunofluorescência dos tumores e DRGs, as amostras foram coletadas e fixadas com paraformaldeído 4% pH=7,4 *overnight* (4°C), em seguida lavadas três vezes com PBS 1x e colocadas em solução de sucrose diluída em PBS 1x à 30% (peso/volume), e mantidas 48h a 4°C, até o processamento dos tecidos. Após esse período, as amostras foram congeladas em OCT TissueTek utilizando isopentano (2-metilbutano, Sigma cat. M32631). Após inclusão no OCT TissueTek, os tecidos foram cortados utilizando um criostato (Leica) e colocados em lâminas gelatinizadas. Os tumores foram cortados em 20 µM e os DRGs em 12 µM. As amostras de tumores e DRGs foram então incubadas com tampão de bloqueio (4% BSA + 0,5% de triton X-100 diluídos em PBS 1x) durante 1h30min a T.A. Em seguida, os anticorpos primários que reconhecem fibronectina, vimentina, N-caderina, E-caderina, CD31, CGRP, SP, VIP, NaV1.8 e TUBB3, foram diluídos em tampão de bloqueio e aplicados nas concentrações padronizadas (tabela I). Os

cortes de tecidos foram deixados *overnight* (4°C) e no dia seguinte procedemos com a imunofluorescência. O anticorpo primário foi então removido e as amostras lavadas três vezes com PBS 1x e os anticorpos secundários específicos foram diluídos em PBS 1x e aplicados na diluição de 1:1000. Após 3h de incubação à T.A, os anticorpos secundários foram removidos e os tecidos lavados três vezes com PBS 1x. Em seguida, os cortes foram marcados com DAPI (1µg/mL, Invitrogen™) por 10 minutos a T.A. Para finalizar, as amostras foram lavadas três vezes com PBS 1x e as lâminas foram fechadas utilizando glicerol a 50%, diluído em PBS 1x. As marcações foram visualizadas no microscópio de fluorescência confocal da Carl Zeiss (LSM 880) e registradas utilizando o programa ZEN versão 3.4.

Tabela 1. Informações sobre os anticorpos primários utilizados na imunofluorescência

Anticorpo	Fabricante	Host	Diluição
E-caderina	BD Biosciences	Mouse	1:500
N-caderina	Thermo Fisher Scientific	Mouse	1:500
Fibronectina	Abcam	Rabbit	1:100
Vimentina	Abcam	Rabbit	1:500
Vimentina	Abcam	Mouse	1:500
CD31/PECAM-1	Novus Biologicals	Rat	1:500
CGRP	Invitrogen	Goat	1:300
SP	Invitrogen	Rabbit	1:300
VIP	Invitrogen	Rabbit	1:300
NaV1.8	Invitrogen	Ginea Pig	1:300
TUBB3 – alexa fluor 488	BioLegend	Mouse	1:200

4.13 Caracterização celular por citometria de fluxo

A eliminação da sobreposição de cores foi realizada após o desenho experimental na plataforma online “Spectrum Viewer” da Thermo Fisher. As amostras de células cultivadas *in-*

vitro foram adquiridas no citômetro de fluxo LRSFortessa™ (BD Bioscience) utilizando o software de aquisição FACSDiva. Já a aquisição das amostras de tumores foi realizada no equipamento DxFLEX (Beckman Coulter) utilizando o software CytExpert. Os fluorocromos foram compensados utilizando BD™ CompBeads (BD Biosciences). As análises posteriores dos dados foram realizadas no software Flow Jo (Tree Star) V10. Foram adquiridos 100.000 eventos no citômetro de fluxo.

4.13.1 Citometria das células cultivadas *in-vitro*

Para caracterização fenotípica da linhagem celular LLC1 cultivada *in-vitro*, 1×10^6 de células para cada marcação foram coletadas e lavadas com PBS 1x por cinco minutos a 3500 RPM. As amostras foram incubadas com 100 μ L de Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogen – 1:1000) por 15 minutos à T.A. Em seguida foram adicionados 100 μ L de PBS 1x em cada poço e então as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2500 RPM (4°C). Após este passo, as células foram ressuspensas em FACS buffer (PBS 1x + 0,1% de azida sódica + 1% de SFB) com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos e que reconhecem: (I) CD24, (II) CD133 e (III) CD44, na diluição previamente estabelecida (tabela suplementar III). As amostras foram incubadas durante 20 minutos a 4°C e protegidas da luz. Após a marcação das proteínas extracelulares, procedemos com a marcação das proteínas intracelulares utilizando o kit eBioscience Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer™. Para isto, adicionamos 100 μ L da solução de permeabilização (Fix/Perm) e incubamos as amostras a 4°C (protegido da luz). Em seguida foram adicionados 100 μ L da solução Perm/Wash para que as amostras fossem centrifugadas. O sobrenadante foi então descartado e 100 μ L de Ki-67 diluídos em solução Perm/Wash foram adicionados. Após 20 minutos a 4°C (protegido da luz), foi adicionado 100 μ L da solução Perm/Wash e as amostras foram centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e todas as amostras foram fixadas com PFA a 2%, e armazenadas a 4°C para serem adquiridas no citômetro de fluxo no dia seguinte.

Para identificação das células ALDH⁺ foi utilizado o kit ALDEFLUOR Stem Cell Identification (Stemcell Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foi coletado 1×10^6 células e lavadas com PBS 1x durante cinco minutos por 3500 RPM. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 0.5 mL do tampão de marcação disponibilizado pelo kit e foi adicionado 2.5 μ L do reagente ALDEFLUOR, substrato intracelular de ALDH que entra por difusão passiva nas membranas de células viáveis. Após este passo, 250 μ L foi transferido para um novo tubo contendo 2.5 μ L do reagente DEAB, um inibidor seletivo de

ALDH. O DEAB é utilizado como um controle negativo no momento em que delimitamos a população celular positiva para ALDH (ZHOU *et al.*, 2019).

4.13.2 Citometria das amostras de tumores de animais C57BL/6J

Para imunofenotipagem dos tumores, as amostras foram coletadas em microtubos de 2 mL contendo meio L-15 gelado suplementado com 1% de antibiótico-antimicótico, sem soro fetal bovino. Logo em seguida, foi adicionado as enzimas Liberase (62,5 µg/mL) e DNase (0,5 mg/mL). Os tumores foram então incubados durante 90 minutos a 37°C, agitando as amostras a cada 10 minutos com o auxílio de um vórtex. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 3500 RPM durante cinco minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e foi adicionado uma solução de tripsina-EDTA 1x (Sigma) para completa dissociação do tecido. Após 10 minutos na incubadora a 37°C, as amostras foram novamente centrifugadas. Após este passo, as amostras foram submetidas à lise de eritrócitos utilizando tampão ACK por cinco minutos à temperatura ambiente (T.A). Em seguida, procedeu-se com uma nova etapa de centrifugação. As células foram ressuspensas em PBS 1x estéril e filtradas em um *cell-strainer* de 40 µM e contadas na câmara de Neubauer. Para cada marcação celular, foram utilizados 1×10^6 células. As marcações foram realizadas em placas de fundo redondo.

As amostras foram incubadas com 100 µL de Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogen – 1:1000) por 15 minutos à T.A. Em seguida foram adicionados 100 µL de PBS 1x em cada poço e então as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2500 RPM (4°C). Para neutralizar ligações inespecíficas, optamos por tratar as amostras por 10 minutos com o próprio soro extraído de cada animal e diluído (1:100) em PBS 1x. As amostras foram novamente centrifugadas e em seguida foi adicionado 100 µL do mix contendo anticorpos para marcação de proteínas de superfície de membrana celular (tabela suplementar III), sendo estas: CD24, CD133, CD44, CD3, CD45, NK1.1, CD4 e CD8. Após 20 minutos de incubação a 4°C (protegido da luz), 100 µL de PBS 1x foram adicionados e as amostras foram então centrifugadas. Além disto, a suspensão celular foi fixada e permeabilizada para a avaliação intracelular de Ki-67 ou FOXP3. Para identificação de células ALDH⁺ nos tumores, procedemos com as marcações da mesma forma que fizemos para as células cultivadas *in-vitro*, utilizado o kit ALDEFLUOR Stem Cell Identification (Stemcell Technologies) de acordo com as instruções do fabricante.

Para obter o número absoluto de células por amostras, multiplicamos o número de células identificadas em cada subpopulação no citômetro pelo número total de células contadas

após a digestão dos tumores. Em seguida, dividimos o resultado pelo número de eventos adquiridos na citometria. Para descobrir qual era exatamente o número de células por mg de tumor, dividimos o número total de células pelo peso do tumor (BLANCHARD *et al.*, 2022).

4.14 Análise de dados

A expressão relativa na qPCR foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Este método analisa as mudanças na expressão dos alvos na amostra tratada em relação à mesma amostra não tratada (também chamada de calibradora ou amostra de referência), considerando o controle endógeno como normalizador. Assim, é possível verificar a subexpressão ou superexpressão dos genes alvo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O processamento das imagens de microscopia confocal foi realizado no software Image J (FIJI v.1.53c). O registro da coloração por *Picrosirius Red* foi realizado utilizando uma câmera com luz polarizada (Spot Insight) conectado ao microscópio Olympus BX41, software Spot 3.4. Em média 10 campos por lâmina foram capturados para serem quantificados no software QuPath. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Após os testes de normalidade (Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov), foram aplicados os métodos mais apropriados para cada análise.

5. RESULTADOS

A figura 6 mostra uma micrografia da linhagem celular LLC1 cultivada nos modelos monocamada (MN) e tumoresfera (TE). É possível observar que a monocamada de células LLC1 é caracterizada por células aderidas à garrafa de cultivo e outras fracamente aderidas, enquanto a estrutura tridimensional das tumoresferas é mais compacta no sétimo dia (7D) em relação ao terceiro dia (3D) de incubação (momento em que há troca de meio).

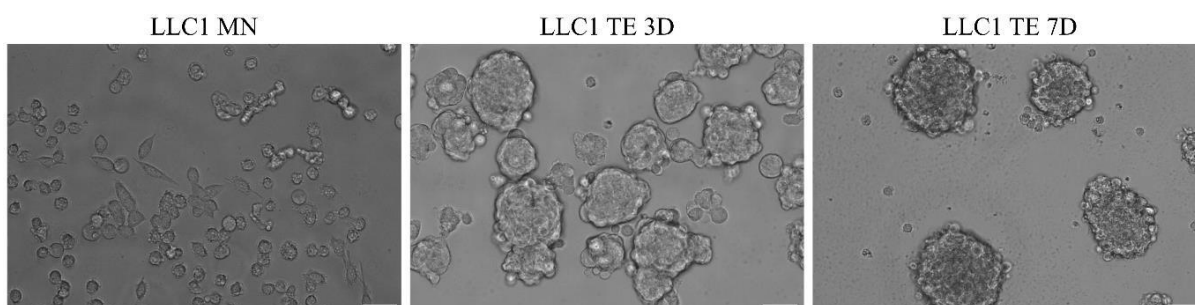


Figura 6. Fotomicrografia da linhagem celular LLC1 cultivada em monocamada (MN) e tumoresfera (TE). A monocamada celular é caracterizada por células aderentes, enquanto as tumoresferas são representadas por estruturas tridimensionais compactas, dificilmente dissociadas por simples pipetagem. 3D e 7D: terceiro e sétimo dia de incubação das tumoresferas, respectivamente. Escala: 50 μ M. Aumento: 20x.

5.1 O modelo de enriquecimento de CSCs demonstrou-se mais resistente ao tratamento com cisplatina

Para mostrar que as tumoresferas representam um modelo de quimiorresistência comparado ao modelo monocamada, investigamos as diferenças no IC_{50} das células LLC1 tratadas com o quimioterápico cisplatina em ambos modelos. Nossos resultados mostraram diferenças estatísticas na curva de sobrevivência da linhagem celular de câncer de pulmão de células não-pequenas (*NSCLC*) cultivada em monocamada (MN) e tumoresfera (TE) (Figura 7A e B, respectivamente). Baseados na análise da curva de sobrevivência, os valores de IC_{50} foram estimados por meio do software Dr Fit (Figura 7C e D). A média do IC_{50} de três experimentos independentes foi calculada. Análises estatísticas revelaram uma clara diferença da dose necessária para inibir 50% do crescimento entre os modelos MN e TE (Figura 7E). A TE da linhagem celular LLC1 demonstrou-se mais resistente ao tratamento com cisplatina ($166,66 \mu\text{g/mL}$) em comparação à MN ($6,25 \mu\text{g/mL}$).

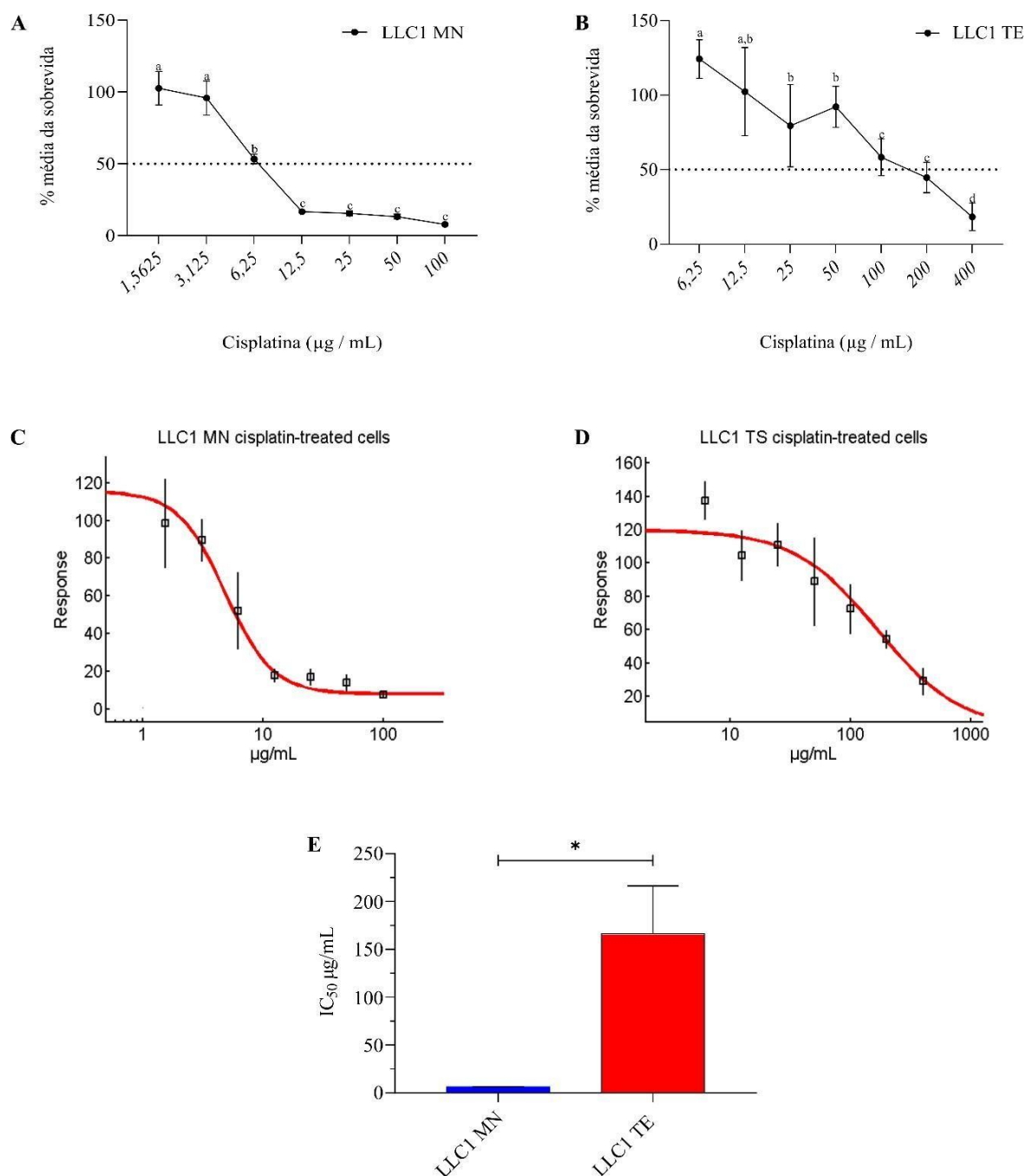


Figura 7. Análise da curva de sobrevivida da linhagem celular LLC1 nos modelos monocamada (MN) e tumoresfera (TE) tratados com cisplatina. (A) observa-se uma dose-resposta entre 3,125 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ para a LLC1 em MN e (B) 100 - 400 $\mu\text{g/mL}$ para as células em TE. O IC_{50} foi estimado utilizando o programa Dr.Fit versão 1.042 (C e D). (E) Distribuição dos valores de IC_{50} para as células nos dois modelos estudados. A linhagem celular LLC1 no modelo TE demonstrou-se mais resistente ao tratamento com cisplatina em relação à mesma célula em MN. Curvas de sobrevivida foram analisadas utilizando One-way Anova e as diferenças de IC_{50} pelo teste T. * $p < 0,05$.

5.2 O tratamento com cisplatina regulou positivamente genes de pluripotência e marcadores EMT nos modelos 2D e 3D

Após a extração do RNA total da linhagem celular LLC1 nos modelos monocamada e tumoresfera antes e após o tratamento com cisplatina, as amostras foram quantificadas no equipamento Nanovue™ Plus e a integridade analisada por meio de uma eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 8A). A presença das subunidades ribossomais 18S e 28S sem arrastes em todas as amostras foram determinantes para afirmar que as amostras de RNA total estavam íntegras e adequadas para dar continuidade ao estudo.

Neste estudo avaliamos como o tratamento quimioterápico com cisplatina nos modelos monocamada (MN) e tumoresfera (TE) da linhagem celular LLC1 interfere na transcrição de *Zeb1*, *Zeb2*, *Twist*, *Snail* e *FoxA2*, que são os principais fatores de transcrição (FTs) envolvidos na regulação do evento EMT. Avaliamos também os alvos a jusante desses fatores de transcrição, como *E-caderina*, *Tgfb1*, *Vimentina*, *Fibronectina* e *N-caderina*. Além disso, avaliamos a expressão dos transcritos *Oct-4*, *Sox2* e *Nanog*, os quais estão relacionados à pluripotência e manutenção das características de CSCs. Após o tratamento com cisplatina, observamos uma regulação positiva dos genes de pluripotência na monocamada e tumoresfera (Figura 8B). Neste trabalho, identificamos uma superexpressão do mRNA do marcador epitelial *E-caderina* e dos FTs *Snail*, *Zeb1* e *Zeb2* na monocamada tratada. No modelo de enriquecimento de CSCs, os transcritos de *N-caderina*, *Snail*, *Zeb1* e *Zeb2* também foram regulados positivamente (Figura 8C).

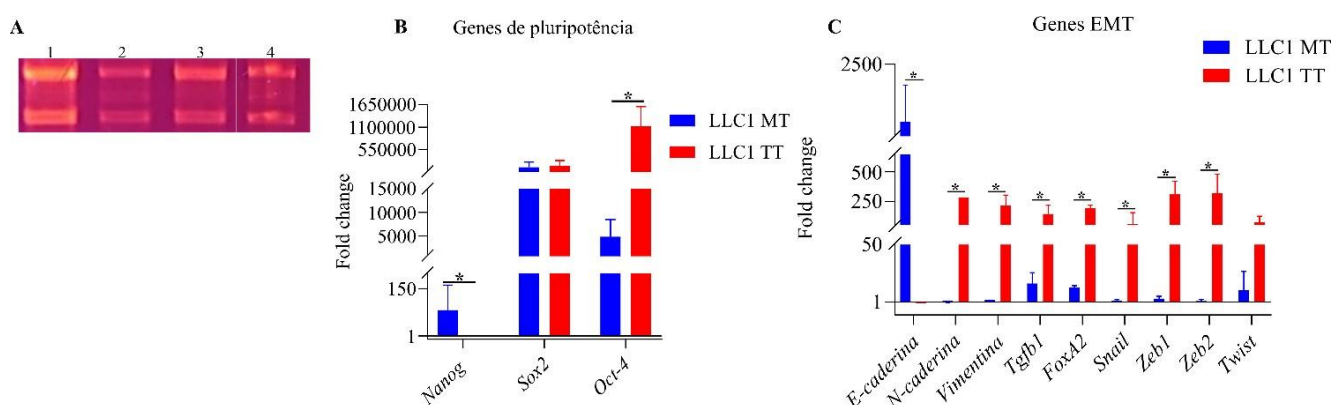


Figura 8. Tratamento com cisplatina promove superexpressão dos genes de pluripotência e do fenômeno EMT. (A) Análise da integridade do RNA total extraído das amostras em monocamada controle (1), tratada (2) e tumoresfera controle (3) e tratada (4). (B) Após o tratamento com cisplatina, observamos uma regulação positiva dos genes de pluripotência na monocamada e tumoresfera. (C) Neste trabalho, identificamos uma superexpressão do mRNA do marcador epitelial *E-caderina* e dos fatores de transcrição (FTs), *Snail*, *Zeb1* e *Zeb2* na monocamada tratada. No modelo de enriquecimento de CSCs, os transcritos de *N-caderina*, *Snail*, *Zeb1* e *Zeb2*

também foram regulados positivamente. Teste: Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

5.3 Cisplatina afeta a expressão dos marcadores mesenquimais na linhagem celular LLC1 cultivada em 2D e 3D

Durante a EMT, as células epiteliais perdem a expressão de marcadores epiteliais como E-caderina e junções aderentes, e passam a expressar marcadores mesenquimais, como N-caderina, fibronectina e vimentina. Estas alterações refletem em uma mudança morfológica celular, onde as células adquirem aspectos fusiformes característicos de células mesenquimais (RIBEIRO; PAREDES, 2014).

Nossos resultados mostraram que o tratamento com cisplatina diminuiu a expressão do marcador mesenquimal vimentina (Figuras 9 A e B, 12 C) na monocamada. Nenhuma alteração na expressão da proteína do citoesqueleto F-actina, do marcador epitelial E-caderina ou mesenquimais, fibronectina e N-caderina, foram observadas após o tratamento da monocamada com cisplatina (Figuras 9 A e B, 10 A e B, 11 A e B e 12 A, B, D e E). No que se diz respeito à organização tridimensional de células LLC1, observamos que o tratamento com cisplatina reduziu a expressão dos marcadores mesenquimais fibronectina e N-caderina (Figuras 9 C e D, 11 C e D e 12 G e J). Além disso, poucas células eram positivas para o marcador epitelial E-caderina (Figuras 10 C e D e 12 I).

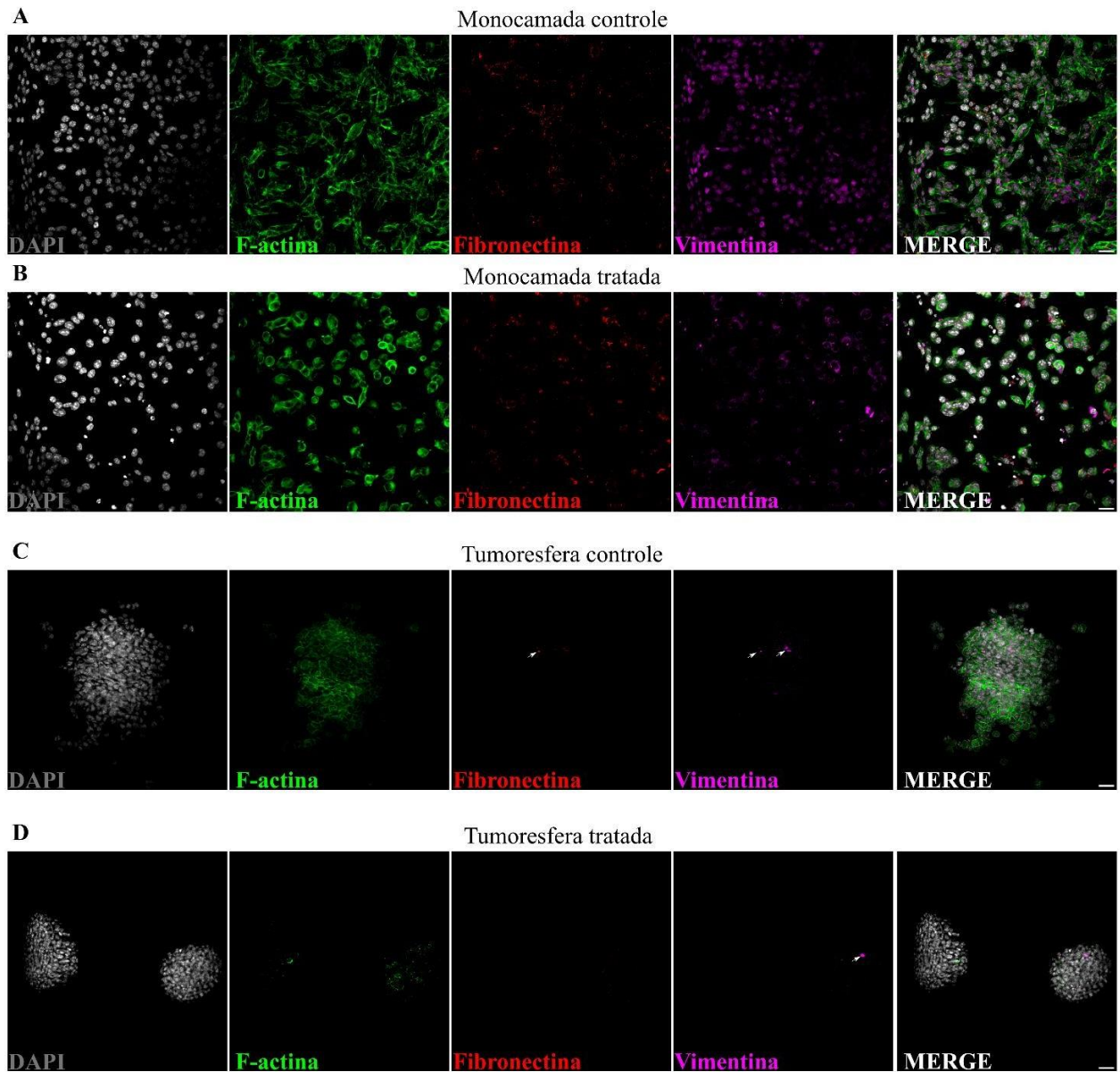


Figura 9. Perfil e distribuição dos marcadores mesenquimais fibronectina e vimentina, e da proteína do citoesqueleto F-actina na linhagem celular LLC1 cultivada em monocamada (A e B) e tumoresfera (C e D), antes e após tratamento com cisplatina. Setas brancas indicam células positivas para os marcadores mesenquimais no interior das tumoresferas. Núcleo foi marcado com DAPI. Aumento 20x. Escala: 50 μ M. Imagens das tumoresferas foram capturadas em *Z-stack*.

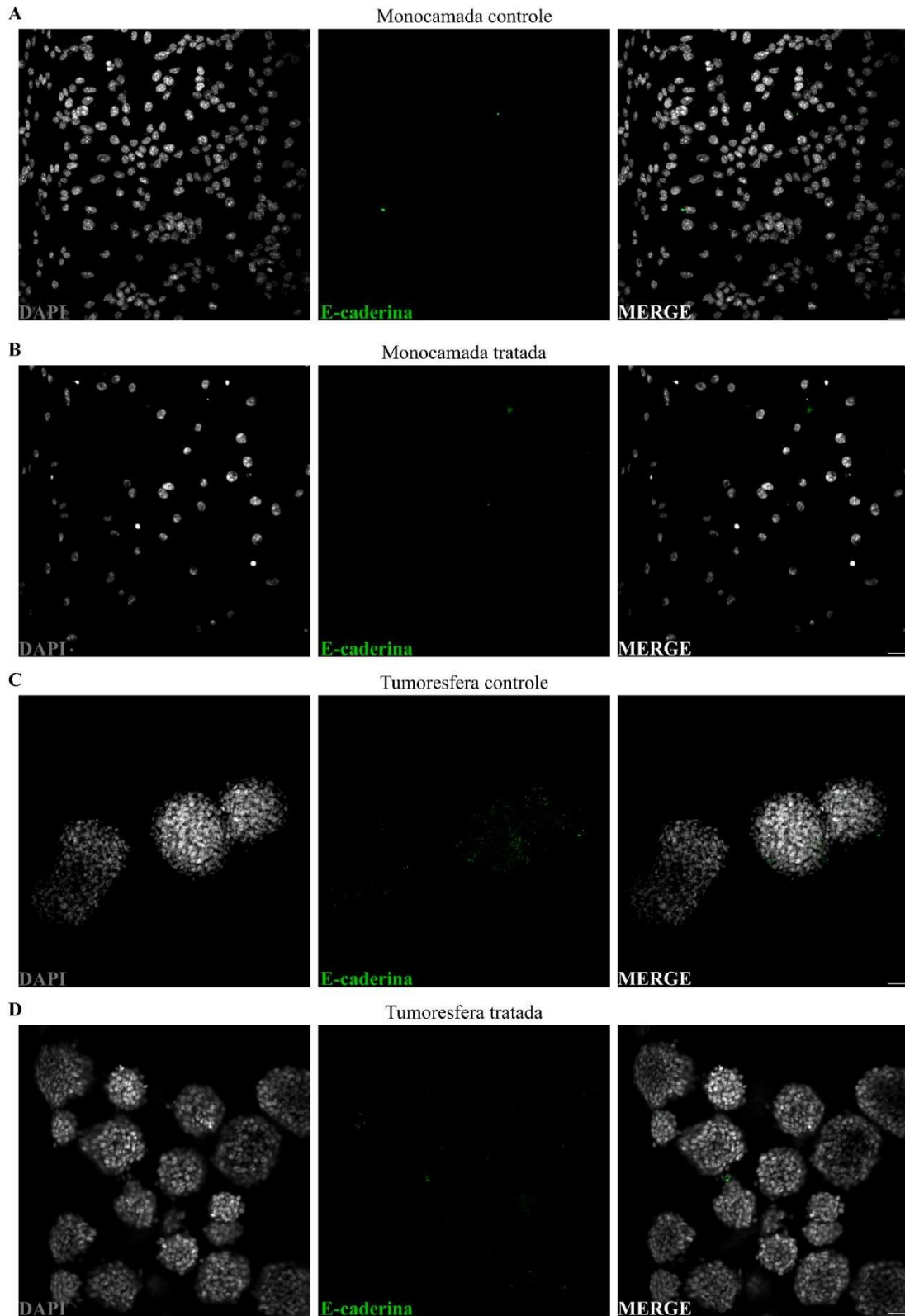


Figura 10. Perfil e distribuição do marcador epitelial E-caderina na linhagem celular LLC1 cultivada em monocamada (A e B) e tumoresfera (C e D), antes e após tratamento com cisplatina. Observamos raras células positivas para E-caderina. Aumento 20x. Escala: 50 μ M. Imagens das tumoresferas foram capturadas em *Z-stack*.

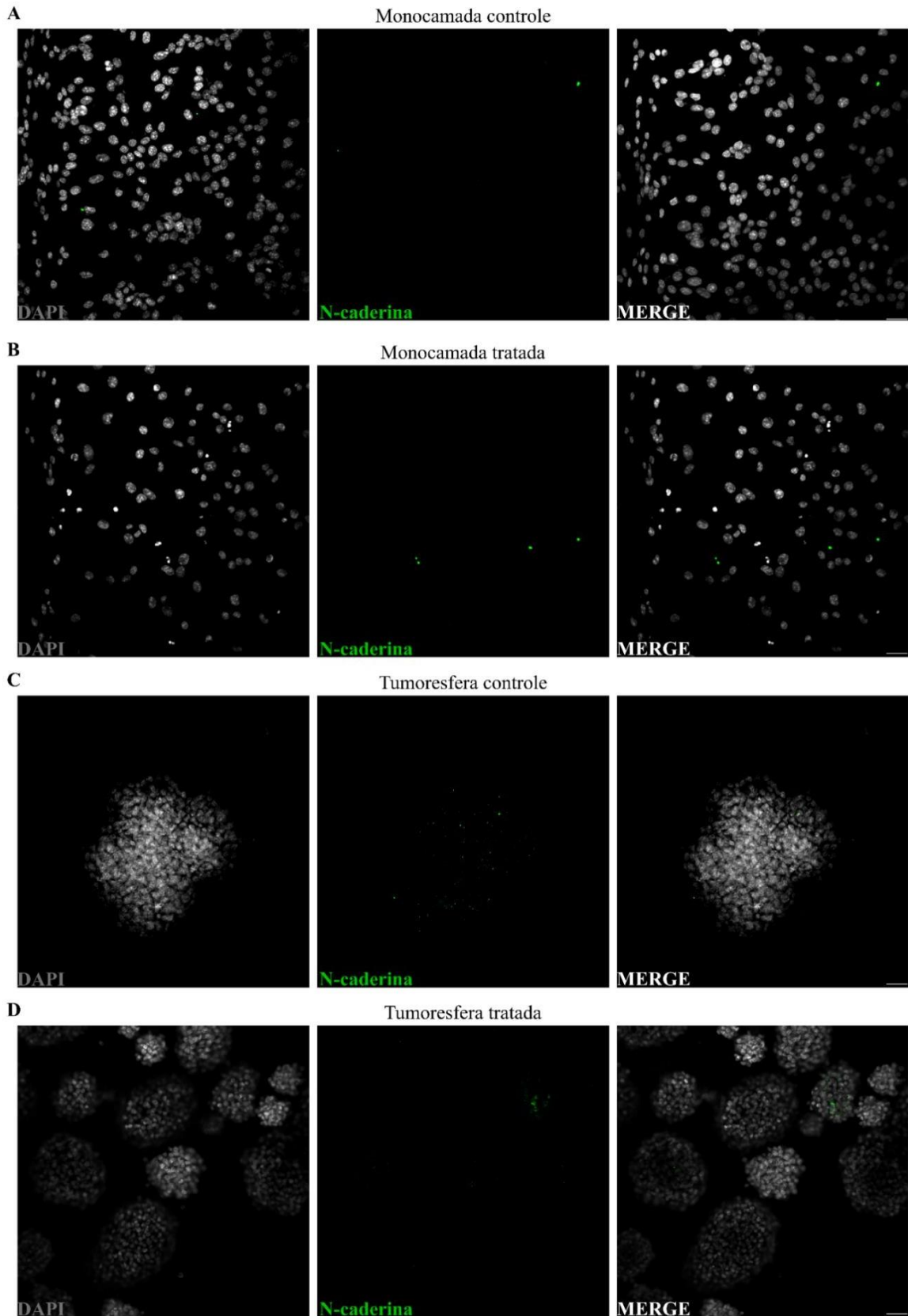


Figura 11. Perfil e distribuição do marcador mesenquimal N-caderina na linhagem celular LLC1 cultivada em monocamada (A e B) e tumoresfera (C e D), antes e após tratamento com cisplatina. Observamos raras células

positivas para N-caderina nos modelos monocamada e tumoresfera. Além disso, a distribuição morfológica dessa proteína na organização tridimensional das tumoresferas mostra que assim como os outros marcadores mesenquimais, fibronectina e vimentina, células N-caderina⁺ estão localizadas mais no interior das tumoresferas. Aumento 20x. Escala: 50 μ M. Imagens das tumoresferas foram capturadas em *Z-stack*.

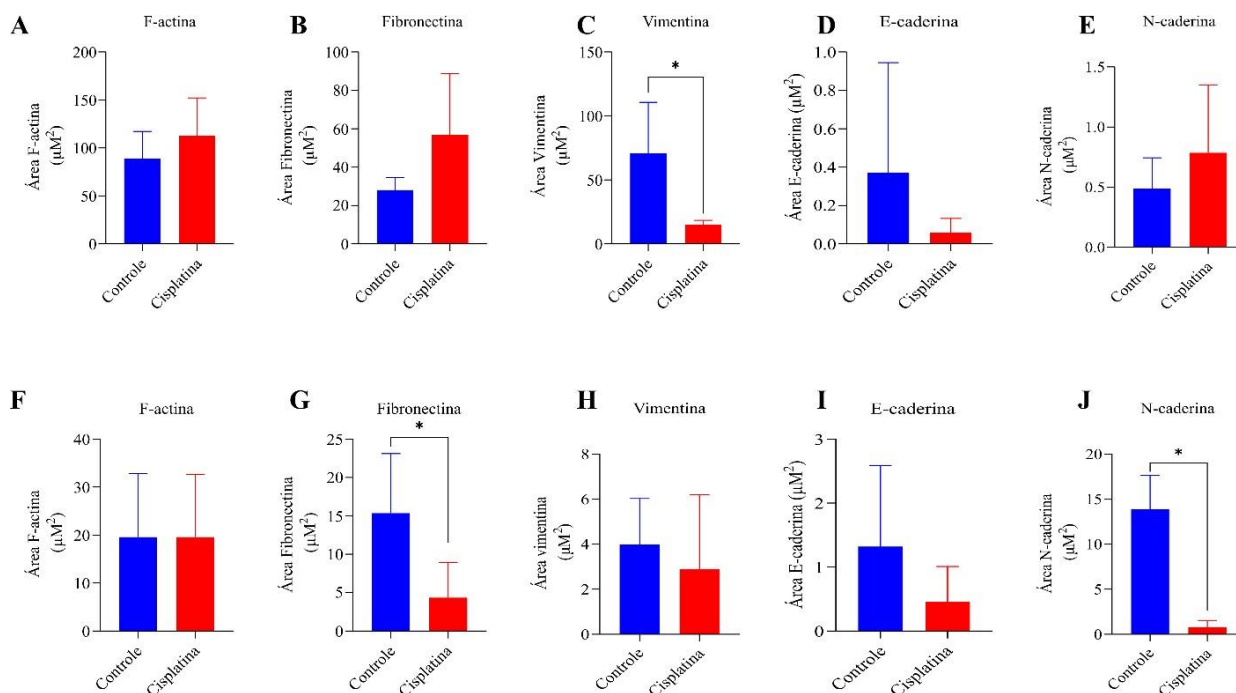


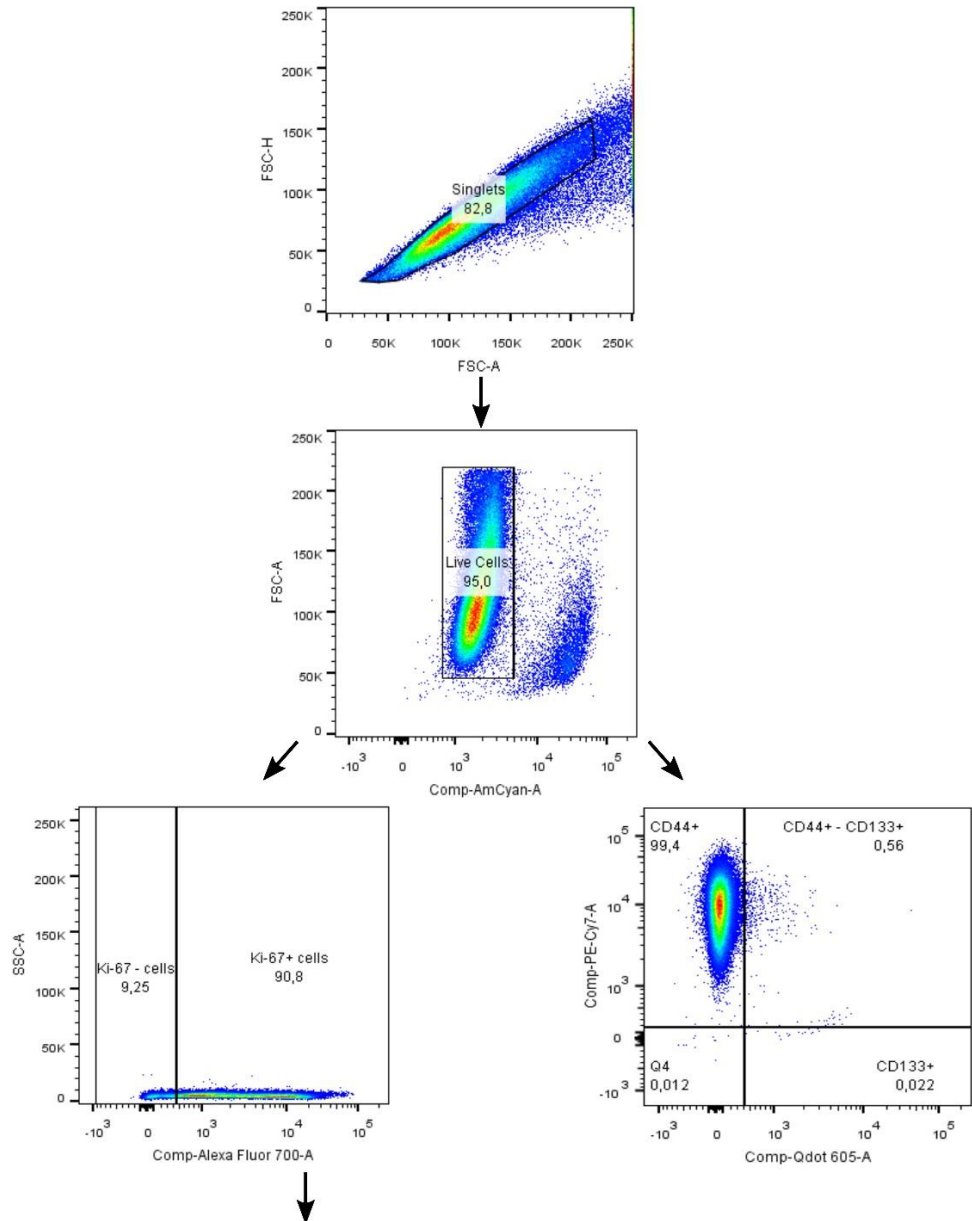
Figura 12. O tratamento com o quimioterápico cisplatina afetou a expressão dos marcadores mesenquimais na linhagem LLC1 cultivada em monocamada (A-E) ou tumoresfera (F-J). A cisplatina diminuiu a expressão de vimentina nas células LLC1 em monocamada (C), e de fibronectina (G) e N-caderina (J) nas células cultivadas sob o modelo de tumoresfera. Teste: Mann-Whitney. * $p < 0,05$. $n=5$.

5.4 O tratamento com cisplatina não alterou o perfil de células *CSCs-like* ou aquelas em estado proliferativo

Dados os resultados supracitados, buscamos compreender como o tratamento com cisplatina afeta o perfil fenotípico de *CSCs-like* baseado na expressão dos marcadores CD44⁺/CD133⁺/CD24⁺ e ALDH⁺. Além disso, avaliamos o estado proliferativo das células por meio da marcação de Ki-67. Desta forma, utilizamos um painel de anticorpos conjugados com fluorocromos para estudar a presença dessas células na monocamada (MN) e tumoresfera (TE) de LLC1. As estratégias de gates utilizadas na citometria de fluxo estão representadas nas figuras 13 e 15.

Nossos dados mostraram diferenças no perfil de células CD44⁺ totais entre os grupos MN ou TE, mas não devido ao tratamento com cisplatina (Figura 14 A). Ao discriminar o perfil de células CD44⁺ dentro do grupo de células Ki-67⁻, observamos uma diferença na porcentagem desse tipo celular na tumoresfera controle comparado a monocamada controle (Figura 14 B). Subpopulações CD24⁺ foram encontradas nos quatro modelos aqui estudados (monocamada e tumoresfera, controle ou tratada), entretanto, o tratamento com o quimioterápico cisplatina não alterou a porcentagem de células positivas para esse marcador (Figura 15 B). Destacamos ainda que o modelo de enriquecimento de CSCs apresentou células positivas para ALDH quando comparado a monocamada celular (Figura 15 D), mas a porcentagem de células ALDH⁺ após tratamento com cisplatina não teve alterações significativas.

A



B

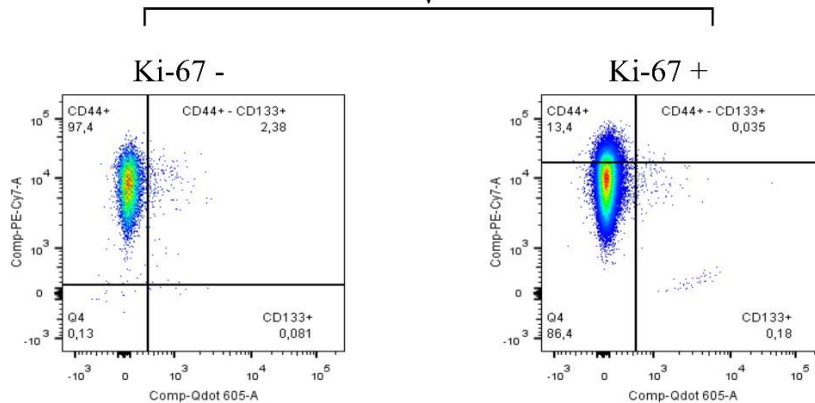


Figura 13. Estratégia de gates utilizada para identificação de células CD44⁺/CD133⁺ totais ou dentro dos grupos Ki-67⁻ / Ki-67⁺. (A) Agregados celulares foram eliminados utilizando os parâmetros de FSC-H e FSC-A. Inicialmente as populações celulares foram selecionadas com base nos valores de granulosidade/complexidade interna (SSC – side scatter) e de tamanho (FSC – forward scatter). A discriminação da subpopulação Ki-67⁺ e

CD44⁺/CD133⁺ foi realizada dentro das células vivas (não marcadas com as sondas Live/Dead). (B) células CD44⁺/CD133⁺ também foram estudadas conforme o estado proliferativo (Ki-67⁻ ou Ki-67⁺).

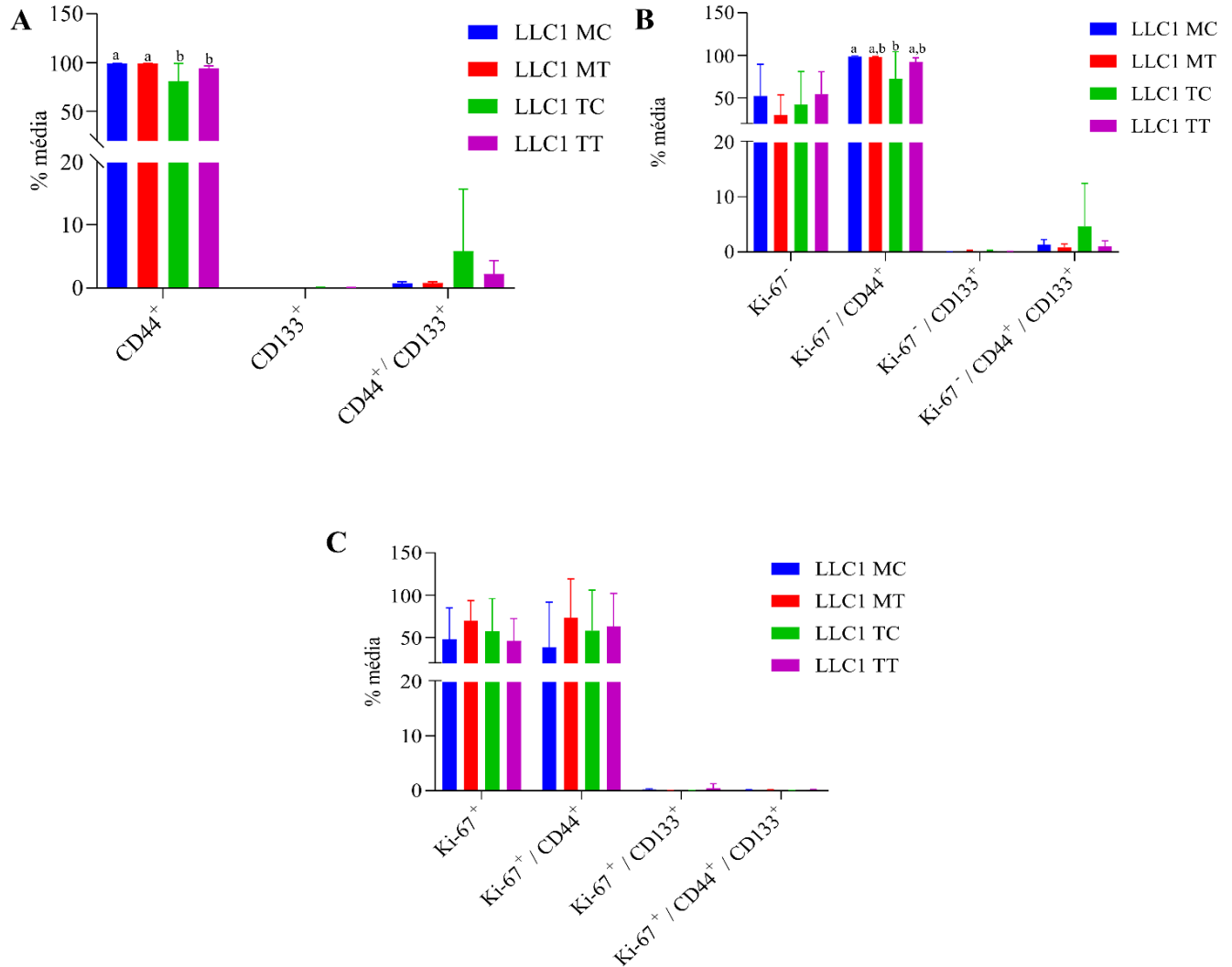


Figura 14. Análises estatísticas do perfil de células com características CSCs-like (CD44⁺ / CD133⁺) e do estado proliferativo (Ki-67⁺). (A) Nossos dados mostraram diferenças no perfil de células CD44⁺ totais entre os grupos monocamada e tumoresfera não tratados com cisplatina. (B) Ao discriminar o perfil de células CD44⁺ dentro do grupo de células que não estão em proliferação (Ki-67⁻), observamos uma diferença na porcentagem desse tipo celular na tumoresfera controle comparado a monocamada controle. (C) Nenhuma diferença foi observada na porcentagem de células em estado proliferativo. Teste: Kruskal Wallis pos hoc Dunn's. * p < 0,05. n=3.

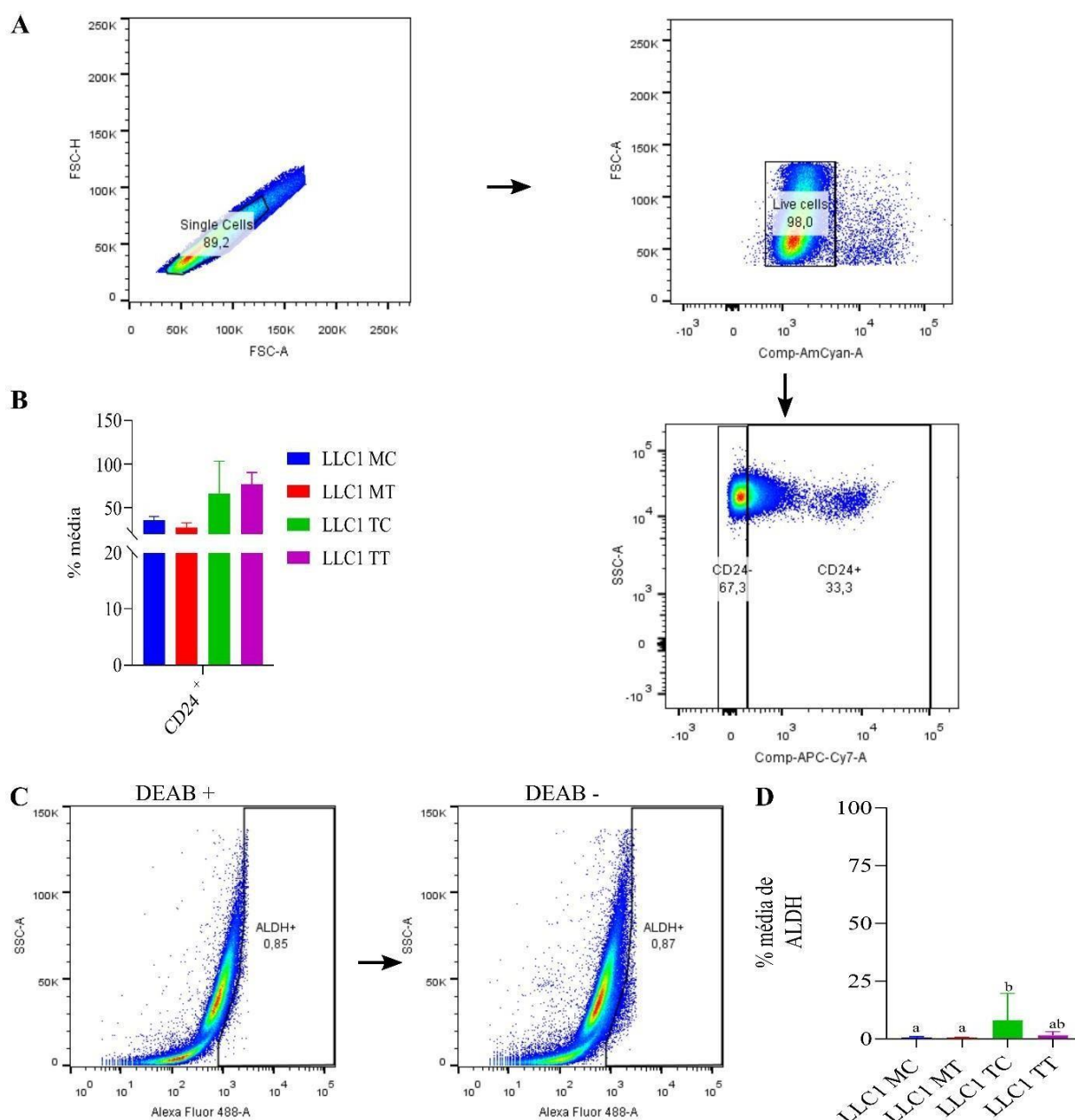


Figura 15. Estratégia de gates utilizada para identificação de células $CD24^+$ e $ALDH^+$. Agregados celulares foram eliminados utilizando os parâmetros de FSC-H e FSC-A. (A) Inicialmente as populações celulares foram selecionadas com base nos valores de granulosidade/complexidade interna (SSC – side scatter) e de tamanho (FSC – forward scatter). A discriminação da subpopulação $CD24^+$ foi realizada dentro das células vivas (não marcadas com Live and Dead). (B) nenhuma diferença na expressão de CD24 foi observada entre os grupos. (C) A delimitação da subpopulação de células $ALDH^+$ foi realizada com base no controle (DEAB⁺) que teve a expressão de ALDH inibida pelo DEAB. Teste: Kruskal Wallis.* $p < 0,05$. $n=3$.

5.5 Meio condicionado dos neurônios sensoriais altera a viabilidade celular, capacidade clonogênica e a expressão de marcadores do evento EMT

Neste trabalho, utilizamos da tecnologia de animais geneticamente modificados para confirmar que as células isoladas a partir dos DRGs tratavam-se de neurônios sensoriais.

Uma representação do modelo experimental está indicada na figura 16A. Imagens representativas desses neurônios sensoriais expressando a fluorescência endógena tDTomato sob controle do promotor do gene do canal de sódio voltagem dependente NaV.1.8^{cre}, estão representadas na figura 16 B e C. Após 12 horas de cultivo, é possível observar prolongamentos de neurônios em crescimento (Figura 16 B – setas amarelas) bem como muitos corpos celulares fracamente aderidos, e após 24 horas observamos muitas células aderidas com prolongamentos bem extensos (Figura 16 C).

Para caracterizar o perfil dos neuropeptídeos CGRP, SP e VIP nos neurônios sensoriais extraídos do gânglio da raiz dorsal de animais fêmeas adultas da linhagem C57Bl/6J, realizamos análises morfológicas por imunofluorescência. Nossos resultados mostraram que neurônios sensoriais (NaV 1.8^{cre} / tdTomato) expressam CGRP no citoplasma (Figura 17 A), mas são negativos para SP (Figura 17 B) e VIP (Figura 17 C).

Para avaliar como o meio condicionado desses neurônios sensoriais afeta a resposta terapêutica à cisplatina, células LLC1 em monocamada (MN) e tumoresfera (TE) foram tratadas com cisplatina diluída em meio condicionado ou em meio neurobasal, este último utilizado aqui como um controle interno para verificar se qualquer atividade proveniente do meio condicionado não seria devido aos componentes do meio de cultivo dos neurônios. Além disso, decidimos utilizar a linhagem celular de fibroblastos murino, L929, para averiguar se o meio condicionado possuía alguma ação em células não tumorais.

Na figura 18, observamos uma micrografia das células L929 (A) e LLC1 em monocamada (B) e tumoresfera (C) tratadas com os meios (i) condicionado, (ii) neurobasal ou (iii) o meio apropriado para o cultivo de cada uma. Observamos uma diminuição no tamanho das células L929 cultivada com o meio Neurobasal, entretanto, nenhuma alteração morfológica foi observada quando essas células foram cultivadas em meio condicionado, comparado as células L929 cultivadas no próprio meio de cultura. Após tratamento com meio condicionado, as células LLC1 em MN exibiram longos prolongamentos (setas vermelhas). Na TE, observamos que após tratamento com meio condicionado, células se desprenderam das tumoresferas e aderiram à placa, sugerindo uma possível diferenciação celular promovida pelo meio condicionado. Nenhuma alteração foi observada na viabilidade das linhagens celulares L929 (Figura 19 A) ou LLC1 em MN (Figura 19 B) tratadas com os meios neurobasal ou condicionado entretanto, uma diminuição na viabilidade celular da tumoresfera da LLC1 foi observada após tratamento com meio

condicionado (Figura 19 C).

Em relação ao tratamento com cisplatina, observamos que é necessária uma dose menor de quimioterápico para determinar o IC_{50} das células L929 (Figura 20 A e B) comparado às células tratadas com cisplatina diluída em DMEM Alta Glicose. Para as células LLC1 em MN (Figura 20 C e D) ou TE (Figura 20 E e F) o IC_{50} das células tratadas com cisplatina diluída em meio condicionado foi maior quando comparado à ação da droga que foi aplicada no meio próprio dessas células.

Para compreender como o tratamento com meio condicionado sozinho ou em combinação com cisplatina afeta a capacidade da linhagem LLC1 em formar colônias, optamos por realizar um ensaio de clonogenicidade. Nossos dados mostraram que o tratamento com cisplatina impediu completamente a formação de colônias na MN e TE (Figura 21 A e B). Além disso, comparado ao controles da MN e TE, a fração sobrevivente das células tratadas com o meio condicionado de neurônios sensoriais foi maior.

Para avaliar como os neurônios sensoriais regulam os alvos EMT na linhagem LLC1 cultivada *in-vitro* nos modelos monocamada e tumoresfera, antes e após o tratamento com cisplatina, realizamos uma co-cultura. Para isto, células LLC1 foram semeadas em insertos Transwell e colocadas em co-cultura com neurônios sensoriais durante 24 horas. Após o período de incubação, os meios dos compartimentos superior e inferior foram removidos e as células fixadas com formaldeído para análises por microscopia confocal. Detectamos a presença de células positivas para o marcador epitelial E-caderina na MN tratada e TE controle, as quais eram também, em sua maioria, positivas para o marcador mesenquimal vimentina (Figura 22 A, setas brancas). Nossos achados mostraram que a co-cultura de células tumorais com neurônios sensoriais não afetou a expressão de E-caderina (Figura 22 B) e de vimentina (Figura 22 C), na monocamada. Entretanto, a monocamada tratada com cisplatina diminuiu a produção de F-actina em relação a MN controle co-cultivada com os neurônios sensoriais (Figura 22 D). Observamos ainda que a co-cultura com neurônios sensoriais diminuiu a expressão de E-caderina (Figura 22 E), vimentina (Figura 22 F) e F-actina (Figura 22 G) na tumoresfera tratada com cisplatina. Baseados nos dados supracitados, avaliamos ainda se a co-cultura com as células de câncer de pulmão modificou a expressão do neuropeptídeo CGRP nos neurônios sensoriais (Figura 23 A-E). Observamos que a marcação de CGRP não foi afetada nos neurônios sensoriais quando colocados em co-cultura com a monocamada controle (Figura 23 A), monocamada tratada (Figura 23 B), tumoresfera controle (Figura 23 C) ou tumoresfera tratada

(Figura 23 D) da linhagem LLC1.

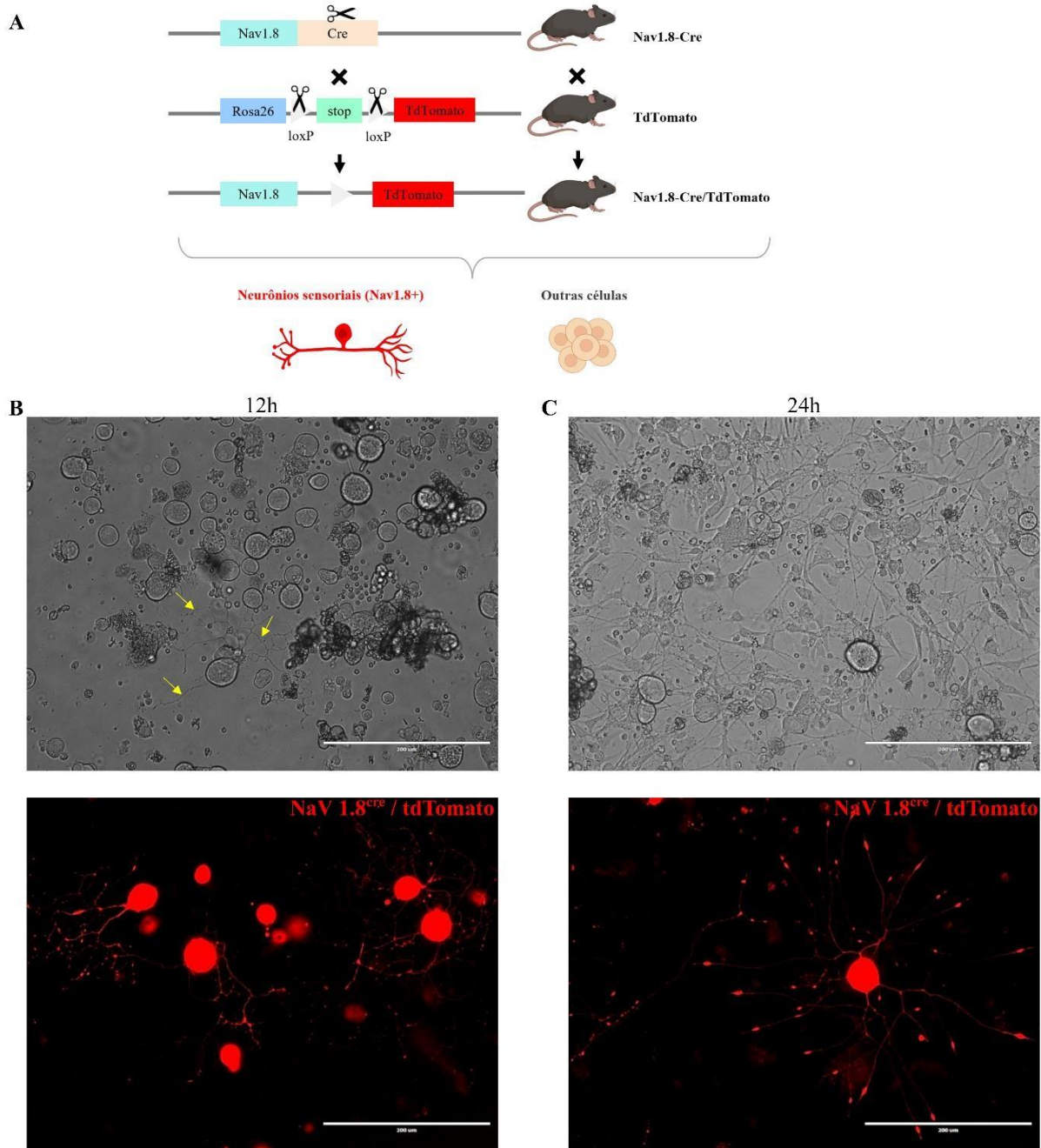


Figura 16. (A) Representação do animal Nav 1.8^{cre} / tdTomato. O modelo Nav 1.8^{cre} possui a sequência codificadora da enzima recombinase Cre inserida na mesma sequência do gene Nav 1.8, que é expresso pelos neurônios sensoriais. A recombinase Cre é uma enzima que cliva regiões específicas, denominadas “LoxP sites”. No entanto, como camundongos normalmente não possuem as sequências específicas “LoxP sites”, a recombinase Cre, mesmo estando no núcleo, não tem os sítios para clivar o DNA. O modelo de camundongo tdTomato possui a sequência codificadora de uma proteína que produz fluorescência vermelha inserido na mesma sequência de um gene que é expresso em todas as células. A sequência dessa proteína é antecedida por uma sequência que para a transcrição (STOPcodon). Esse STOPcodon é flanqueado por sequências que são reconhecidas pela enzima Cre

recombinase (“LoxP sites”). Os animais provenientes do cruzamento entre animais NaV 1.8^{cre} e animais tdTomato terão a enzima Cre recombinase expressa nos neurônios sensoriais. Dessa forma, a recombinase Cre presente nessas células irá reconhecer as sequências que flanqueiam o STOP códon (LoxP sites), essas sequências serão clivadas, o que permitirá que a proteína que produz fluorescência vermelha seja expressa. Micrografia 12h (B) e 24h (C) dos neurônios extraídos a partir da dissociação do gânglio da raiz dorsal. Para confirmar a identidade desses neurônios, foram capturadas imagens representativas de neurônios sensoriais expressando a fluorescência endógena tDTomato, em células que possuem o canal de sódio voltagem dependente NaV.1.8^{cre}. Escala: 200 μM. Aumento: 20x.

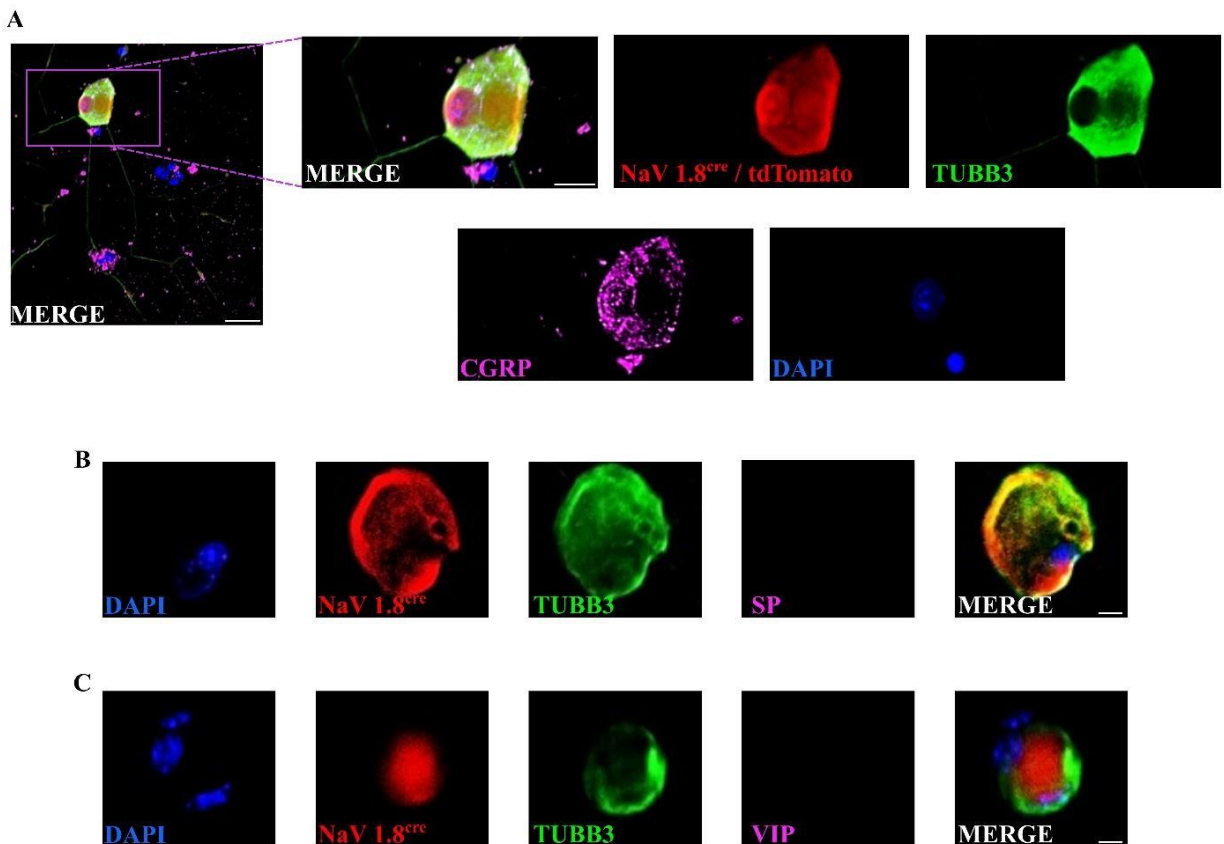


Figura 17. Neurônios sensoriais cultivados *in-vitro* são positivos para CGRP e negativos para SP e VIP. Para caracterizar o perfil dos neuropeptídeos CGRP, SP e VIP nos neurônios sensoriais extraídos do gânglio da raiz dorsal de animais fêmeas adultas da linhagem C57Bl/6J, realizamos análises morfológicas por imunofluorescência. Nossos resultados mostraram que neurônios sensoriais (NaV 1.8^{cre} / tdTomato) expressam CGRP no citoplasma (A), mas são negativos para SP (B) e VIP (C). CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; VIP: peptídeo vasoativo intestinal; SP: substância P; TUBB3: β-tubulina III. Aumento 20x. Escala: 50 μM.

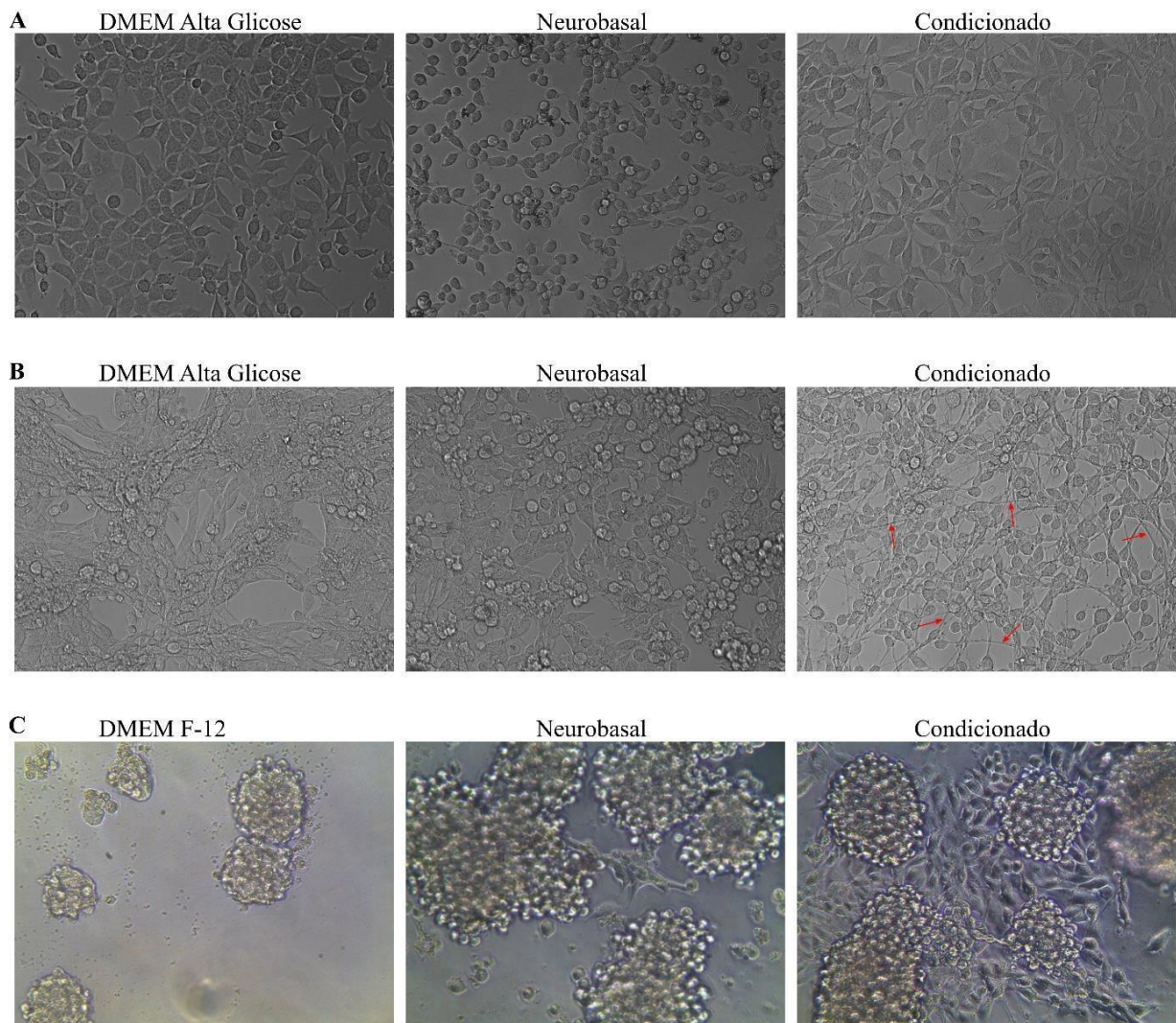


Figura 18. Micrografia das células L929 (A) e LLC1 em monocamada (MN-B) e tumoresfera (TE-C) tratadas com meio condicionado. Observamos uma diminuição no tamanho das células L929 cultivadas em meio neurobasal, comparado as mesmas células cultivadas no próprio meio de cultura (DMEM Alta Glicose). Após o tratamento com meio condicionado as células LLC1 em MN exibiram longos prolongamentos (setas vermelhas). Na TE, observamos que após tratamento com meio condicionado, células se desprenderam das tumoresferas e aderiram à placa, sugerindo uma possível diferenciação celular promovida pelo meio condicionado.

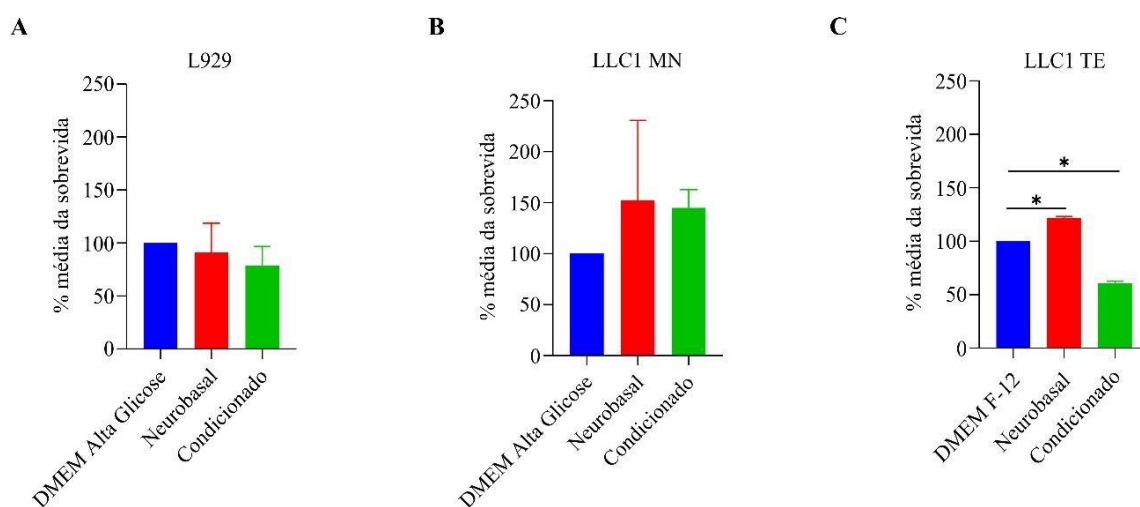


Figura 19. Análise da viabilidade das células L929 (A) e LLC1 em monocamada (MN-B) e tumoresfera (TE-C) tratadas com meio condicionado. Nenhuma alteração foi observada na viabilidade das linhagens celulares L929 ou LLC1 (MN) tratadas com os meios neurobasal ou condicionado. Entretanto, uma diminuição na viabilidade celular da tumoresfera da LLC1 foi observada após tratamento com meio condicionado. Teste: One-Way Anova. * $p < 0,05$.

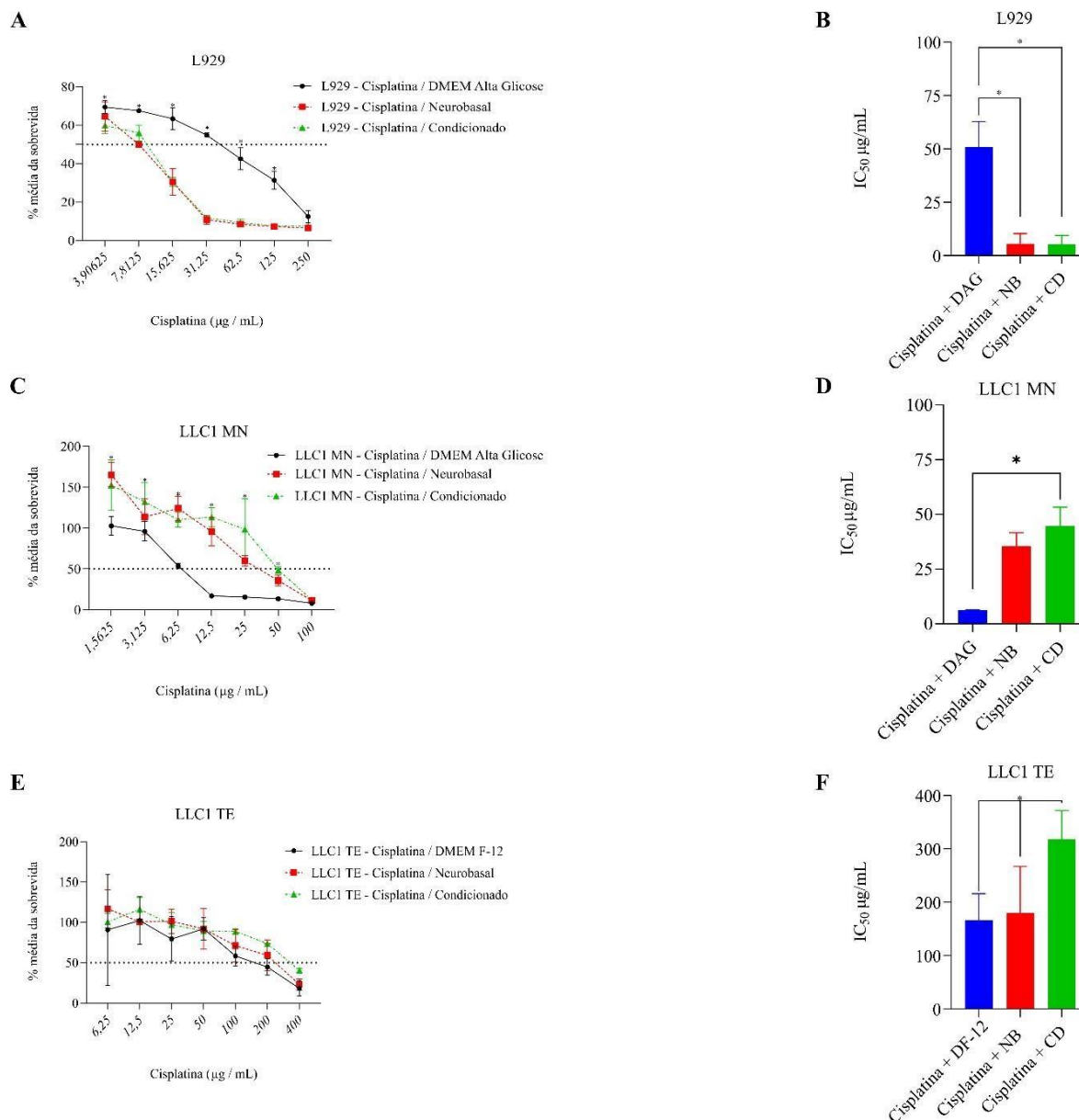


Figura 20. Análise das curvas de sobrevivida e IC₅₀ das linhagens celulares L929 e LLC1 nos modelos monocamada (MN) e tumoresfera (TE), tratadas com cisplatina diluída no meio próprio de cultivo de cada célula, meio neurobasal ou meio condicionado. Observa-se que após o tratamento com a cisplatina diluída em meio neurobasal ou condicionado é necessário uma dose menor de quimioterápico para determinar o IC₅₀ das células L929 (A) e (B) comparado às células tratadas com cisplatina diluída em DMEM Alta Glicose (DAG). Entretanto, para a LLC1 em MN ou TE (C - F) o IC₅₀ das células tratadas com cisplatina diluída em meio condicionado foi maior quando comparado à ação da droga que foi aplicada no meio próprio dessa célula (cisplatina + DAG ou cisplatina + DMEM F-12/DF-12). Teste para análise das curvas de sobrevivida: Two way Anova. Teste para análise do IC₅₀: One-way Anova. * p < 0,05.

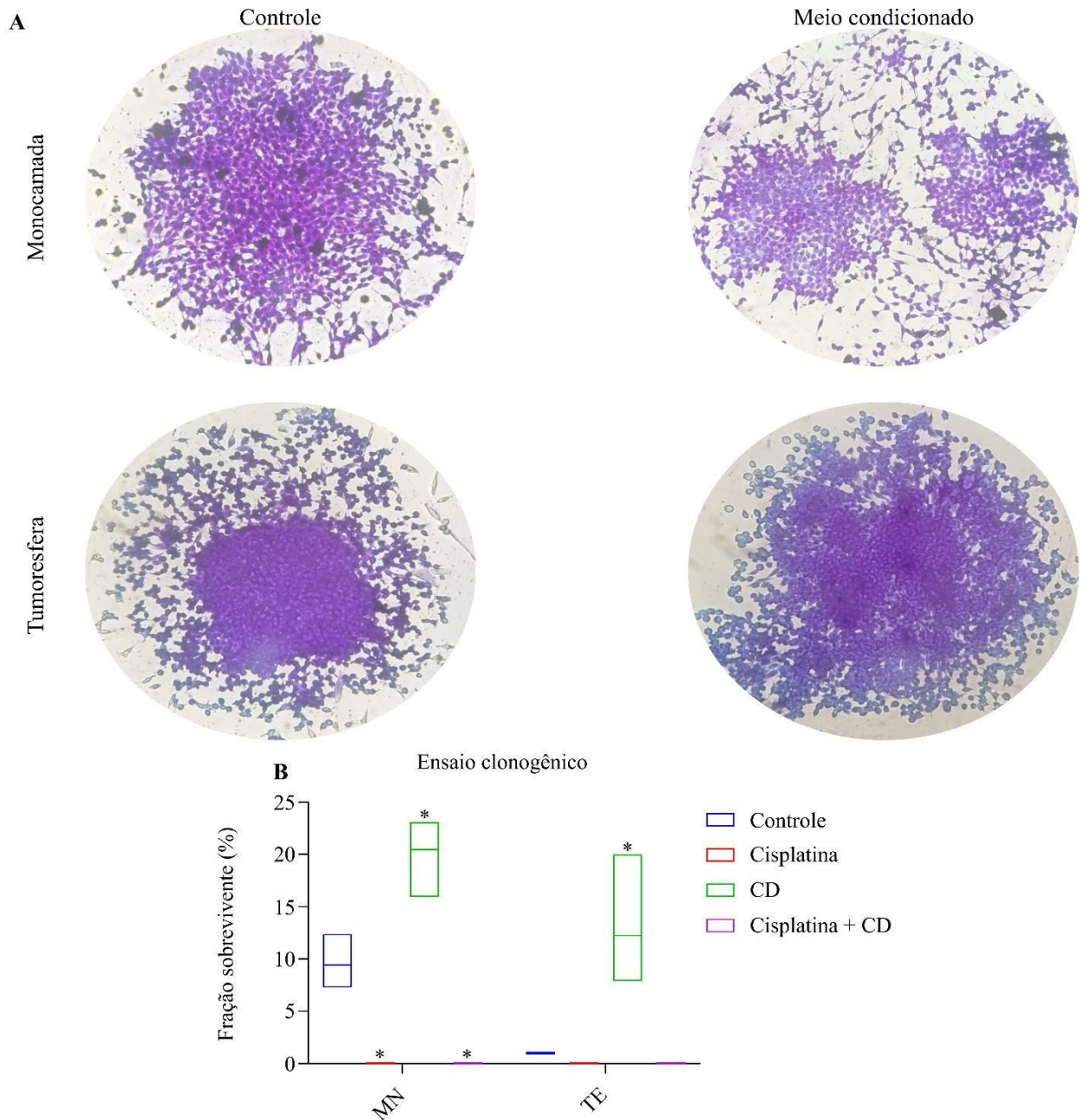


Figura 21. Ensaio clonogênico da linhagem LLC1 nos modelos monocamada (MN) e tumoresfera (TE). (A) Imagens representativas das colônias formadas nos grupos controles e após tratamento com meio condicionado. O tratamento com cisplatina impediu completamente a formação de colônias na MN e TE. (B) Comparado aos controles da MN e TE, a fração sobrevivente das células tratadas com o meio condicionado de neurônios sensoriais foi maior. Teste: Two-way Anova pos hoc LSD. * $p < 0,05$.

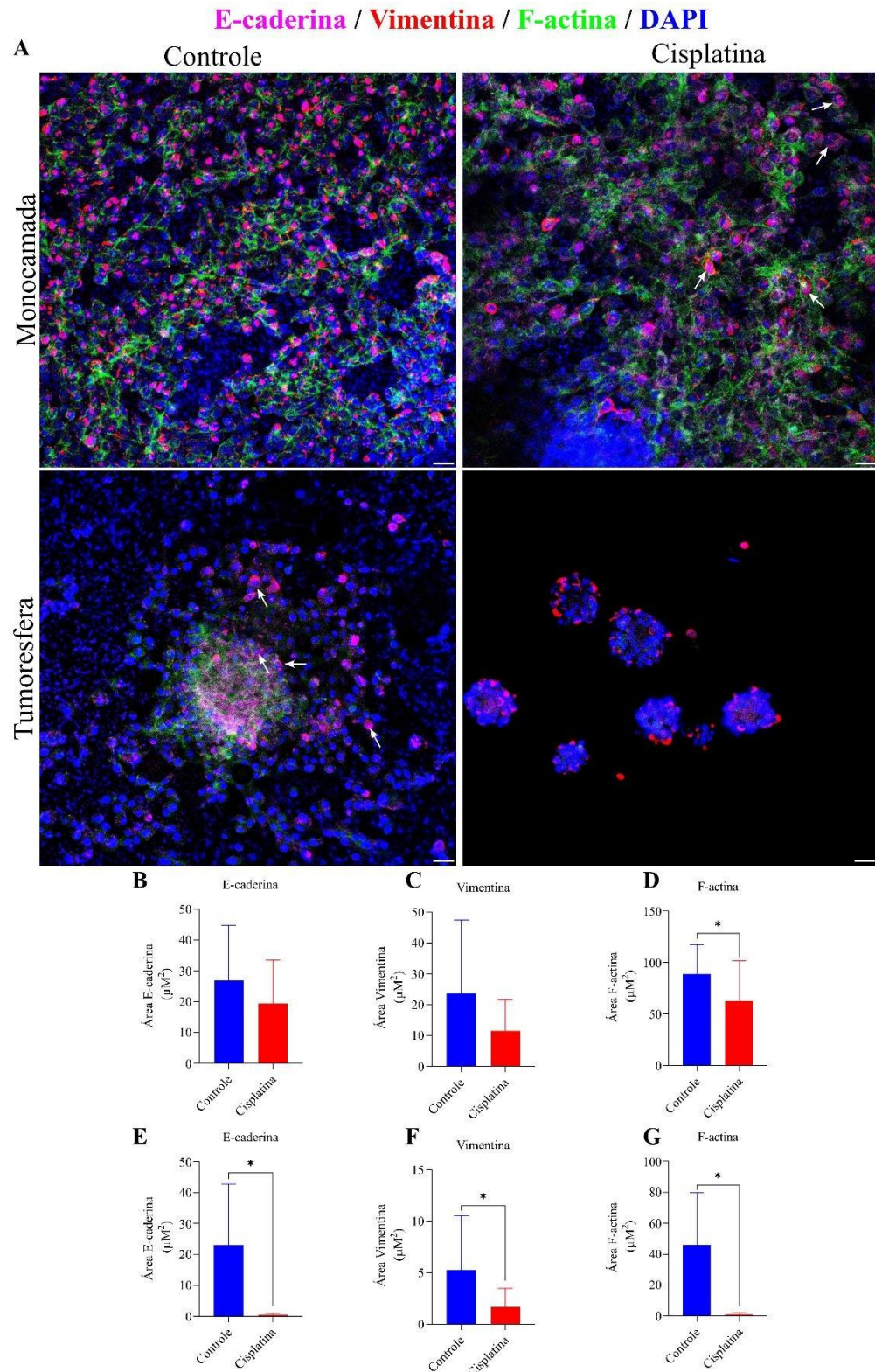


Figura 22. Co-cultura da linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas, LLC1, com neurônios sensoriais. (A) Imunofluorescência das células LLC1 nos modelos monocamada (MN) e tumoresfera (TE), co-cultivadas com neurônios sensoriais. Detectamos a presença de células positivas para o marcador epitelial E-caderina na MN tratada e TE controle, as quais eram também, em sua maioria, positivas para o marcador mesenquimal vimentina (setas brancas). Nossos achados mostraram que a co-cultura de células tumorais com neurônios sensoriais não afetou a expressão de E-caderina (B) e de vimentina (C), na monocamada. Entretanto, a monocamada tratada com

cisplatina diminuiu a produção de F-actina em relação a MN controle co-cultivada com os neurônios sensoriais (D). Observamos ainda que a co-cultura com neurônios sensoriais diminuiu a expressão de E-caderina (E), vimentina (F) e F-actina (G) na tumoresfera tratada com cisplatina. Teste: Mann-Whitney. Aumento 20x. Escala: 50 μ M.

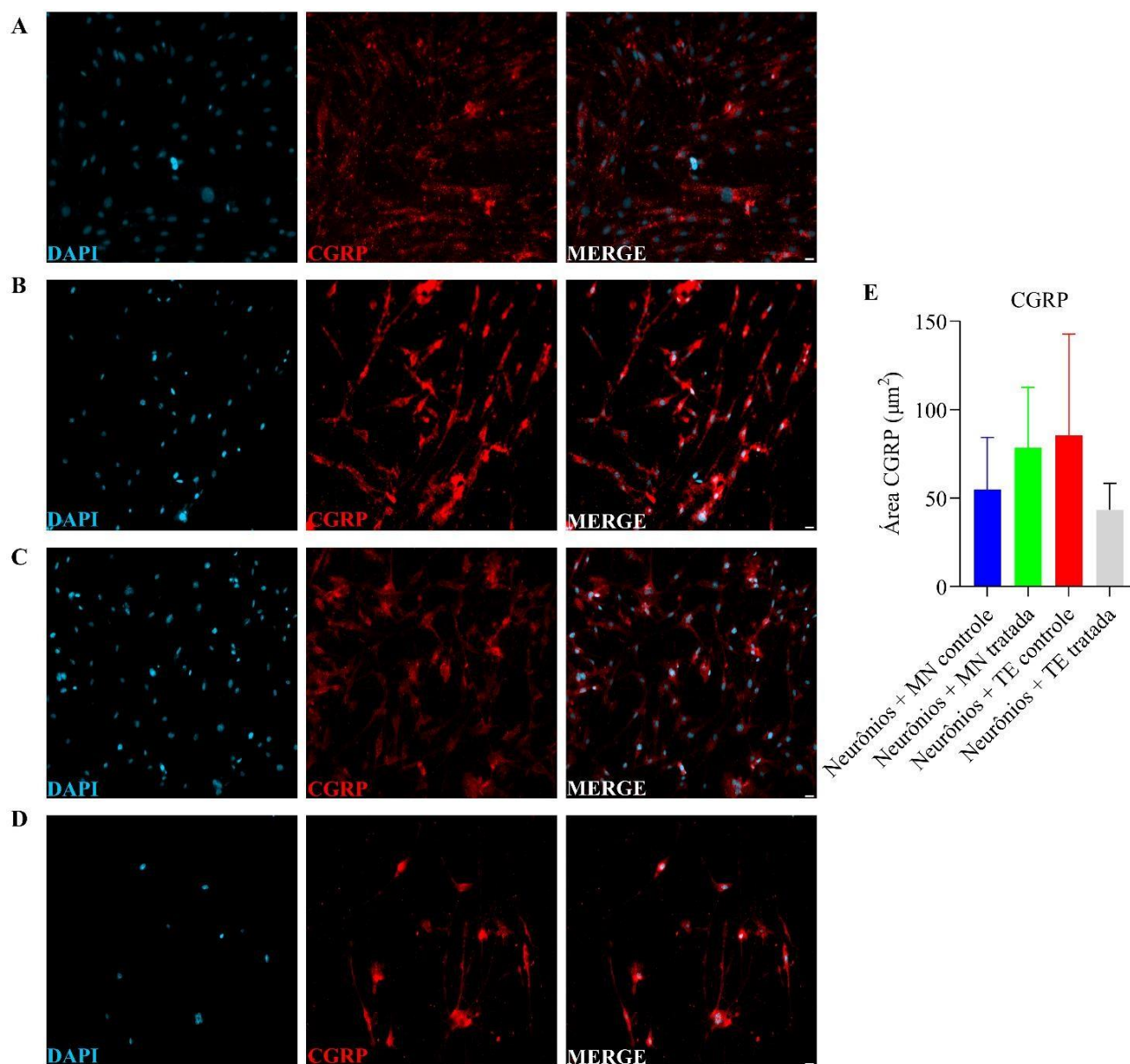


Figura 23. A expressão do neuropeptídeo CGRP não foi afetada nos neurônios sensoriais quando colocados em co-cultura com a linhagem celular LLC1 nos modelos monocamada (MN) ou tumoresfera (TE). (A) Neurônios em co-cultura com a MN das células LLC1, não tratada com cisplatina. (B) Neurônios em co-cultura com a MN das células LLC1, tratada com cisplatina. (C) Neurônios em co-cultura com a TE das células LLC1, não tratada com cisplatina. (D) Neurônios em co-cultura com a TE das células LLC1, tratada com cisplatina. (E) Análises estatísticas da expressão de CGRP nos neurônios sensoriais em co-cultura com células LLC1. Teste: Kruskal-Wallis pos hoc Dunn's * $p < 0,05$. Aumento 10x. Escala: 200 μ M. CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina.

5.6 Depleção química dos nervos sensoriais aumenta o crescimento do tumor primário

Para compreender como a depleção dos nervos sensoriais afeta na carcinogênese e evento EMT em *NSCLC*, efetuamos previamente a depleção farmacológica dos nervos sensoriais utilizando resiniferatoxina (RTX) por via subcutânea, três dias consecutivos com doses crescentes de 30, 70 e 100 $\mu\text{g} / \text{kg}$ (Figura 24 A). Para a confirmação da depleção dos neurônios sensoriais pelo RTX foram realizados dois testes comportamentais vinte dias após a última dose de RTX. No teste Tail Flick, uma fonte de calor é aplicada a 2 cm da ponta da cauda e o tempo necessário para o animal retirar sua cauda da fonte de calor é registrado como a latência do movimento da cauda. Nossos dados demonstraram claramente que o tempo de latência para os animais com os neurônios sensoriais depletados foi maior do que o grupo controle (Figura 24 B). O teste Randall Selitto consiste na aplicação de uma força mecânica crescente na pata direita até que resulte em uma resposta de retirada. Por meio deste teste, verificamos que o limiar de retirada da pata para os animais do grupo RTX foi maior do que o limiar dos animais do grupo controle, sem neurônios sensoriais depletados (Figura 24 C).

Vinte e oito dias após a depleção dos neurônios sensoriais com RTX, 5×10^5 células foram inoculadas no flanco esquerdo dos animais, diluídas em 50 μL de PBS 1x. A partir do 9º dia após o inóculo das células LLC1 (Figura 24 A) e desenvolvimento de um tumor palpável, um grupo de animais que não tiveram os neurônios sensoriais depletados com RTX foi tratado com cisplatina (1 mg/kg) via intraperitoneal (I.P), até o 22º dia, com intervalo de 3 dias entre cada dose. Na figura 24 D, observamos uma imagem macroscópica dos tumores oriundos de cada grupo experimental (PBS, Cisplatina e RTX). Durante os vinte e dois dias de desenvolvimento do tumor não observamos variações significativas no peso corporal dos animais entre os três grupos (Figura 24 E) e nem quando normalizamos o peso do tumor pelo peso corporal (Figura 24 H). Entretanto, observamos claramente que o volume e a área dos tumores do grupo RTX (Figura 24 F e I) foi maior em relação aos grupos PBS (controle) e cisplatina. E o peso dos tumores do grupo RTX foi maior em relação ao grupo controle (Figura 24 G).

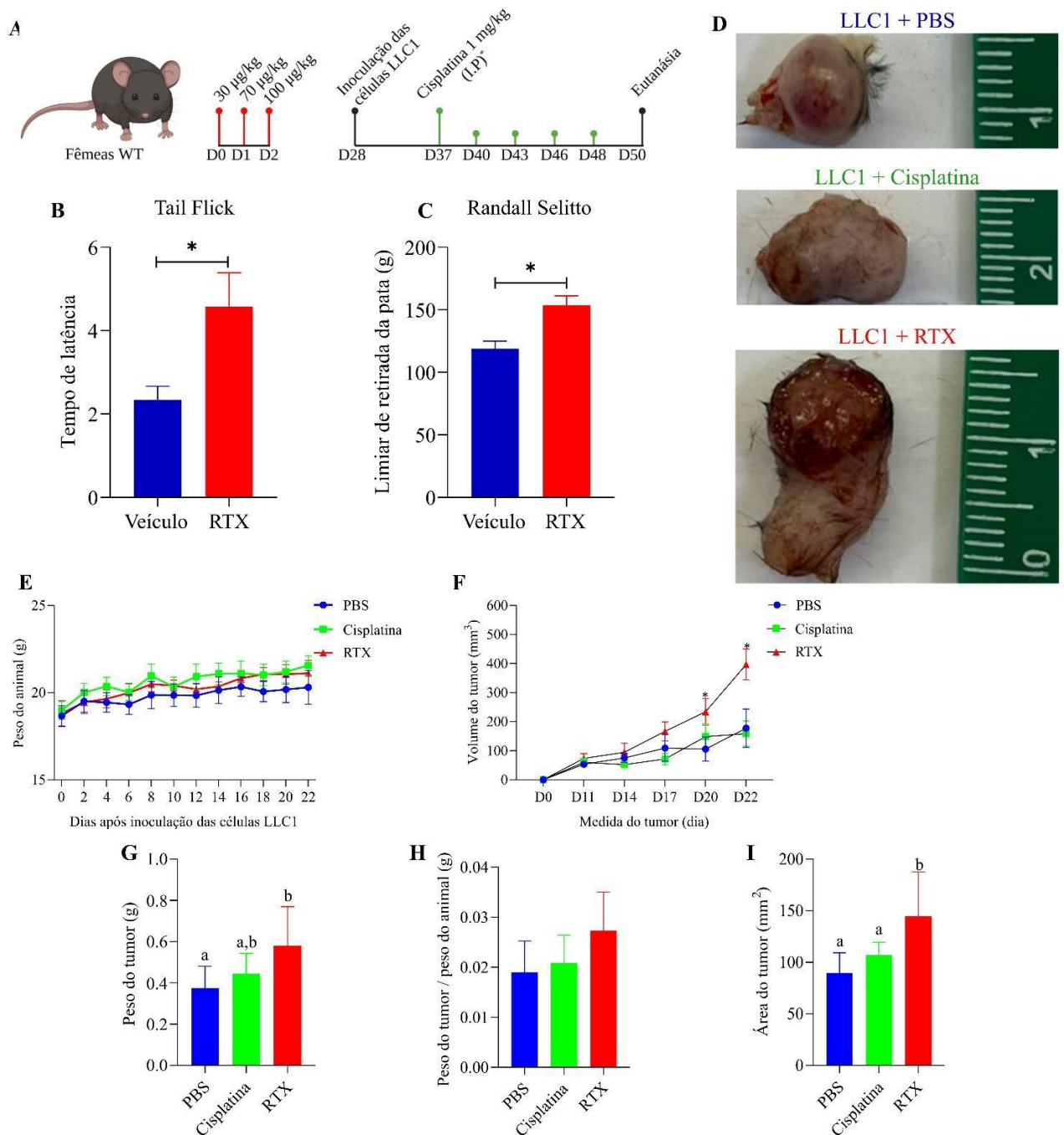


Figura 24. Depleção farmacológica dos nervos sensoriais com resineratoxina (RTX) promoveu aumento do volume, peso e área tumoral. (A) Delineamento experimental da depleção farmacológica utilizando RTX e do tratamento com cisplatina. (B) No teste Tail Flick, observamos que o tempo de latência (s) para os animais retirarem a cauda da fonte de calor, foi maior no grupo RTX do que o grupo tratado com o veículo (PBS). (C) No teste Randall Selitto, verificamos que o limiar de retirada da pata após aplicação de uma força mecânica, para os animais do grupo RTX, foi maior do que o limiar dos animais do grupo controle. (D) Imagens macroscópicas e representativas dos tumores coletados após eutanásia dos animais. (E) Registro do peso corporal dos animais durante o desenvolvimento dos tumores. (F) O volume tumoral no grupo RTX foi maior do que os grupos controle (PBS) e cisplatina. (G) O peso dos tumores no grupo RTX foi maior que o do grupo controle. (H) Peso do tumor normalizado pelo peso corporal dos animais. (I) A área dos tumores do grupo RTX foi maior do que os grupos

PBS e cisplatina. PBS (n=4), cisplatina (n=5) e RTX (n=7). Barras representam desvio padrão. Tail Flick e Randall Selitto: Teste T. Peso corporal e volume tumoral: Two-Way Anova pos hoc LSD. Peso do tumor e peso do tumor / peso corporal: One-Way Anova pos hoc LSD. Área do tumor: Kruskal-Wallis pos hoc Dunn's. * p <0,05.

5.7 Depleção química dos nervos sensoriais ou tratamento com cisplatina afeta produção de neuropeptídeos nos DRGs e no tumor primário

Para confirmar se o tratamento com RTX promoveu a depleção dos nervos sensoriais, avaliamos a presença do canal de sódio NaV 1.8 diretamente nos gânglios da raiz dorsal (DRGs). Demonstramos que de fato o tratamento com RTX depletou os neurônios sensoriais (Figuras 25-27). Além disso, o tratamento com cisplatina promoveu o mesmo efeito. Nossos resultados mostraram ainda que após o tratamento com cisplatina ou a depleção dos neurônios sensoriais com RTX, houve uma redução na marcação de CGRP e VIP (Figuras 25 e 27) nos DRGs, entretanto, observamos que expressão de SP (Figura 26) se manteve nos DRGs dos animais dos grupos cisplatina ou RTX. A marcação de β -tubulina III (TUBB3) nos DRGs nos mostrou ainda que, embora os neurônios sensoriais tenham sido afetados pelos tratamentos, outros subtipos de neurônios continuam presentes nos DRGs.

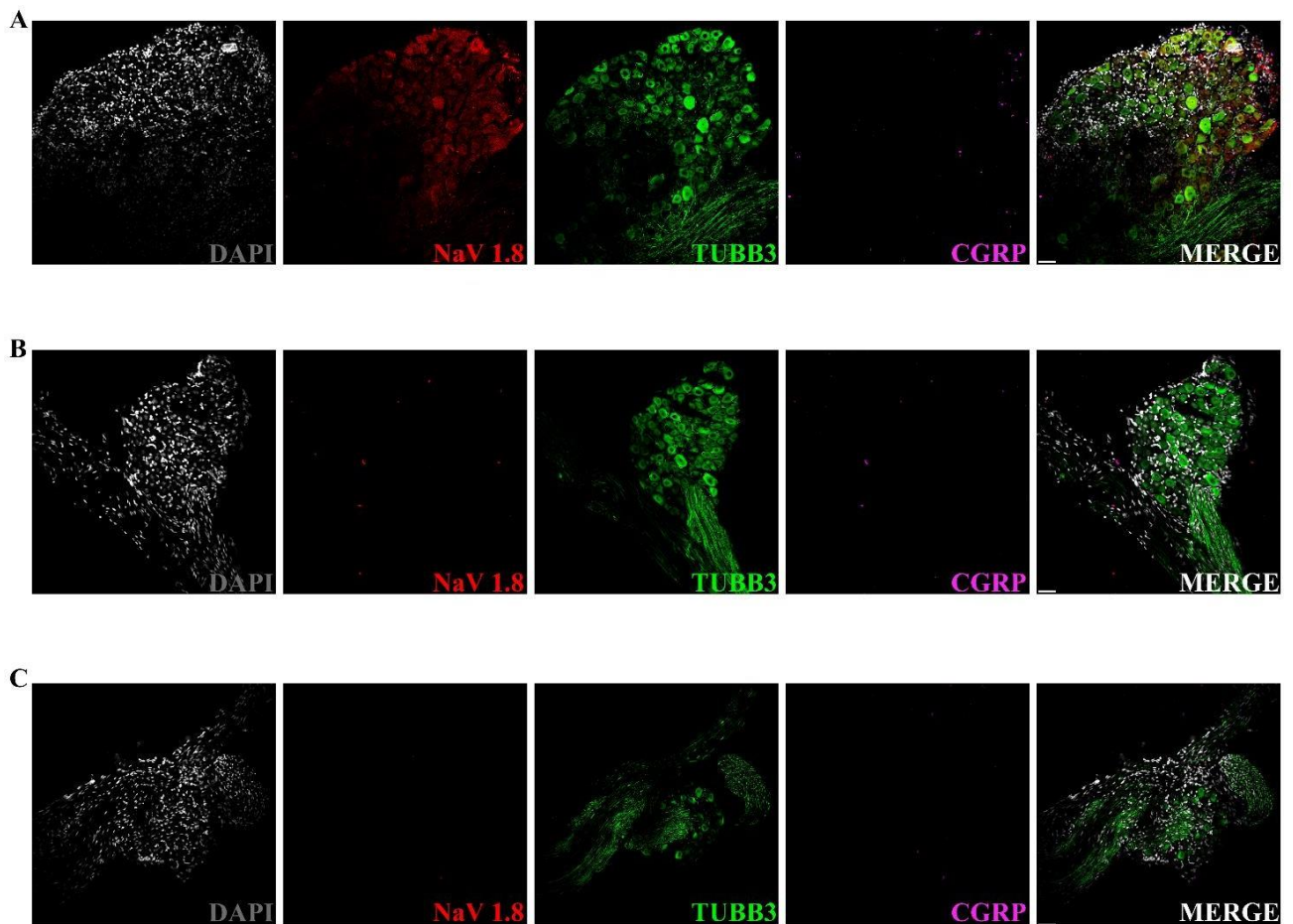


Figura 25. Gânglios da raiz dorsal (DRGs) de animais tratados com RTX ou cisplatina são negativos para o canal

de sódio NaV 1.8 e para o neuropeptídeo CGRP. DRGs representativos de animais dos grupos controle (PBS) (A), cisplatina (B) e RTX (C). Núcleos foram marcados com DAPI. NaV 1.8: canal de sódio voltagem dependente; TUBB3: β -tubulina III; CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. Aumento 20x. Escala: 50 μ M.

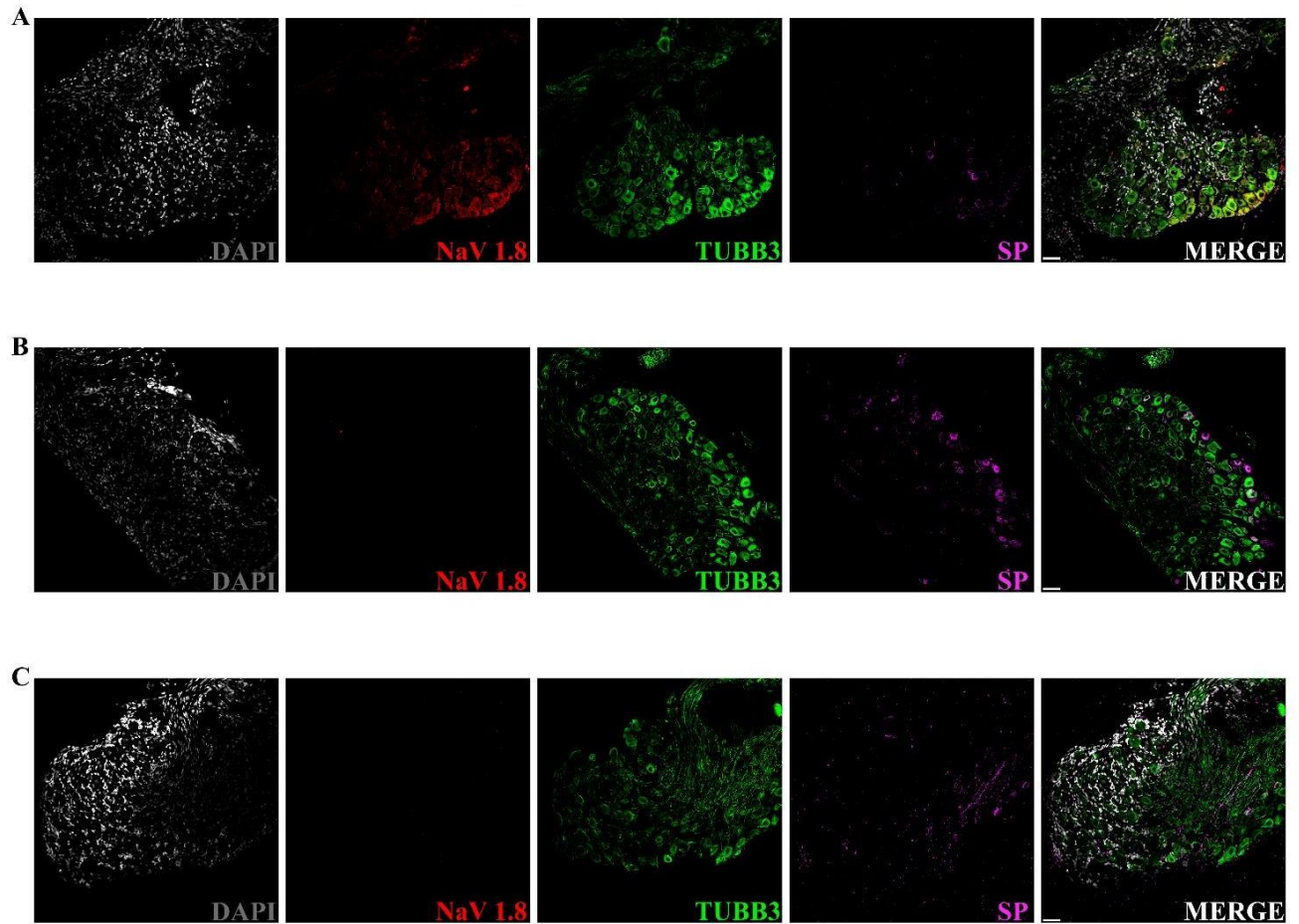


Figura 26. Gânglios da raiz dorsal (DRGs) de animais tratados com RTX ou cisplatina são negativos para o canal de sódio NaV 1.8 e positivos para o neuropeptídeo SP. DRGs representativos de animais dos grupos controle (PBS) (A), cisplatina (B) e RTX (C). Núcleos foram marcados com DAPI. NaV 1.8: canal de sódio voltagem dependente; TUBB3: β -tubulina III; SP: Substância P. Aumento 20x. Escala: 50 μ M.

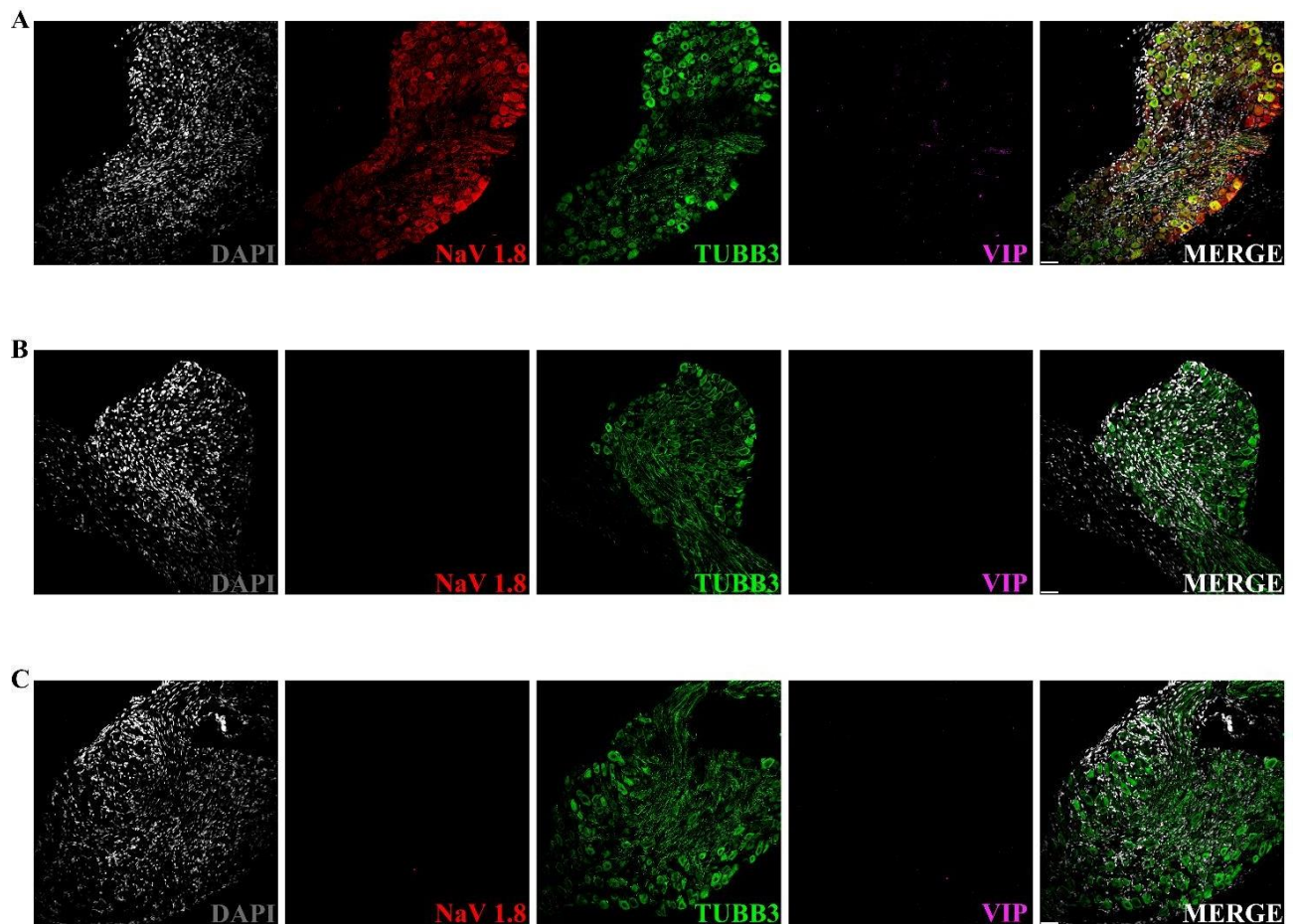


Figura 27. Gânglios da raiz dorsal (DRGs) de animais tratados com RTX ou cisplatina são negativos para o canal de sódio NaV 1.8 e para o neuropeptídeo VIP. DRGs representativos de animais dos grupos controle (PBS) (A), cisplatina (B) e RTX (C). Núcleos foram marcados com DAPI. NaV 1.8: canal de sódio voltagem dependente; TUBB3: β -tubulina III; VIP: peptídeo vasoativo intestinal. Aumento 20x. Escala: 50 μ M.

Para identificar a presença de fibras nervosas sensoriais em diferentes estágios de desenvolvimento do câncer de pulmão, inoculamos células LLC1 em animais NaV 1.8^{cre}/tDtomato, portanto, todas as fibras de neurônios sensoriais (NaV 1.8⁺) possuem a proteína fluorescente vermelha tDtomato. Fibras sensoriais são observadas no 14º dia (Figura 28 A) e 22º dia (Figura 28 B). Observamos que essas fibras nervosas sensoriais estão localizadas ao redor, mas também dentro do tumor, próximo a vasos sanguíneos (CD31⁺). Quantificação das fibras utilizando o software Image J mostrou que não havia diferença na quantidade de fibras tDtomato⁺, entre o 14º e 22º dia (Figura 28 C).

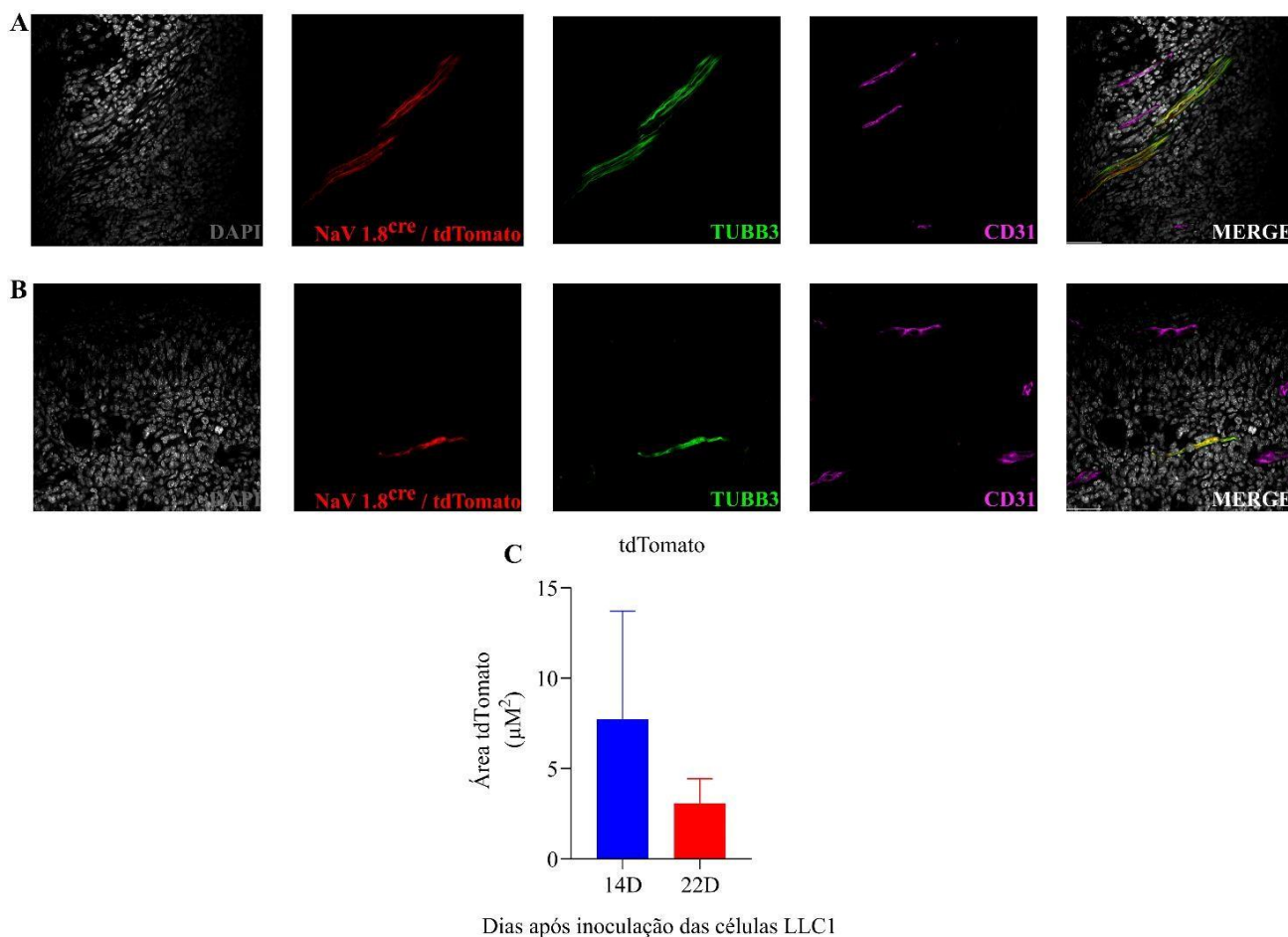


Figura 28. Fibras de neurônios sensoriais estão presentes em diferentes momentos durante o desenvolvimento do câncer de pulmão. Para identificar a presença de fibras sensoriais no 14º dia (A) e 22º dia (B) do desenvolvimento do câncer de pulmão, inoculamos células LLC1 em animais NaV 1.8^{cre}/tdTomato, portanto, todas as fibras de neurônios sensoriais (NaV 1.8⁺) possuem a proteína fluorescente vermelha tdTomato. Observamos que essas fibras nervosas sensoriais estão localizadas ao redor, mas também dentro do tumor, próximo a vasos sanguíneos (CD31⁺). Quantificação das fibras utilizando o software Image J mostrou que não havia diferença na quantidade de fibras tdTomato⁺, entre o 14º e 22º dia (C). Núcleos foram marcados com DAPI. NaV 1.8: canal de sódio voltagem dependente; TUBB3: β-tubulina III; CD31: molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1). n= 3. Aumento 40x. Escala: 50 μM. Teste: Mann-Whitney.

Nosso próximo passo foi analisar fibras nervosas sensoriais (NaV 1.8⁺) e os neuropeptídeos CGRP, SP e VIP, nos tumores dos grupos controle (PBS), cisplatina e RTX. Semelhante aos resultados obtidos nas imunofluorescências dos DRGs, observamos que o tratamento com cisplatina ou a depleção com RTX afetou a presença de nervos sensoriais no tumor primário e também dos neuropeptídeos CGRP e VIP (Figuras 29 e 31). Entretanto, ao avaliarmos a presença de SP nos tumores dos grupos cisplatina e RTX, observamos que outras células expressavam este neuropeptídeo, e não fibras nervosas (figura 30). É importante

destacar que, assim como nos DRGs, em todos os tumores observamos a presença do marcador de neurônios maduros β -tubulina III, indicando que outras fibras neuronais estão presentes no tumor.

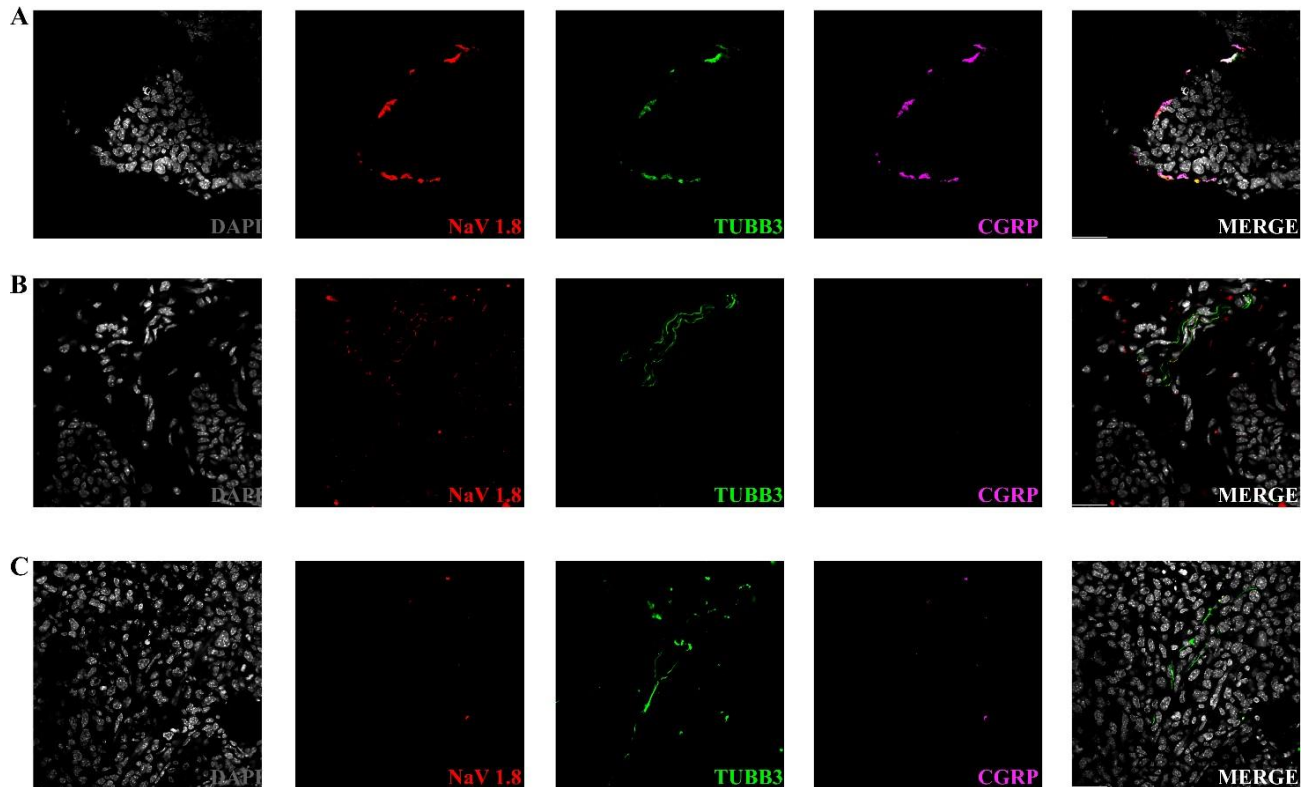


Figura 29. O tratamento com RTX promoveu a depleção de fibras sensoriais e do neuropeptídeo CGRP no tumor primário. (A) Fibras nervosas sensoriais NaV 1.8⁺ e o neuropeptídeo CGRP estão presentes no tumor primário oriundo do inóculo de células LLC1 em animais do grupo controle (PBS). (B) O tratamento dos animais com o quimioterápico cisplatina reduziu drasticamente a marcação do canal de sódio NaV 1.8 e da expressão de CGRP. (C) Ausência de fibras sensoriais NaV 1.8⁺ e do neuropeptídeo CGRP nos tumores primários de animais tratados com RTX. Em todos os tumores, observamos a presença do marcador de neurônios maduros TUBB3, indicando que outras fibras neuronais estão presentes no tumor. Núcleos foram marcados com DAPI. NaV 1.8: canal de sódio voltagem dependente; TUBB3: β -tubulina III; CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. Aumento 40x. Escala: 50 μ M.

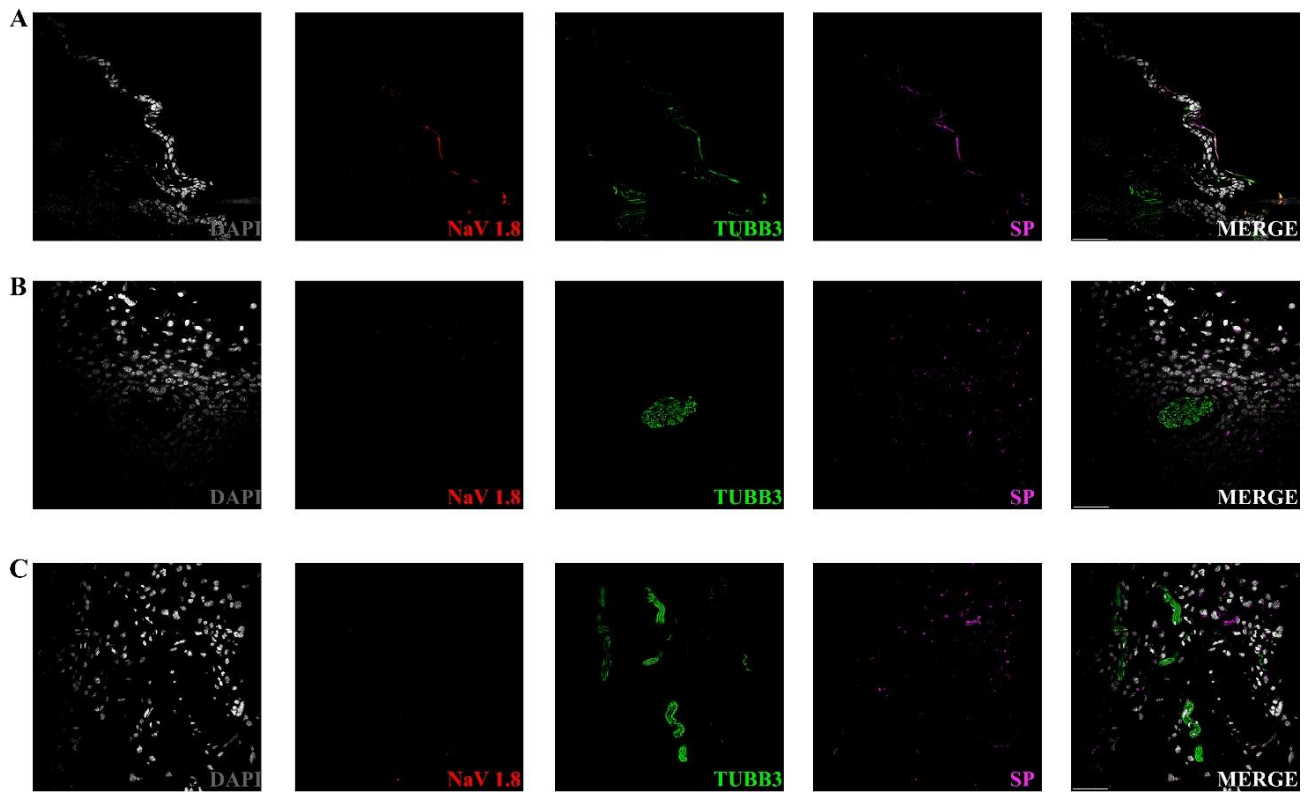


Figura 30. Depleção dos nervos sensoriais promoveu a expressão do neuropeptídeo SP por outras células no tumor primário. (A) Fibras nervosas sensoriais positivas para NaV 1.8 e o neuropeptídeo SP estão presentes no tumor primário oriundo do inóculo de células LLC1 em animais do grupo controle (PBS). (B) Ausência de fibras sensoriais NaV 1.8⁺ após o tratamento com cisplatina. Outros tipos celulares apresentam marcação para SP. (C) Ausência de fibras sensoriais NaV 1.8⁺ nos tumores primários de animais tratados com RTX. Assim como o grupo de animais tratados com o quimioterápico cisplatina, no grupo RXT observamos que outras células eram positivas para SP. Em todos os tumores, observamos a presença do marcador de neurônios maduros TUBB3, indicando que outras fibras neuronais estão presentes no tumor. Núcleos foram marcados com DAPI. NaV 1.8: canal de sódio dependente; TUBB3: β -tubulina III; SP: substância P. Aumento 40x. Escala: 50 μ M.

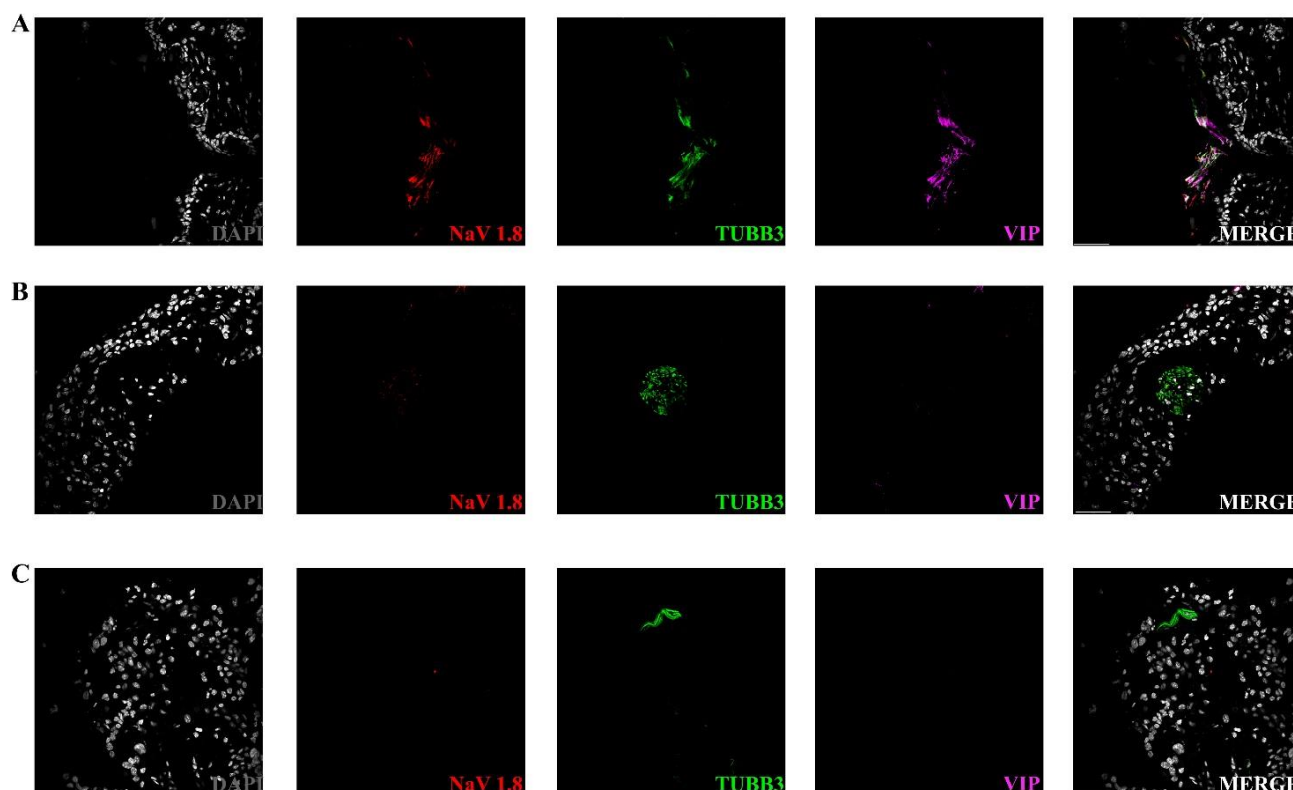


Figura 31. O tratamento com RTX ou cisplatina promoveu a depleção de fibras sensoriais e do neuropeptídeo VIP no tumor primário. (A) Fibras nervosas sensoriais NaV 1.8⁺ e o neuropeptídeo VIP estão presentes no tumor primário oriundo do inóculo de células LLC1 em animais do grupo controle (PBS). Fibras sensoriais NaV 1.8⁺ e o neuropeptídeo VIP não foram observados nos tumores de animais tratados com cisplatina (B) ou nos tumores primários de animais tratados com RTX (C). Em todos os tumores, observamos a presença do marcador de neurônios maduros TUBB3, indicando que outras fibras neuronais estão presentes no tumor. Núcleos foram marcados com DAPI. NaV 1.8: canal de sódio voltagem dependente; TUBB3: β -tubulina III; VIP: peptídeo vasoativo intestinal. Aumento 40x. Escala: 50 μ M.

5.8 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais aumenta o número de metástases no pulmão

Análises histológicas indicaram tumores pleiomórficos caracterizados por inúmeras figuras de mitose, por sua vez atípicas, principalmente no grupo cisplatina (Figura 32 A). Análises histológicas dos pulmões mostraram metástases nos grupos cisplatina e RTX (Figura 32 B). Nenhum animal do grupo controle (PBS) apresentou áreas de metástases, somente infiltrados inflamatórios perto de bronquíolos terminais (setas amarelas). Os focos metastáticos nos grupos cisplatina e RTX (linhas amarelas tracejadas) estão principalmente ao redor de vasos sanguíneos (setas vermelhas). O número de metástases nos pulmões do grupo RTX foi maior, comparado aos grupos controle e tratado com cisplatina.

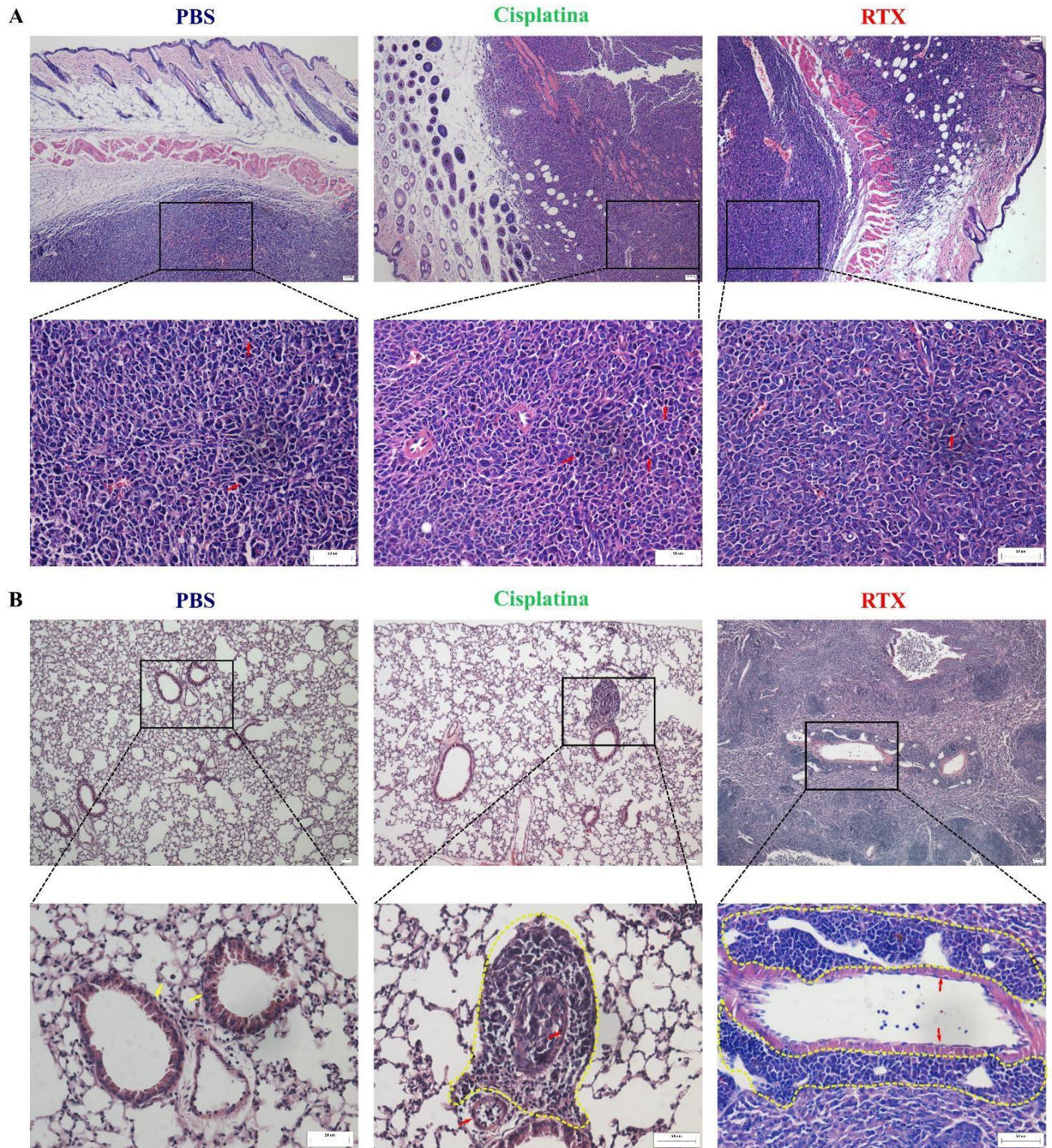


Figura 32. Depleção farmacológica dos neurônios sensoriais com RTX impulsionou a migração de células do tumor primário para o pulmão. (A) Análises histológicas dos tumores. Setas vermelhas indicam figuras de mitose atípicas. (B) Análises histológicas dos pulmões mostraram metástases nos grupos cisplatina e RTX. Nenhum animal do grupo PBS apresentou áreas de metástases, somente infiltrados inflamatórios perto de bronquíolos terminais (setas amarelas). Os focos metastáticos nos grupos cisplatina e RTX (linhas amarelas tracejadas) estão principalmente ao redor de vasos sanguíneos (setas vermelhas). Visualmente, as áreas de metástases pulmonares do grupo RTX foram maiores, comparado aos grupos controle e tratado com cisplatina. Espessura dos cortes: 4 μM . Aumento 40x. Escala: 50 μM .

5.9 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais ou tratamento com cisplatina afetou subpopulações celulares com características de CSCs ou de células imunes

Para compreender como a depleção dos nervos sensoriais utilizando RTX ou o tratamento com o quimioterápico cisplatina afeta diferentes subpopulações celulares no tumor primário de pulmão, efetuamos uma imunofenotipagem por citometria de fluxo, utilizando painéis específicos para células com perfil de CSCs ($CD24^+ / CD44^+ / CD133^+ / ALDH^+$) e células do sistema imunológico, tais como: células NK ($CD45^+/NK1.1^+/CD3^-$), NKT ($CD45^+/NK1.1^+/CD3^+$), linfócitos T CD4 ($CD45^+/CD3^+/CD4^+$) e linfócitos T CD8 ($CD45^+/CD3^+/CD8^+$). A estratégia de gates utilizada para seleção das células com perfil CSCs foi a mesma representada nas figuras 13 e 15. Para identificação das células imunológicas, utilizamos a estratégia de gates representada na figura 33.

Nossos dados mostraram que a porcentagem de células $CD44^+$ e $CD44^+/CD133^+$ (*CSCs-like*) totais aumentou após o tratamento com cisplatina. Por outro lado, a depleção dos neurônios sensoriais com RTX reduziu essas subpopulações (Figura 34 A). Observamos ainda que a depleção dos neurônios sensoriais com RTX ou o tratamento com cisplatina diminuiu as subpopulações celulares $Ki-67^-/CD44^+/CD133^+$ e $Ki-67^+/CD44^+/CD133^+$ (Figura 34 B e C). Nossos achados mostraram ainda que o tratamento com cisplatina promoveu um aumento da porcentagem de células $Ki-67^+$ (Figura 34 C). A subpopulação celular $Ki-67^+/CD44^+$ reduziu drasticamente após o tratamento com cisplatina. Nos tumores de animais com neurônios sensoriais depletados por RTX, a subpopulação celular $Ki-67^+/CD133^+$ também foi afetada, comparado aos outros dois grupos. E células duplamente positivas e que estão em estágio proliferativo ($Ki-67^+$) diminuíram nos grupos cisplatina e RTX em relação ao controle. Em relação ao perfil de células $CD24^+$ (Figura 34 D) e $ALDH^+$ (Figura 34 E), a porcentagem dessas subpopulações foi menor no grupo RTX.

Neste trabalho, mostramos ainda que a depleção dos neurônios sensoriais com RTX ou o tratamento com cisplatina afetou diferentes subpopulações de células imunológicas. A depleção dos neurônios sensoriais com RTX reduziu a população total de células $CD45^+$, NK e $NK/FOXP3^+$ no tumor primário (Figura 35 A-C). Em relação às subpopulações de células NKT e $NKT/FOXP3^+$ (Figura 35 D e E), o tratamento com cisplatina promoveu uma diminuição dessas subpopulações em relação ao grupo controle (PBS). A depleção dos neurônios sensoriais com RTX ou o tratamento com cisplatina promoveu o mesmo efeito nas subpopulações de linfócitos CD3 totais, linfócitos T CD4 e T $CD4/FOXP3^+$ (Figura 35 F-H). Já o infiltrado de linfócitos T CD8⁺ e T $CD8^+/FOXP3^+$ foi muito maior no grupo cisplatina do que nos grupos

controle ou RTX (Figura 35 I).

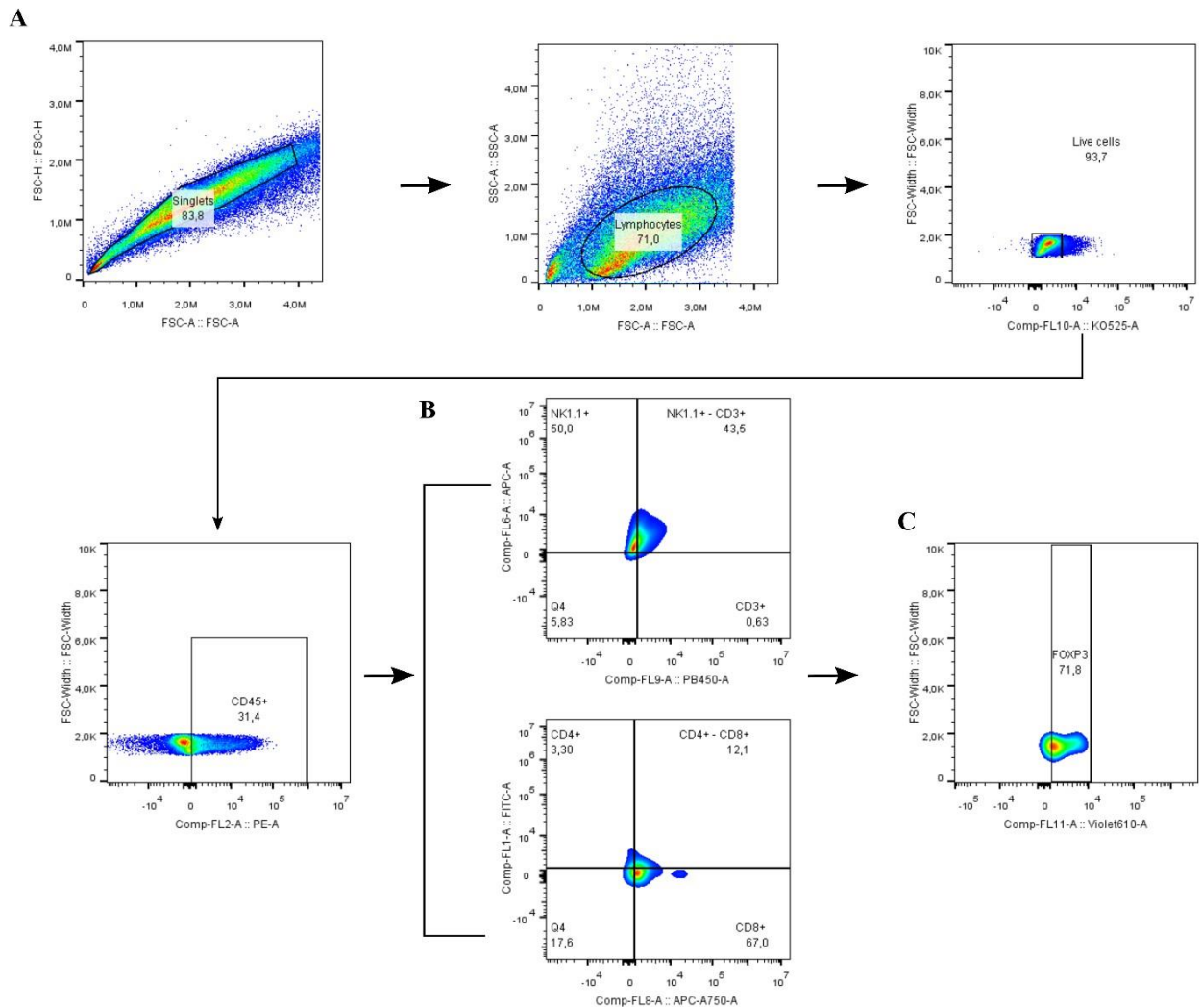


Figura 33. Estratégia de gates utilizada para identificação de infiltrado de linfócitos no tumor. (A) Agregados celulares foram eliminados utilizando os parâmetros FSC-H e FSC-A. Em seguida a população de linfócitos foi selecionada com base nos valores de granulosidade/complexidade interna (SSC – *side scatter*) e de tamanho (FSC – *forward scatter*). A discriminação de células vivas e mortas foi realizada utilizando sondas Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain. Em seguida, selecionamos todas as células CD45⁺. (B) Dentro da população de células CD45⁺, avaliamos a presença de células NK (NK1.1⁺/ CD3⁻), NKT (NK1.1⁺/ CD3⁺), linfócitos T CD4 (CD3⁺/ CD4⁺) e linfócitos T CD8 (CD3⁺/ CD8⁺). (C) Além disso, dentro de todas as populações avaliamos a presença de células FOXP3⁺.

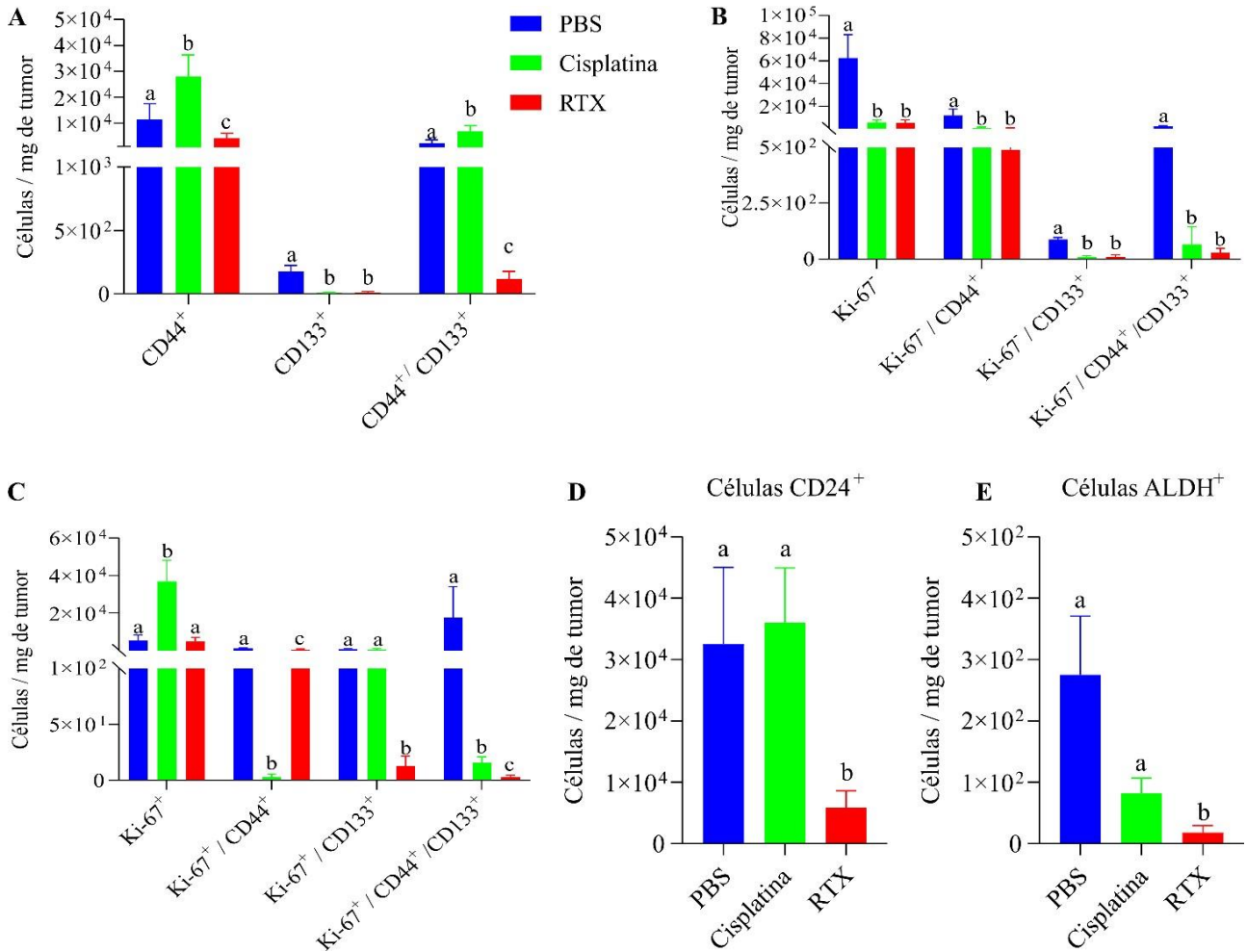


Figura 34. Depleção dos neurônios sensoriais com RTX ou o tratamento com cisplatina diminuiu a subpopulação de CSCs CD44⁺/CD133⁺ dentro da população de células não proliferativas (Ki-67⁻) e em proliferação (Ki-67⁺). (A) Em relação ao grupo controle (PBS), a porcentagem de células CD44⁺ e CD44⁺/CD133⁺ (CSCs-like) totais aumentou após o tratamento com cisplatina. Por outro lado, a depleção dos nervos sensoriais com RTX promoveu a diminuição dessas subpopulações no tumor primário. O tratamento com cisplatina ou depleção prévia de neurônios sensoriais com RTX tiveram o mesmo efeito na população de células CD133⁺. (B) A porcentagem de células em estágio não proliferativo (Ki-67⁻) é menor nos grupos cisplatina e RTX em relação ao grupo controle. Assim como todas as demais subpopulações que se encontram dentro do grupo Ki-67⁻. Entretanto, observamos que a maior parte das células dos tumores oriundos do tratamento com cisplatina se encontram dentro da população Ki-67⁺ (C), portanto, em estágio proliferativo. A subpopulação celular Ki-67⁺/CD44⁺ reduziu drasticamente após o tratamento com cisplatina. Nos tumores de animais com neurônios sensoriais depletados por RTX, a subpopulação celular Ki-67⁺/CD133⁺ também foi afetada, comparado aos outros dois grupos. E células que pertencem de fato ao perfil CSCs-like e que estão em estágio proliferativo (Ki-67⁺) diminuíram nos grupos cisplatina e RTX em relação ao controle. (D) A depleção dos neurônios sensoriais com RTX diminuiu a porcentagem de células CD24⁺ e ALDH⁺ (E). PBS (n=4), cisplatina (n=5) e RTX (n=7). Quantidade de células positivas foram normalizadas pelo peso (mg) dos tumores. Teste (A-C): Two-way Anova pos hoc LSD. Teste (D-E): Kruskal-Wallis pos hoc Dunn's. Dados representados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam valor de p < 0,05.

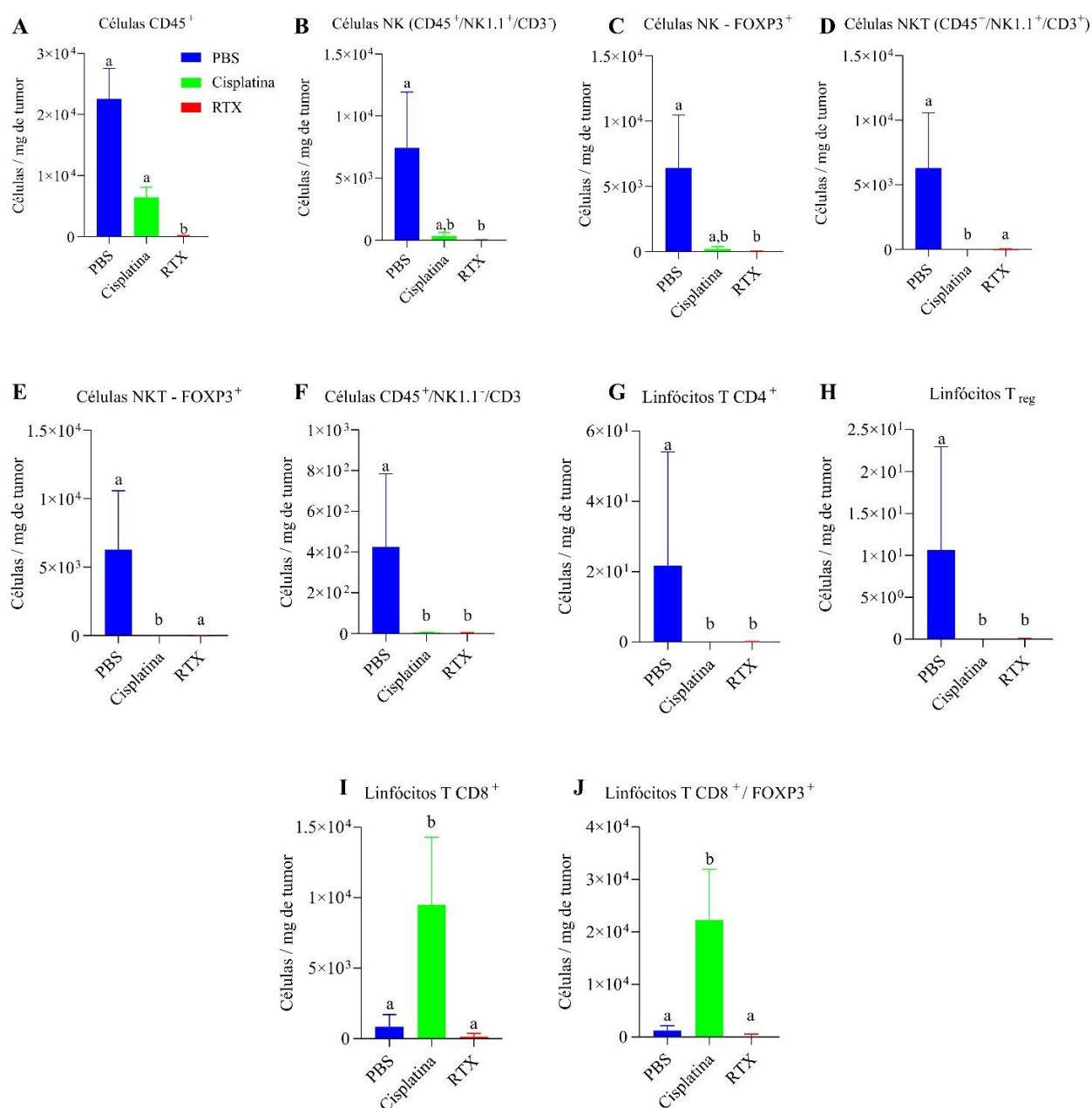


Figura 35. A depleção dos neurônios sensoriais com RTX ou o tratamento com cisplatina afetaram as subpopulações de células do sistema imunológico. (A) A depleção dos neurônios sensoriais com RTX reduziu a população total de células CD45⁺, (B) NK e (C) NK/FOXP3⁺ no tumor primário. (D) Em relação às células NKT e (E) NKT/FOXP3⁺, o tratamento com cisplatina promoveu uma diminuição dessas subpopulações em relação ao grupo controle (PBS). A depleção dos neurônios sensoriais com RTX ou o tratamento com cisplatina promoveu o mesmo efeito nas subpopulações de linfócitos CD3 totais (F), linfócitos T CD4 (G) e T CD4/FOXP3⁺ (H). (I) O infiltrado de linfócitos T CD8⁺ e (J) T CD8⁺/FOXP3⁺, foi muito maior no grupo cisplatina do que nos grupos controle ou RTX. PBS (n=4), cisplatina (n=5) e RTX (n=7). Quantidade de células positivas foram normalizadas pelo peso (mg) dos tumores. Teste: Kruskal-Wallis pos hoc Dunn's. Dados representados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam valor de p < 0,05.

5.10 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais ou tratamento com cisplatina afetou o perfil transcriptômico de genes reguladores do fenômeno EMT, pluripotência e apoptose

Para entender como a depleção dos neurônios sensoriais ou o tratamento com cisplatina afeta o perfil transcriptômico de genes relacionados ao fenômeno de transição epitélio-mesenquimal e manutenção de células tronco do câncer, células imunológicas e morte celular programada por apoptose, avaliamos a expressão de diferentes alvos por PCR em tempo real quantitativa (qPCR).

Nossos resultados mostraram que os genes de pluripotência *Nanog*, *Sox2* e *Oct-4*, foram regulados positivamente nos grupos cisplatina e RTX (Figura 36 A). Mostramos ainda que a depleção dos nervos sensoriais ou o tratamento com cisplatina afetou a expressão do mRNA dos genes reguladores da EMT (Figura 36 B), especialmente dos genes *E-caderina*, *Vimentina* e *Twist*. O gene da E-caderina estava subexpresso no grupo RTX e os transcritos *Vimentina* e *Twist* foram regulados positivamente no mesmo grupo, já no grupo cisplatina, observamos resultados inversos. Em relação aos genes envolvidos na resposta imunológica, observamos diferenças estatisticamente significativas para *IL-12* e *IFN- γ* (Figura 36 C). No grupo cisplatina, *IL-12* foi regulado negativamente e *IFN- γ* positivamente, enquanto no grupo RTX os resultados foram opostos, *IL-12* foi regulado positivamente e *IFN- γ* negativamente.

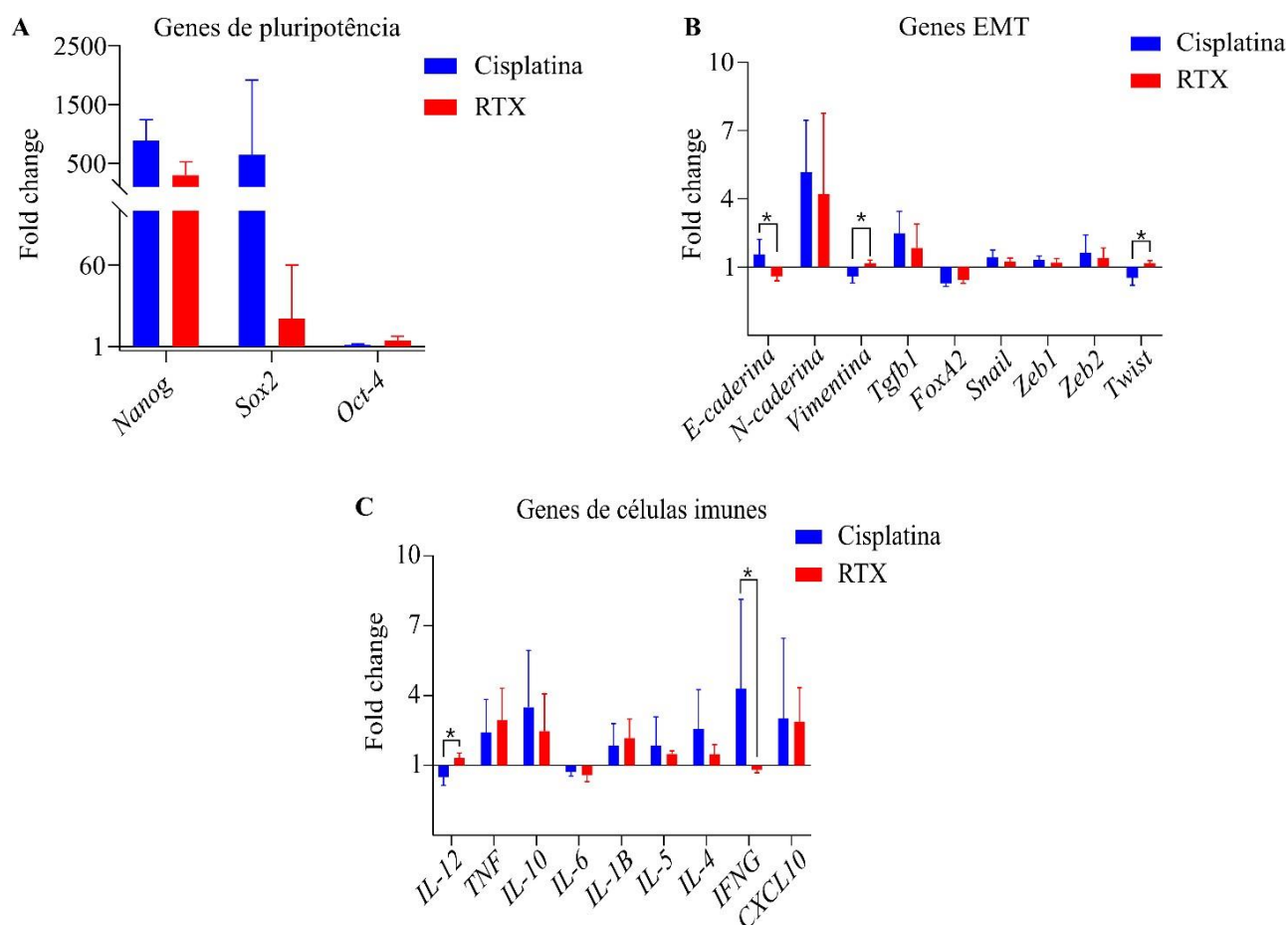


Figura 36. Análise do mRNA dos genes associados ao evento EMT, pluripotência e células do sistema imunológico nos tumores de animais com nervos sensoriais depletados com RTX ou tratados com cisplatina. (A) Depleção farmacológica dos nervos sensoriais ou tratamento com cisplatina regulou positivamente a expressão dos genes de pluripotência *Nanog*, *Sox2* e *Oct-4*, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. (B) A depleção dos nervos sensoriais ou o tratamento com cisplatina afetou a expressão do mRNA dos genes reguladores da EMT. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os dois grupos em relação à expressão relativa de *E-caderina*, *Vimentina* e *Twist*. (C) Análise dos transcritos envolvidos na resposta imunológica mostrou diferença estatisticamente significativa para o mRNA de *IL-12* e *IFN-gamma*. PBS (n=4), cisplatina (n=5) e RTX (n=7). A quantificação relativa foi realizada com base no perfil de expressão dos alvos no grupo PBS (amostra calibradora). O Ct de cada alvo foi normalizado de acordo com o Ct dos controles endógenos β -actina e *RPS26*. Teste: Mann-Whitney. * p < 0,05.

Neste trabalho, avaliamos ainda a expressão de 85 genes relacionados à morte celular programada por apoptose utilizando um ensaio da Qiagen (*Mouse Apoptosis*). Desses 85 genes, 41 estavam diferencialmente expressos entre os dois grupos (cisplatina e RTX) (Figura 37). Desses 41 genes, 3 deles estavam subexpressos no grupo RTX em relação ao grupo cisplatina, são eles *Abl1*, *Diablo* e *Igf1r*. 35 genes foram regulados positivamente somente no grupo RTX:

Aifm1, Akt1, Apaf1, Atf5, Bag3, Bak, Bcl2, Bcl2l2, Bcl2l10, Bcl2l1, Bid, Birc3, Bnip2, Bnip3, Bnip3l, Card10, Casp3, Casp6, Casp8, CD70, Cflar, Cidea, Cideb, Dad, Fadd, Lhx4, Ltr, Mcl1, Nap2, Nme5, Nod, Prdx2, Traf2, Traf3 e Xiap. E 3 genes estavam superexpressos em ambos grupos porém em maior quantidade no grupo cisplatina, são eles: *Bax, Casp14 e CD40lg*. Para melhor interpretação e visualização dos dados, representamos os 41 genes diferencialmente expressos em forma de um *heatmap* (Figura 38).

Os outros 44 genes que não tiveram diferença entre os grupos cisplatina e RTX, são: *Anxa5, Api5, Bad, Bag1, Bcl10, Bcl2a1a, Bcl2l11, Birc2, Birc5, Bok, Casp1, Casp2, Casp4, Casp7, Casp9, Casp12, Cd40, Cradd, Dapk1, Dffa, Dffb, Fas, Fasl, Gadd45a, Hsp90ab1, Il10, Mapk1, Naip1, Nfkb1, Nol3, Polb, Pycard, Ripk1, Tnf, Tnfrsf10b, Tnfrsf11b, Tnfrsf1a, Tnfsf10, Tnfsf12, Traf1, Trp53, Trp63, Trp73 e Trp53bp2*. A análise estatística desses genes pode ser encontrada na figura suplementar 1.

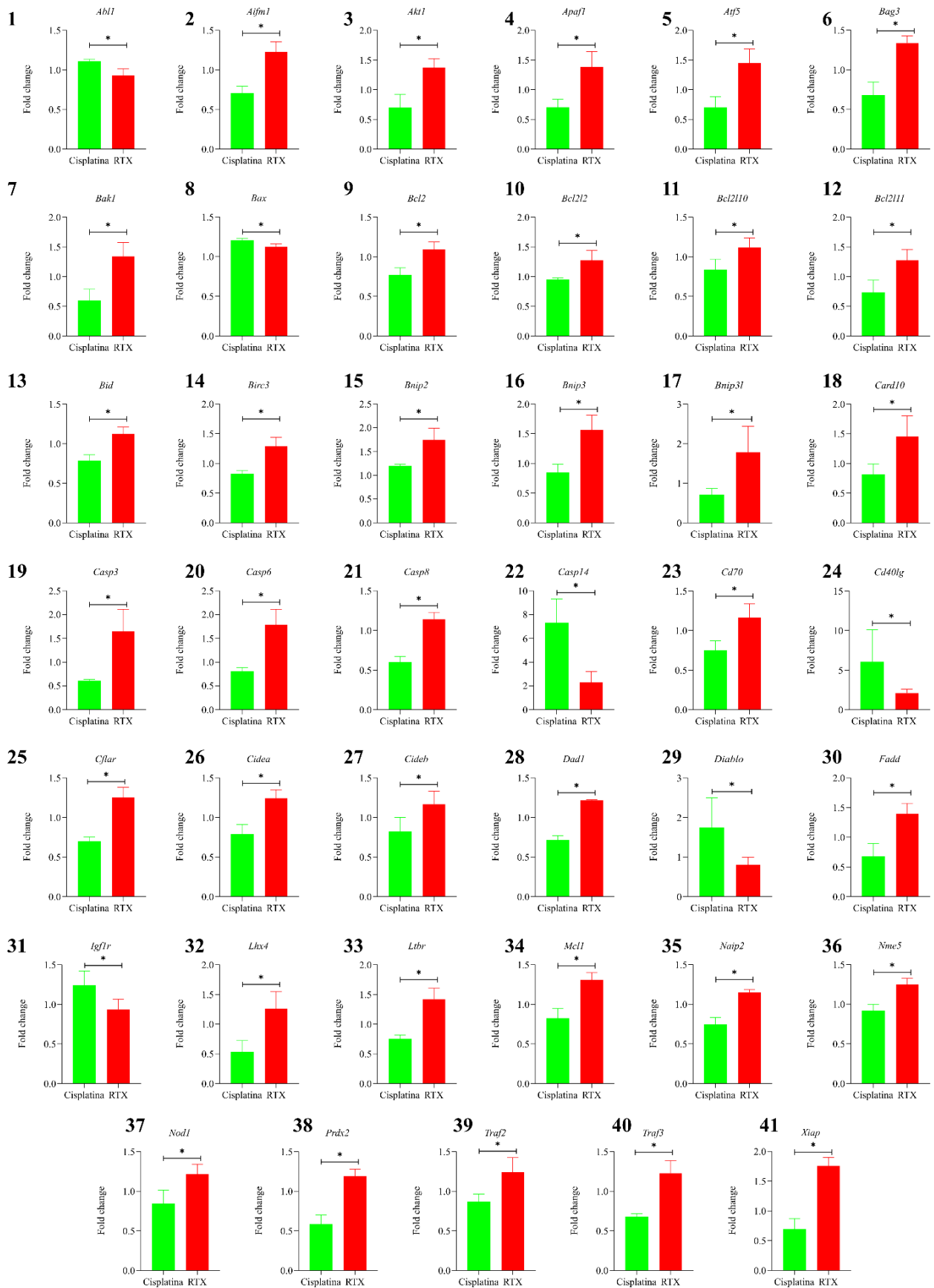


Figura 37. Análise estatística da expressão dos transcritos associados à morte celular programada por apoptose, nos tumores de animais com nervos sensoriais depletados com RTX ou tratados com cisplatina. Neste trabalho,

avaliamos a expressão de 85 genes relacionados à apoptose, sendo que 41 desses genes estavam diferencialmente expressos entre os dois grupos (cisplatina e RTX). Desses 41 genes, 3 deles estavam subexpressos no grupo RTX em relação ao grupo cisplatina, são eles *Abl1* (1), *Diablo* (29) e *Igf1r* (31). 35 genes foram regulados positivamente somente no grupo RTX: *Aifm1* (2), *Akt1* (3), *Apaf1* (4), *Atf5* (5), *Bag3* (6), *Bak1* (7), *Bcl2* (9), *Bcl2l2* (10), *Bcl2l10* (11), *Bcl2l11* (12), *Bid* (13), *Birc3* (14), *Bnip2* (15), *Bnip3* (16), *Bnip3l* (17), *Card10* (18), *Casp3* (19), *Casp6* (20), *Casp8* (21), *CD70* (23), *Cflar* (25), *Cidea* (26), *Cideb* (27), *Dad1* (28), *Fadd* (30), *Lhx4* (32), *Ltbr* (33), *Mcl1* (34), *Nap2* (35), *Nme5* (36), *Nod1* (37), *Prdx2* (38), *Traf2* (39), *Traf3* (40) e *Xiap* (41). E 3 genes estavam superexpressos em ambos grupos porém em maior quantidade no grupo cisplatina, são eles: *Bax* (8), *Casp14* (22) e *CD40lg* (24). A quantificação relativa foi realizada com base no perfil de expressão dos alvos no grupo PBS (amostra calibradora). O Ct de cada alvo foi normalizado de acordo com o Ct dos controles endógenos β -actina e *RPS26*. n= 4 animais por grupo. Teste: Mann-Whitney. * p <0,05.

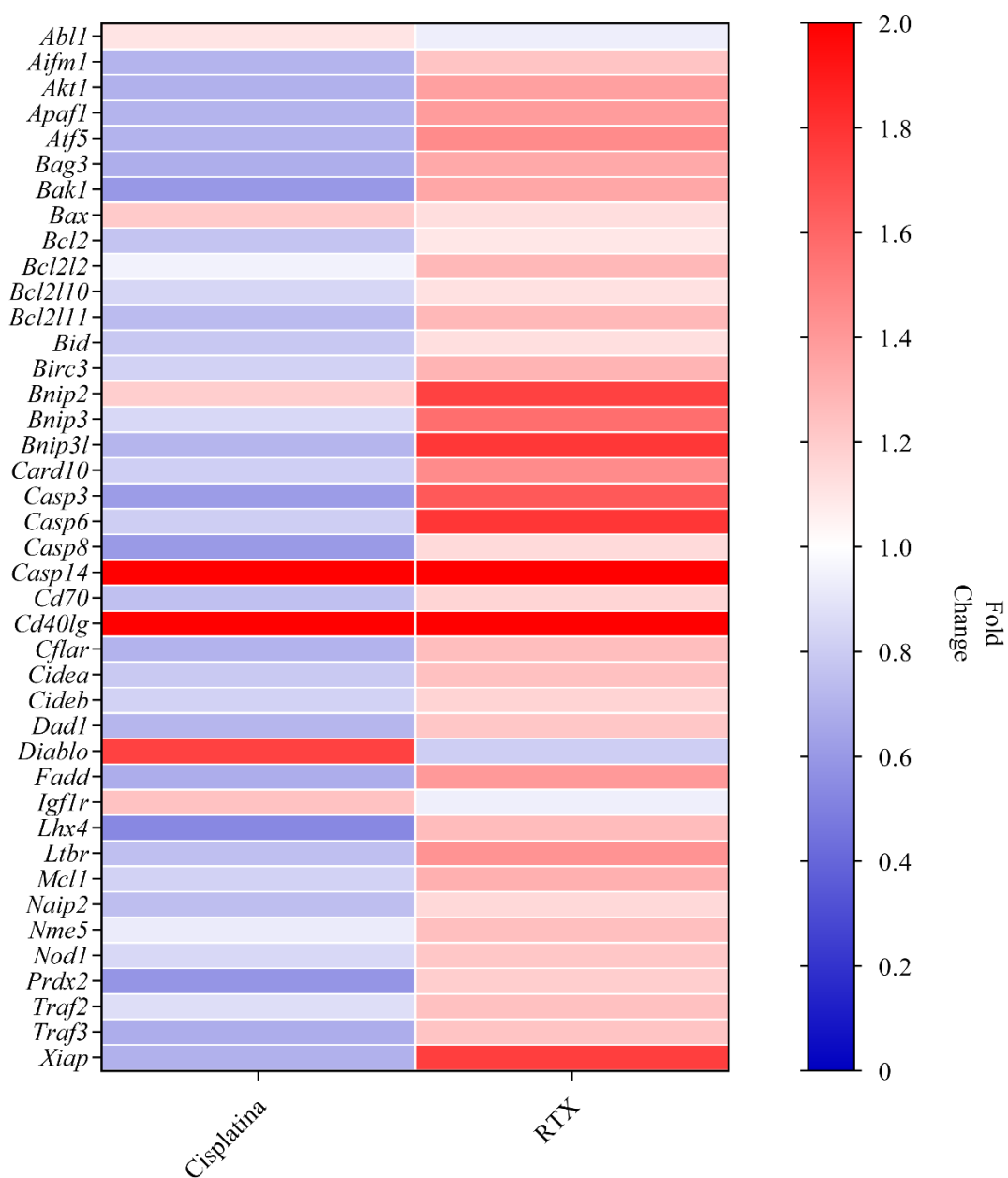


Figura 38. Heatmap dos 41 genes envolvidos na via da apoptose e que foram diferencialmente expressos entre os animais tratados com cisplatina ou aqueles que tiveram os neurônios sensoriais depletados.

5.11 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais ou tratamento com cisplatina afetou a expressão tecidual de marcadores EMT

Uma vez que elucidamos como o tratamento com cisplatina ou a depleção farmacológica dos neurônios sensoriais com RTX impacta na transcrição dos genes envolvidos na transição epitélio-mesenquimal no tumor primário, buscamos compreender como a regulação desses genes afeta o perfil da proteína epitelial, E-caderina, e dos marcadores mesenquimais, fibronectina, vimentina e N-caderina, nos grupos PBS (controle), cisplatina e RTX. Nossos dados mostraram que o tratamento com cisplatina ou a depleção dos nervos sensoriais com RTX reduziu a expressão das proteínas mesenquimais fibronectina, vimentina e N-caderina (Figuras 39, 41 e 43) e também do marcador epitelial E-caderina (Figuras 40 e 43).

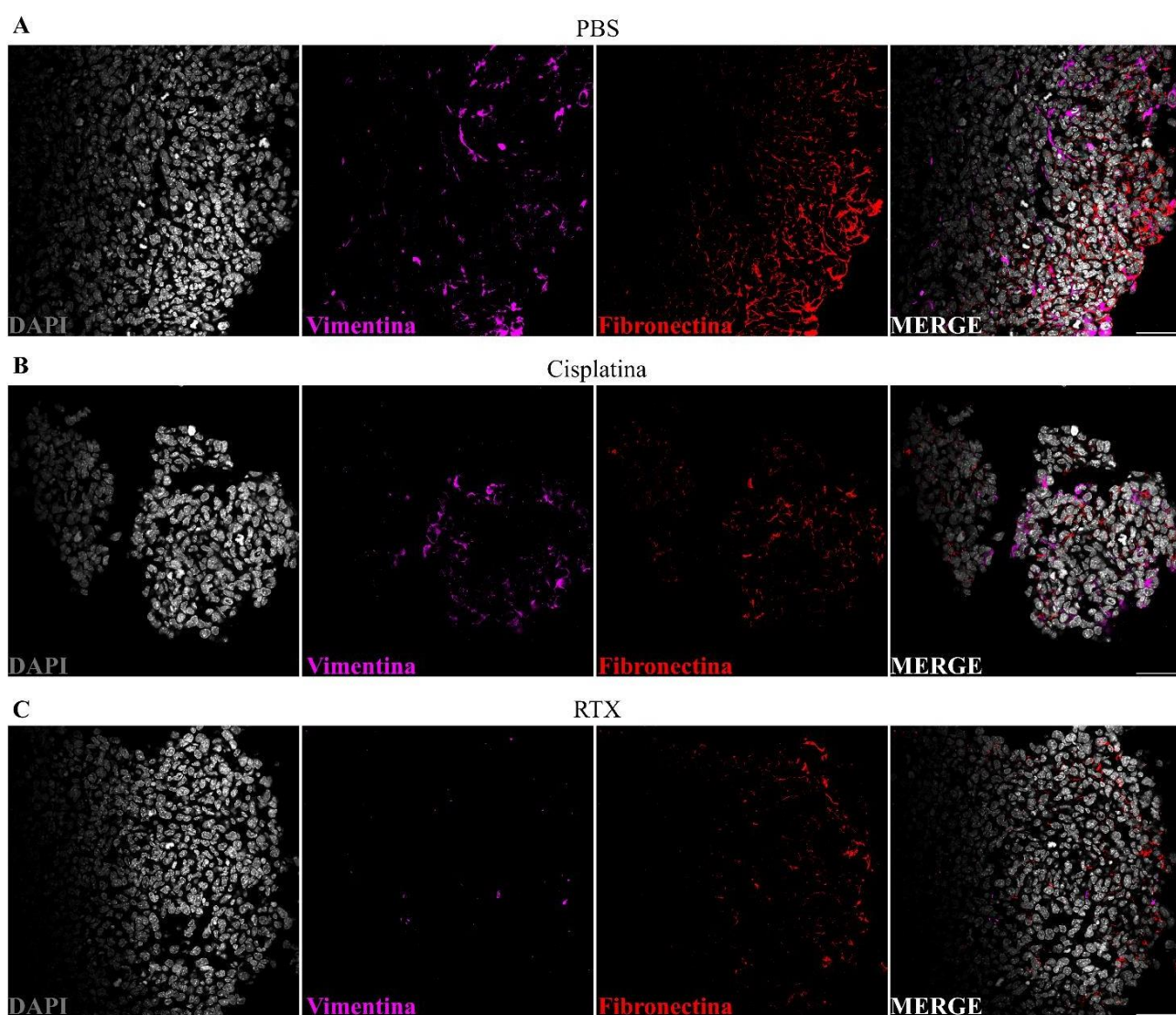


Figura 39. Perfil e distribuição dos marcadores mesenquimais fibronectina e vimentina nos tumores primários

oriundos do inóculo de células de câncer de pulmão LLC1. (A) Animais controle, (B) tratados com cisplatina ou (C) que tiveram os neurônios sensoriais previamente depletados com RTX. Núcleo foi marcado com DAPI. Aumento 40x. Escala: 50 μ M. Imagens foram capturadas em *Z-stack*.

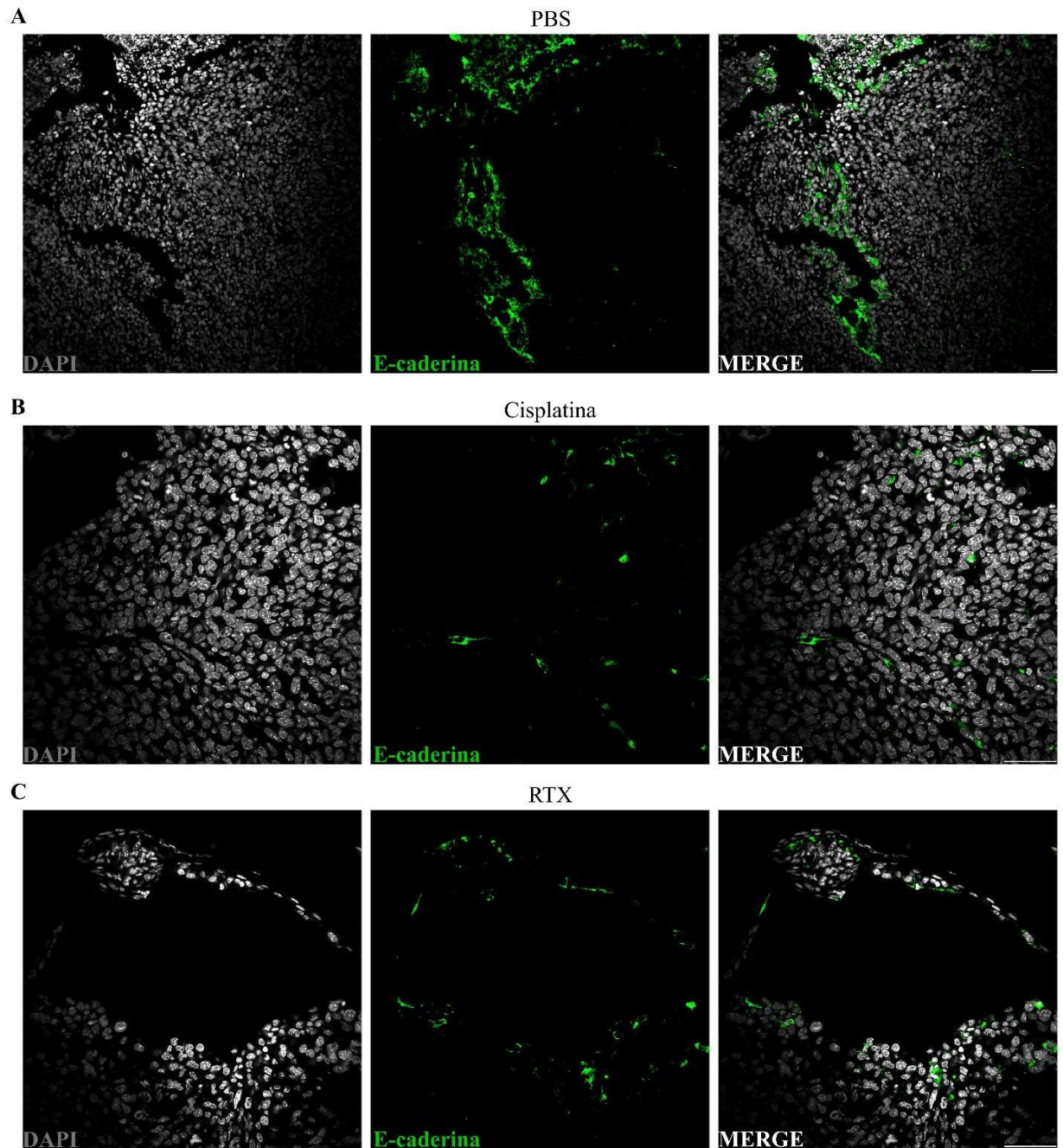


Figura 40. Perfil e distribuição do marcador epitelial E-caderina, nos tumores primários oriundos do inóculo de células de câncer de pulmão LLC1. (A) Animais controle, (B) tratados com cisplatina ou (C) que tiveram os neurônios sensoriais previamente depletados com RTX. Núcleo foi marcado com DAPI. (A) Aumento 20x. (B) e (C) Aumento 40x. Escala: 50 μ M. Imagens foram capturadas em *Z-stack*.

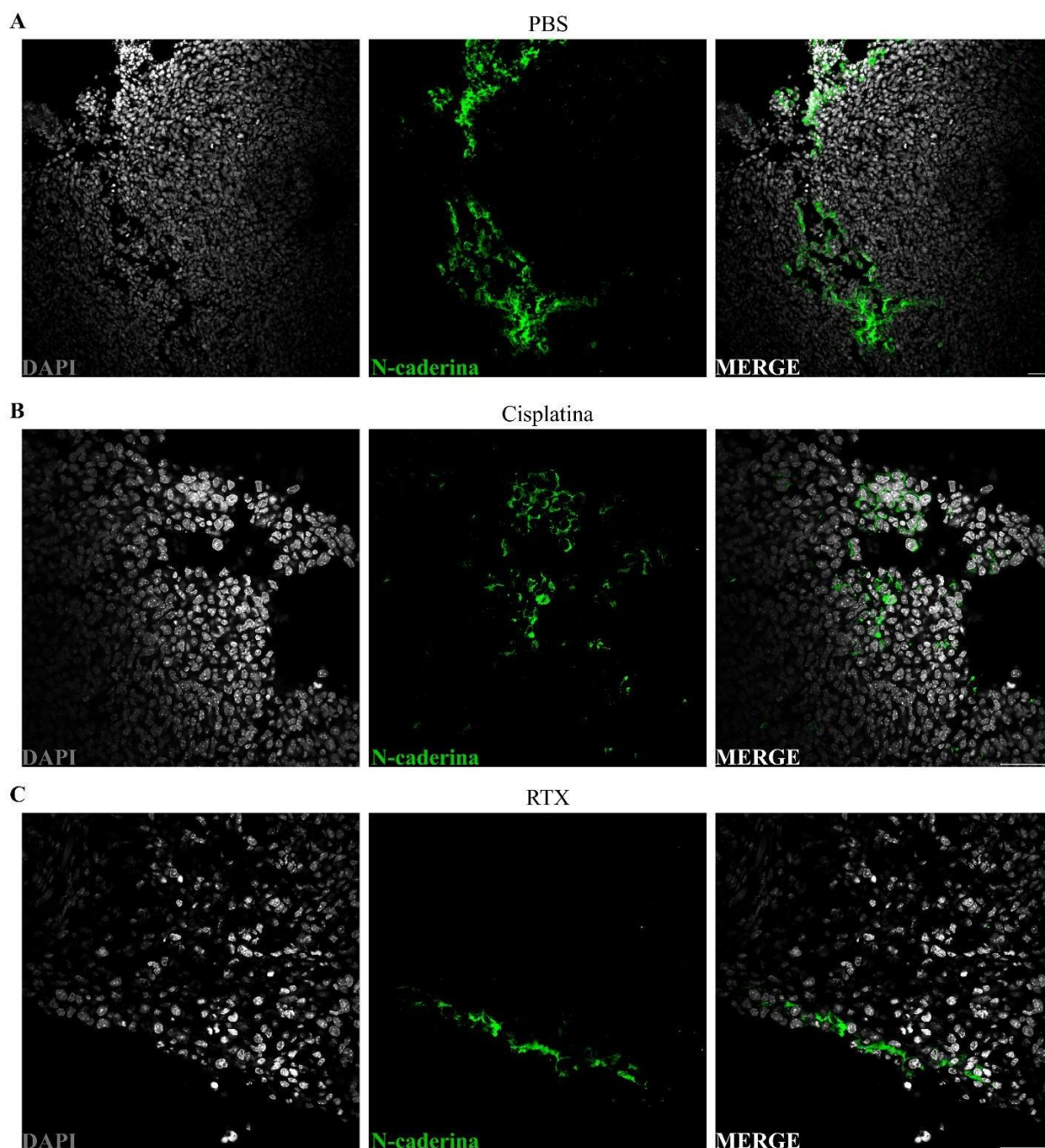


Figura 41. Perfil e distribuição do marcador mesenquimal N-caderina, nos tumores primários oriundos do inóculo de células de câncer de pulmão LLC1. (A) Animais controle, (B) tratados com cisplatina ou (C) que tiveram os neurônios sensoriais previamente depletados com RTX. Núcleo foi marcado com DAPI. (A) Aumento 20x. (B) e (C) Aumento 40x. Escala: 50 μ M. Imagens foram capturadas em *Z-stack*.

5.12 Depleção farmacológica dos nervos sensoriais aumentou a expressão do marcador de vasos sanguíneos CD31

Para entender de que forma o tratamento com o quimioterápico cisplatina ou a depleção dos neurônios sensoriais impacta na presença de vasos sanguíneos dentro do tumor, avaliamos

a expressão por imunofluorescência do marcador de células endoteliais CD31 (PECAM-1). Nossos achados mostraram claramente que a expressão de CD31 dentro dos tumores dos animais que tiveram seus neurônios sensoriais depletados farmacologicamente (RTX) foi reduzida em relação aos grupos controle (PBS) e tratado com cisplatina (Figuras 42 e 43).

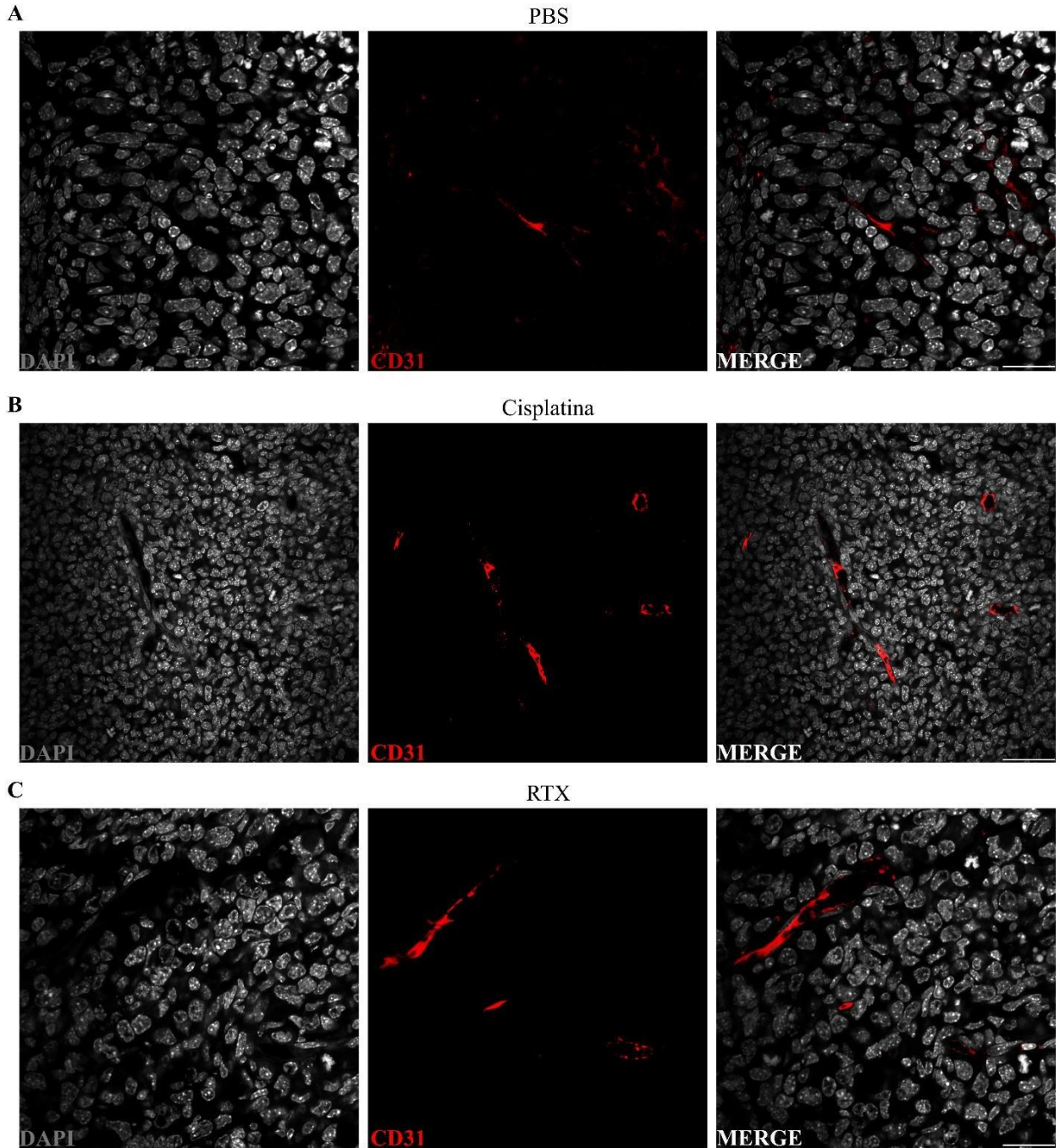


Figura 42. Perfil e distribuição do marcador de vasos sanguíneos CD31, nos tumores primários oriundos do inóculo de células de câncer de pulmão LLC1. (A) Animais controle, (B) tratados com cisplatina ou (C) que tiveram os neurônios sensoriais previamente depletados com RTX. Núcleo foi marcado com DAPI. Aumento 40x. Escala: 50 μ M. Imagens foram capturadas em *Z-stack*.

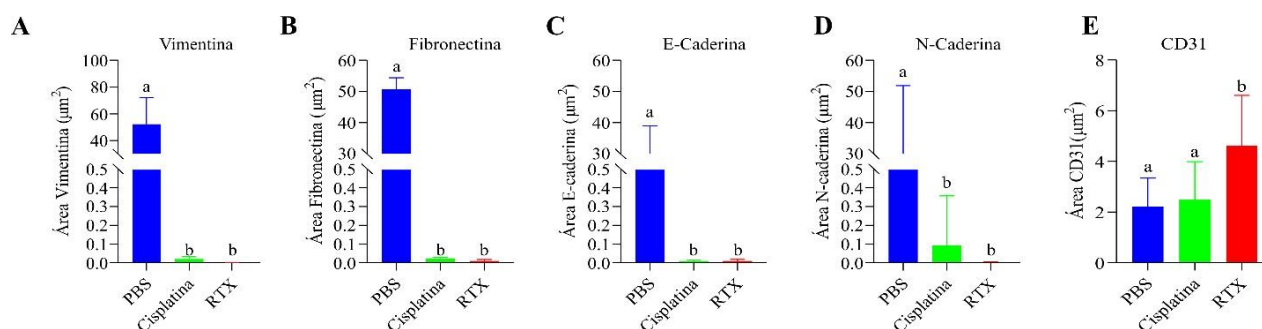


Figura 43. Análises estatísticas de E-caderina, N-caderina, vimentina, fibronectina e CD31 nos tumores primários. O tratamento com o quimioterápico cisplatina ou a depleção farmacológica dos neurônios sensoriais com RTX reduziu a expressão das proteínas vimentina (A), fibronectina (B), E-caderina (C) e N-caderina (D). (E) Somente o tratamento com RTX aumentou a expressão do marcador de células endoteliais CD31, dentro do tumor. PBS (n=4), cisplatina (n=5) e RTX (n=7). Teste: One-way Anova pos hoc LSD. Dados representados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam valor de $p < 0,05$.

5.13 O tratamento com cisplatina ou a depleção farmacológica das fibras neuronais sensoriais com RTX, promoveram alterações nas fibras de colágeno do tipo I e do tipo III

Sabendo que o tratamento com cisplatina ou a depleção farmacológica dos neurônios sensoriais afetou a expressão de marcadores de transição epitélio-mesenquimal, decidimos avaliar a presença de fibras de colágeno do tipo I e do tipo III, dentro dos tumores primários, por meio da coloração de *picrosirius red* (Figura 44 A-C). O corante especial *picrosirius red* tem a capacidade de aumentar a birrefringência natural do colágeno quando exposto à luz polarizada. Portanto, é possível visualizar o colágeno tipo I nas cores amarelo/vermelho e o tipo III na cor verde (COELHO *et al.*, 2018). Neste trabalho, mostramos que o tratamento com cisplatina ou a depleção farmacológica dos neurônios sensoriais com RTX promoveram uma diminuição de fibras de colágeno do tipo III (Figura 44 E) em relação ao grupo controle (PBS). Entretanto, os tumores de animais tratados com cisplatina possuem mais fibras de colágeno do tipo I do que os grupos controle e RTX (Figura 44 D). Quando comparamos a presença de fibras de colágeno do tipo I ou III dentro do mesmo grupo, observamos que os três grupos apresentam uma abundância de colágeno do tipo III em relação ao colágeno do tipo I (Figura 44 F-H). Para averiguar o perfil transcriptômico dos genes precursores de colágeno I e colágeno III, realizamos uma qPCR. Nossos dados mostraram que não há diferença no perfil do mRNA de *Colágeno I* (Figura 44 I), entretanto o mRNA para *Colágeno III*, está superexpresso nos tumores de animais tratados com RTX, em relação ao grupo cisplatina (Figura 44J).

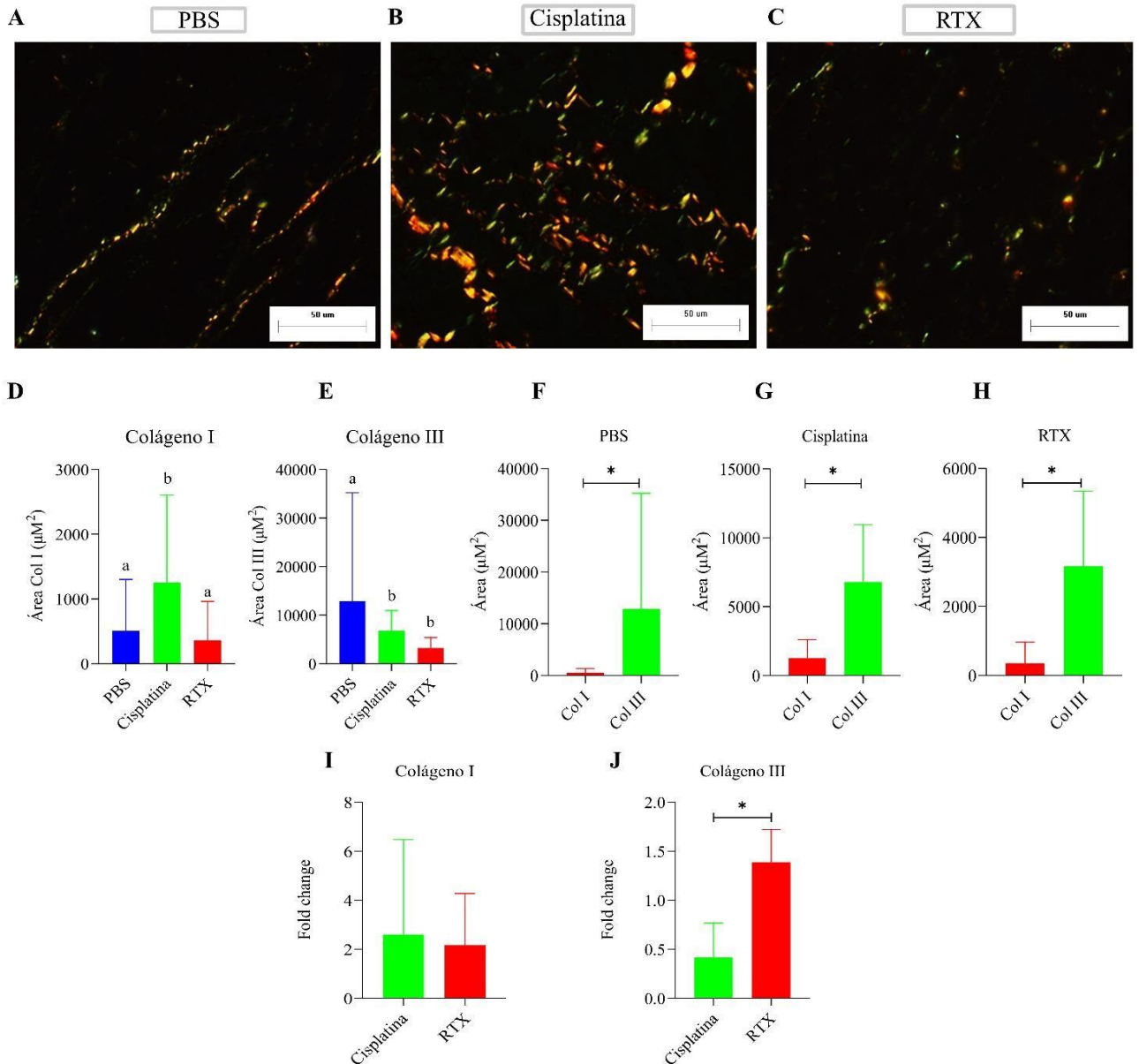


Figura 44. Análise de fibras de colágeno do tipo I e do tipo III dentro dos tumores primários. Detecção de fibras de colágeno do tipo I (cores amarelo e vermelho) e fibras de colágeno do tipo III (cor verde) por meio da coloração de picosirius nos grupos de animais controle (A), tratados com cisplatina (B) ou que tiveram os neurônios sensoriais depletados com RTX (C). As imagens foram capturadas em um microscópio óptico contendo lente de luz polarizada. (D) O tratamento com cisplatina promoveu o aumento de colágeno I em relação aos outros dois grupos. (E) Tumores de animais do grupo controle tratados apenas com PBS possuem mais colágeno III em relação aos grupos cisplatina e RTX. (F-H) Todos os três grupos, de maneira geral, apresentam mais fibras de colágeno do tipo III do que colágeno do tipo I. Análise da expressão do mRNA dos colágenos I e III demonstrou que não houve diferenças significativas na transcrição do gene que codifica Col I entre os grupos cisplatina e RTX (I). Entretanto, observamos que o mRNA que produz o Col III está superexpresso no grupo RTX em relação ao grupo cisplatina. O grupo PBS foi utilizado como amostra calibradora na qPCR. PBS (n=4), cisplatina (n=5) e RTX (n=7). Teste D e F: Kruskal-Wallis pos hoc Dunn's. Teste F-J: Mann-Whitney. Dados representados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes ou * indicam valor de $p < 0,05$. Aumento 40x. Escala: 50 μ M.

6. DISCUSSÃO

Hoje, o tratamento do câncer ainda é aplicado de forma indiscriminada entre pacientes diagnosticados com o mesmo tumor e no mesmo estágio, sem levar em consideração o perfil celular e molecular de cada paciente, o que leva a diferentes respostas ao tratamento (NCI, 2017; VERMA, 2012). Desta forma, a presença de CSCs resistentes à quimioterapia citotóxica padrão pode explicar os eventos de recidiva oncológica comumente observados em tumores sólidos. Por isso, decidimos determinar o IC₅₀ do quimioterápico cisplatina para a linhagem celular LLC1 cultivada em dois modelos, o de monocamada aderente (2D) e o de enriquecimento de células tronco do câncer (tumoresferas/3D). Em contraste com o cultivo *in-vitro* 2D, o ensaio em 3D é considerado um modelo mais confiável na avaliação da resposta terapêutica, justamente pelo enriquecimento de células com um perfil de CSCs. Desta forma, o modelo de enriquecimento de CSCs pode fornecer informações a respeito da quimiorresistência mediada por esse tipo celular em *NSCLC*. Nossos achados mostraram que, de fato, a linhagem celular LLC1 cultivada no modelo de tumoresferas é mais resistente ao tratamento com cisplatina do que a mesma linhagem celular cultivada em monocamada (IC₅₀ da TE: 166,66 µg/mL - IC₅₀ da MN 6,25 µg/mL).

Gonçalves e colaboradores (2020) avaliaram a presença de diferentes subpopulações celulares com características de CSCs e MSCs (células tronco mesenquimais/*mesenchymal stem cells*) em linhagens celulares derivadas de glioblastomas e neuroblastomas humanos, cultivadas nos modelos monocamada (2D) e tumoresfera (3D), e tratadas com o quimioterápico cisplatina. Os dados dos autores mostraram que diferentes subtipos celulares estão presentes nos modelos 2D e 3D, e que o tratamento com cisplatina pode favorecer o surgimento de outras subpopulações que expressam marcadores de CSCs. Neste trabalho, mostramos que o tratamento *in-vitro* da linhagem celular LLC1 com cisplatina não alterou as subpopulações com perfil de CSCs clássicas de câncer de pulmão (CD44⁺/CD133⁺), seja em estado proliferativo (Ki-67⁺), ou não (Ki-67⁻). Além disso, após o tratamento com cisplatina, não observamos alterações nas células CD24⁺ ou ALDH⁺.

Células tumorais secretam ativamente fatores de crescimento que promovem a inervação tumoral, processo conhecido como neo-axonogênese. Em um modelo pré-clínico de câncer de próstata, neurônios sensoriais foram atrelados à proliferação das células tumorais (MAGNON *et al.*, 2013). Em pacientes com câncer de mama de alto grau, a presença de fibras nervosas foi correlacionada com o aumento de metástases para os linfonodos, recidiva oncológica e um

pobre prognóstico (DEMIR *et al.*, 2020). Em pacientes com câncer de mama triplo-negativo (TNBC), um subtipo histológico responsável por aproximadamente 20% dos casos de câncer de mama, a presença de fibras nervosas é um evento recorrente e já foi associada com uma maior capacidade de migração e metástase (JÉZÉQUEL *et al.*, 2019).

Neste trabalho, realizamos o tratamento das células LLC1 em 2D ou 3D com o meio condicionado coletado do cultivo *in-vitro* de neurônios sensoriais e avaliamos a capacidade que as células tinham em formar colônias, por meio do ensaio clonogênico. O ensaio clonogênico é um teste considerado padrão ouro, pois permite avaliar a morte reprodutiva de células expostas a determinado tratamento, ou seja, a capacidade que essas células possuem em formar progenies (colônias) a partir de uma única célula. Desta forma, tratando-se de células neoplásicas, é possível correlacionar *in-vitro* a sensibilidade a determinado quimioterápico com a resposta observada (FRANKEN, 2006; BROWMAN *et al.*, 1983). Nossos dados mostraram claramente que o meio condicionado dos neurônios sensoriais induziu a formação de colônias, indicando, portanto, que neuromediadores secretados pelos neurônios sensoriais afetam a sobrevivência celular.

Uma característica clássica do evento EMT é a diminuição ou perda da expressão da proteína de adesão celular E-caderina e concomitante expressão de marcadores mesenquimais como Fibronectina, Vimentina e N-caderina, além da ativação de vias intracelulares como aquelas mediadas pela proteína TGFB1 (BABAEI *et al.*, 2021). Diferentes fatores de transcrição têm sido associados à repressão transcricional do mRNA de proteínas que promovem adesão célula-célula e célula-matriz e ativação da transcrição do mRNA de proteínas mesenquimais. Entretanto, apesar de serem conhecidos majoritariamente como ativadores clássicos do estado mesenquimal, células tumorais podem flutuar no que se diz respeito aos fenótipos epitelial e mesenquimal (KARACOSTA *et al.*, 2019).

Para determinar se os nervos sensoriais modulam a expressão de algum marcador do fenômeno EMT *in-vitro*, realizamos uma co-cultura entre neurônios sensoriais e células LLC1 cultivada em monocamada ou tumoresfera, tratada ou não com cisplatina. Os neurônios sensoriais foram isolados dos DRGs de camundongos fêmeas adultas usando protocolos previamente estabelecidos. Para confirmar a identidade dos neurônios isolados antes do início dos experimentos, utilizamos animais NaV 1.8^{cre} / tdTomato. Nossos dados mostraram que, de fato, neurônios sensoriais podem alterar a expressão de marcadores EMT e que células LLC1, quando co-cultivadas com os neurônios sensoriais, adquirem um fenótipo EMT híbrido, com

expressão do marcador epitelial E-caderina e do marcador mesenquimal vimentina. Além disso, observamos que neurônios sensoriais podem promover alterações na estrutura do citoesqueleto, como identificadas aqui por meio da marcação de F-actina com sondas faloidina.

O microambiente tumoral inclui células do sistema imunológico, vasos sanguíneos recém formados, fibroblastos, CSCs, MSCs, e componentes do sistema nervoso (RESTAINO; VERMEER, 2022). Fibras nervosas estão presentes em diferentes tipos de câncer como os de mama, próstata, colorretal e pancreático. A origem, o tipo e a quantidade dessas fibras nervosas no câncer variam e podem incluir feixes de fibras simpáticas, parassimpáticas e sensoriais (RESTAINO; VERMEER, 2022; WANG *et al.*, 2020). Além disso, o microambiente tumoral inclui neuropeptídeos/neuromediadores imunologicamente ativos, alguns desses incluem: o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P (SP), peptídeo vasoativo intestinal (VIP), neurotensina e o fator de crescimento de nervo (NGF) (CHOI *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020; GRIFFIN *et al.*, 2018; OUYANG *et al.*, 2017; XIE *et al.*, 2010).

Fibras nervosas e neuropeptídeos possuem diversas funções que podem aumentar ou diminuir a progressão tumoral (RESTAINO; VERMEER, 2022; HUTCHINGS; PHILLIPS, 2020; WANG *et al.*, 2020; HORVATHOVA; MRAVEC, 2016; AYALA *et al.*, 2008). Por exemplo, a presença de fibras simpáticas no estroma tumoral de pacientes com câncer de mama promove a progressão do tumor, enquanto fibras parassimpáticas parecem ter um efeito oposto (KAMIYA *et al.*, 2019). No entanto, o papel dos nervos sensoriais na iniciação e progressão do câncer de pulmão ainda não é bem compreendido. Portanto, utilizando-se do estado da arte, neste trabalho buscamos compreender como o sistema nervoso sensorial comunica-se com o microambiente do câncer de pulmão e como a ausência dessas fibras nociceptivas afeta diferentes subpopulações celulares e o fenômeno de transição epitélio-mesenquimal (EMT) *in vivo*.

Como abordado anteriormente neste trabalho, funcionalmente o SNP é dividido em nervos motores (eferentes) e sensitivos (aférentes). Os neurônios aferentes primários (sensoriais) têm seus corpos celulares localizados nos gânglios cranianos e espinhais. Sendo que neurônios sensoriais categorizados como espinhais têm os corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal (ERIN *et al.*, 2022).

Vimos ainda que os neurônios sensoriais podem então ser categorizados em três grupos com base em sua velocidade de condução e diâmetro das fibras. Fibras finas não mielinizadas

são chamadas de fibras C e contém nociceptores polimodais e uma porção menor de mecanorreceptores. Os outros dois grupos incluem fibras A δ e A β , ambas mielinizadas, mas que diferem no diâmetro das fibras nervosas. As fibras nervosas A δ transmitem informações nociceptivas e não nociceptivas, enquanto fibras A β transmitem informações não nociceptivas dos músculos e articulações (ERIN *et al.*, 2022).

Anteriormente, nosso grupo demonstrou que a depleção genética de neurônios sensoriais utilizando um modelo de animal geneticamente modificado que expressa a toxina diftérica em células NaV 1.8⁺, ou a depleção farmacológica utilizando o análogo da capsaicina (RTX), promoveram o aumento do crescimento do melanoma murino experimental e angiogênese tumoral (PRAZERES *et al.*, 2020).

Neste trabalho utilizamos a substância química RTX, como forma de depleção dos neurônios sensoriais, uma vez que apenas fibras amielínicas (C) e finamente mielinizadas (A δ) são destruídas após a injeção de RTX (KOH *et al.*, 2016). Mostramos dados inéditos a respeito da depleção farmacológica de neurônios sensoriais em um modelo murino heterotópico de câncer de pulmão de células não pequenas, por meio da inoculação de células LLC1. Nossos dados mostraram que a depleção das fibras neuronais sensoriais com RTX promoveu o aumento do volume, peso e área do tumor, além de aumentar a marcação de CD31, uma molécula presente em células endoteliais, indicando, portanto, angiogênese tumoral.

Estudos na literatura sugerem uma interação física e bioquímica entre os neurônios aferentes primários e vasos sanguíneos durante a carcinogênese. A ativação de nociceptores resulta na liberação de neurotransmissores como o CGRP, endotelina, histamina, glutamato e SP. Esses mediadores sensoriais derivados do nervo possuem ações vasodilatadoras e, como resultado, o suprimento sanguíneo para os tecidos tumorais pode aumentar (TODA *et al.*, 2008). Fan e colaboradores (1993), haviam demonstrado o potencial efeito angiogênico do neuropeptídeo SP. Nossos achados mostraram que mesmo na ausência de fibras neuronais sensoriais os tumores primários dos animais dos grupos cisplatina ou RTX apresentavam células positivas para o neuropeptídeo SP. Levando em consideração as informações até aqui expostas, consideramos que células do sistema imunológico podem ser as responsáveis por liberarem SP na ausência de fibras sensoriais. Portanto, nossos dados abrem caminhos para a investigação da expressão de SP por células imunes no microambiente do câncer de pulmão de células não-pequenas.

Erin e colaboradores (2004) mostraram que a depleção sistêmica dos neurônios sensoriais utilizando capsaicina aumentou o número de metástases pulmonares e cardíacas em animais adultos injetados ortotopicamente com a linhagem celular de câncer de mama, 4T1. Desta forma, sugerindo que mediadores secretados por neurônios sensoriais podem limitar direta ou indiretamente o crescimento metastático. Portanto, nossos dados utilizando um modelo heterotópico de câncer de pulmão em animais adultos tratados com RTX corroboram com o fato de que a ausência de neurônios sensoriais pode aumentar o número de metástases. Além disso, mostramos aqui que o tratamento com o quimioterápico cisplatina também afeta os neurônios sensoriais e que assim como o grupo de animais tratados com RTX, a cisplatina promoveu metástases pulmonares.

Balood e colaboradores (2022) avaliaram a presença de fibras nociceptivas TRPV1⁺ em biópsias de pacientes com melanoma. Os autores mostraram a presença de fibras nervosas sensoriais nas dez amostras de tumor em comparação com amostras de tecido saudável adjacente. Além disso, o número de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) acompanhou o aumento da imunomarcagem para TRPV1. Desta forma, esses dados indicaram que os melanomas são inervados por neurônios sensoriais e que esses neurônios podem afetar o número intratumoral de células imunes. Para investigar com mais detalhes a presença de neurônios nociceptores no melanoma, os autores inocularam células de melanoma murino da linhagem B16F10, as quais expressavam a proteína verde fluorescente (B16F10-eGFP) em camundongos NaV1.8^{cre}/tdtomato^{fl/WT}. Vinte e dois dias após o inóculo, neurônios nociceptores NaV1.8⁺ foram encontrados ao redor e dentro dos tumores.

Nossos resultados utilizando animais transgênicos NaV 1.8^{cre}/tdTomato, os quais somente neurônios sensoriais expressam a fluorescência vermelha, mostraram a presença de fibras nociceptivas ao longo do desenvolvimento do câncer de pulmão. Observamos ainda que essas fibras sensoriais estão presentes ao redor e dentro dos tumores e que a quantidade dessas fibras não se altera ao longo dos 22 dias de desenvolvimento tumoral, quando comparado o 14º com o 22º dia. Outro fator importante a ser destacado é que independente da depleção dos neurônios sensoriais com RTX ou o tratamento quimioterápico com cisplatina, observa-se fibras neuronais positivas para o marcador de neurônios maduros, β -tubulina III (TUBB3). Esse dado mostra que outros tipos de fibras nervosas podem estar presentes no microambiente tumoral, como fibras simpáticas e parassimpáticas.

Para investigar a expressão do canal TRPV1 e sua associação clínica com a sobrevida

livre de doença em pacientes com câncer de pulmão (*Disease Free Survival / DFS*), utilizamos dados públicos disponíveis no *GEPIA – Gene Expression Profiling Interactive Analysis*. A DFS é definida como o tempo entre o início do tratamento e a progressão da doença ou morte por qualquer causa (DINIZ *et al.*, 2016). Observamos que a alta expressão do gene TRPV1 está correlacionado com uma maior taxa de sobrevida, quando comparado com uma baixa expressão do gene (Figura suplementar 2).

Le e colaboradores (2022) mostraram que células de câncer de mama, quando co-cultivadas *in-vitro* em contato direto com neurônios sensoriais, se aderem aos prolongamentos neuronais e migram mais rapidamente do que células cancerosas sozinhas ou simplesmente na presença do meio condicionado advindo da cultura desses neurônios. Além disso, os autores realizaram um sequenciamento de RNA células únicas (RNA-seq) e mostraram que existe uma regulação positiva dos genes envolvidos nos processos de migração, adesão e proliferação celular em células tumorais co-cultivadas com neurônios sensoriais.

Como já discutido anteriormente neste trabalho, o evento EMT é fundamental para a progressão do câncer pois aumenta a capacidade invasiva e resistência à morte celular, por meio da degradação da matriz extracelular e aquisição de um fenótipo semelhante a células mesenquimais (KALLURI *et al.*, 2009; POLYAK; WEINBERG, 2009; MANI *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado que o sistema nervoso pode regular esse fenômeno liberando neurotransmissores e neurotrofinas (BAO *et al.*, 2013; DASGUPTA *et al.*, 2009). A superexpressão de TrkB ou sua ativação por BDNF em linhagens celulares de câncer endometrial resultou na alteração da expressão de marcadores envolvidos na EMT (BAO *et al.*, 2013).

Nossos resultados mostraram que tanto o tratamento com cisplatina quanto a depleção prévia dos neurônios sensoriais utilizando RTX possuem efeitos sobre os alvos EMT. Destacamos aqui a regulação positiva dos mRNAs que codificam as proteínas Vimentina e TWIST e a regulação negativa do mRNA que codifica a proteína E-caderina, no grupo RTX. Já nos animais tratados com cisplatina, observamos uma superexpressão do gene para *E-caderina* e uma subexpressão dos genes *Vimentina* e *Twist*. Nos ensaios de imunofluorescência, observamos que o tratamento com cisplatina ou a depleção de neurônios sensoriais com RTX promoveram a diminuição de E-caderina, N-caderina, fibronectina e vimentina.

A remodelação da MEC, especialmente das fibras de colágeno é um evento importante a ser considerado durante a EMT. Por meio da coloração de *Picrosirius Red* foi possível

observar que os tumores oriundos de animais tratados com cisplatina possuem mais colágeno do tipo I do que os outros dois grupos. E que as fibras de colágeno do tipo III nos tumores dos grupos cisplatina ou RTX diminuíram em relação ao grupo controle (PBS).

Os colágenos são um grupo de proteínas que compartilham uma característica estrutural comum: a presença de três cadeias polipeptídicas entrelaçadas. Os membros da família do colágeno são abundantemente encontrados na MEC. Além de participarem da estruturação e organização tecidual, os colágenos estão envolvidos nos processos de adesão, proliferação e migração celular. Vinte e oito tipos de colágenos com diferentes estruturas, localizações e funções biológicas já foram descritos até o momento. O COL1 é o mais comum, essa proteína fibrilar pode ser encontrada na pele, tendões, ligamentos, vasos sanguíneos, ossos, pulmões e coração. O COL1 está envolvido em processos fisiológicos como mineralização óssea, hemostasia e angiogênese, mas também em disfunções patológicas como o câncer (NECULA *et al.*, 2022). Shintani e colaboradores (2008) mostraram que COL1 induz EMT em linhagens celulares de câncer de pulmão de células não-pequenas.

O COL3 desempenha uma função crítica na manutenção de tecidos e órgãos, em parte por meio de sua capacidade de regular a formação de fibras de colágeno do tipo I. Di Martino e colaboradores (2022) mostraram que o microambiente tumoral de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço é enriquecido de COL3 e que esse colágeno era necessário para sustentar a dormência de células tumorais. Em um modelo murino de câncer de mama, utilizando a linhagem celular 4T1, a deficiência de colágeno 3 aumentou a proliferação e diminuiu a apoptose *in-vitro* e em tumores primários *in-vivo* (BRISSON *et al.*, 2015). Em câncer de bexiga, a superexpressão do gene de colágeno 3 confere um pobre prognóstico aos pacientes (YUAN *et al.*, 2017). Mesmo diante do que foi exposto, o papel do COL3 na carcinogênese, especialmente no *NSCLC*, é pouco conhecido. Desta forma, nossos dados trouxeram novos conhecimentos sobre a influência do tratamento com cisplatina ou a depleção dos neurônios sensoriais com RTX, sobre as fibras de colágeno do tipo 3.

Evidências na literatura já apontaram uma relação da inervação no desenvolvimento de CSCs (HAYAKAWA *et al.*, 2017; YIN *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2014). Fibras nervosas podem regular diferentes vias de sinalização em CSCs como as vias Wnt, Notch e Hedgehog (YIN *et al.*, 2015). Fibras colinérgicas podem ativar a via de sinalização Wnt em células tronco gástricas por meio do receptor muscarínico tipo 3 (M3R), contribuindo para a expansão das células tronco (HAYAKAWA *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2014). A liberação parácrina de BDNF

por células de câncer de mama triplo-negativo (TNBC) promove a capacidade de auto-renovação das CSCs positivas para o receptor TRKB, por meio da ativação transcricional de KLF4. Tais CSCs TRKB⁺ representam uma subpopulação distinta, associada à recidiva oncológica em TNBCs (YIN *et al.*, 2015). Nossos dados mostraram que a ausência de neurônios sensoriais diminuiu as subpopulações celulares com perfil de células tronco do câncer independente de estarem em proliferação (Ki-67⁺) ou não (Ki-67⁻), e que o tratamento com cisplatina teve efeito similar sobre esses subtipos celulares, o que nos leva a questionar a presença de uma via em CSCs que é afetada da mesma forma em ambos tratamentos.

A presença de células do sistema imunológico no microambiente tumoral levanta uma questão fundamental: como as células tumorais escapam do ataque mediado pelas células do sistema imune? A princípio, o desenvolvimento tumoral pode ser controlado por células imunes inatas e adaptativas, entretanto, à medida que o câncer evolui, as células neoplásicas desenvolvem diferentes mecanismos que promovem uma tolerância imunológica, e desta forma, escapando da morte celular (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018). À medida que o tumor progride, diferentes subpopulações são recrutadas para o microambiente tumoral, afetando desta forma o seu percurso. Por exemplo, durante os estágios iniciais do desenvolvimento do tumor, as células imunológicas com atividade citotóxica, tais como células Natural Killer (NK) e linfócitos T CD8⁺, reconhecem antígenos presentes nas células tumorais e as eliminam (GIATROMANOLAKI *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2019).

As células NK têm um efeito antitumoral bem documentado. Em tumores colorretais e gástricos a infiltração de células NK correlaciona-se com um bom prognóstico. Células NK ativadas medeiam a eliminação das células tumorais por meio da liberação de granzimas e perforinas e também desencadeando a morte celular por apoptose através da produção de TNF α ou via contato direto célula-célula através da ativação das vias TRAIL e FASL (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018). Os linfócitos T são componentes do sistema imunológico adaptativo e que podem adquirir diferentes fenótipos dentro do microambiente tumoral. Portanto, dependendo do contexto em que estão inseridos, essas células podem regular positivamente ou negativamente a resposta imunológica contra as células tumorais. Altos níveis de células T efetoras no tumor correlacionam-se a um bom prognóstico no câncer de pulmão de células não pequenas (GIATROMANOLAKI *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2019).

Após sua ativação por células apresentadoras de antígenos (APCs), os linfócitos T CD8⁺ se diferenciam em linfócitos T citotóxicos e, por meio da exocitose de grânulos contendo

perforina e granzima, promovem a eliminação das células do tumor. Enquanto isso, a resposta antitumoral mediada por linfócitos T CD4⁺ auxiliares, por meio da secreção de altas quantidades de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, TNF α e IFN- γ , promove não apenas a ativação de células CD8 em linfócitos citotóxicos, mas também a atividade antitumoral de macrófagos e células NK, bem como aumento geral na apresentação de antígenos tumorais (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018).

Durante a homeostase imunológica, um mecanismo crucial da tolerância periférica para proteger os tecidos de danos inflamatórios é a regulação da resposta das células T efetoras por meio da expressão de moléculas consideradas *checkpoints* imunológicos em linfócitos T citotóxicos e T CD4⁺ ativados. Essas moléculas incluem principalmente CTLA-4 e PD-1, que atuam como reguladores negativos da função das células T e têm sido associados à evasão imune no câncer (PARDOLL, 2012). O envolvimento da sinalização mediada por CTLA-4 no câncer de pulmão de células não-pequenas já foi descrito por diferentes autores (CHAE *et al.*, 2018; PAULSEN *et al.*, 2017). Além disso, o envolvimento de PD1 com seu co-receptor presente em células tumorais, PD-L1, resulta na inibição da migração, proliferação e secreção de mediadores citotóxicos por células T (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018).

Além da expressão de *checkpoints* por células T, outros supressores imunológicos são recrutados para o microambiente tumoral durante a carcinogênese. Neste trabalho, avaliamos a presença de células T CD4⁺ reguladoras (T_{regs}), uma subpopulação celular responsável por suprimir a apresentação de antígenos e ativação/citotoxicidade mediada por linfócitos T CD4⁺ perfil Th₁, linfócitos T citotóxicos, macrófagos, células NK e neutrófilos. A imunossupressão mediada por células T_{regs} é orquestrada por mecanismos dependentes de contato, como a expressão de PD-L1, LAG-3, CD39, CD73, CTLA4 ou PD1, e por mecanismos de contato independente, que envolvem o sequestro de IL-2 e a produção de moléculas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018).

Outra subpopulação imunológica presente no microambiente tumoral são células NKT. As NKT compreendem um subconjunto de linfócitos T que exibem funções efetoras inatas e expressam um receptor de linfócitos T (TCR) semi-invariante. Ao contrário das células T clássicas, restritas ao MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), as células NKT adquirem suas funções efetoras durante o desenvolvimento e sua ativação se deve ao reconhecimento de antígenos apresentados pela proteína CD1d que está presente na superfície de células apresentadoras de antígenos, resultando na liberação de citocinas típicas da resposta

Th₁ e Th₂, como IFN- γ e IL-4. Após sua ativação e aumento da expressão de uma variedade de moléculas indutoras de morte celular, incluindo perforina e os ligantes FAS e TRAIL, as células NKT, assim como outras células citotóxicas como células NK e linfócitos T citotóxicos, podem induzir a morte de células tumorais (INGRAM *et al.*, 2018). Em um estudo realizado por Dockry e colaboradores (2018), utilizando amostras de pacientes com *NSCLC*, o número de células NKT e da proteína CD1d nos pulmões era menor, comparado a pulmões de pacientes saudáveis. Além disso, a redução de CD1d foi correlacionada com uma baixa sobrevida. Monteiro e colaboradores (2010) descobriram uma população única de células NKT/FOXP3⁺ murinas que exibem moléculas de superfície típicas de células T_{regs} que são ativadas pela citocina TGF- β e suprimem a proliferação de células T por meio de um mecanismo dependente de IL-10. Além disso, os autores mostraram que TGF- β promove a regulação positiva de FOXP3 em células NKT e células T CD4⁺, convertendo-as em células FOXP3⁺ imunossupressoras.

Nossas análises de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ dentro do tumor primário revelaram uma diminuição desse perfil fenotípico nos tumores de animais que foram tratados com cisplatina ou que tiveram suas fibras neuronais sensoriais depletadas com RTX. Entretanto, ao analisarmos células T CD8⁺ e CD8⁺/FOXP3⁺, observamos que a cisplatina promoveu o aumento dessas subpopulações nos tumores. Nossos dados mostraram ainda que as subpopulações celulares com fenótipo T_{reg} (CD4⁺/FOXP3⁺) diminuíram nos tumores de animais tratados com cisplatina ou com RTX. No que se diz respeito às subpopulações de células NK ou NKT, observamos que os tratamentos com cisplatina ou RTX afetam essas células de maneiras diferentes. Após a depleção farmacológica das fibras nervosas sensoriais com RTX, células NK e NK/FOXP3⁺ diminuíram, enquanto o tratamento com cisplatina não alterou significativamente a presença dessas células nos tumores. Já as subpopulações com perfil de células NKT e NKT/FOXP3⁺ foram reguladas negativamente somente nos tumores de animais tratados com cisplatina. Desta forma, nossos dados indicaram que a depleção dos neurônios sensoriais pode desencadear uma mudança no perfil imunológico do câncer de pulmão, com alvo nas células NK, CD4 e T_{reg}. Por outro lado, o tratamento com cisplatina promove alterações no perfil fenotípico de células NKT, CD4, T_{reg} e CD8.

Os sistemas neuronal e imunológico não operam separadamente, em vez disso, eles interagem entre si para manter a homeostase tecidual. As células imunológicas ativadas produzem mediadores inflamatórios como citocinas, mediadores lipídicos e histamina que estimulam diretamente os terminais dos nervos periféricos nos tecidos locais. Esses estímulos

não apenas são transmitidos para o SNC, mas também aumentam a excitabilidade neuronal e diminuem o limiar de ativação dos neurônios. Da mesma forma, os terminais de neurônios sensoriais liberam vários neuropeptídeos após a ativação neuronal, como SP, VIP, neurocinina A e CGRP, com o intuito de regular a resposta imunológica (KABATA *et al.*, 2019).

A regulação neural da resposta imune tem sido identificada como um campo de estudo emergente na biologia dos tumores (DANTZER, 2018). Por exemplo, os efeitos imunomodulatórios do nervo vago, também conhecidos como via antiinflamatória colinérgica, têm sido associados à ação da acetilcolina, o neurotransmissor predominante do sistema nervoso parassimpático. Desta forma, a vagotomia eleva o risco ou mortalidade por câncer gástrico, colorretal e pulmão (ÅHSBERG; OLSSON; STAËL VON HOLSTEIN, 2009). Por outro lado, o sistema nervoso simpático modula a sinalização de receptores β -adrenérgicos (β -AR) de células imunes presentes nos tumores por meio da epinefrina/norepinefrina (NE) circulante ou secreção local de NE pelas fibras nervosas do SNS (NISSEN; SLOAN; MATTAROLLO, 2018).

No que se diz respeito à imunidade adaptativa, a ativação da sinalização β -adrenérgica suprime a proliferação e capacidade citotóxica de células T CD8⁺ por meio da produção de IFN- γ , além de ativar linfócitos T reguladores (NISSEN; SLOAN; MATTAROLLO, 2018). A ativação da via de sinalização β 2-AR em linfócitos promove a expressão das quimiocinas CCR7 e CXCR4, bloqueando assim a saída de linfócitos dos linfonodos (NAKAI *et al.*, 2014). Por outro lado, um estudo recente demonstrou que a depleção do SNS contribui para o acúmulo de células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs) imaturas em câncer de cólon, o que facilita a expansão de linfócitos T_{regs} e consequentemente supressão da imunidade tumoral (NEVIN *et al.*, 2020). Ainda a respeito do papel do SNS no microambiente tumoral, trabalhos descrevem que o repertório imunológico adaptativo muda significativamente após a depleção do SNS no câncer de mama. Após a remoção dos nervos simpáticos, células T diminuem a expressão de PD-1 (*programmed cell death-1*), uma molécula de checkpoint imunológico, indicando que essas populações de linfócitos tornam-se mais eficazes na resposta antitumoral. Além disso, a inervação simpática aumenta as populações de células T FOXP3⁺ imunossupressoras (KAMIYA *et al.*, 2019). Portanto, estudar a interação entre sistema nervoso e imunidade tumoral pode abrir novos caminhos na biologia do câncer, permitindo uma abordagem direcionada a fim de aliviar a imunossupressão no microambiente tumoral (NEVIN *et al.*, 2020).

Levando em consideração que fibras neuronais positivas para β -tubulina III foram observadas nos tumores oriundos de animais tratados com cisplatina ou que tiveram seus neurônios sensoriais depletados com RTX, a presença de outras fibras nervosas devem ser avaliadas para compreender se a ausência de fibras neuronais sensoriais desencadeou uma superativação de fibras simpáticas ou parassimpáticas. Dados não publicados do nosso grupo, utilizando um modelo murino de câncer de próstata endógeno (Hi-Myc), mostraram que a depleção dos neurônios sensoriais promoveu um aumento da marcação de tirosina hidroxilase (TH), um marcador do sistema nervoso simpático. Portanto, nossos resultados abrem caminhos para o estudo da participação de diferentes fibras neuronais no câncer.

A morte celular é um evento natural durante o desenvolvimento, diferenciação celular e formação de tecidos e órgãos. A eliminação de células nocivas ou danificadas e a manutenção da homeostase é essencial para o funcionamento saudável de organismos multicelulares (ADESHAKIN *et al.*, 2021; IOZZO; GUBBIOTTI, 2018; SOLBOL, 2018).

As proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) são reguladores essenciais da apoptose por inibirem a ativação de caspases ou interferirem na sinalização pró-apoptótica mediada por SMAC/DIABLO (segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria). IAPs como BIRC2 (cIAP1), BIRC3 (cIAP2), XIAP (BIRC4) e survivina (BIRC5) são frequentemente superexpressas no câncer, enquanto permanecem ausentes em muitos tecidos. Em sarcomas, uma alta expressão de XIAP e survivina está correlacionada com um pobre prognóstico (FALKENHORST *et al.*, 2016).

Alternativamente, células de câncer também podem diminuir a expressão de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, aumentar a expressão das antiapoptóticas ou fazer ambos. Um exemplo é uma translocação que coloca o gene *bcl-2* próximo à região promotora de genes de imunoglobulinas e acontece em alguns linfomas e leucemias, aumentando a expressão de Bcl-2, que é antiapoptótica (KOFF; RAMACHANDIRAN; BERNAL-MIZRACHI, 2015).

O contrapeso promovido pelas IAPs e proteínas anti-apoptóticas que estão associadas à via intrínseca da apoptose, regula a morte celular pelas proteínas pró-apoptóticas da mesma via. Desta forma, demonstramos aqui que, embora a depleção farmacológica dos neurônios sensoriais tenha promovido uma superexpressão de genes que codificam proteínas que participam da via intrínseca da apoptose, o mesmo promoveu uma regulação positiva do mRNA para *Bcl2*, *Bcl2l*, *Birc3*, *Mcl1* e *Xiap* ambos genes codificam proteínas que culminam na inibição

da apoptose.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fim de reunir os principais achados das experimentações *in-vivo*, desenhamos alguns modelos esquemáticos. Em síntese, observamos que a depleção farmacológica das fibras de neurônios sensoriais, utilizando a resiniferatoxina (RTX), promoveu o crescimento e angiogênese tumoral. Demonstramos ainda que o tratamento com o quimioterápico cisplatina promoveu uma perda de fibras sensoriais no tumor primário, semelhante à depleção farmacológica com RTX. Consequentemente, a presença de fibras sensoriais secretoras dos neuropeptídeos SP, CGRP e VIP reduziram nos grupos de animais tratados com cisplatina ou RTX. Entretanto, observamos a marcação de SP nos grupos cisplatina e RTX, indicando que outras células produtoras de SP, que não os neurônios sensoriais, foram recrutadas para o microambiente tumoral. Além disso, fibras neuronais TUBB3⁺ se mantiveram mesmo após os tratamentos, sugerindo que outros tipos de fibras nervosas estão presentes no tumor primário (Figura 45).

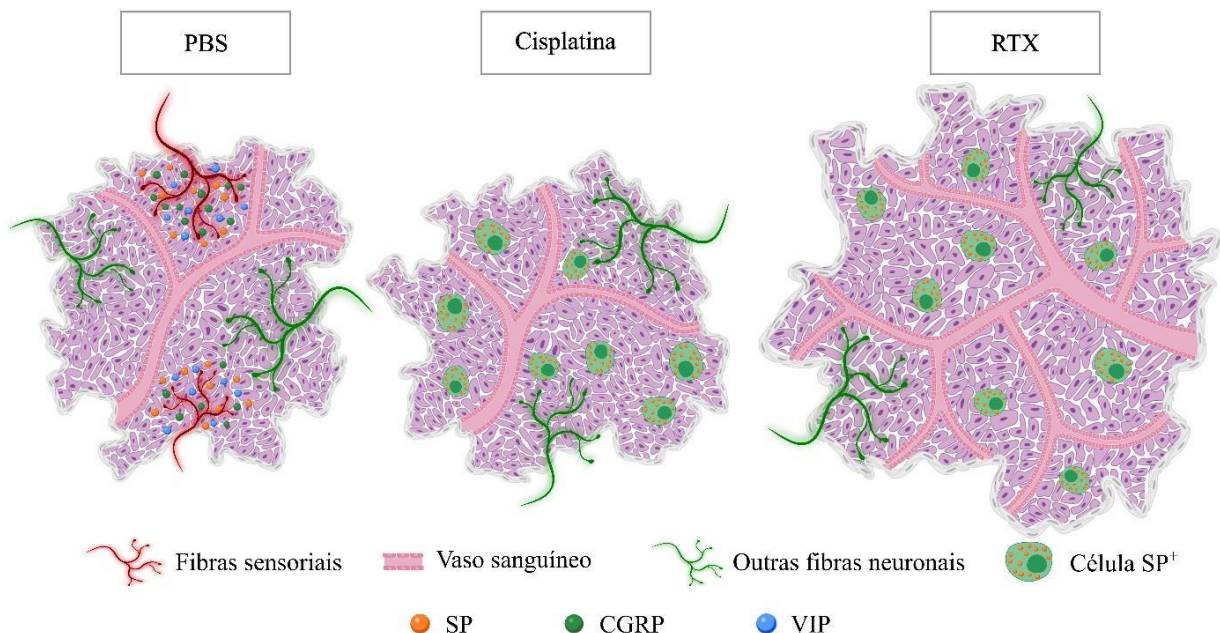


Figura 45. Modelo esquemático I. O tratamento com cisplatina ou com RTX promoveu danos às fibras sensoriais no tumor primário. O crescimento e angiogênese tumoral foram impulsionados pela depleção dos neurônios sensoriais com RTX. Células positivas para o neuropeptídeo SP foram observadas mesmo após os tratamentos. Fibras positivas para o marcador neuronal TUBB3 foram observadas nos três grupos, indicando a

presença de outras fibras neuronais no tumor primário.

Neste trabalho, mostramos que o tratamento com cisplatina ou a depleção prévia de neurônios sensoriais com RTX diminuiu as subpopulações celulares com perfil de CSCs, seja em estado proliferativo ($Ki-67^+$) ou não ($Ki-67^-$). Além disso, as subpopulações de células $ALDH^+$ ou $CD24^+$ foram drasticamente reduzidas no grupo RTX, indicando que neurônios sensoriais possuem algum papel na manutenção dessas células (Figura 46).

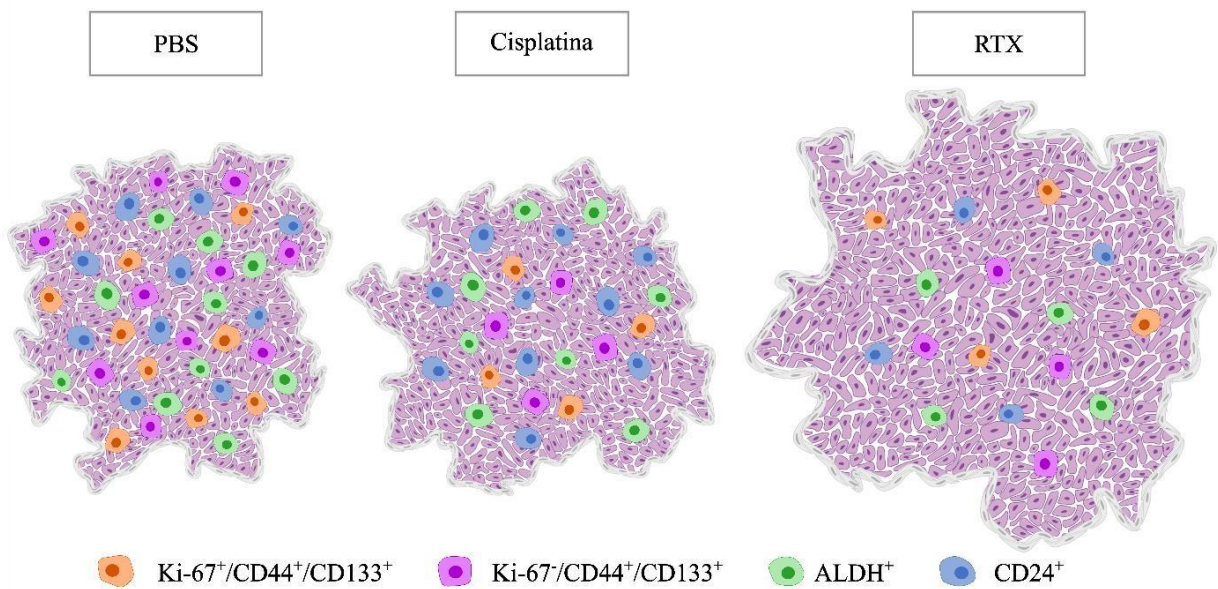


Figura 46. Modelo esquemático II. O tratamento com cisplatina ou com RTX diminuiu as subpopulações celulares com perfil de CSCs, seja em estado proliferativo ($Ki-67^+$) ou não ($Ki-67^-$). A depleção farmacológica dos neurônios sensoriais com RTX reduziu drasticamente as subpopulações celulares $ALDH^+$ e $CD24^+$.

Nossos achados mostraram ainda que as subpopulações de células do sistema imunológico foram afetadas após os tratamentos. No grupo de animais tratados com cisplatina, observamos uma redução de células NK, $NK/FOXP3^+$, $CD4^+$ e $CD4/FOXP3^+$, e um recrutamento de células $CD8^+$ e $CD8^+/FOXP3^+$. Já no grupo de animais que tiveram seus neurônios sensoriais depletados com RTX, observamos uma redução de células NKT, $NKT/FOXP3^+$, $CD4^+$ e $CD4/FOXP3^+$ (Figura 47).

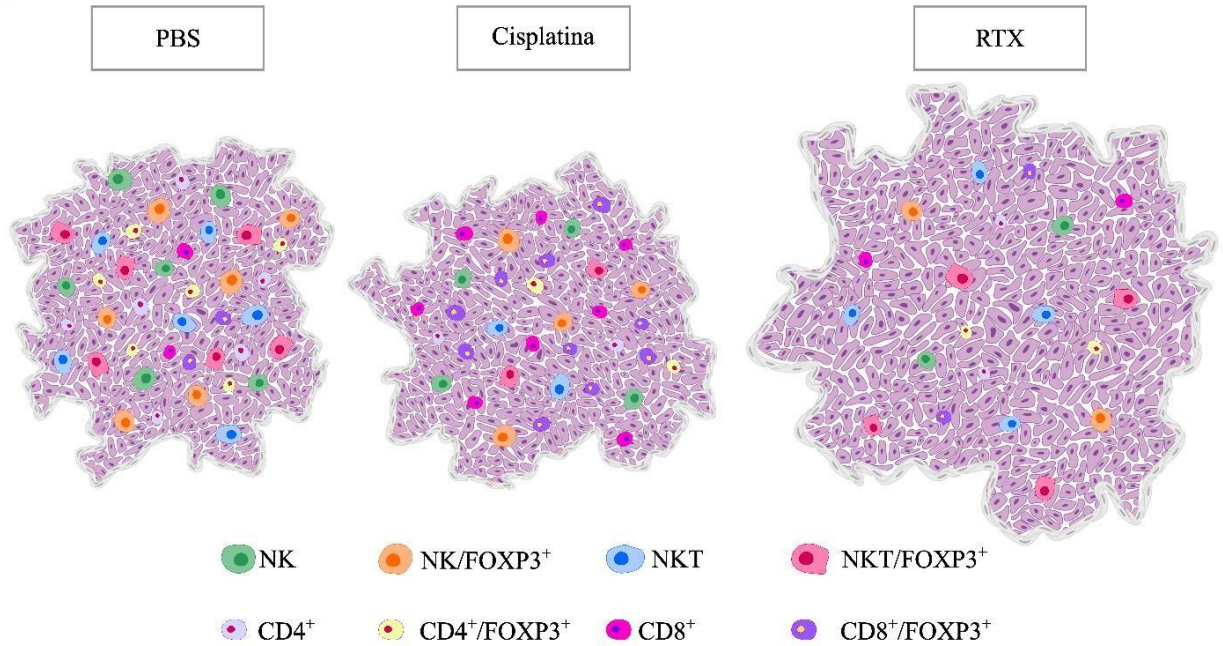


Figura 47. Modelo esquemático III. As subpopulações de células imunes foram afetadas nos grupos cisplatina e RTX. No grupo de animais tratados com cisplatina, observamos uma redução de células NK, NK/FOXP3⁺, CD4⁺ e CD4/FOXP3⁺, e um recrutamento de células CD8⁺ e CD8⁺/FOXP3⁺. Já no grupo de animais que tiveram seus neurônios sensoriais depletados com RTX, observamos uma redução de células NKT, NKT/FOXP3⁺, CD4⁺ e CD4/FOXP3⁺.

No que se diz respeito à regulação dos marcadores do evento EMT, nossos dados demonstraram que ambos os tratamentos reduziram a expressão da proteína epitelial E-caderina e dos marcadores mesenquimais N-caderina, Vimentina e Fibronectina, no tumor primário. O tratamento com o quimioterápico cisplatina promoveu o aumento de fibras de colágeno do tipo I e ambos tratamentos reduziram a produção de fibras de colágeno do tipo III (Figura 48).

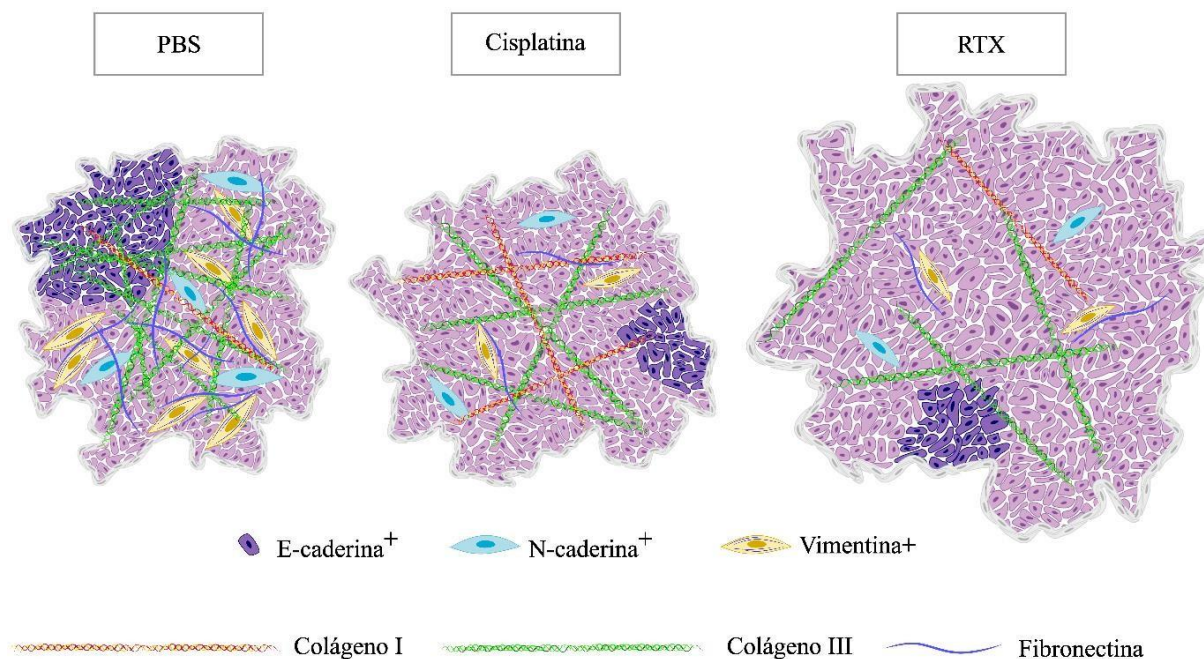


Figura 48. Modelo esquemático IV. A expressão de marcadores do fenômeno EMT foi afetada nos grupos cisplatina e RTX. Ambos os tratamentos reduziram a expressão da proteína epitelial E-caderina e dos marcadores mesenquimais N-caderina, Vimentina e Fibronectina, no tumor primário. O tratamento com o quimioterápico cisplatina promoveu o aumento de fibras de colágeno do tipo I e ambos tratamentos reduziram a produção de fibras de colágeno do tipo III.

Os resultados gerados neste projeto podem constituir uma mudança de paradigma, uma vez que demonstrar a importância das interações dos nervos sensoriais e células de câncer abrirá questões sobre o papel dos neurônios sensoriais na regulação do fenômeno EMT *in vivo*. Esta pesquisa pode mudar a forma como o papel dos nervos sensoriais no câncer é clinicamente definido. Em vez de serem simplesmente a causa de dor associada ao câncer, as inervações sensoriais encontradas nos tumores sólidos podem se tornar possíveis alvos para tratamentos inovadores.

8. CONCLUSÃO

- A linhagem celular de câncer de pulmão de células não-pequenas LLC1 cultivada em tumoresfera representa, de fato, um modelo de quimiorresistência ao tratamento com cisplatina;
- Nossos estudos *in-vitro* demonstraram que a cisplatina induz a regulação positiva dos genes de pluripotência e EMT, especialmente na linhagem LLC1 cultivada no modelo de enriquecimento de CSCs;

- O meio condicionado de neurônios sensoriais é capaz de diminuir a viabilidade celular da linhagem LLC1 cultivada em tumoresfera;
- O meio condicionado de neurônios sensoriais confere quimiorresistência à linhagem celular LLC1 tratada com cisplatina, além de aumentar a fração sobrevivente das células em monocamada ou tumoresfera;
- As células LLC1 em co-cultura com neurônios sensoriais extraídos do DRG apresentam um fenótipo EMT híbrido;
- A depleção sistêmica de neurônios sensoriais com resiniferatoxina (RTX) promoveu o crescimento e angiogênese tumoral. Além disso, um número maior de metástases foram observadas nos pulmões de animais do grupo RTX;
- O tratamento com o quimioterápico cisplatina ou a depleção prévia de neurônios sensoriais com RTX induziram efeitos semelhantes no tumor primário em relação à ausência de fibras sensoriais, diminuição das proteínas E-caderina, N-caderina, fibronectina e vimentina, redução de células com perfil *CSCs-like* e de células do sistema imunológico;
- A cisplatina promoveu um aumento das células CD8⁺ e CD8⁺/FOXP3⁺;
- A depleção dos neurônios sensoriais com RTX promoveu regulação positiva de genes associados à via intrínseca da apoptose comparado ao tratamento com cisplatina;
- O tratamento com cisplatina promoveu aumento na produção de fibras de colágeno do tipo I na matriz extracelular dos tumores.

REFERÊNCIAS

1. ADESHAKIN, Funmilayo O. *et al.* Mechanisms for modulating Anoikis resistance in cancer and the relevance of metabolic reprogramming. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 626577, 2021.
2. ÅHSBERG, Kristina; OLSSON, Håkan; STAËL VON HOLSTEIN, Christer. Increased mortality in prostate carcinoma and smoking-related disease after parietal cell vagotomy: A long-term follow-up study. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 44, n. 8, p. 947-951, 2009.
3. ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
4. ALDOSSARY, Sara A. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 12, n. 1, p. 7-15, 2019.
5. ALI, Asfa; BHATTACHARYA, Santanu. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 16, p. 4506-4521, 2014.
6. ALMEIDA VL, Leitão A, Reina LD, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MT. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**. 2005 Jan;28(1):118-29.
7. ALMEIDA VL, Leitão A, Reina LD, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MT. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**. 2005 Jan;28(1):118-29.
8. AMIT, Moran *et al.* International collaborative validation of intraneural invasion as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **Head & neck**, v. 37, n. 7, p. 1038-1045, 2015.
9. AREVALO, J. C.; WU, S. H. Neurotrophin signaling: many exciting surprises!. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 13, p. 1523-1537, 2006
10. ASSAS, Bakri M.; PENNOCK, Joanne I.; MIYAN, Jaleel A. Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, p. 23, 2014.
11. AYALA, Gustavo E. *et al.* Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 23, p. 7593-7603, 2008.
12. AYOB, Ain Zubaidah; RAMASAMY, Thamil Selvee. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. **Journal of biomedical science**, v. 25, n. 1, p. 20, 2018.

13. BABAEI, Ghader; AZIZ, Shiva Gholizadeh-Ghaleh; JAGHI, Nasrin Zare Zavieyh. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 110909, 2021.
14. BALOOD, Mohammad *et al.* Nociceptor neurons affect cancer immunosurveillance. **Nature**, p. 1-8, 2022.
15. BAO, Wei *et al.* Upregulation of TrkB promotes epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance in endometrial carcinoma. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e70616, 2013.
16. BAPAT, Aditi A. *et al.* Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 10, p. 695-707, 2011.
17. BARRIERE, Guislaine *et al.* Epithelial mesenchymal transition: a double-edged sword. **Clinical and translational medicine**, v. 4, n. 1, p. 14, 2015.
18. BAUTISTA, Diana M. *et al.* The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature**, v. 448, n. 7150, p. 204-208, 2007.
19. BAYATI, Samaneh *et al.* Antileukemic effects of neurokinin-1 receptor inhibition on hematologic malignant cells: a novel therapeutic potential for aprepitant. **Anti-cancer drugs**, v. 29, n. 3, p. 243-252, 2018.
20. BEARD, C. J. *et al.* Perineural invasion is associated with increased relapse after external beam radiotherapy for men with low-risk prostate cancer and may be a marker for occult, high-grade cancer. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 58, n. 1, p. 19-24, 2004.
21. BEER, David G. *et al.* Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. **Nature medicine**, v. 8, n. 8, p. 816-824, 2002.
22. BEN-SHAANAN, T. L. *et al.* Modulation of anti-tumor immunity by the brain's reward system. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 2723, Jul 13 2018.
23. BIANKIN, Andrew V. *et al.* Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 399-405, 2012.
24. BLANCHARD, Lucas *et al.* Flow cytometry analysis of endothelial cells and subsets of exhausted CD8+ T cells in murine tumor models. **STAR protocols**, v. 3, n. 2, p. 101444, 2022.
25. BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

26. BRISSON, Becky K. *et al.* Type III collagen directs stromal organization and limits metastasis in a murine model of breast cancer. **The American journal of pathology**, v. 185, n. 5, p. 1471-1486, 2015.
27. BUCK, Stephen H. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. **Pharmacol. Rev.**, v. 38, p. 179-226, 1986.
28. BUZZA, Marguerite S. *et al.* Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23549-23558, 2005.
29. CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.* Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. **Nature**, v. 511, n. 7511, p. 543, 2014.
30. CANCER RESEARCH UK. Treatment for non small cell lung cancer (NSCLC). Disponível em: < <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/lung-cancer/treatment/non-small-cell-lung-cancer>>. Acesso em: 02 de novembro de 2022.
31. CASEY, Stephanie C. *et al.* Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2015. p. S199-S223.
32. CATERINA, Michael J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-824, 1997.
33. CAVALETTI, G. *et al.* Morphometric study of the sensory neuron and peripheral nerve changes induced by chronic cisplatin (DDP) administration in rats. **Acta neuropathologica**, v. 84, n. 4, p. 364-371, 1992.
34. CERVERO, F.; MCRITCHIE, H. A. Neonatal capsaicin does not affect unmyelinated efferent fibers of the autonomic nervous system: functional evidence. **Brain research**, v. 239, n. 1, p. 283-288, 1982.
35. CEYHAN, Güralp O. *et al.* Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 374, n. 3, p. 442-447, 2008.
36. CEYHAN, Güralp O. *et al.* The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis. **Gut**, v. 56, n. 4, p. 534-544, 2007.
37. CHAE, Young Kwang *et al.* Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 6, n. 1, p. 1-27, 2018.

38. CHAO, Moses V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 4, p. 299-309, 2003.
39. CHEN, Hongyu *et al.* Chronic psychological stress promotes lung metastatic colonization of circulating breast cancer cells by decorating a pre-metastatic niche through activating β -adrenergic signaling. **The Journal of pathology**, v. 244, n. 1, p. 49-60, 2018.
40. CHEN, Xiao-Yi *et al.* High expression of substance P and its receptor neurokinin-1 receptor in colorectal cancer is associated with tumor progression and prognosis. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 3595, 2016.
41. CHOI, Yoo Jin *et al.* Diagnostic model for pancreatic cancer using a multi-biomarker panel. **Annals of surgical treatment and research**, v. 100, n. 3, p. 144-153, 2021.
42. COELHO, Polyana Galvão Bernardes *et al.* Evaluation of dermal collagen stained with picosirius red and examined under polarized light microscopy. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 93, p. 415-418, 2018.
43. COLE, Steven W. *et al.* Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 9, p. 563-572, 2015.
44. COLEMAN, Mathew L. *et al.* Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. **Nature cell biology**, v. 3, n. 4, p. 339-345, 2001.
45. CRACCHIOLO, Jennifer R. *et al.* Patterns of recurrence in oral tongue cancer with perineural invasion. **Head & neck**, v. 40, n. 6, p. 1287-1295, 2018.
46. CUDA, Carla M.; POPE, Richard M.; PERLMAN, Harris. The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 9, p. 543-558, 2016.
47. CUI, Ling; SHI, Yu; ZHANG, Guo Nan. Perineural invasion as a prognostic factor for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 292, n. 1, p. 13-19, 2015.
48. DA FONSECA PACHECO, Daniela; ROMERO, Thiago Roberto Lima; DUARTE, Igor Dimitri Gama. Ketamine induces central antinociception mediated by endogenous cannabinoids and activation of CB1 receptors. **Neuroscience Letters**, v. 699, p. 140-144, 2019.
49. DANTZER, Robert. Neuroimmune interactions: from the brain to the immune system and vice versa. **Physiological reviews**, v. 98, n. 1, p. 477-504, 2018.
50. DASARI, Shaloam R. *et al.* Preclinical assessment of low doses of cisplatin in the management of acute promyelocytic leukemia. **International journal of cancer research and molecular mechanisms**, v. 1, n. 3, 2015.

51. DASGUPTA, Piyali *et al.* Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 1, p. 36-45, 2009.
52. DELGADO, Mario; GANEA, Doina. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. **Amino acids**, v. 45, n. 1, p. 25-39, 2013.
53. DEMIR, Ihsan Ekin *et al.* Clinically actionable strategies for studying neural influences in cancer. **Cancer Cell**, v. 38, n. 1, p. 11-14, 2020.
54. DEMIR, Ihsan Ekin; FRIESS, Helmut; CEYHAN, Gueralp O. Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 11, p. 649-659, 2015.
55. DEMIR, Ihsan Ekin; FRIESS, Helmut; CEYHAN, Güralp O. Nerve-cancer interactions in the stromal biology of pancreatic cancer. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 97, 2012.
56. DENG, Jing *et al.* Prognostic value of perineural invasion in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88907, 2014.
57. DESHMUKH, Swati D.; WILLMANN, Jürgen K.; JEFFREY, R. Brooke. Pathways of extrapancreatic perineural invasion by pancreatic adenocarcinoma: evaluation with 3D volume-rendered MDCT imaging. **American journal of roentgenology**, v. 194, n. 3, p. 668-674, 2010.
58. DESKIN, Brian *et al.* Inhibition of HDAC6 attenuates tumor growth of non-small cell lung cancer. **Translational oncology**, v. 13, n. 2, p. 135-145, 2020.
59. DI MARTINO, Julie S. *et al.* A tumor-derived type III collagen-rich ECM niche regulates tumor cell dormancy. **Nature Cancer**, v. 3, n. 1, p. 90-107, 2022.
60. DI VEROLI, Giovanni Y. *et al.* An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features. **Scientific reports**, v. 5, p. 14701, 2015.
61. DINIZ, Roberta Wolp *et al.* Disease-free survival in patients with non-metastatic breast cancer. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, p. 407-413, 2016.
62. DOCKRY, Éilis *et al.* Epigenetic induction of CD1d expression primes lung cancer cells for killing by invariant natural killer T cells. **Oncoimmunology**, v. 7, n. 6, p. e1428156, 2018.
63. DOLLÉ, Laurent *et al.* Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. **Current cancer drug targets**, v. 4, n. 6, p. 463-470, 2004.
64. DONGRE, Anushka; WEINBERG, Robert A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. **Nature reviews Molecular cell biology**, p. 1, 2018.

65. DURAKER, Nüvit; ŞIŞMAN, Servet; CAN, Günay. The significance of perineural invasion as a prognostic factor in patients with gastric carcinoma. **Surgery today**, v. 33, n. 2, p. 95-100, 2003.
66. ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
67. ERAMO, A.; HAAS, T. L.; DE MARIA, R. Lung cancer stem cells: tools and targets to fight lung cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 33, p. 4625-4635, 2010.
68. ERIN, Nuray *et al.* Activation of neuroimmune pathways increases therapeutic effects of radiotherapy on poorly differentiated breast carcinoma. **Brain, behavior, and immunity**, v. 48, p. 174-185, 2015.
69. ERIN, Nuray *et al.* Capsaicin-induced inactivation of sensory neurons promotes a more aggressive gene expression phenotype in breast cancer cells. **Breast cancer research and treatment**, v. 99, n. 3, p. 351-364, 2006.
70. ERIN, Nuray *et al.* Capsaicin-mediated denervation of sensory neurons promotes mammary tumor metastasis to lung and heart. **Anticancer research**, v. 24, n. 2B, p. 1003-1010, 2004.
71. ERIN, Nuray *et al.* Regulation of Carcinogenesis by Sensory Neurons and Neuromediators. **Cancers**, v. 14, n. 9, p. 2333, 2022.
72. ERIN, Nuray. Role of sensory neurons, neuroimmune pathways, and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in a murine model of breast cancer metastasis. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 69, n. 2, p. 307-314, 2020.
73. ERNEST, Nola Jean; HABELA, Christa W.; SONTHEIMER, Harald. Cytoplasmic condensation is both necessary and sufficient to induce apoptotic cell death. **Journal of cell science**, v. 121, n. 3, p. 290-297, 2008.
74. ESPAÑA-FERRUFINO, Alejandro; LINO-SILVA, Leonardo S.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, Rosa A. Extramural perineural invasion in pT3 and pT4 gastric carcinomas. **Journal of pathology and translational medicine**, v. 52, n. 2, p. 79-84, 2018.
75. ESTEBAN, F. *et al.* A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. **Cancer and metastasis reviews**, v. 25, n. 1, p. 137-145, 2006.
76. FALKENHORST, Johanna *et al.* Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) are commonly dysregulated in GIST and can be pharmacologically targeted to enhance the pro-apoptotic activity of imatinib. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 41390, 2016.

77. FAN, Tai-Ping D. *et al.* Stimulation of angiogenesis by substance P and interleukin-1 in the rat and its inhibition by NK1 or interleukin-1 receptor antagonists. **British journal of pharmacology**, v. 110, n. 1, p. 43-49, 1993.
78. FAULKNER, Sam *et al.* Tumor neurobiology and the war of nerves in cancer. **Cancer discovery**, v. 9, n. 6, p. 702-710, 2019.
79. FINK, Susan L.; COOKSON, Brad T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907-1916, 2005.
80. FINNO, Carrie J. *et al.* Cisplatin neurotoxicity targets specific subpopulations and K⁺ channels in tyrosine-hydroxylase positive dorsal root ganglia neurons. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 16, 2022.
81. FITZGERALD, Jessica E. *et al.* Heterogeneity of circulating tumor cell dissemination and lung metastases in a subcutaneous Lewis lung carcinoma model. **Biomedical Optics Express**, v. 11, n. 7, p. 3633-3647, 2020.
82. FRANKLIN, MARYLAND. LL/2: an immunosuppressive murine tumor model. **Labcorp**, 2019. Disponível em: <<https://drugdevelopment.labcorp.com/industry-solutions/oncology/preclinical/tumor-spotlights/ll-2-an-immunosuppressive-murine-tumor-model.html>>. Acesso em: 23, novembro de 2022.
83. FRANTZ, Christian; STEWART, Kathleen M.; WEAVER, Valerie M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of cell science**, v. 123, n. 24, p. 4195-4200, 2010.
84. FRIESS, Helmut *et al.* Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. **Laboratory investigation**, v. 83, n. 5, p. 731-742, 2003.
85. GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.
86. GANEA, D.; RODRIGUEZ, R.; DELGADO, M. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: players in innate and adaptive immunity. **Cellular And Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)**, v. 49, n. 2, p. 127-142, 2003.
87. GANEA, Doina; HOOPER, Kirsten M.; KONG, Weimin. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide: direct effects on immune cells and involvement in inflammatory and autoimmune diseases. **Acta Physiologica**, v. 213, n. 2, p. 442-452, 2015.

88. GARCIA-RECIO, Susana *et al.* Substance P Autocrine Signaling Contributes to Persistent HER2 Activation That Drives Malignant Progression and Drug Resistance in Breast Cancer Transmodulation of HER2 by SP in Breast Cancer. **Cancer research**, v. 73, n. 21, p. 6424-6434, 2013.
89. GARG, Minal. Epithelial-mesenchymal transition-activating transcription factors-multifunctional regulators in cancer. **World journal of stem cells**, v. 5, n. 4, p. 188, 2013.
90. GARNIER, Agnès *et al.* Targeting the neurokinin-1 receptor inhibits growth of human colon cancer cells. **International journal of oncology**, v. 47, n. 1, p. 151-160, 2015.
91. GAUTRON, Laurent *et al.* Genetic tracing of Nav1.8-expressing vagal afferents in the mouse. **Journal of Comparative Neurology**, v. 519, n. 15, p. 3085-3101, 2011.
92. GEORGE, Julie *et al.* Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. **Nature**, v. 524, n. 7563, p. 47-53, 2015.
93. GEPPETTI, Pierangelo; HOLZER, Peter. **Neurogenic inflammation**. Crc Press, 1996.
94. GIATROMANOLAKI, Alexandra *et al.* Prognostic relevance of the relative presence of CD4, CD8 and CD20 expressing tumor infiltrating lymphocytes in operable non-small cell lung cancer patients. **Anticancer Research**, v. 41, n. 8, p. 3989-3995, 2021.
95. GOADSBY, P. J.; EDVINSSON, L.; EKMAN, R. Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 23, n. 2, p. 193-196, 1988.
96. Gonçalves, B.Ô.P., Fialho, S.L., Silvestrini, B.R., Sena, I.F.G., dos Santos, G.S.P., Gomes, D. A and Silva, L.M., 2020. Central nervous system (CNS) tumor cell heterogeneity contributes to differential platinum-based response in an in vitro 2D and 3D cell culture approach. *Experimental and Molecular Pathology*, p.104520.
97. GONZALEZ, Hugo; HAGERLING, Catharina; WERB, Zena. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. **Genes & development**, v. 32, n. 19-20, p. 1267-1284, 2018.
98. GRANSTEIN, Richard D. *et al.* Calcitonin gene-related peptide: key regulator of cutaneous immunity. **Acta physiologica**, v. 213, n. 3, p. 586-594, 2015.
99. GREEN, Ryan *et al.* Actinomycin D and telmisartan combination targets Lung cancer Stem cells through the Wnt/Beta catenin pathway. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.
100. GRIFFIN, Nathan *et al.* Targeting neurotrophin signaling in cancer: The renaissance. **Pharmacological research**, v. 135, p. 12-17, 2018.

101. GRIVICICH I; REGNER A; ROCHA AB. **Morte Celular por Apoptose**. Revista Brasileira de Cancerologia 2007; 53(3): 335-343.
102. GUO, Kun *et al.* Interaction of the Sympathetic Nerve with Pancreatic Cancer Cells Promotes Perineural Invasion through the Activation of STAT3 Signaling Role of Sympathetic Nerve in Perineural Invasion. **Molecular cancer therapeutics**, v. 12, n. 3, p. 264-273, 2013.
103. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
104. HARFORD-WRIGHT, E. *et al.* Evaluating the role of substance P in the growth of brain tumors. **Neuroscience**, v. 261, p. 85-94, 2014.
105. HASSAN, Mohamed *et al.* Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
106. HAYAKAWA, Yoku *et al.* Nerve growth factor promotes gastric tumorigenesis through aberrant cholinergic signaling. **Cancer cell**, v. 31, n. 1, p. 21-34, 2017.
107. HELLIWELL, Rachel JA *et al.* Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. **Neuroscience letters**, v. 250, n. 3, p. 177-180, 1998.
108. HOLZER, Peter. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 739-768, 1988.
109. HORVATHOVA, L.; MRAVEC, B. Effect of the autonomic nervous system on cancer progression depends on the type of tumor: solid are more affected than ascitic tumors. **Endocrine Regulations**, v. 50, n. 4, p. 215-224, 2016.
110. HSIAO, Kuan-Chung *et al.* Elevated expression of lumican in lung cancer cells promotes bone metastasis through an autocrine regulatory mechanism. **Cancers**, v. 12, n. 1, p. 233, 2020.
111. HU, Shuiying *et al.* Recent developments of novel pharmacologic therapeutics for prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 21, p. 6295-6301, 2019.
112. HUANG, Chih-Yang *et al.* A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. **Biomedicine**, v. 7, n. 4, 2017.
113. HUANG, Yanqi *et al.* Individualized prediction of perineural invasion in colorectal cancer: development and validation of a radiomics prediction model. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 40, 2018.

114. HUTCHINGS, Charlotte; PHILLIPS, Jade A.; DJAMGOZ, Mustafa BA. Nerve input to tumours: Pathophysiological consequences of a dynamic relationship. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1874, n. 2, p. 188411, 2020.
115. HUYETT, Phillip *et al.* Perineural invasion in parotid gland malignancies. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, v. 158, n. 6, p. 1035-1041, 2018.
116. INDA, Maria-del-Mar *et al.* Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. **Cancers**, v. 6, n. 1, p. 226-239, 2014.
117. INGRAM, Zewde *et al.* Targeting natural killer T cells in solid malignancies. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1329, 2021.
118. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2019.
119. International Agency For Research On Cancer. Estimated number of incident cases from 2020 to 2025, all cancers, both sexes, all ages. Disponível em: < https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=1&single_unit=500000&years=2025>. Acesso em: 02 de novembro de 2022.
120. IOZZO, Renato V.; GUBBIOTTI, Maria A. Extracellular matrix: the driving force of mammalian diseases. **Matrix Biology**, v. 71, p. 1-9, 2018.
121. JANELSINS, Brian M. *et al.* Neurokinin-1 receptor agonists bias therapeutic dendritic cells to induce type 1 immunity by licensing host dendritic cells to produce IL-12. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 121, n. 15, p. 2923-2933, 2013.
122. JÉZÉQUEL, Pascal *et al.* Identification of three subtypes of triple-negative breast cancer with potential therapeutic implications. **Breast Cancer Research**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2019.
123. JI, Ru-Rong; CHAMESSIAN, Alexander; ZHANG, Yu-Qiu. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 572-577, 2016.
124. JINESH G, Goodwin; CHUNDURU, Srinivas; KAMAT, Ashish M. Smac mimetic enables the anticancer action of BCG-stimulated neutrophils through TNF- α but not through TRAIL and FasL. **Journal of leukocyte biology**, v. 92, n. 1, p. 233-244, 2012.
125. JOBLING, Phillip *et al.* Nerve–cancer cell cross-talk: a novel promoter of tumor progression. **Cancer research**, v. 75, n. 9, p. 1777-1781, 2015.
126. JOLLY, Mohit Kumar *et al.* Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 155, 2015.

127. KABATA, Hiroki *et al.* Neuro-immune crosstalk and allergic inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 4, p. 1475-1482, 2019.
128. KALLURI, Raghu *et al.* The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.
129. KAMIYA, Atsunori *et al.* Genetic manipulation of autonomic nerve fiber innervation and activity and its effect on breast cancer progression. **Nature neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 1289-1305, 2019.
130. KANG, Kyeongjin *et al.* Analysis of Drosophila TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 597-600, 2010.
131. KARACOSTA, Loukia G. *et al.* Mapping lung cancer epithelial-mesenchymal transition states and trajectories with single-cell resolution. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2019.
132. KARASHIMA, Yuji *et al.* TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 4, p. 1273-1278, 2009.
133. KARIMI-BUSHERI, Feridoun *et al.* CD24+/CD38-as new prognostic marker for non-small cell lung cancer. **Multidisciplinary respiratory medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.
134. KELLEY, Michael J. *et al.* Small cell lung carcinoma cell lines express mRNA for calcitonin and alpha-and beta-calcitonin gene related peptides. **Cancer letters**, v. 81, n. 1, p. 19-25, 1994.
135. KIM, Do *et al.* Epithelial mesenchymal transition in embryonic development, tissue repair and cancer: a comprehensive overview. **Journal of clinical medicine**, v. 7, n. 1, p. 1, 2017.
136. KIM, Seok-Hyun *et al.* Prognostic impact of CD8 and programmed death-ligand 1 expression in patients with resectable non-small cell lung cancer. **British journal of cancer**, v. 120, n. 5, p. 547-554, 2019.
137. KIM, Yong-Nyun *et al.* Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. **International journal of cell biology**, v. 2012, 2012.
138. KITAZAWA, Ayako; SHIMIZU, Norio. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia. **New biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 326-333, 2011.
139. KOFF, Jean L.; RAMACHANDIRAN, Sampath; BERNAL-MIZRACHI, Leon. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 2, p. 2942-2955, 2015.

140. KOH, Won Uk *et al.* The preventive effect of resiniferatoxin on the development of cold hypersensitivity induced by spinal nerve ligation: involvement of TRPM8. **BMC neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2016.
141. KRARUP-HANSEN, A. *et al.* Histology and platinum content of sensory ganglia and sural nerves in patients treated with cisplatin and carboplatin: an autopsy study. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 25, n. 1, p. 29-40, 1999.
142. KRISTIENSEN, G. *et al.* CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. **British journal of cancer**, v. 88, n. 2, p. 231-236, 2003.
143. KRUGER, Lawrence. Morphological features of thin sensory afferent fibers: a new interpretation of 'nociceptor' function. **Progress in brain research**, v. 74, p. 253-257, 1988.
144. KUOL, Nyanbol *et al.* Role of the nervous system in cancer metastasis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1-12, 2018.
145. KUSINDARTA, Dwi Liliek; WIHADMADYATAMI, Hevi. The role of extracellular matrix in tissue regeneration. **Tissue regeneration**, v. 65, 2018.
146. LAGADEC, C. *et al.* TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 28, n. 18, p. 1960-1970, 2009.
147. LAPIDOT, Tsvee *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 645, 1994.
148. LAVOUÉ *et al.* **Les nouveaux profils moléculaires dans le cancer de l'ovaire peuvent-ils modifier les stratégies thérapeutiques?** J Gynecol Obstet Hum Reprod (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jogoh.2016.09.002>.
149. LE, Thanh T. *et al.* Sensory nerves enhance triple-negative breast cancer invasion and metastasis via the axon guidance molecule PlexinB3. **NPJ breast cancer**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2022.
150. LEI, Yifeng *et al.* Gold nanoclusters-assisted delivery of NGF siRNA for effective treatment of pancreatic cancer. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2017.
151. LI, Chang-Lin *et al.* Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. **Cell research**, v. 26, n. 1, p. 83-102, 2016.
152. LI, Jun *et al.* Monoamine oxidase A suppresses hepatocellular carcinoma metastasis by inhibiting the adrenergic system and its transactivation of EGFR signaling. **Journal of hepatology**, v. 60, n. 6, p. 1225-1234, 2014.

153. LI, Xuqi *et al.* Neurotransmitter Substance P Mediates Pancreatic Cancer Perineural Invasion via NK-1R in Cancer Cells Substance P Mediates Pancreatic Cancer Perineural Invasion. **Molecular cancer research**, v. 11, n. 3, p. 294-302, 2013.
154. LIM, Ji Eun; CHUNG, Eunkyung; SON, Youngsook. A neuropeptide, Substance-P, directly induces tissue-repairing M2 like macrophages by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway even in the presence of IFN γ . **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2017.
155. LIN, Ya-Tin; CHEN, Jin-Chung. Dorsal root ganglia isolation and primary culture to study neurotransmitter release. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 140, p. e57569, 2018.
156. LIU, Xiaohao *et al.* Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: where we are and where we need to go. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 1493, 2020.
157. LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
158. Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?. *Journal of neuroscience methods*. 2000 Mar 15;96(2):147-52.
159. LOIS, Carlos; ALVAREZ-BUYLLA, Arturo. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science**, v. 264, n. 5162, p. 1145-1148, 1994.
160. LUO, Weihua; SHARIF, Taraneh R.; SHARIF, Mohammed. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **Cancer Research**, v. 56, n. 21, p. 4983-4991, 1996.
161. LYNCH, Thomas J. *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 21, p. 2129-2139, 2004.
162. MA, Chao *et al.* Sympathetic innervation contributes to perineural invasion of salivary adenoid cystic carcinoma via the β 2-adrenergic receptor. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 1475, 2019.
163. MA, Jun *et al.* Expression of nerve growth factor and tyrosine kinase receptor A and correlation with perineural invasion in pancreatic cancer. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 23, n. 12, p. 1852-1859, 2008.
164. MADEO, Marianna *et al.* Cancer exosomes induce tumor innervation. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2018.

165. MAGNON, Claire *et al.* Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. **Science**, v. 341, n. 6142, p. 1236361, 2013.
166. MAGNON, Claire. Role of the autonomic nervous system in tumorigenesis and metastasis. **Molecular & cellular oncology**, v. 2, n. 2, p. e975643, 2015.
167. MALMBERG, Annika B.; BLEY, Keith R. (Ed.). **Turning up the heat on pain: TRPV1 receptors in pain and inflammation**. Springer Science & Business Media, 2005.
168. MANI, Sendurai A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704-715, 2008.
169. MARCH, Brayden *et al.* Tumour innervation and neurosignalling in prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 17, n. 2, p. 119-130, 2020.
170. MARCHESI, Federica *et al.* Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 1, p. 77-82, 2010.
171. MARMIGERE, Frederic; ERNFORS, Patrik. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 2, p. 114-127, 2007.
172. MARSHALL, Erin A. *et al.* Emerging roles of T helper 17 and regulatory T cells in lung cancer progression and metastasis. **Molecular cancer**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2016.
173. MARTINVALET, Denis; ZHU, Pengcheng; LIEBERMAN, Judy. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 355-370, 2005.
174. MAUFFREY, Philippe *et al.* Progenitors from the central nervous system drive neurogenesis in cancer. **Nature**, v. 569, n. 7758, p. 672-678, 2019.
175. MCDONALD, Elizabeth S. *et al.* Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. **Neurobiology of disease**, v. 18, n. 2, p. 305-313, 2005.
176. MEHBOOB, Riffat *et al.* Role of neurotransmitter Substance P in progression of oral squamous cell carcinoma. **Pathology-Research and Practice**, v. 211, n. 3, p. 203-207, 2015.
177. MIETTO, Bruno Siqueira *et al.* Schwann cells provide iron to axonal mitochondria and its role in nerve regeneration. **Journal of Neuroscience**, v. 41, n. 34, p. 7300-7313, 2021.
178. MONTEIRO, Marta *et al.* Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF- β . **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 4, p. 2157-2163, 2010.

179. MOODY, Terry W.; NUCHE-BERENGUER, Bernardo; JENSEN, Robert T. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity**, v. 23, n. 1, p. 38-47, 2016.
180. MOREIRA, Milene Pereira *et al.* STAT3 as a promising chemoresistance biomarker associated with the CD44+/high/CD24-/low/ALDH+ BCSCs-like subset of the triple-negative breast cancer (TNBC) cell line. **Experimental Cell Research**, v. 363, n. 2, p. 283-290, 2018.
181. MUÑOZ, Miguel *et al.* Antitumor activity of neurokinin-1 receptor antagonists in MG-63 human osteosarcoma xenografts. **International journal of oncology**, v. 44, n. 1, p. 137-146, 2014.
182. MURAKAMI, Yoshiaki *et al.* Perineural invasion in extrahepatic cholangiocarcinoma: prognostic impact and treatment strategies. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 17, n. 8, p. 1429-1439, 2013.
183. NAGAKAWA, Osamu *et al.* Effect of prostatic neuropeptides on invasion and migration of PC-3 prostate cancer cells. **Cancer letters**, v. 133, n. 1, p. 27-33, 1998.
184. NAGY, J. I. *et al.* Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. **Journal of Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 399-406, 1983.
185. NAKAI, Akiko *et al.* Control of lymphocyte egress from lymph nodes through β 2-adrenergic receptors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 13, p. 2583-2598, 2014.
186. NCI (National Cancer Institute), 2015. What Is Cancer? Disponível em: < <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 07 de novembro de 2019.
187. NCI (National Cancer Institute), 2017. Precision Medicine in Cancer Treatment. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/precision-medicine>>. Acesso em: 16 de setembro de 2019.
188. NECULA, Laura *et al.* Collagen Family as Promising Biomarkers and Therapeutic Targets in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12415, 2022.
189. NEVIN, James T. *et al.* Sympathetic nervous tone limits the development of myeloid-derived suppressor cells. **Science Immunology**, v. 5, n. 51, p. eaay9368, 2020.

190. NISSEN, Michael D.; SLOAN, Erica K.; MATTAROLLO, Stephen R. β -Adrenergic Signaling Impairs Antitumor CD8⁺ T-cell Responses to B-cell Lymphoma Immunotherapy β AR Signaling Impairs T cell-Mediated Immunotherapy. **Cancer immunology research**, v. 6, n. 1, p. 98-109, 2018.
191. NUNEZ, R. *et al.* Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 11, p. 1665-1671, 2010.
192. O'CONNOR, Terence M. *et al.* The role of substance P in inflammatory disease. **Journal of cellular physiology**, v. 201, n. 2, p. 167-180, 2004.
193. OLA, Mohammad Shamsul; NAWAZ, Mohd; AHSAN, Haseeb. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 351, n. 1, p. 41-58, 2011.
194. ORONSKY *et al.* **A brief review of the management of platinum-resistant-platinum-refractory ovarian cancer**. *Med Oncol* (2017) 34:103.
195. OUYANG, Qing *et al.* Oncogenic role of neurotensin and neurotensin receptors in various cancers. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 44, n. 8, p. 841-846, 2017.
196. OVEN USTAALIOGLU, Bala Basak *et al.* Prognostic factors for operated gallbladder cancer. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, v. 50, n. 3, p. 451-457, 2019.
197. OZAKI, Hideo *et al.* The prognostic significance of lymph node metastasis and intrapancreatic perineural invasion in pancreatic cancer after curative resection. **Surgery today**, v. 29, n. 1, p. 16-22, 1999.
198. PAEZ, J. Guillermo *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. **Science**, v. 304, n. 5676, p. 1497-1500, 2004.
199. PALMA, C. *et al.* Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cell lines bearing tachykinin NK1 receptors. **British Journal of Cancer**, v. 79, n. 2, p. 236-243, 1999.
200. PALMA, Carla. Tachykinins and their receptors in human malignancies. **Current drug targets**, v. 7, n. 8, p. 1043-1052, 2006.
201. PAOLI, Paolo; GIANNONI, Elisa; CHIARUGI, Paola. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3481-3498, 2013.
202. PARDI, Ruggero *et al.* Signal transduction by adhesion receptors. 2010.

203. PARDOLL, Drew M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 252-264, 2012.
204. PAULSEN, Erna-Elise *et al.* CTLA-4 expression in the non-small cell lung cancer patient tumor microenvironment: diverging prognostic impact in primary tumors and lymph node metastases. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 66, n. 11, p. 1449-1461, 2017.
205. PEIFER, Martin *et al.* Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. **Nature genetics**, v. 44, n. 10, p. 1104-1110, 2012.
206. PERNER, Caroline; SOKOL, Caroline L. Protocol for dissection and culture of murine dorsal root ganglia neurons to study neuropeptide release. **STAR protocols**, v. 2, n. 1, p. 100333, 2021.
207. POLYAK, Kornelia; WEINBERG, Robert A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 265-273, 2009.
208. PRABAVATHY, D.; SWARNALATHA, Y.; RAMADOSS, Niveditha. Lung cancer stem cells—origin, characteristics and therapy. **Stem cell investigation**, v. 5, 2018.
209. PRAZERES, Pedro HDM *et al.* Ablation of sensory nerves favours melanoma progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 17, p. 9574-9589, 2020.
210. PUNDAVELA, Jay *et al.* ProNGF correlates with Gleason score and is a potential driver of nerve infiltration in prostate cancer. **The American journal of pathology**, v. 184, n. 12, p. 3156-3162, 2014.
211. RANDALL, Lowell O. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. **Arch Int Pharmacodyn.**, v. 111, p. 409-419, 1957.
212. REAVIS, Hunter D.; CHEN, H. Isaac; DRAPKIN, Ronny. Tumor innervation: cancer has some nerve. **Trends in cancer**, v. 6, n. 12, p. 1059-1067, 2020.
213. RENTHAL, William *et al.* Transcriptional reprogramming of distinct peripheral sensory neuron subtypes after axonal injury. **Neuron**, v. 108, n. 1, p. 128-144. e9, 2020.
214. RESTAINO, Anthony C.; VERMEER, Paola D. Neural regulations of the tumor microenvironment. **FASEB BioAdvances**, v. 4, n. 1, p. 29-42, 2022.
215. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.
216. RIBEIRO, Ana Sofia; PAREDES, Joana. P-cadherin linking breast cancer stem cells and invasion: a promising marker to identify an “intermediate/metastable” EMT

- state. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 371, 2015.
217. RICKERT RC; JELLUSOVA J; MILETIC AV. **Signaling by the TNFR superfamily in B-cell biology and disease**. *Immunol Rev.* 2011 November ; 244(1): 115–133.
218. RIZVI, Naiyer A. *et al.* Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non–small cell lung cancer. **Science**, v. 348, n. 6230, p. 124-128, 2015.
219. ROCHA, Clarissa Ribeiro Reily *et al.* DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. **Clinics**, v. 73, 2018.
220. ROCHLITZER, S. *et al.* The neuropeptide calcitonin gene-related peptide affects allergic airway inflammation by modulating dendritic cell function. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 41, n. 11, p. 1609-1621, 2011.
221. ROSENBERG, Barnett; VANCAMP, Loretta. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. **Cancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1799-1802, 1970.
222. RUDIN, Charles M. *et al.* Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. **Nature genetics**, v. 44, n. 10, p. 1111-1116, 2012.
223. RUTLEDGE, Alison *et al.* Spinal cord injuries and nerve dependence in prostate cancer. **Trends in cancer**, v. 3, n. 12, p. 812-815, 2017.
224. SALOMAN, Jami L. *et al.* Ablation of sensory neurons in a genetic model of pancreatic ductal adenocarcinoma slows initiation and progression of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 11, p. 3078-3083, 2016.
225. SASTRY, Konduru S. *et al.* Cytoprotective effect of neuropeptides on cancer stem cells: vasoactive intestinal peptide-induced antiapoptotic signaling. **Cell death & disease**, v. 8, n. 6, p. e2844-e2844, 2017.
226. SASTRY, Konduru S. *et al.* Cytoprotective effect of neuropeptides on cancer stem cells: vasoactive intestinal peptide-induced antiapoptotic signaling. **Cell death & disease**, v. 8, n. 6, p. e2844-e2844, 2017.
227. SASTRY, Konduru SR *et al.* Diverse antiapoptotic signaling pathways activated by vasoactive intestinal polypeptide, epidermal growth factor, and phosphatidylinositol 3-kinase in prostate cancer cells converge on BAD. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 30, p. 20891-20901, 2006.
228. SCHMITD, L. B.; SCANLON, C. S.; D’SILVA, N. J. Perineural invasion in head and neck cancer. **Journal of dental research**, v. 97, n. 7, p. 742-750, 2018.
229. SCIOLINO, Natale R. *et al.* Recombinase-dependent mouse lines for chemogenetic

- activation of genetically defined cell types. **Cell reports**, v. 15, n. 11, p. 2563-2573, 2016.
230. SCLABAS, Guido M. *et al.* Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. **Clinical cancer research**, v. 11, n. 2, p. 440-449, 2005.
231. SERRANO-GOMEZ, Silvia Juliana; MAZIVEYI, Mazvita; ALAHARI, Suresh K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. **Molecular cancer**, v. 15, n. 1, p. 18, 2016.
232. SHINTANI, Yasushi *et al.* Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor- β signaling. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 38, n. 1, p. 95-104, 2008.
233. SINGH, Anurag; SETTLEMAN, J. E. M. T. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 34, p. 4741, 2010.
234. SINGH, Deeppreet *et al.* Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 1, p. 388-393, 2000.
235. SONBOL, Hala Salim. Extracellular matrix remodeling in human disease. **Journal of microscopy and ultrastructure**, v. 6, n. 3, p. 123, 2018.
236. STIRLING, L. Caroline *et al.* Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous NaV1. 8-Cre recombinase mice. **Pain**, v. 113, n. 1-2, p. 27-36, 2005.
237. STOPCZYNSKI, Rachele E. *et al.* Neuroplastic Changes Occur Early in the Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Cancer research**, v. 74, n. 6, p. 1718-1727, 2014.
238. SZALLASI, Arpad *et al.* The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nature reviews Drug discovery**, v. 6, n. 5, p. 357-372, 2007.
239. TAKAMI, H. *et al.* Radioimmunoassay of plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels in patients with endocrine tumor. **Gan to Kagaku ryoho. Cancer & Chemotherapy**, v. 16, n. 6, p. 2219-2225, 1989.
240. TANAKA, Masashi *et al.* Induction of antitumor immunity by combined immunogene therapy using IL-2 and IL-12 in low antigenic Lewis lung carcinoma. **Cancer gene therapy**, v. 7, n. 11, p. 1481-1490, 2000.

241. TODA, Masaya *et al.* Neuronal system-dependent facilitation of tumor angiogenesis and tumor growth by calcitonin gene-related peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p. 13550-13555, 2008.
242. TODA, Masaya *et al.* Neuronal system-dependent facilitation of tumor angiogenesis and tumor growth by calcitonin gene-related peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p. 13550-13555, 2008.
243. TRAVIS, William D. *et al.* Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 10, n. 9, p. 1240-1242, 2015.
244. USOSKIN, Dmitry *et al.* Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 145-153, 2015.
245. VENKATESH, Humsa S. *et al.* Neuronal activity promotes glioma growth through neuroligin-3 secretion. **Cell**, v. 161, n. 4, p. 803-816, 2015.
246. VERMA, Mukesh. Personalized medicine and cancer. **Journal of personalized medicine**, v. 2, n. 1, p.1-14, 2012
247. VISVADER, Jane E.; LINDEMAN, Geoffrey J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nature reviews cancer**, v. 8, n. 10, p. 755, 2008.
248. VLADIMIROVNA, Irina Lyadova *et al.* Mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells:common traits in immune regulation. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.
249. VORONINA, Natalia *et al.* The landscape of chromothripsis across adult cancer types. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2020.
250. WAHL, Geoffrey M.; SPIKE, Benjamin T. Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intra-tumoral heterogeneity. **NPJ breast cancer**, v. 3, n. 1, p. 14, 2017.
251. WAJANT, Harald. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1635-1636, 2002.
252. WANG, W. *et al.* Patterns of expression and function of the p75NGFR protein in pancreatic cancer cells and tumours. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 35, n. 8, p. 826-832, 2009.
253. WHO (World Health Organization), 2018. Noncommunicable diseases. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>>. Acesso em: 10 de julho de 2019.

254. WILSON, Rachel *et al.* Human peptidergic nociceptive sensory neurons generated from human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC). **PLoS one**, v. 13, n. 6, p. e0199996, 2018.
255. WIMALAWANSA, Sunil J. CGRP radioreceptor assay: a new diagnostic tool for medullary thyroid carcinoma. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 8, n. 4, p. 467-473, 1993.
256. XIE, Lining *et al.* CD10-bearing fibroblast inhibits matrigel invasive potency of interleukin-1 α -producing squamous cell carcinoma by diminishing substance P levels in the tumor microenvironment. **Cancer science**, v. 101, n. 12, p. 2570-2578, 2010.
257. YAO, Yixin; DAI, Wei. Genomic instability and cancer. **Journal of carcinogenesis & mutagenesis**, v. 5, 2014.
258. YIN, B. *et al.* The TrkB+ cancer stem cells contribute to post-chemotherapy recurrence of triple-negative breast cancers in an orthotopic mouse model. **Oncogene**, v. 34, n. 6, p. 761-770, 2015.
259. YUAN, Lushun *et al.* Overexpression of COL3A1 confers a poor prognosis in human bladder cancer identified by co-expression analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 70508, 2017.
260. ZARE-BANDAMIRI, Mohammad *et al.* Risk factors predicting colorectal cancer recurrence following initial treatment: a 5-year cohort study. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 18, n. 9, p. 2465, 2017.
261. ZENG, Qiqun *et al.* Synaptic proximity enables NMDAR signalling to promote brain metastasis. **Nature**, v. 573, n. 7775, p. 526-531, 2019.
262. ZHANG, Nan *et al.* Novel therapeutic strategies: Targeting epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 8, p. e358-e368, 2021.
263. ZHANG, Yu *et al.* Calcitonin gene-related peptide: A promising bridge between cancer development and cancer-associated pain in oral squamous cell carcinoma. **Oncology letters**, v. 20, n. 5, p. 1-1, 2020
264. ZHANG, Yu *et al.* The neuropeptide calcitonin gene-related peptide links perineural invasion with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **BMC cancer**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2021.
265. ZHAO, Chun-Mei *et al.* Denervation suppresses gastric tumorigenesis. **Science translational medicine**, v. 6, n. 250, p. 250ra115-250ra115, 2014.
266. ZHOU, Lei *et al.* Identification of cancer-type specific expression patterns for active aldehyde dehydrogenase (ALDH) isoforms in ALDEFLUOR assay. **Cell biology and toxicology**, v. 35, n. 2, p. 161-177, 2019.

267. ZHU, Yi *et al.* Perineural invasion in early-stage cervical cancer and its relevance following surgery. **Oncology Letters**, v. 15, n. 5, p. 6555-6561, 2018.

ANEXOS

Tabela suplementar I – Sequência e concentração dos iniciadores utilizados

Gene	Sequência dos iniciadores	Concentração (nM)
<i>Zeb1</i>	FW 5' 'CCAGCAGACCAGACAGTATT 3' RV 5' TCTGAGTCACACTCGTTGTC 3'	100FW/100RV
<i>Zeb2</i>	FW 5' GCCACGAGAAGAATGAAGAG 3' RV 5' CTCCTGGGTTAGCATTTGG 3'	100FW/100RV
<i>E-caderina</i>	FW 5' CATCATTGAGAGGGAGACAG 3' RV 5' GACACGGCATGAGAATAGAG 3'	100FW/100RV
<i>N-caderina</i>	FW 5' CTGACTGAGGAGCCTATGAA 3' RV 5' CAGTCTCTCTTCTGCCTTTG 3'	100FW/100RV
<i>Vimentina</i>	FW 5' CCTTGAACGCAAAGTGGAATC 3' RV 3' GACATGCTGTTCTGAATCTGAG 3'	300FW/300RV
<i>Snail</i>	FW 5' CAACTATAGCGAGCTGCAGGA 3' RV 5' GTACCAGGAGAGAGTCCCAGAT 3'	100FW/100RV
<i>Twist</i>	FW 5'CTAGAGACTCTGGAGCTGGATAACTAAAAA 3' RV 5'CGACCTCTTGAGAATGCATGCATGAAAAA 3'	300FW/200RV
<i>FoxA2</i>	FW 5' CATGGGACCTCACCTGAGTC 3' RV 5' CATCGAGTTCATGTTGGCGTA 3'	300FW/250RV
<i>Tgfb1</i>	FW 5' AAACGGAAGCGCATCGAA 3' RV 5' GGGACTGGCGAGCCTTAGTT 3'	300FW/150RV
<i>Oct-4</i>	FW 5' TGCTGAAGCAGAAGAGGATCAC 3' RV 5' CAGATGGTGGTCTGGCTGAA 3'	300FW/150RV
<i>Sox2</i>	FW 5' AGATGCACAACCTCGGAGATCAG 3' RV 5' TCATGAGCGTCTTGGTTTTCC 3'	250FW/200RV
<i>Nanog</i>	FW 5' GGTTGAAGACTAGCAATGGTCTGA 3' RV 5' TCCAGATGCGTTCACCAGATAG 3'	300FW/150RV
<i>IL-12</i>	FW 5' TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG 3' RV 5' ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT 3'	250FW/150RV
<i>TNF</i>	FW 5' CCCTCACACTCAGATCATCTTCT 3' RV 5' GCTACGACGTGGGCTACAG 3'	300FW/300RV

<i>IL-10</i>	FW 5' TTTGAATTCCTGGGTGAGAA 3' RV 5' GGAGAAATCGATGACAGCGC 3'	300FW/300RV
<i>IL-6</i>	FW 5' TGTTCCTCTGGGAAATCGTGGA 3' RV 5' AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA 3'	300FW/300RV
<i>IL-1B</i>	FW 5' ACCTGTCCTGTGTAATGAAAGACG 3' RV 5' TGGGTATTGCTTGGGATCCA 3'	300FW/300RV
<i>IL-5</i>	FW 5' AAAGAGAAGTGTGGCGAGGAGA 3' RV 5' CACCAAGGAACTCTTGCAGGTAA 3'	300FW/300RV
<i>IL-4</i>	FW 5' TCATCGGCATTTTGAACGAG 3' RV 5' CGTTTGGCACATCCATCTCC 3'	300FW/300RV
<i>IFNG</i>	FW 5' AACGCTACACACTGCATCTTGG 3' RV 5' GCCGTGGCAGTAACAGCC 3'	300FW/300RV
<i>CXCL10</i>	FW 5' GCCGTCATTTTCTGCCTCA 3' RV 5' CGTCCTTGCGAGAGGGATC 3'	300FW/300RV
<i>Colágeno I</i>	FW 5' TTGACCCTAACCAAGGATGC 3' RV 5' CACCCGTTCTGCGTTGTATT 3'	300FW/300RV
<i>Colágeno III</i>	FW 5' AGAGGATGGCTGCACTAAACAC 3' RV 5' TTGGTCACTTTCCTGTTGAC 3'	300FW/300RV
<i>Beta-actina</i>	FW 5' CGCTGGTCGTCGACAACG 3' RV 5' CTGACCCATTCCCACCAT 3'	250FW/150RV
<i>RPS26</i>	FW 5' GATCCTCTTTCGAGTCTTGGCT 3' RV 5' TCTTGATGGCCTTATCCTTGGG 3'	100FW/100RV

Tabela suplementar II – Informações sobre os genes do ensaio de apoptose

GenBank	Symbol	Description
NM_009594	Abl1	<i>C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>
NM_012019	Aifm1	<i>Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1</i>
NM_009652	Akt1	<i>Thymoma viral proto-oncogene 1</i>
NM_009673	Anxa5	<i>Annexin A5</i>
NM_009684	Apaf1	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>
NM_007466	Api5	<i>Apoptosis inhibitor 5</i>
NM_030693	Atf5	<i>Activating transcription factor 5</i>
NM_007522	Bad	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>
NM_009736	Bag1	<i>Bcl2-associated athanogene 1</i>
NM_013863	Bag3	<i>Bcl2-associated athanogene 3</i>
NM_007523	Bak1	<i>BCL2-antagonist/killer 1</i>
NM_007527	Bax	<i>Bcl2-associated X protein</i>
NM_009740	Bcl10	<i>B-cell leukemia/lymphoma 10</i>
NM_009741	Bcl2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>
NM_009742	Bcl2a1a	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a</i>
NM_009743	Bcl2l1	<i>Bcl2-like 1</i>
NM_013479	Bcl2l10	<i>Bcl2-like 10</i>
NM_009754	Bcl2l11	<i>BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)</i>
NM_007537	Bcl2l2	<i>Bcl2-like 2</i>
NM_007544	Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
NM_007465	Birc2	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 2</i>
NM_007464	Birc3	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 3</i>
NM_009689	Birc5	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 5</i>
NM_016787	Bnip2	<i>BCL2/adenovirus E1B interacting protein 2</i>
NM_009760	Bnip3	<i>BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3</i>
NM_009761	Bnip3l	<i>BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like</i>
NM_016778	Bok	<i>BCL2-related ovarian killer protein</i>
NM_130859	Card10	<i>Caspase recruitment domain family, member 10</i>
NM_009807	Casp1	<i>Caspase 1</i>
NM_009808	Casp12	<i>Caspase 12</i>
NM_009809	Casp14	<i>Caspase 14</i>
NM_007610	Casp2	<i>Caspase 2</i>
NM_009810	Casp3	<i>Caspase 3</i>
NM_007609	Casp4	<i>Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
NM_009811	Casp6	<i>Caspase 6</i>
NM_007611	Casp7	<i>Caspase 7</i>
NM_009812	Casp8	<i>Caspase 8</i>
NM_015733	Casp9	<i>Caspase 9</i>
NM_011611	Cd40	<i>CD40 antigen</i>
NM_011616	Cd40lg	<i>CD40 ligand</i>
NM_011617	Cd70	<i>CD70 antigen</i>
NM_009805	Cflar	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>
NM_007702	Cidea	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A</i>
NM_009894	Cideb	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector B</i>
NM_009950	Cradd	<i>CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain</i>
NM_010015	Dad1	<i>Defender against cell death 1</i>
NM_029653	Dapk1	<i>Death associated protein kinase 1</i>
NM_010044	Dffa	<i>DNA fragmentation factor, alpha subunit</i>
NM_007859	Dffb	<i>DNA fragmentation factor, beta subunit</i>
NM_023232	Diablo	<i>Diablo homolog (Drosophila)</i>
NM_010175	Fadd	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>
NM_007987	Fas	<i>Fas (TNF receptor superfamily member 6)</i>
NM_010177	Fasl	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>
NM_007836	Gadd45a	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha</i>
NM_010513	Igf1r	<i>Insulin-like growth factor I receptor</i>
NM_010548	Il10	<i>Interleukin 10</i>
NM_010712	Lhx4	<i>LIM homeobox protein 4</i>
NM_010736	Libr	<i>Lymphotoxin B receptor</i>
NM_011949	Mapk1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
NM_008562	Mcl1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
NM_008670	Naip1	<i>NLR family, apoptosis inhibitory protein 1</i>
NM_010872	Naip2	<i>NLR family, apoptosis inhibitory protein 2</i>
NM_008689	Nfkb1	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105</i>
NM_080637	Nme5	<i>Non-metastatic cells 5, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase)</i>
NM_172729	Nod1	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1</i>
NM_030152	Nol3	<i>Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)</i>
NM_011130	Polb	<i>Polymerase (DNA directed), beta</i>
NM_011563	Prdx2	<i>Peroxioredoxin 2</i>
NM_023258	Pycard	<i>PYD and CARD domain containing</i>

NM_009068	<i>Ripk1</i>	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
NM_013693	<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor
NM_020275	<i>Tnfrsf10b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
NM_008764	<i>Tnfrsf11b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)
NM_011609	<i>Tnfrsf1a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
NM_009425	<i>Tnfsf10</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
NM_011614	<i>Tnfsf12</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12
NM_009421	<i>Traf1</i>	Tnf receptor-associated factor 1
NM_009422	<i>Traf2</i>	Tnf receptor-associated factor 2
NM_011632	<i>Traf3</i>	Tnf receptor-associated factor 3
NM_011640	<i>Trp53</i>	Transformation related protein 53
NM_173378	<i>Trp53bp2</i>	Transformation related protein 53 binding protein 2
NM_011641	<i>Trp63</i>	Transformation related protein 63
NM_011642	<i>Trp73</i>	Transformation related protein 73
NM_009688	<i>Xiap</i>	X-linked inhibitor of apoptosis
NM_007393	<i>Actb</i>	Actin, beta
NM_009735	<i>B2m</i>	Beta-2 microglobulin
NM_008084	<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
NM_010368	<i>Gusb</i>	Glucuronidase, beta
NM_008302	<i>Hsp90ab1</i>	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1

Tabela III – Informações dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo

Anticorpo	Fluorocromo	Fabricante	Catálogo	Concentração
CD133	SuperBright 600	Thermo Fisher	63133182	0,58 µL em 100
CD44	PeCy7	Thermo Fisher	47-0242-82	0,58 µL em 100
CD24	APC e-Fluor 780	Thermo Fisher	25044182	0,58 µL em 100
Ki-67	Alexa Fluor 700	Thermo Fisher	56569882	0,58 µL em 100
CD45	PE	eBioscience	12-0453-82	0,58 µL em 100
NK1.1	APC	eBioscience	17-5941-82	0,58 µL em 100
CD3	efluor 450	eBioscience	48-0032-82	0,58 µL em 100
CD4	FITC	BD Biosciences	553729	0,58 µL em 100
CD8	APC-Cy7	BD Biosciences	557654	0,58 µL em 100
FOXP3	eFluor 605	eBioscience	IH93-5773-93	0,58 µL em 100

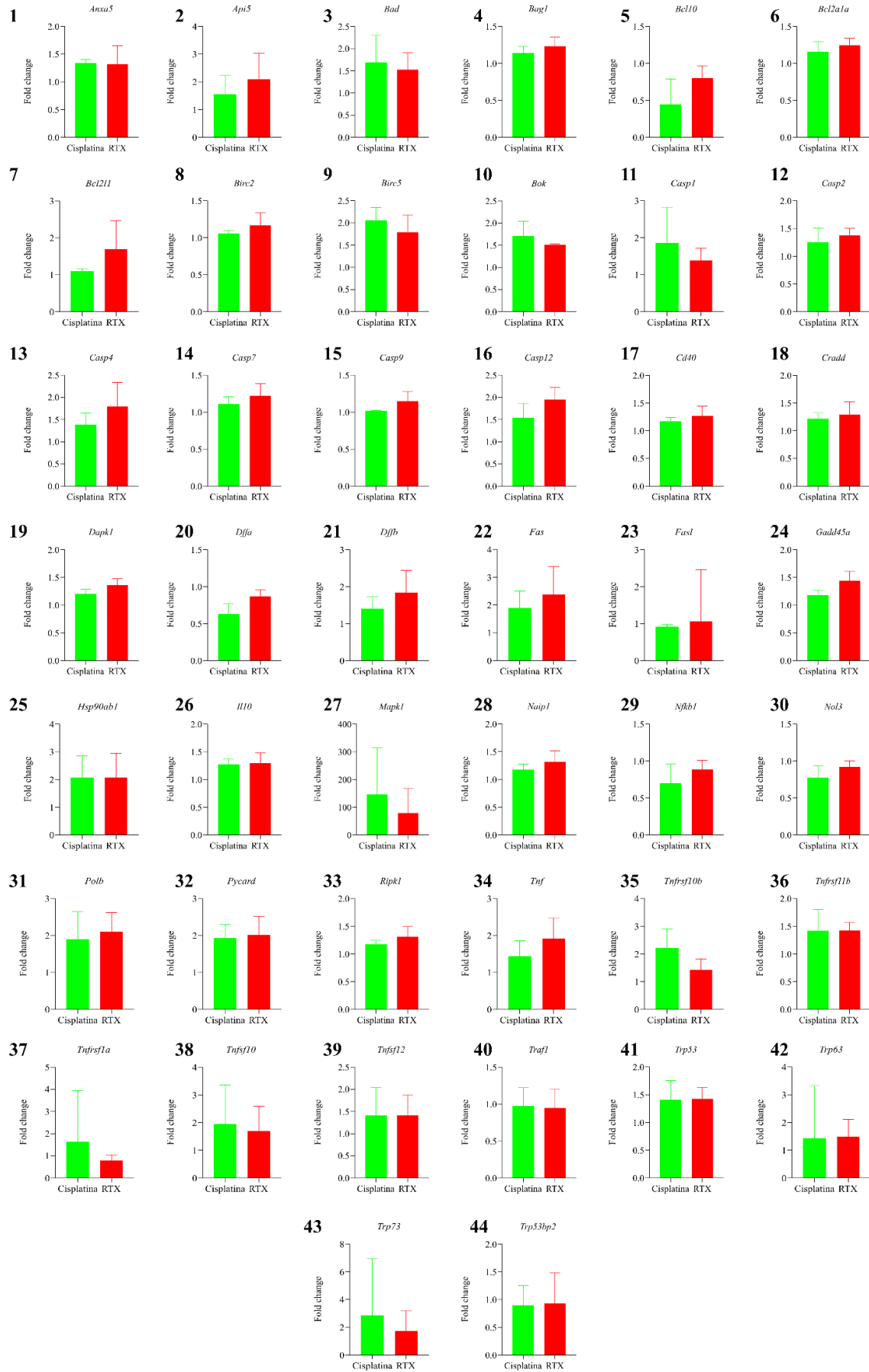


Figura suplementar 1. Análise estatística dos 44 genes que não deram diferença entre os grupos cisplatina e RTX.

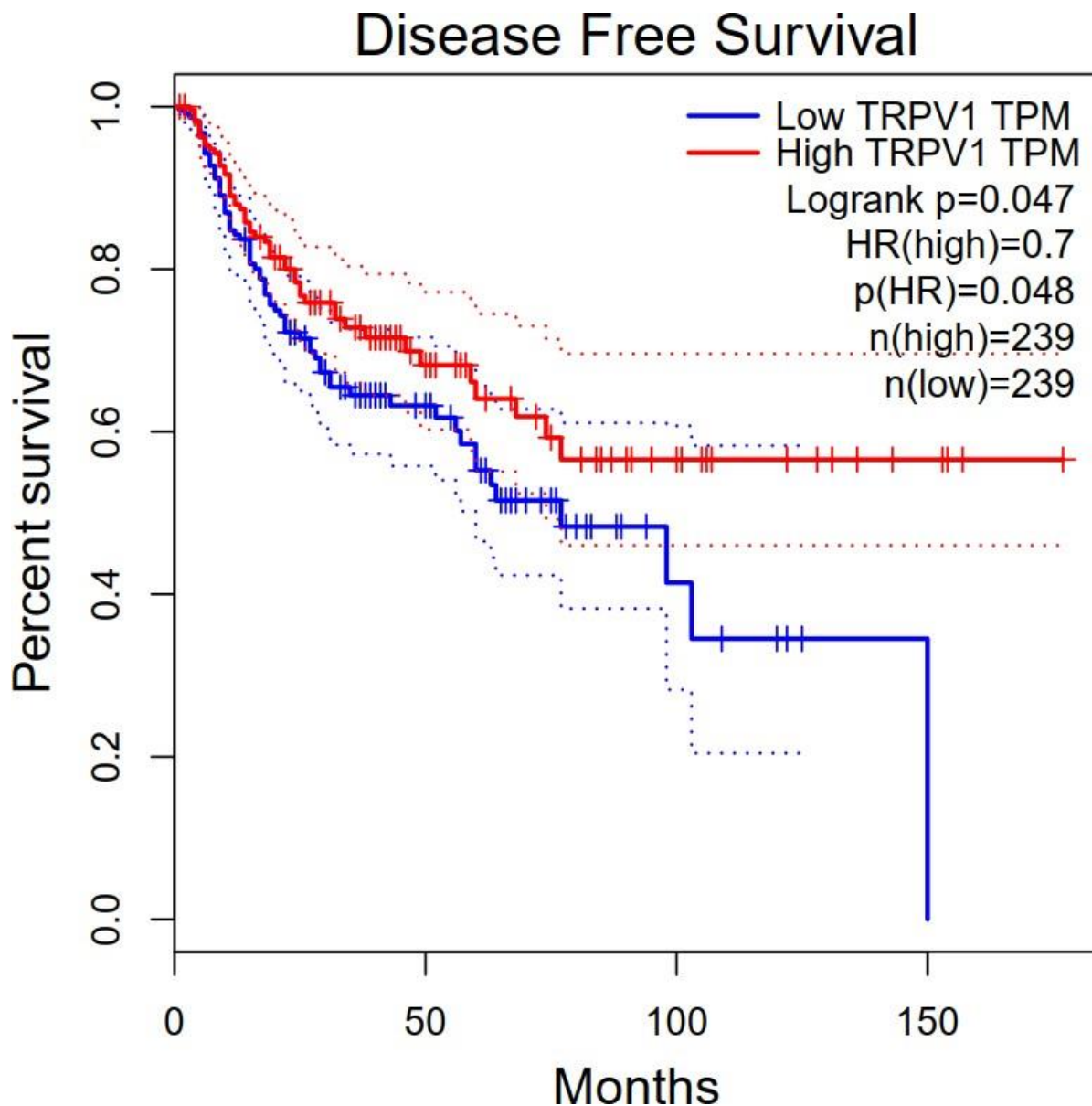


Figura suplementar 2. Expressão de TRPV1 em pacientes com câncer de pulmão e sua associação clínica com a sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de pulmão. DFS: *Disease Free Survival*. TPM: *transcript per million*. Fonte: GEPIA – *Gene Expression Profiling Interactive Analysis*, 2022.