

**A expressão de Epirregulina e o papel dual  
dos macrófagos pró-inflamatórios no  
microambiente tumoral de Carcinoma  
Pulmonar de Células Não Pequenas**

Vinícius Jardim Carvalho

TESE APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE MATEMÁTICA E ESTATÍSTICA  
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS

Programa: Interunidades de Pós-graduação em Bioinformática  
Orientador: Prof. Dr. André Fujita - IME-USP  
Coorientador: Prof. Dr. Gilberto de Castro Jr - ICESP-HCFM-USP

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento  
de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001  
Durante o desenvolvimento deste trabalho, o autor recebeu  
auxílio financeiro da FAPESP – processo n° 2019/03615-2

São Paulo  
Março de 2023



**A expressão de Epirregulina e o papel dual  
dos macrófagos pró-inflamatórios no  
microambiente tumoral de Carcinoma  
Pulmonar de Células Não Pequenas**

Vinícius Jardim Carvalho

Esta versão da tese contém as correções e  
alterações sugeridas pela Comissão Julgadora  
durante a defesa da versão original do  
trabalho, realizada em 15 de Março de 2023.

Uma cópia da versão original está  
disponível no Instituto de Matemática e  
Estatística da Universidade de São Paulo.

Comissão julgadora:

Prof. Dr. André Fujita (orientador) – IME-USP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Lima Boroni Martins – LBBC – INCA

Prof. Dr. Benilton de Sá Carvalho – IMECC – UNICAMP

Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis – IQ – USP

*Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.*

*Dedico esta tese a todos cidadãos brasileiros sem os quais o desenvolvimento desse trabalho não seria possível e para os quais ela foi desenvolvida.*



# Agradecimentos

*Somos una especie en viaje  
No tenemos pertenencias sino equipaje  
Vamos con el polen en el viento  
Estamos vivos porque estamos en movimiento*  
— Jorge Drexler

Um trabalho científico nunca é feito sozinho. Portanto, é de extrema importância lembrar e agradecer a contribuição de todos aqueles que participaram, de diversas formas, na produção desse trabalho.

É primordial agradecer a importância da Universidade de São Paulo, especificamente dos Instituto de Matemática e Estatística (IME-USP) e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês (IEP-HSL) no desenvolvimento do trabalho. São instituições reconhecidas pela formação de pessoal capacitado (professores, funcionários e alunos) e infraestrutura essencial para o desenvolvimento científico. Quero agradecer aos funcionários dessas instituições que fazem com que tudo ocorra dentro da normalidade. Especialmente gostaria de agradecer a Marlene, Patrícia, Elisângela, Ernande, Lilian e Vanessa que colaboraram com as burocracias, ensinamentos, organização e dúvidas nos laboratórios e também foram companheiras e companheiros ao longo dos anos de doutorado.

Também Gostaria de agradecer à CAPES e a FAPESP (Processo 2019/52065-3) pelo financiamento dos projetos que participei. Além disso, é importante agradecer ao grupo eScience do IME (apoio financeiro FAPESP processo 2011/59761-2, do CNPq, da CAPES e do NAP eScience – PRP – USP) pela rede de computadores usada nas análises.

Agradeço enormemente aos três orientadores que tive durante o processo do doutorado, André Fujita, Gilberto de Castro e Mariane Amano. Meu orientador principal, Prof. Dr. André Fujita, me acompanha desde de a época do mestrado quando foi meu co-orientador. Em todo esse processo ele foi essencial não só no desenvolvimento desse trabalho mas

principalmente na minha formação como cientista. Tão importante quanto, foi também a co-orientação do Prof. Dr. Gilberto de Castro Jr com quem aprendi muito, não só sobre a biologia do câncer de pulmão, mas também no comportamento e atitudes em relação ao produção científica. Por fim, é importante destacar o papel indispensável da Profa. Dra. Mariane Tami Amano que foi uma terceira orientadora, principalmente na parte *in vitro* do projeto (últimos 2 anos). Sua ajuda, paciência e atenção certamente garantiram que eu aprendesse muito do trabalho em laboratório e que o trabalho tivesse uma considerável melhora na qualidade científica.

Além dos orientadores citados, é importante agradecer aos seus respectivos grupos de pesquisa. Neles, conheci pessoas que me ajudaram e ajudam na minha formação como pesquisador e como pessoa. Um agradecimento a todos os alunos do Prof. Fujita em especial à Suzana, Taiane, Grover e Eduardo que foram companheiros no IME nos primeiros anos do doutorado. Outro grupo importante no desenvolvimento desse trabalho é o grupo de pesquisa do professor Gilberto com os colegas Kadu, Murilo, Rafael, Ana Paula, Isabela, João Lucas e Mateus. O aluno Mateus em especial, com quem fiz diversas colaborações. Por fim, não posso deixar de agradecer o carinho e atenção com que fui recebido pelo grupo de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês. Gostaria de agradecer a todas pesquisadoras (es), alunas (os), técnicas (os) e funcionárias (os). Um agradecimento mais que especial à todo o grupo de pesquisa da Dra Mariane: Ana Carolina, Bruna, Letícia, Leílton, Leonilia e Thais que hoje são amigos com quem tive grandes aprendizados e momentos de desespero e alegria na bancada.

Não posso deixar de agradecer ao Prof. Dr. Helder Nakaya que participou desde a qualificação, CACs e EPP se tornando um grande colaborador do projeto.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos de graduação, Caian Tupa, Gabi Pomba, Luiz Limão, Luciana Diva, Leandro Max, Luisa Síndrome, Chico Pera, Adrian, Isabela, Nati, Andreas, Felipe, Larissa e tantos outros amigos com quem convivi nesses muitos anos de USP. Não poderia deixar de falar dos amigos que fiz no Joga no Pagode, time de futebol de campo da biologia (hoje IC BIO) com quem dividi muitos momentos de alegria, superação e muitas derrotas também. Agradecer enormemente aos meus amigos do Bonde de Lorena. São amigos a quase 15 anos e até hoje os tenho como irmãos como Jorge, Marcos, Rafael Kurt, Rogério, Thiago, Pinguin, Antônio, Biro, Matheus, Caio Lagoa, Erick e Barchi. Um agradecimento especial ao meu irmão Dr. João Bosco que hoje é um grande pesquisador com quem sempre dividi as alegrias e angústias da vida e da academia. Por fim, esse trabalho é uma homenagem especial ao irmão Rafael Meireles, que faleceu em 2022 e deixa muitas saudades em todos com quem conviveu.

Quero agradecer especialmente à Karine que tem sido uma grande amiga, companheira

e amante em todos os momentos da minha vida. Ela vem me inspirando sempre a fazer um trabalho cada vez melhor e juntos sonhamos em chegar cada vez mais longe.

Por fim, não posso deixar de agradecer aos meus Avós, Terezinha, Enéas, Bela e Carlito que sempre me ensinaram a ter amor e respeito pelo próximo, aos meus tios e tias, à minha irmã Sofia que é uma companheira e amiga de toda a minha vida, e principalmente aos meus pais Leonardo e Márcia que me ensinaram a viver a vida com alegria, otimismo e muita dedicação para enfrentar os desafios.

Este trabalho e eu não existiríamos se não tivéssemos a participação de todas essas pessoas e ainda de muitas outras que não foram citadas aqui.

Obrigado a todos.



# Resumo

Vinícius Jardim Carvalho. **A expressão de Epirregulina e o papel dual dos macrófagos pró-inflamatórios no microambiente tumoral de Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas.** Tese (Doutorado). Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O câncer de pulmão é a primeira causa de mortes por câncer em todo o mundo. É necessária uma melhor compreensão dos processos envolvidos na progressão tumoral, além da busca por marcadores relacionados ao seu grau de agressividade. A via de transdução de sinal empregando receptores com atividade de tirosina quinase, como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), é crucial na sobrevivência da célula neoplásica. Dentre os ligantes de EGFR está a epirregulina (EREG). A literatura aponta que EREG está relacionada a piores prognósticos e à resistência ao tratamento com inibidores de tirosina quinase (TKI-EGFR), porém não está claro em quais contextos essa expressão ocorre. Nosso objetivo foi investigar a relação da expressão de EREG com a sobrevida de pacientes de câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP) e em quais contextos tumorais essa expressão ocorre. O aumento da expressão desse gene está fortemente relacionada com a menor sobrevida global de pacientes em estádios iniciais de CPCNP. O impacto prognóstico da expressão de EREG foi usado pra definir a sobrevida de novos pacientes em bancos de dados independentes. Observamos também que os macrófagos são o tipo celular que apresenta a maior expressão de *EREG*, relacionada principalmente ao fenótipo pró-inflamatório (M1). O estímulo com EREG leva à fosforilação prolongada de EGFR, o que pode estar relacionado à resistência ao tratamento com EGFR-TKIs em CPCNP. Outro fenótipo de macrófago analisado foi o tolerizado. Vimos que esse fenótipo expressa altos valores de EREG bem como citocinas pró-inflamatórias. Análises de proliferação celular mostraram que o meio de cultura do macrófago tolerizado estimula maior proliferação, o que não foi observado para o macrófago M1. O macrófago tolerizado nos permite explicar a relação de marcadores pró-inflamatórios e EREG no contexto tumoral. Esses resultados trazem novos indícios sobre a resistência ao tratamento com EGFR-TKIs pela via parácrina, sugerindo estudos mais aprofundados em terapias dirigidas para a expressão de EREG em macrófagos tolerizados.

**Palavras-chave:** Neoplasias pulmonares. Genes ERBB. Epirregulina. Macrófagos. Prognóstico.



# Abstract

Vinícius Jardim Carvalho. **Epiregulin expression and the dual role of pro-inflammatory macrophages in the tumor microenvironment of Non-Small Cell Lung Carcinoma**. Thesis (Doctorate). Institute of Mathematics and Statistics, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths worldwide. A better understanding of the processes involved in tumor progression is required, in addition to the search for biomarkers related to its degree of aggressiveness. The signal transduction pathway employing receptors with tyrosine kinase activity, such as the epidermal growth factor receptor (EGFR), is critical to neoplastic cell survival. Among the EGFR ligands is epiregulin (EREG). The literature points out that EREG is related to worse prognosis and resistance to treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKI-EGFR). However, it is unclear in which contexts this expression occurs. Our objective was to investigate the relationship of *EREG* expression with survival in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients and in which tumor contexts this expression occurs. Increased gene expression is strongly related to shorter overall survival in early-stage NSCLC patients. The prognostic impact of *EREG* expression was used to define the survival of new patients in independent databases. We also observed that macrophages are the cell type with the highest expression of *EREG*, mainly related to the pro-inflammatory phenotype (M1). Stimulation with EREG leads to prolonged phosphorylation of EGFR, which may be related to resistance to treatment with EGFR-TKIs in NSCLC. Another macrophage phenotype analyzed was tolerized. We saw that this phenotype expresses high values of *EREG* and pro-inflammatory cytokines. Cell proliferation analyses showed that the culture medium of the tolerized macrophage stimulates higher proliferation, which was not observed for the M1 macrophage. The tolerized macrophage allows us to explain the relationship between pro-inflammatory biomarkers and *EREG* in the tumor context. These results bring new evidence on the resistance to treatment with EGFR-TKIs by the paracrine pathway, suggesting further studies on therapies directed at *EREG* expression in tolerized macrophages.

**Keywords:** Lung Neoplasms. ERBB genes. Epiregulin. Macrophages. Prognosis.



# Lista de Figuras

1.1	Classificação de pacientes do banco de dado GEO . . . . .	7
1.2	Análise de <i>KM</i> com pacientes com e sem mutação de <i>EGFR</i> . . . . .	16
1.3	Análise de <i>Kaplan-Meier</i> com os grupos separados de acordo com a presença de alguma mutação condutora. . . . .	17
1.4	Análise de <i>KM</i> com os grupos separados de acordo com a sobrevida relativa estimada . . . . .	19
1.5	Grupos de células do banco de dados <i>GSE127465</i> . . . . .	20
1.6	Expressão de <i>EREG</i> pelos tipos celulares definidos pelos autores de <i>GSE127465</i> . . . . .	21
1.7	Expressão de <i>EREG</i> nos tipos celulares pré definidos em <i>GSE131907</i> . . . . .	22
1.8	Expressão de <i>EREG</i> em macrófagos M1, M2 e nas células epiteliais dos bancos de dados <i>GSE127465</i> e <i>GSE131907</i> . . . . .	23
1.9	Expressão de genes pró-inflamatórios por macrófagos polarizados M0, M1 e M2. . . . .	25
1.10	Expressão de genes anti-inflamatórios por macrófagos polarizados M0, M1 e M2. . . . .	26
1.11	Produção de <i>EREG</i> por macrófagos M0, M1 e M2. . . . .	27
1.12	Expressão de <i>EGFR</i> e <i>ERBB2</i> em macrófagos M1, M2 e nas células epiteliais dos bancos de dados <i>GSE127465</i> e <i>GSE131907</i> . . . . .	28
1.13	Experimento de estímulo de H1299 com <i>EREG</i> e <i>EGF</i> . . . . .	30
1.14	Expressão de genes relacionados à proliferação. . . . .	31
1.15	Expressão de genes relacionados à apoptose. . . . .	31
1.16	Expressão de genes <i>checkpoints</i> . . . . .	32
1.17	Ensaio de proliferação de H1299 após estímulos com <i>EGF</i> e <i>EREG</i> . . . . .	33
1.18	Expressão de genes por macrófagos polarizados M0, M1, M2 e MT. . . . .	34
1.19	Produção de <i>EREG</i> por macrófagos M0, M1 M2 e MT. . . . .	35
1.20	Ensaio de proliferação de H1299 após estímulos com <i>EGF</i> e <i>EREG</i> e com os sobrenadantes de macrófagos M0, M1, M2 e MT. . . . .	36

A.1	Expressão de <i>EREG</i> em macrófagos M1, M2 e nas células epiteliais dos pacientes p1, p4 e p6. . . . .	48
A.2	Expressão de <i>EREG</i> em macrófagos M1, M2, M1/M2 e nas células epiteliais do tecido Tumoral dos pacientes pt.06, pt.09, pt.20 e pt.34. . . . .	49
A.3	Expressão de <i>EGFR</i> e <i>ERBB2</i> em macrófagos M1, M2 e nas células epiteliais do tecido Tumoral e normal adjacente dos pacientes pt.06, pt.09, pt.20 e pt.34. . . . .	50
A.4	Expressão de <i>EGFR</i> e <i>ERBB2</i> em macrófagos M1, M2 e nas células epiteliais do tecido Tumoral dos pacientes p1, p4 e p6. . . . .	51
A.5	Expressão de genes marcadores de macrófagos M1 (CD86 (A) e HLA-DRA (B)) e M2 (CD163 (C) e CD206 (D)) e expressão de <i>EREG</i> (E) por macrófagos derivados da linhagem mieloide THP1. . . . .	53

## Lista de Tabelas

1.1	Resumo das características dos indivíduos com CPCNP. . . . .	6
1.2	Resumo dos pacientes do BD <i>GSE127465</i> de acordo com o estadio e subtipo histológico . . . . .	8
1.3	Resumo dos pacientes do BD <i>GSE131907</i> de acordo com o estadio, status do gene <i>EGFR</i> e frequência de fumo . . . . .	8
1.4	Voluntários . . . . .	10
1.5	Análise de Cox multivariado com a expressão de <i>EREG</i> e dos demais genes ligantes dos receptores da família <i>ERBB</i> . . . . .	16
1.6	Relação da expressão de <i>EREG</i> com a sobrevida de pacientes com CPCNP do banco de dados <i>TCGA</i> . . . . .	18
A.1	Análise de correlação de <i>Pearson</i> das expressões gênicas de ligantes e receptores da família <i>ERBB</i> . . . . .	45
A.2	Análise de Cox multivariado com a expressão de <i>EREG</i> e dos genes de receptores de membrana da família <i>ERBB</i> . . . . .	45
A.3	Análise de Cox multivariado com a expressão de <i>EREG</i> e dos demais genes ligantes dos receptores da família <i>ERBB</i> . . . . .	46
A.4	Contagem de pacientes pertencentes aos grupos de acordo com mutação em <i>EGFR</i> e expressão de <i>EREG</i> . . . . .	46

A.5	Contagem de pacientes pertencentes aos grupos de acordo com mutação condutora e expressão de <i>EREG</i> . . . . .	46
A.6	Análise da relação da expressão de <i>EREG</i> com a sobrevida de pacientes com CPCNP que não apresentam nenhum gene com mutações condutoras. . . . .	47
A.7	Tabela de <i>primers</i> . . . . .	52



# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Objetivo	4
	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>5</b>
1.2	Conjuntos de dados	5
1.2.1	Análises de sobrevida	6
1.2.2	Replicabilidade em outros conjuntos de dados	6
1.3	Dados de expressão gênica de célula única	8
1.3.1	Reclassificação dos tipos celulares	9
1.4	Delineamento do estudo <i>in vitro</i>	9
1.4.1	Critérios de inclusão	9
1.4.2	Caracterização dos voluntários	10
1.5	Separação de leucócitos	10
1.6	Purificação de monócitos	10
1.7	Diferenciação de macrófagos M1 e M2	10
1.8	Análise de expressão gênica	11
1.8.1	Extração de RNA	11
1.8.2	Purificação de RNA	11
1.8.3	Síntese de cDNA	11
1.8.4	qPCR	12
1.9	Proliferação das linhagens tumorais	12
1.10	Avaliação das vias de sinalização via Western Blot	12
1.11	Análise estatística dos resultados <i>in vitro</i>	13
	<b>Resultados</b>	<b>15</b>
1.12	Análise de sobrevida	15
1.13	Relação de <i>EREG</i> com a sobrevida em outros conjuntos de dados	17
1.14	Expressão dos genes nos tipos celulares	19

1.14.1	Análise de macrófagos segundo classificação do autor . . . . .	20
1.15	Análise de macrófagos segundo marcadores de polarização . . . . .	22
1.16	Expressão de <i>EREG</i> em macrófagos M1 de células mononucleares de sangue periférico . . . . .	24
1.17	Expressões dos receptores <i>EGFR</i> e <i>HER2</i> em dados de expressão de célula única . . . . .	28
1.18	Resultado de WB na via de H1299 com estímulo de <i>EREG</i> . . . . .	29
1.18.1	Ativação da via <i>EGFR</i> pelos ligantes <i>EREG</i> e <i>EGF</i> . . . . .	29
1.18.2	Modulação da expressão de conjuntos de genes chave após os estímulos com <i>EREG</i> e <i>EGF</i> . . . . .	30
1.18.3	Efeito na proliferação celular . . . . .	32
1.19	Análises com macrófago tolerizado . . . . .	33
	<b>Discussão</b>	<b>37</b>
	<b>Conclusão</b>	<b>41</b>
	<b>Demais atividades realizadas no doutorado</b>	<b>43</b>
1.20	Publicações e colaborações realizadas durante o doutorado . . . . .	43
	<b>Apêndices</b>	
<b>A</b>		<b>45</b>
A.1	Análises de expressão gênica com TCGA . . . . .	45
A.2	Análise de expressão gênica scRNAseq . . . . .	48
A.3	Análise de experimento <i>in vitro</i> . . . . .	52
A.3.1	Teste de polarização com THP1 . . . . .	52
A.4	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) . . . . .	54
	<b>Referências</b>	<b>57</b>

# Capítulo 1

## Introdução

De acordo com a *American Cancer Society*, o câncer de pulmão foi o segundo com mais casos novos em 2020 (2 206 711) e com o maior número de óbitos (1 796 144) (SUNG *et al.*, 2021). O Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas (CPCNP; NSCLC - *Non-Small Cell Lung Cancer*) é o subtipo histológico mais frequente, ocorrendo em 85% dos casos (TRAVIS *et al.*, 2015). No Brasil, o câncer de pulmão, é o terceiro mais comum em homens (17 760 casos novos) e o quarto em mulheres (12 440 casos novos), sendo responsável por 28.620 mortes (Instituto nacional do Câncer - INCA, 2020). Ainda segundo o INCA, no fim do século XX, o câncer de pulmão se tornou uma das principais causas de morte evitáveis. Sua grande ocorrência torna necessário encontrar marcadores de maior risco em pacientes de estadios iniciais e aqueles que irão se beneficiar de terapias adjuvantes. Esse tem sido um importante desafio na área da oncologia (YAMAUCHI *et al.*, 2012).

As mutações condutoras são importantes marcadores da agressividade e de tratamento de diversos tipos de tumores. Em CPCNP, mutações no gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) são frequentes. Essas mutações ocorrem em 11–16% dos pacientes caucasianos com adenocarcinomas CPCNP e acima de 50% nas populações do leste asiático (S. MA *et al.*, 2021). Na América do sul, a frequência de mutações ativadoras de *EGFR* é heterogênea, estando correlacionada à ancestralidade das populações da região (CARROT-ZHANG *et al.*, 2021). De forma geral, a mutação está presente em aproximadamente 36% dos pacientes com adenocarcinoma de CPCNP (MIDHA *et al.*, 2015). Porém, em populações andinas essa porcentagem chega a 51% (CARROT-ZHANG *et al.*, 2021). Já em outros países sulamericanos essa porcentagem vai de 14% na Argentina e varia de 25% a 34% na Colômbia, no Brasil e no México (CARROT-ZHANG *et al.*, 2021).

O gene *EGFR* faz parte da família dos genes *ERBB* (*erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*), composta por *ERBB1/EGFR/HER1*, *ERBB2/HER2/Neu*, *ERBB3/HER3* e *ERBB4/HER4* (CHENG *et al.*, 2021). Esses genes codificam proteínas de membrana que fazem parte de um grupo de receptores tirosina quinase (*RTK*), associados a importantes vias de sinalização. Os receptores *ERBB* medeiam a ativação de algumas vias de sinalização como *RAS/RAF* (*Rat sarcoma/Rapidly accelerated fibrosarcoma*), *PI3K/AKT/mTOR* (*Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-Quinase/Serine/ threonine protein kinase*), *PLC- $\gamma$ 1* (*phospholipase C- $\gamma$ 1*) e *STAT* (*Signal transducer and activator of transcription*) (YARDEN e PINES, 2012). A expressão dos genes *ERBBs* está associada à progressão tumoral como proliferação celular, invasão,

metástase, angiogênese e resistência a apoptose, apresentando mutações condutoras em diversos tumores (Noriaki SUNAGA e KAIRA, 2015; CHENG *et al.*, 2021).

Sete ligantes se conectam aos receptores ERBB. EGF (fator de crescimento epidérmico), EPN (Epigenina), TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ), AREG (Anfirregulina), EREG (Epirregulina), BTC (Betacelulina) e HB-EGF (EGF ligante de Heparina). Os ligantes de ERBB se conectam ao domínio extracelular dos receptores ERBB1, ERBB3, e ERBB4 para formar homodímeros ou heterodímeros ativos. Não ocorre, por exemplo, ligação direta ao ERBB2 no seu estado ligado-ativado, favorecendo sua heterodimerização (CHENG *et al.*, 2021). EGF, TGF $\alpha$ , BTC, e HB-EGF, apresentam alta afinidade ao EGFR de superfície celular ( $K_d$  aparente de 0,1-1  $\eta M$ ) se comparados aos demais ligantes de baixa afinidade como EREG, EPGN e AREG, que se ligam de 10 a 100 vezes mais fracamente. Apesar da menor afinidade de ligação de EREG com EGFR, ocorre uma ligação mais prolongada do que com EGF que apresenta uma conexão transiente (FREED *et al.*, 2017).

O EREG tem papel importante na diferenciação e proliferação de células epiteliais do sistema respiratório, respondendo a estímulos de estresse (Noriaki SUNAGA e KAIRA, 2015; C. WANG *et al.*, 2022). Outros autores observaram que a epirregulina não estimula a proliferação celular, atuando principalmente na inibição da formação de adesão focal e espalhamento das células tumorais (IJIJIMA *et al.*, 2017). A alta expressão de *EREG* foi correlacionada com baixa resposta clínica e baixa sobrevivência livre de progressão (PFS) em pacientes CPCNP que receberam tratamento com inibidores de tirosina quinase (TKI - Tyrosine Kinase Inhibitor) (S. MA *et al.*, 2021).

Os casos de CPCNP avançados que apresentam mutação em *EGFR* são comumente tratados com TKI-*EGFR* de primeira geração, como gefitinibe e erlotinibe. O TKI de terceira geração, osimertinibe, vem apresentando melhor eficácia clínica e menos efeitos adversos sendo recomendado como medicamento de primeira linha (SORIA *et al.*, 2018). Contudo, a resistência intrínseca ou a adquirida após um período de resposta inicial continua a ser um problema no campo da terapia com *EGFR-TKI*. S. MA *et al.*, 2021 sugerem que o EREG produzido por células não-tumorais no microambiente tumoral (TME - Tumor microenvironment) pode ser parte de um novo mecanismo para a resistência aos *EGFR-TKIs*. No entanto, a expressão do *EREG* nas células tumorais não foi associada à resistência intrínseca ou adquirida aos *EGFR-TKIs*. Os resultados mostraram que a expressão de *EREG* endógeno em linhagem de CPCNP também diminuiu na presença de gefitinibe, sugerindo que a expressão de *EREG* por células tumorais é inibida por *EGFR-TKIs* e, portanto, não está associada à sensibilidade *EGFR-TKI* (S. MA *et al.*, 2021).

Embora vários ligantes EGFR tenham sido relacionados à piores prognósticos, as origens celulares destes ligantes não foram profundamente investigadas. Resultados anteriores sugerem que o EGFR e seus ligantes medeiam processos vitais no microambiente tumoral (DE LUCA *et al.*, 2008). Vários ligantes de EGFR, tais como EGF, TGF $\alpha$ , AREG e EREG, podem ser secretados por células cancerosas do pulmão. Contudo, estes ligantes podem também derivar de outras células dentro do microambiente tumoral, tais como fibroblastos e macrófagos (CHENG *et al.*, 2021). EREG foi implicado em respostas inflamatórias tanto em condições fisiológicas como patológicas (RIESE e CULLUM, 2014). No trabalho de BAUER *et al.*, 2016, camundongos com *EREG* reprimido apresentaram menor inflamação e menor infiltração de macrófagos na região do tumor.

A participação do *TME* na carcinogênese do CPCNP é fundamental e tem sido alvo de diversos estudos (HANAHAN, 2022; KIM *et al.*, 2020). O *TME* é composto por células não malignas como fibroblastos, células endoteliais e células imunes (BALKWILL *et al.*, 2012). Por isso, uma melhor compreensão do papel de células do sistema imune presentes no *TME* tem sido importante para estimar prognósticos e investigar novas intervenções terapêuticas (KEELEY *et al.*, 2019). A expressão de *EREG* tem sido relacionada aos tipos celulares do estroma de câncer de próstata (C. WANG *et al.*, 2022) e ao papel de macrófagos em outro tipos de câncer.

Os macrófagos têm uma grande plasticidade que os permite adquirir diferentes fenótipos tanto em condições normais de inflamação quanto no *TME* (GALDIERO *et al.*, 2013; KEELEY *et al.*, 2019). Inicialmente entendia-se que os macrófagos, quando estimulados por fatores como IFN- $\gamma$ , são ativados pela via clássica e adquirem o fenótipo pró-inflamatório conhecido como M1 (KEELEY *et al.*, 2019). Esse fenótipo pode liberar diversos mediadores como TNF $\alpha$  e ROS (*Reactive Oxygen Species*) que estimulam o recrutamento de células T citotóxicas. Por outro lado, quando estimulados por fatores como TGF $\beta$ , IL13 e IL4, assumem o fenótipo alternativo M2. Com a secreção de *IL-10*, TGF $\beta$  e *ARG1* o fenótipo M2 inibe a ativação das células T, estimula a angiogênese e promove a remodelação dos tecidos e desfaz a inflamação iniciada pelos neutrófilos e macrófagos M1 (KEELEY *et al.*, 2019). Posteriormente, baseado em dados de transcrição gênica considerou-se a existência do subtipos de macrófagos M2a, M2b, M2c e M2d com papéis específicos em diversos tipos de doenças (L. X. WANG *et al.*, 2019). Nesse caso, o subtipo de macrófago M2d estaria relacionado ao desenvolvimento tumoral e à angiogênese.

Apesar da caracterização dos fenótipos M1 e M2 de macrófagos ser frequentemente usada na literatura, a identificação da sua atuação quando associados ao tumor (*TAMs - Tumor Associated Macrophages*) não é trivial (SINGHAL *et al.*, 2019). Mesmo usando dados de sequenciamento de células únicas a detecção dos subtipos de macrófagos em tumores de CPCNP não é clara, já que os macrófagos expressam simultaneamente marcadores dos subtipos M1 e M2 (SINGHAL *et al.*, 2019). A complexidade dos fenótipos assumidos por macrófagos e seus papéis em diferentes microambientes tumorais vem sendo alvo de novas investigações, redefinindo a forma como os fenótipos de macrófagos são classificados (R. Y. MA *et al.*, 2022).

R. Y. MA *et al.*, 2022 realizaram uma revisão dos tipos de macrófagos associados ao tumor (*TAMs*) que foram observados em estudos baseados análises de células únicas em tecidos tumorais. Com o objetivo de unificar a nomenclatura de *TAMs*, os autores definiram sete grupos de macrófagos que pareceram estar presentes em quase todos os tipos de câncer. Com base na busca de genes marcadores, vias enriquecidas e função prevista, propôs-se que estes subconjuntos de macrófagos associados ao tumor sejam designados por *TAMs* estimulados por IFN (*IFN-TAMs*), *TAMs* reguladores da imunidade (*Reg-TAMs*), *TAMs* inflamatórios enriquecidos com citocinas (*Inflam-TAMs*), *TAMs* associados a lipídios (*LA-TAMs*), *TAMs* pró-angiogênicos (*Angio-TAMs*), *TAMs* semelhantes a macrófagos residentes do tecido (*RTM-TAMs*) e *TAMs* em proliferação (*Prolif-TAMs*).

Nesse contexto, é necessário investigar a relação entre a expressão de *EREG* e a sobrevida de pacientes com câncer de pulmão, considerando os indícios da importância desse gene e dessa via no desenvolvimento tumoral. É importante definir se e em quais

contextos os macrófagos expressam e produzem *EREG* no microambiente tumoral de CPCNP, pois isso pode estar relacionado à resistência a tratamentos com *TKI-EGFR*. Além disso, é necessário verificar se outros tipos celulares apresentam a expressão de *EREG*, bem como avaliar os possíveis efeitos da proteína resultante em linhagens tumorais de câncer de pulmão não pequenas células.

## 1.1 Objetivo

Nesse contexto, o presente estudo tem o objetivo de verificar a relação de *EREG* com o desenvolvimento do CPCNP e a expressão de *EREG* pelas células do microambiente tumoral. Além disso, os objetivos específicos são:

- Verificar a relação da expressão dos ligantes e receptores *ERBB* com a sobrevida de pacientes CPCNP.
- Determinar o valor prognóstico da expressão de *EREG* em pacientes CPCNP.
- Identificar qual o fenótipo de macrófago que expressa *EREG* nos dados de expressão gênica de célula única.
- Testar, a partir de amostras de sangue de voluntários saudáveis, qual o fenótipo de macrófago tem a expressão de *EREG* mais elevada.
- Verificar a ativação da via de EGFR por *EREG* e EGF.
- Verificar se os ligantes *EREG* e EGF e os meios de cultura de macrófagos estimulam a proliferação de linhagens tumorais CPCNP.

# Materiais e Métodos

## 1.2 Conjuntos de dados

Utilizamos dados de expressão gênica de CPCNP em estadios iniciais tratados com cirurgia com intenção curativa de pacientes de cinco bancos de dados públicos. A primeira base de dados é o *The Cancer Genome Atlas Program (TCGA)*, uma base de dados moleculares de mais de 20 000 indivíduos e 33 diferentes tipos de câncer. Usamos os dados de expressão gênica de contagem de *reads* (*RNAseq*-nível três) que inclui os tumores de CPCNP de dois subtipos, Adenocarcinoma (AD - *LUAD*) e Carcinoma de célula escamosa (CCE - *LUSC*). A expressão dos genes foi analisada usando a escala de  $\log_2$  transcritos por milhão mais um ( $\log_2(TPM + 1)$ ). Metade dos indivíduos do banco, 804 pacientes, albergavam CPCNP estadios I ou II (Tabela 1.1), classificação baseada na sétima edição do sistema de estadiamento AJCC/UICC (EDGE *et al.*, 2010). Utilizamos também os dados de genômica de 544 pacientes de CPCNP estadio inicial para verificar a ocorrência de mutações condutoras em câncer de pulmão nos seguintes genes: *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *MET*, *RET*, *ERBB2*, *ROS1*, *KRAS* e *FGFR1*.

Os demais conjuntos de dados provêm do repositório de dados *Gene Expression Omnibus (GEO)*, composto por conjuntos de dados públicos de diversas espécies e tipos de dados. O conjunto de dados *GSE81089* possui dados de *RNA-seq* (plataforma *Illumina HiSeq 2500*) de tumores ressecados de 199 pacientes com CPCNP. Os dados estão normalizados em  $\log_2(FPKM + 1)$ . O outro conjunto de dados analisado é o *GSE30219*. A plataforma de análise desse conjunto é *Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array*. Usamos também dois metadados que reúnem grupos de conjuntos de dados, *E-MTAB-6043* e *GSE67639*. Em ambos conjuntos de dados as amostras foram renormalizadas para que pudessem ser analisadas em conjunto. As principais características dos pacientes contidos nos conjuntos de dados e metadados estão resumidas na Tabela 1.1. Obtivemos e processamos os dados do *TCGA* com o pacote *TCGAbiolinks* ([bioconductor.org/packages/TCGAbiolinks/](http://bioconductor.org/packages/TCGAbiolinks/)) do R. Os dados da base de dados *GEO* foram obtidos usando os pacotes *GEOquery* ([bioconductor.org/packages/GEOquery/](http://bioconductor.org/packages/GEOquery/)) do R ([cran.r-project.org/](http://cran.r-project.org/)).

Variável	Status	Número de ocorrência (%)				
		TCGA	GSE81089	GSE30219	E-MTAB-6043	GSE67639
Tipo histológico	Adenocarcinoma	515 (51)	70 (56)	85 (58)	321 (89)	587 (100)
	Célula escamosa	501 (49)	54 (44)	61 (42)	41 (11)	0
Estadio	I	520 (51)	91 (73)	131 (90)	168 (74)	462 (79)
	II	284 (30)	33 (27)	10 (6)	58 (26)	125 (21)
	III	168 (16)	0	5 (4)	0	0
	IV	33 (16)	0	0	0	0
Sexo	Homem	609 (60)	58 (47)	122 (84)	171 (47)	298 (51)
	Mulher	408 (40)	66 (53)	24 (16)	191 (53)	289 (49)
Idade	Média (Min-Max)	66 (39 - 90)	68 (46 - 84)	62 (44 - 84)	63 (30 - 88)	64 (33 - 88)

**Tabela 1.1:** Resumo das características dos indivíduos com CPCNP dos bancos de dados TCGA, GSE81089, GSE30219, E-MTAB-6043 e GSE67639. Os valores são referentes à quantidade de indivíduos contidos na categoria e entre parênteses estão as respectivas porcentagens. Apenas para a variável Idade está apresentada a média e os valores máximo e mínimo.

### 1.2.1 Análises de sobrevida

Realizamos tanto análises de sobrevida univariadas (*Kaplan-Meier - KM*) (KAPLAN e MEIER, 1958) quanto multivariadas (*Cox*) (ANDERSEN e GILL, 1982) com os dados de pacientes do TCGA. Testamos a relação de dois grupos de genes com a sobrevida dos pacientes nos estadios iniciais de CPCNP: expressão dos ligantes da família *ERBB* (*EREG*, *EGF*, *TGFA*, *HB-EGF*, *BTC*, *EPGN* e *AREG*) e da expressão dos genes dos receptores *ERBB* (*EGFR*, *ERBB2* e *ERBB4*). Antes de realizar as análises de sobrevida, fizemos um teste de correlação de *Pearson* para evitar colinearidade entre os padrões de expressão dos genes. No caso de haver colinearidade entre alguns genes, fizemos a escolha do gene usando seleção de modelos. Selecionamos o gene do modelo com o menor valor de *Akaike Information Criterion (AIC)*. Nas análises multivariadas incluímos a idade, sexo e tipo histológico dos pacientes para remover o efeito dessas covariáveis. Consideramos também o efeito, na sobrevida, da interação entre a expressão de *EREG* e mutações condutoras ou especificamente em *EGFR*. Realizamos as análises de *KM* e *Cox* utilizando o pacote `Survival` do R.

### 1.2.2 Replicabilidade em outros conjuntos de dados

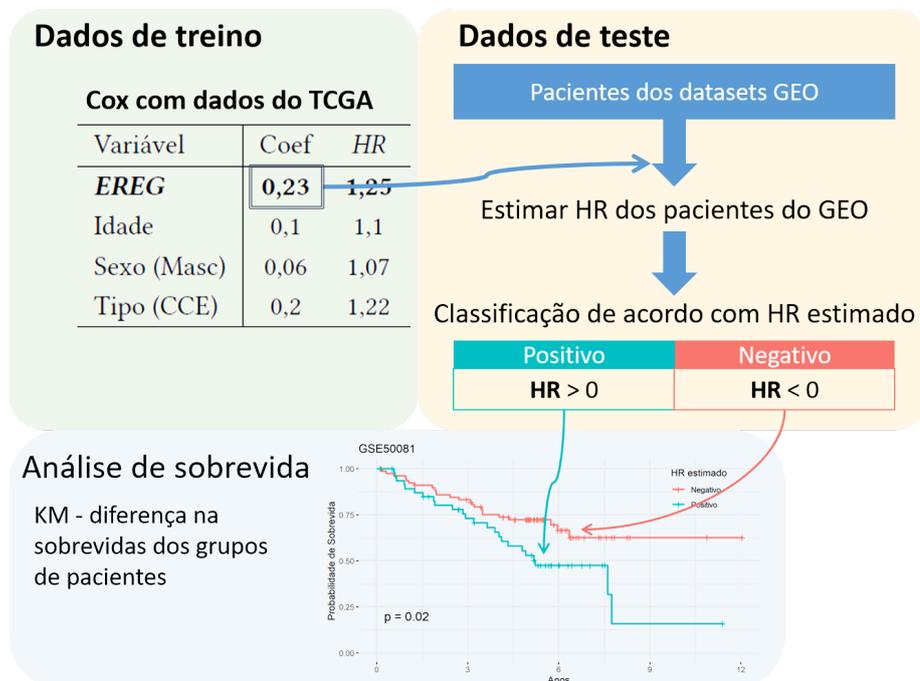
Para verificar a replicabilidade do resultado encontrado na Tabela 1.6, consideramos os dados do TCGA como dados de treino e os demais conjuntos de dados (*GSE81089*, *GSE30219*, *E-MTAB-6043* e *GSE67639*) como dados teste. Dois cenários foram criados para verificar a possibilidade de definir a sobrevida de um novo conjunto de pacientes a partir dos dados do TCGA:

1. Usar os coeficientes de *EREG* e das covariáveis idade, sexo e tipo, da análise de

Cox com os dados do TCGA (Tabela 1.6) e realizar uma multiplicação matricial pela expressão de *EREG*, Idade, Sexo e Tipo dos pacientes do conjunto de dados para ser estimado o *Harzard Ratio* (*HR*) relativo (chance de morte estimada). Considerando  $N^{\circ}pac$  como o número de pacientes, multiplicamos a matriz dos valores dos pacientes, (matriz de dimensões -  $N^{\circ}pac \times 4$ ) pela matriz de coeficientes ( $4 \times 1$ ), para obtermos uma matriz final  $N^{\circ}pac \times 1$ . Separamos os *HRs* relativos em dois grupos de acordo com a média. Realizamos uma análise de *KM* para verificar se existe diferença estatística entre as sobrevidas dos pacientes do grupo com *HRs* relativos acima e abaixo da média.

2. Usar o coeficiente de *EREG* da análise de Cox com os dados do TCGA (Tabela 1.6) e multiplicar pela expressão de *EREG* dos pacientes do conjunto de dados para ser estimado o *HR* relativo (chance de morte estimada). Separamos os *HRs* relativos em dois grupos de acordo com a média. Realizamos uma análise de *KM* para verificar se existe diferença estatística entre as sobrevidas dos pacientes do grupo com *HRs* relativos acima e abaixo da média.

Nos dois cenários, espera-se que os pacientes com chances de morte abaixo da média (*HR* estimado negativo) tenham sobrevida maior que os pacientes acima da média (*HR* estimado positivo). Uma síntese dessa metodologia é apresentada na Figura 1.1.



**Figura 1.1:** Esquema sintetizando a metodologia de verificação da replicabilidade dos resultados encontrados nos dados do TCGA. A partir da relação de *EREG* com a sobrevida global dos pacientes do TCGA, realizamos a estimativa da sobrevida de pacientes dos datasets GEO. Assim, classificamos os pacientes de acordo com o *HR* estimado e realizamos a análise de sobrevida univariada (Kaplan Meier) para avaliar se existe diferença estatística entre as sobrevidas globais dos grupos de pacientes.

### 1.3 Dados de expressão gênica de célula única

Além dos dados de expressão total da massa tumoral, analisamos dados de expressão gênica de células únicas (*scRNAseq - single cell RNAseq*) a partir de dois bancos de dados. A primeira base de dados, obtida de *GSE127465* (ZILIONIS *et al.*, 2019), é composta por sete pacientes sendo três de estadio inicial e quatro de estadio avançado (Tabela 1.2). A expressão é definida pela contagem baseada em *Unique Molecular Identifiers (UMI)* para cada gene em cada célula, sendo normalizada para valores *TPM*. O agrupamento das células e a classificação dos tipos celulares foram obtidos a partir do trabalho dos autores do artigo de origem do banco de dados *GSE127465* (ZILIONIS *et al.*, 2019). Os autores agruparam as células de acordo com um algoritmo de clusterização e classificaram usando um classificador Bayesiano baseado na expressão de marcadores moleculares de células imunes e não imunes. Os Mapas bidimensionais das Figuras 1.5b e 1.6 foram adaptados a partir de uma análise de redução de dimensionalidade realizada e disponibilizada pelos autores do banco de dados (ZILIONIS *et al.*, 2019).

	AD	CCE	Total
Inicial	2	1	3
Avançado	3	1	4
Total	5	2	7

**Tabela 1.2:** Os sete pacientes do banco de dados *GSE127465* de acordo com o estadio e subtipo histológico do tumor. Consideramos o estadio I e II como inicial e III e IV como avançado, de acordo com *AJCC 8th edition*

O segundo banco de dados, o *GSE131907* (KIM *et al.*, 2020), é composto por 11 pacientes com adenocarcinoma, sendo nove de estadio inicial e dois de estadio avançado (Tabela 1.3). Todos os pacientes exceto o P025 possuem amostras de tecido adjacente normal. Ao final, temos quatro pacientes do estadio inicial (I e II) com *EGFR* selvagem e com quantificação da expressão em tecido adjacente normal (P006, P009, P020 e P034). A expressão é definida pela contagem baseada em *UMI* para cada gene em cada célula, sendo normalizada para valores *TPM*. Os autores agruparam as células de acordo com o perfil de expressão gênica e as classificaram segundo a expressão de marcadores dos tipos celulares (KIM *et al.*, 2020).

	<b>P006</b>	P008	<b>P009</b>	P018	P019	<b>P020</b>	P025	P028	P030	P031	<b>P034</b>
<b>Estadio</b>	I	I	II	I	I	I	I	III	I	III	I
<b>Status EGFR</b>	WT	MT	WT	MT	MT	WT	WT	WT	MT	WT	WT
<b>Fumante</b>	Ex	Nunca	Ex	Ex	Fum	Fum	Ex	Fum	Nunca	Ex	Nunca

**Tabela 1.3:** Apresentação dos onze pacientes da base de dados *GSE131907*. Estadio do desenvolvimento tumoral de acordo com *AJCC 8th edition*, sendo I e II considerado inicial e III e IV avançados. Apresentamos também o status de mutação no gene *EGFR* e a frequência de tabagismo como: nunca fumou (Nunca), ex-fumante (Ex) e fumante (Fum). Destacamos em negrito os pacientes P006, P020 e P034 que possuem o *EGFR* selvagem e tumor no estadio inicial, com dados de tecido normal adjacente.

### 1.3.1 Reclassificação dos tipos celulares

Para investigar o padrão de expressão gênica especificamente de macrófagos M1 e M2, subclassificamos os macrófagos de forma alternativa a dos autores dos bancos de dados. Detectamos os subtipos celulares de macrófagos de acordo com a expressão de marcadores típicos de cada fenótipo. A partir das células classificadas como macrófagos pelos autores, verificamos se a célula expressa o gene marcador do fenótipo acima de 2/3 do valor da média. Os macrófagos do subtipo M1 foram detectados de acordo com a expressão de *IL1 $\beta$* , *HLA-DRA* e *CD86*. Já o subtipo M2 foi selecionado de acordo com a expressão de *CD163*, *CD206* (também chamado de *MRC1*) e com expressão de *IL1 $\beta$*  abaixo de 2/3 do valor médio.

Em *GSE127465* os tipos celulares classificados como tumoral seguiram as classificações dos autores e foram nomeadas aqui como epiteliais. Já em *GSE131907* os tipos celulares classificados como tumoral foram nomeados seguindo as classificações dos autores em dois estágios. A células *tS1* que são células tumorais em estágio menos avançado que tem perfil mais próximo de células epiteliais. O outro grupos são as células *tS2* que apresentam estágio mais avançado de desdiferenciação. As células epiteliais do tecido normal adjacente foram classificadas de acordo com o definido pelos autores.

A expressão gênica dos tipos celulares definidos de acordo com os marcadores moleculares foi comparada entre os três ou quatro tipos celulares (macrófagos M1, M2 e células epiteliais/tumorais *tS1* e *tS2*), por tecido (tumoral ou normal adjacente, no caso do banco *GSE131907*), para cada paciente e com todos os pacientes conjuntamente. Realizamos o teste de *Wilcoxon* comparando par-a-par a expressão gênica dos tipos celulares. Os p-valores foram ajustados por múltiplos testes pelo método *False Discovery Rate (FDR)* (BENJAMINI e HOCHBERG, 1995).

## 1.4 Delineamento do estudo *in vitro*

Estudo prospectivo observacional descritivo e de caráter exploratório com coleta de material biológico, mas sem intervenção. Foram coletados 20ml de sangue em tubos com EDTA de nove indivíduos saudáveis para a obtenção de células mononucleadas do sangue periférico (*PBMC* – do inglês, *peripheral blood mononuclear cell*). Esse número de voluntários foi escolhido seguindo metodologias de referências onde experimentos semelhantes ao do presente trabalho foram realizados (MIA *et al.*, 2014; PIREAUX *et al.*, 2020; DONG *et al.*, 2020; VARGA *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2020).

O presente projeto foi realizado em colaboração com o Grupo de pesquisa em Imunologia da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariane Amano do Hospital Sírio Libanês e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa. Está cadastrado no CEP como HSL 2021-26 e apresenta o número CAAE 43821021.0.0000.5461.

### 1.4.1 Critérios de inclusão

Indivíduos saudáveis com mais de 18 anos, não tabagistas, que não apresentavam comorbidades clinicamente significativas e aceitaram participar do estudo mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE; Apêndice A seção A.4).

### 1.4.2 Caracterização dos voluntários

Foram incluídos nas análises 9 voluntários. A idade média da população é de 32,22 anos. Indivíduos do sexo masculino correspondem a 66% dos voluntários (Tabela 1.4).

Voluntário	Sexo	Idade
2	M	37
3	F	31
4	M	39
5	M	20
6	M	31
7	F	26
8	F	37
9	M	34
10	M	35

**Tabela 1.4:** Caracterização dos voluntários incluídos

## 1.5 Separação de leucócitos

A separação do *PBMC* foi realizada por Ficoll® Paque. A amostra de sangue foi diluída em tampão fosfato (*PBS*) na proporção de um *ml* de *PBS* com 10% de Soro fetal bovino (*SFB*) para um *ml* de sangue. A amostra foi colocada vagarosamente sobre o Ficoll® e centrifugada a 540g por 30 min a temperatura ambiente (21°C) sem *brake*. Após a centrifugação, uma camada de leucócitos torna-se visível, possibilitando a separação dos mesmos.

## 1.6 Purificação de monócitos

Para o isolamento de monócitos deixamos os leucócitos que foram separados por Ficoll® em uma concentração de  $10^8 \text{ cel/ml}$ . Utilizamos o kit *EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit II* (*Stemcell Technologies*, Vancouver, Canadá) de acordo com as instruções do fabricante.

## 1.7 Diferenciação de macrófagos M1 e M2

Uma vez isolados os monócitos, seguimos com plaqueamento em placas de 12 poços na concentração de  $4 \times 10^5 \text{ cel/poço}$ . Realizamos o primeiro estímulo para maturação dos monócitos em macrófagos utilizando *M-CSF* (*Peprotech*, Rocky Hill, NJ, USA) à  $10 \text{ ng/ml}$ . Após 72h o meio de cultura foi substituído por um novo meio R10 com novo estímulo de *M-CSF*. Após cinco dias trocamos novamente o meio de cultura e damos o estímulo de polarização pró-inflamatório para macrófagos M1 (*IFN $\gamma$* - $20 \text{ ng/ml}$  e *LPS*- $50 \text{ ng/ml}$ ) (*Peprotech*, Rocky Hill, NJ, USA) e anti-inflamatório para M2 (*IL-4*- $10 \text{ ng/ml}$  e *IL13*- $10 \text{ ng/ml}$ ) (*Peprotech*, Rocky Hill, NJ, USA). A coleta para extração de *RNA* ocorreu em *Trizol* (*ThermoFisher*

*Scientific*, Waltham, MA, USA) seis horas após o estímulo. Já as extrações de proteína em tampão *RIPA* e do meio de cultura foram realizadas 24h após o estímulo. O meio de cultura foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior uso.

Em resumo, contamos com 3 tratamentos:

1. Macrófagos não estimulados (M0),
2. Macrófagos estimulados com *INF $\gamma$*  (20 $\eta$ /ml) e *LPS* (50 $\eta$ g/ml) (M1),
3. Macrófagos estimulados com *IL-4* (10 $\eta$ /ml) e *IL-13* (10 $\eta$ g/ml) (M2).

## 1.8 Análise de expressão gênica

### 1.8.1 Extração de RNA

Após extração de RNA com *Trizol* (de acordo com as instruções do fabricante), foram adicionados 200 $\mu$ L de clorofórmio às amostras. Esta solução foi homogeneizada por 30 segundos e, em seguida, mantida em repouso por 3 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas à 15000g, por 15 minutos e a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante, contendo o RNA, foi transferido para novo tubo. Em seguida foram adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol nos tubos com o sobrenadante para que ocorresse a precipitação do RNA. O sobrenadante com isopropanol foi incubado *overnight* na temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 15000g, por 10 minutos e a  $4^{\circ}\text{C}$  e, então, tiveram o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1mL de etanol 75% e novamente as amostras foram centrifugadas, mas desta vez a 15000g, por 5 minutos e a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Mais uma vez, foi adicionado 1mL de etanol 75% e, então, as amostras foram centrifugadas como na etapa anterior. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos com as tampas abertas até secarem. As amostras foram ressuspensas com 15  $\mu$ L de água *DPEC* autoclavada e quantificadas pelo espectrofotômetro *NanoDrop<sup>TM</sup>*. Avaliação da integridade do RNA extraído por eletroforese.

### 1.8.2 Purificação de RNA

Para o tratamento com DNase, após quantificação e verificação de integridade, foram separados 1000 $\eta$ g de RNA, aos quais foi adicionada água *DPEC* autoclavada no volume complementar a 8  $\mu$ L. Então, foi adicionado 1  $\mu$ L de *RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction Buffer* (Promega) e 1  $\mu$ L de *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) em cada amostra. Estas foram colocadas no termociclador por 30 minutos à  $37^{\circ}\text{C}$ . Decorrido este tempo, foi adicionado 1  $\mu$ L de *RQ1 DNase Stop Solution* (Promega) passando novamente ao termociclador a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

### 1.8.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA ocorreu através da técnica de transcrição reversa, utilizando o *kit Superscript IV* (*ThermoFisher Scientific*, Waltham, MA, USA). Uma vez obtido o RNA purificado, as amostras foram requantificadas. Separamos 500 $\theta$ g de RNA purificado adicionamos água *DPEC* autoclavada no volume complementar para 11 $\mu$ L. Adicionamos 1  $\mu$ L

de Oligo d(T) a 50  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{L}$  de dNTP a 10 $\eta\text{M}$  por amostra, passando ao termociclador por 5 minutos a 65°C. Após este tempo, adicionados 4  $\mu\text{L}$  de Solução tampão de *SSIV* 5x, 1  $\mu\text{L}$  de *DTT* a 100mM, 1  $\mu\text{L}$  de *RNAse inhibitor* e 1  $\mu\text{L}$  da enzima transcriptase reversa (Termociclador a 55°C por 10 minutos, seguidos de 10 minutos a 80°C). Por fim, o *cDNA* diluído dez vezes em água *Milli-Q* e, então, armazenado a -20°C para posterior uso em PCR em tempo real (qPCR).

#### 1.8.4 qPCR

Para a realização da *qPCR*, adicionamos 5  $\mu\text{L}$  de *SYBR Green 2x* (*ThermoFisher Scientific*, Waltham, MA, USA), 0,5  $\mu\text{L}$  de *primer forward*, 0,5  $\mu\text{L}$  de *primer reverse*, com as concentrações testadas previamente. Utilizamos 4  $\mu\text{L}$  de *cDNA* diluído dez vezes. As análises ocorreram no equipamento *ABI PRISM 7300* (*ThermoFisher Scientific*, Waltham, MA, USA) para a ciclagem da *qPCR*. Utilizando a média das duplicatas, a análise da expressão de todos os genes foi realizada em R utilizando o método  $2^{-\delta\delta C_t}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Como referência, em macrófagos, utilizamos a expressão de genes *housekeeping* como *HPRT*, *GUSB* e *MRPL19*. Já para a linhagem H1299 usamos  $\beta$ -Actina como gene referência. As sequências dos *primers* dos genes utilizados estão listadas na Tabela A.7.

### 1.9 Proliferação das linhagens tumorais

Utilizamos a linhagem H1299 de CPCNP. A verificação da proliferação foi feita por ensaio clonogênico. As células foram plaqueadas na concentração de 60 células por poço em uma placa de 96 poços, contendo 100 $\mu\text{l}$  de meio R10 ou de meio de cultura de macrófagos. A cada três dias realizamos a troca de meio por meio R10 novo, e nove dias após o plaqueamento fizemos a fixação das células com formaldeído 3,7% e coloração das mesmas com Cristal-Violeta. A leitura de absorbância das amostras foi realizada no espectrofotômetro *Infinite M200 Pro* (Tecan Trading AG, Switzerland) a 595  $\eta\text{m}$ , sendo usada como uma *proxy* para a quantidade de células de cada poço.

### 1.10 Avaliação das vias de sinalização via Western Blot

A fim de verificar o efeito do estímulo de EREG e EGF nas linhagem de câncer de pulmão H1299, realizamos o seguinte experimento: 7, 5  $\times 10^5$  cel/poço foram colocadas em uma placa de 6 poços com 2ml de meio R10. Após 12h do plaqueamento removemos o meio R10 e colocamos *RPMI* puro para iniciar o processo de inanição de soro fetal bovino durante 1h. Após 1h, foram estimulados com EREG a 100 $\eta\text{g/ml}$  ou EGF a 30 $\eta\text{g/ml}$  por 1min, 15min, 1h, 6h e 8h, com 1ml de *RPMI* puro. Após o tempo de estímulo, realizamos a lise das células com tampão *RIPA* (10mM Tris-HCl, pH7, 4, 150 mM NaCl, 1% deoxicolato de sódio, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1mM fluorido fenilmetilsulfonil (PMSF), 5 $\mu\text{g/ml}$  aprotinina e 2  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina) e centrifugamos a 800g por 5min a 4°C. Também verificamos a presença da proteína epirregulina intracelular e no meio de cultura de macrófagos polarizados para M0, M1 e M2.

Determinamos a concentração de proteína utilizando o reagente *Pierce* com leitura de absorbância das amostras no espectrofotômetro *Infinite M200 Pro* (Tecan Trading AG, Switzerland) a 660  $\eta\text{m}$ . Os sobrenadantes e os extratos citosólicos (40 $\mu\text{g}$  de proteínas) foram separados num *SDS-PAGE* desnaturante (30% acrilamida/ mix-acrilamida) e transferidos para membranas de nitrocelulose utilizando um tampão de transferência (20% de metanol, 39mM glicina, 48mM Tris-base e 0,037% SDS com *pH*8,3) durante 1:15 h a 110 V (tensão constante). As membranas foram bloqueadas com 5% de BSA 1 h em tampão *TBS-T* (*TBS pH*7 mais *Tween-20* 0,1% v/v) e incubadas com um anticorpo anti-EREG, anti-p-EGFR, anti-pERK, anti-pAKT, e anti-AKT. As membranas foram então lavadas três vezes com tampão *TBS-T*, incubadas com o anticorpo secundário e reveladas. Como controle interno, as membranas foram incubadas com um anticorpo policlonal anti-Actina e anti-Tubulina. As bandas foram visualizadas usando um realce de peroxidase no sistema de detecção quimioluminescente. Realizamos a quantificação das bandas usando o software *Image Studio Lite* (Versão 5.2)

## 1.11 Análise estatística dos resultados *in vitro*

Testamos se a expressão dos genes é estatisticamente diferente entre os grupos (M0, M1 e M2). Devido à estrutura de dependência entre as amostras dos grupos M0, M1 e M2, que se originam de um mesmo voluntário, realizamos o teste de *Friedman*. Para a realização das comparações par-a-par entre os tratamentos realizamos o teste T pareado par-a-par com ajuste do p-valor para múltiplos testes pelo método *False Discovery Rate (FDR)* (BENJAMINI e HOCHBERG, 1995). Na comparação das taxas de proliferação realizamos o teste ANOVA de um fator para as amostras independentes. Para a realização das comparações par-a-par entre os tratamentos realizamos o teste T com ajuste do p-valor para múltiplos testes pelo método *FDR*. Para todos os testes realizados consideramos um nível de significância igual a 5%.



# Resultados

## 1.12 Análise de sobrevida

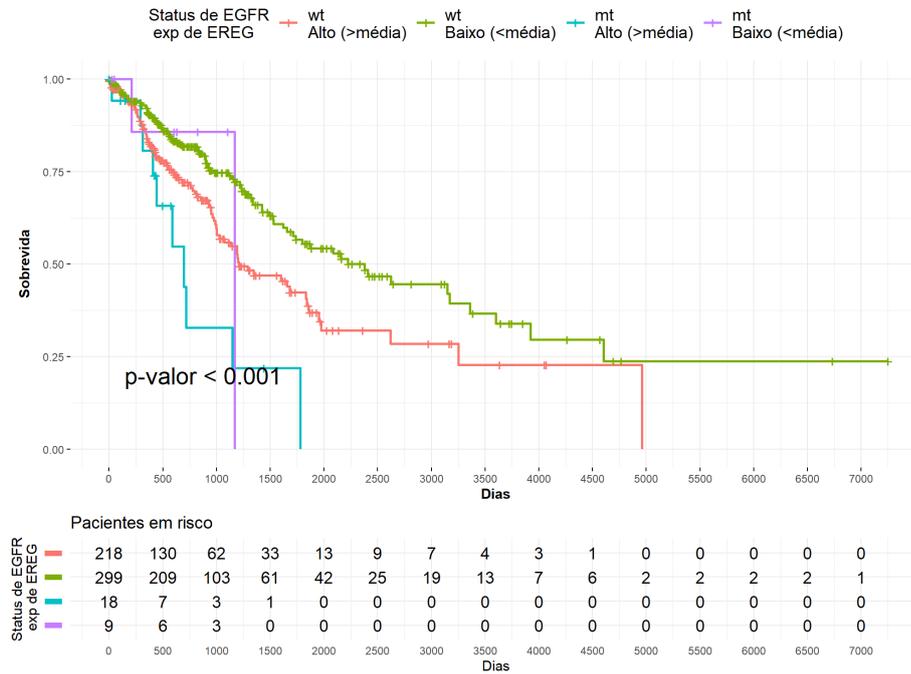
Queremos entender como a expressão de *EREG*, e dos demais genes de ligantes e receptores da família *ERBB* (*EGF*, *TGF $\alpha$* , *HB-EGF*, *BTC*, *AREG*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ERBB4*) se relacionam com a sobrevida dos pacientes em estadios iniciais de CPCNP do banco de dados *TCGA*. Realizamos uma análise de correlação das expressões gênicas de *EREG* e entre os demais genes para evitar colinearidade. A expressão de *EREG* e *AREG* apresentaram uma alta colinearidade (Apêndice A, Tabela A.1). Realizando uma análise de seleção de modelos com dois cenários usando (i) *EREG* e os demais ligantes e (ii) *AREG* com os demais ligantes. Como o critério de informação de Akaike (*AIC*) do cenário com *EREG* (*AIC* = 2082,9) é menor do que com *AREG* (*AIC* = 2083,8), ou seja, explica melhor a sobrevida, decidimos remover *AREG* das análises de sobrevida.

Para entender se *EREG* e os demais ligantes da família *ERBB* estão relacionados com a sobrevida dos pacientes de CPCNP do banco de dados *TCGA*, realizamos uma análise de *Cox* considerando apenas os ligantes de *ERBB*. Removemos o efeito de variáveis confundidoras como idade, sexo e o tipo histológico. Dentre os ligantes de *ERBB*, *EREG* é o único gene que apresenta uma relação estatisticamente significativa da sua expressão com a sobrevida dos 544 pacientes (Tabela 1.5). Realizando um *Cox* de *EREG* com os receptores da família *ERBB* (*EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ERBB4*), a expressão de *EREG* também se mostrou significativamente relacionada com a sobrevida, independentemente da expressão gênica dos receptores (Apêndice A, Tabela A.2). Por outro lado, em pacientes com CPCNP de estadio avançado (III e IV), a expressão de *EREG* já não apresenta relação significativa com a sobrevida (Apêndice A, Tabela A.3).

Considerando a relevância clínica das mutações em *EGFR* (Mox *et al.*, 2009), verificamos se a presença de mutações nesse gene afeta a relação da expressão de *EREG* com a sobrevida. São 27 pacientes de estadio inicial (I e II) de CPCNP com *EGFR* mutado (Apêndice A, Tabela A.4). Do total, nove apresentam expressão de *EREG* abaixo da média. A análise de *Kaplan-Meier* mostra que os 218 pacientes com *EGFR* selvagem e expressão de *EREG* acima da média apresentaram uma sobrevida pior que os 299 com *EGFR* selvagem e a expressão de *EREG* abaixo da média (Figura 1.2).

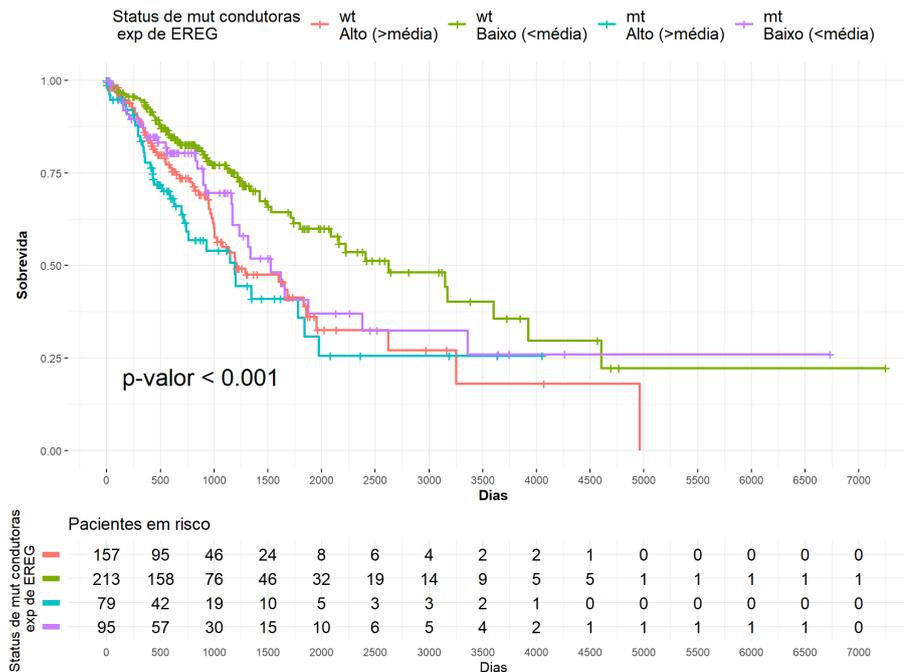
Variável	HR	95% IC	p-valor
<b>EREG</b>	<b>1,24</b>	<b>1,07-1,44</b>	<b>0,004</b>
EGF	0,99	0,85-1,15	0,898
TGFA	1	0,85-1,18	0,970
HBEGF	1,05	0,9-1,22	0,537
BTC	0,9	0,78-1,05	0,184
EPGN	1,1	0,94-1,28	0,244
Idade	1,1	0,94-1,28	0,220
Sexo (Masc)	1,03	0,76-1,41	0,827
Tipo (CCE)	1,04	0,71-1,53	0,838

**Tabela 1.5:** A maior expressão de EREG está relacionada com a pior sobrevida de pacientes com CPCNP do banco de dados TCGA, mesmo removendo o efeito da expressão de outros ligantes de ERBB. Análise de Cox multivariado com a expressão de EREG e dos demais genes ligantes dos receptores da família ERBB em pacientes com CPCNP do estadio inicial (I e II). O Hazard Ratio (HR) se refere à probabilidade de ocorrência do evento de morte com o aumento do valor da variável e o intervalo de confiança de 95%. A linha com p-valor significativo (abaixo de 5%) está destacada em negrito. Essa análise considerou 544 pacientes com 193 eventos de morte.



**Figura 1.2:** A maior expressão de EREG e a mutação em EGFR estão relacionadas com a pior sobrevida de pacientes com CPCNP do banco de dados TCGA. Análise de Kaplan-Meier com os grupos separados de acordo com o status do gene EGFR, selvagem (wt) ou mutado (mt) e expressão de EREG abaixo da média (Baixo) ou acima (Alto). O p-valor da análise é apresentado no gráfico e a proporção de pacientes vivos até determinado instante (Pacientes em risco) aparece na parte inferior.

Levantamos um conjunto de genes com mutações condutoras relacionadas ao CPCNP, como: *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *MET*, *RET*, *ERBB2*, *ROS1*, *KRAS*, *FGFR1*. São 174 pacientes que apresentam pelo menos uma mutação nesse conjunto de genes (Apêndice A, Tabela A.5). A análise de *Kaplan-Meier* mostra que o grupo sem mutações condutoras e com baixa expressão de *EREG* tem maior sobrevida que os grupos com maior expressão e com mutação condutora (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** A maior expressão de *EREG* e a ocorrência de uma mutação condutora estão relacionadas com a pior sobrevida de pacientes com CPCNP do banco de dados TCGA. Análise de *Kaplan-Meier* com os grupos separados de acordo com a presença (mt) ou ausência (wt) de alguma mutação condutora, e expressão de *EREG* abaixo da média (Baixo) ou acima (Alto). O p-valor da análise é apresentado no gráfico e a proporção de pacientes vivos até determinado instante (Pacientes em risco) aparece na parte inferior.

### 1.13 Relação de *EREG* com a sobrevida em outros conjuntos de dados

Considerando a relação de *EREG* com a sobrevida observada no banco de dados do TCGA, queremos prever a sobrevida de pacientes de novos conjuntos de dados de pacientes com CPCNP. Para obter a relação da expressão de *EREG* com a sobrevida de pacientes de estadio inicial (I e II) de CPCNP no banco de dados do TCGA, realizamos uma análise de *Cox* removendo apenas o efeito de covariáveis como idade, sexo e subtipo histológico do tumor. A expressão aumentada do gene *EREG* está associada a um aumento de 25% na chance de morte dos pacientes (Tabela 1.6). Verificamos também que a relação de *EREG* com a sobrevida se mantém mesmo na ausência de pacientes com mutações condutoras. A análise de *Cox* apenas com os pacientes que não apresentam nenhuma das mutações

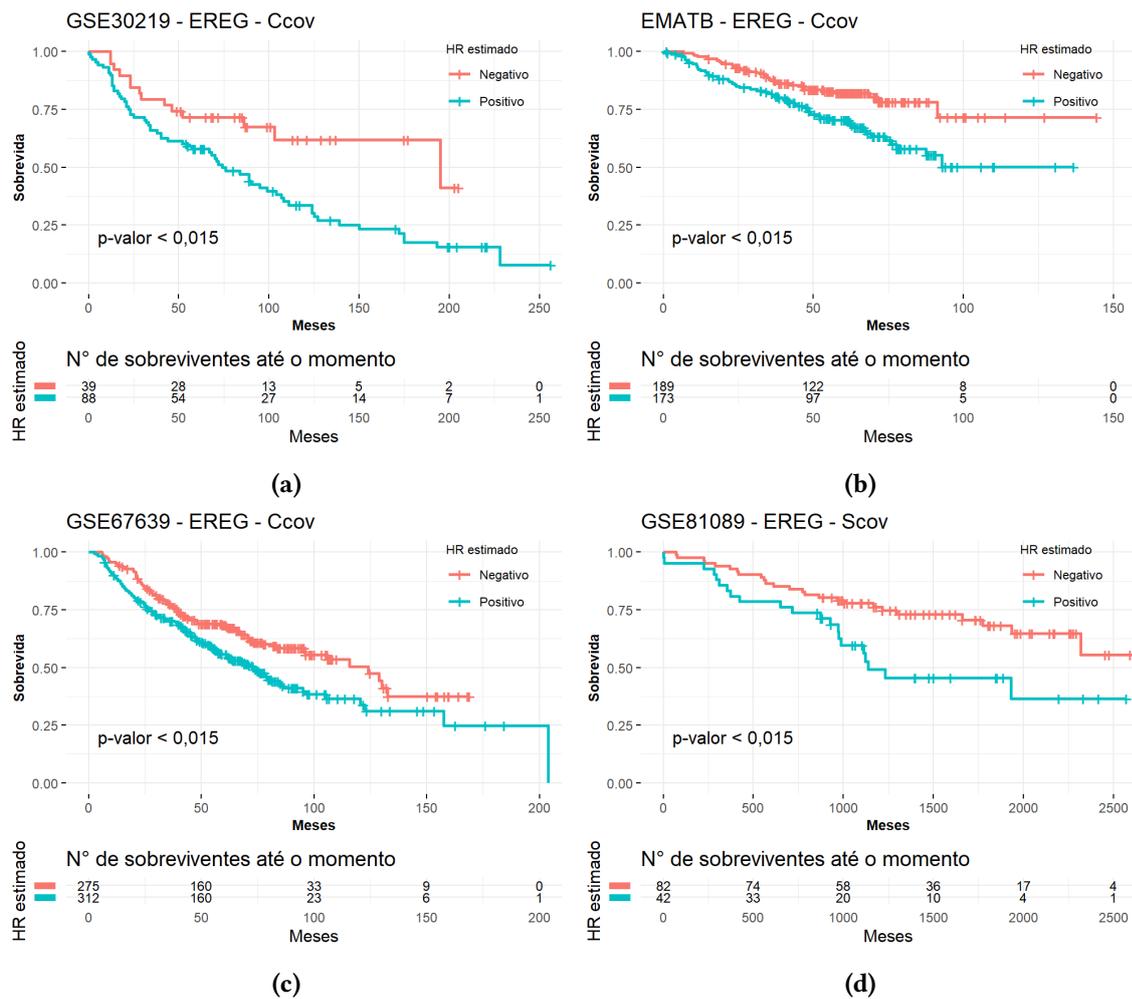
condutoras mostrou um padrão semelhante na relação entre a expressão de *EREG* e a sobrevida (Apêndice A, Tabela A.6).

Variável	Coef	HR	95% IC	p-valor
<b><i>EREG</i></b>	<b>0,23</b>	<b>1,25</b>	<b>1,09-1,44</b>	<b>0,002</b>
Idade	0,1	1,1	0,95-1,28	0,209
Sexo (Masc)	0,06	1,07	0,79-1,44	0,675
Tipo (CCE)	0,2	1,22	0,89-1,68	0,216

**Tabela 1.6:** A maior expressão de *EREG* está relacionada com a pior sobrevida de pacientes com CPCNP do banco de dados TCGA. Relação da expressão de *EREG* com a sobrevida de pacientes com CPCNP do banco de dados TCGA. A coluna Coef se refere ao coeficiente da relação entre a variável e a sobrevida. O Hazard Ratio (HR) é a probabilidade de ocorrência do evento de morte com o aumento do valor da variável e os respectivos limites inferior e superior intervalo de confiança de 95% (95%IC). As linhas com p-valores significativos (abaixo de 5%) estão destacadas em negrito. Essa análise considerou 544 pacientes com 193 eventos de morte.

Utilizamos os coeficientes de *EREG* (0,23) e das demais covariáveis (idade, sexo e tipo histológico), obtidos no Cox com os dados do TCGA (Tabela 1.6). Em quatro dos seis bancos de dados foi possível prever a sobrevida de pacientes tendo como base o nível de expressão de *EREG* no tumor (Figura 1.4). Considerando conjuntamente os coeficientes de expressão de *EREG* com as covariáveis pudemos prever a sobrevida de 1 076 de novos pacientes de três conjuntos de dados que usam a tecnologia de microarranjo de DNA (*GSE30219*, *EMATB* e *GSE67639*). Isso mostra que a relação de *EREG* com a sobrevida pode ser extrapolada para outras tecnologias. Além disso, considerando apenas o coeficiente da expressão de *EREG* é possível estimar a sobrevida de 251 pacientes de dois bancos de dados (*GSE30219* e *GSE81089*). O banco *GSE81089*, assim como o TCGA, usa a tecnologia de RNAseq para inferir a expressão gênica (MEZHHEYUSKI *et al.*, 2018).

Considerando a relação de *EREG* com a sobrevida de pacientes, é importante entender quais tipos celulares e em quais contextos ocorrem as maiores expressões de *EREG*.



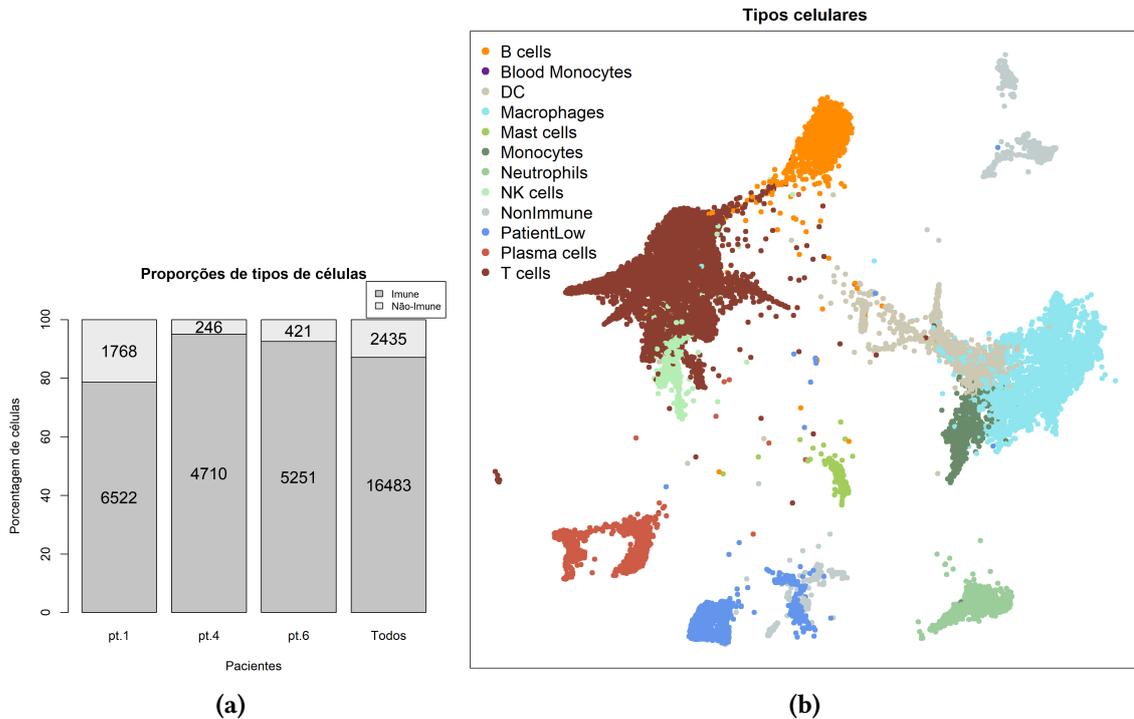
**Figura 1.4:** Usando os dados de expressão gênica de *EREG*, idade, sexo e tipo histológico é possível prever a sobrevida de 1200 pacientes com CPCNP de outros bancos de dados. Análise de Kaplan-Meier com os grupos separados de acordo com a sobrevida relativa, estimada a partir do coeficiente de *EREG* sem as covariáveis (*Scov*) ou com as covariáveis (*Ccov*), apresentadas na Tabela 1.6. O *p*-valor da análise é apresentado no gráfico e o número de sobreviventes até determinado instante está na parte inferior dos gráficos. Os bancos de dados utilizados foram (a) GSE30219, (b) EMATB e (c) GSE67639, (d) GSE81089.

## 1.14 Expressão dos genes nos tipos celulares

A fim de verificar a relação dos genes *EREG*, *EGFR*, e *ERBB2* com os tipos celulares observados em amostras tumorais, usamos os dados de sequenciamento de células únicas (*scRNAseq*) de dois bancos de dados: GSE127465 (ZILIONIS *et al.*, 2019) e GSE131907 (KIM *et al.*, 2020). Em GSE127465 analisamos a expressão de células do tecido tumoral de três pacientes em estadio inicial de CPCNP. Já no banco de dados GSE131907, analisamos amostras de tecido tumoral e de tecido normal adjacente ao tumor de quatro pacientes em estadio inicial.

### 1.14.1 Análise de macrófagos segundo classificação do autor

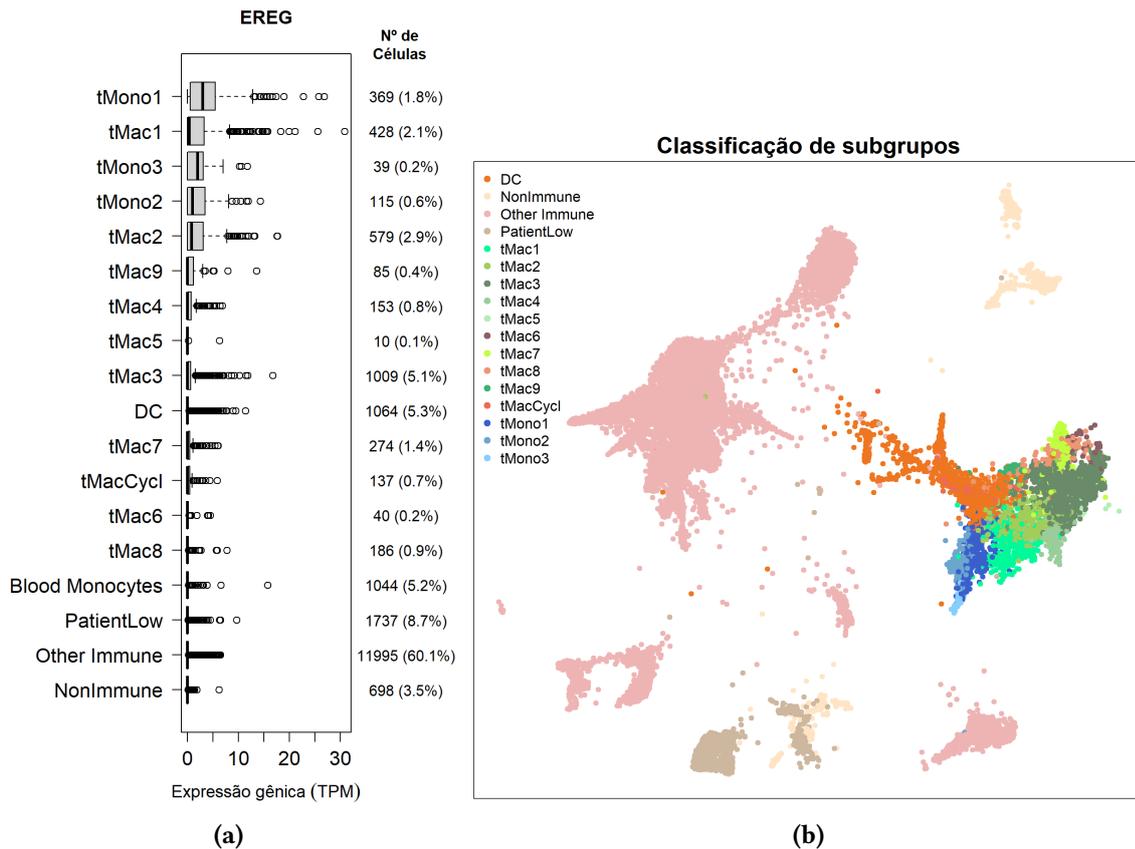
Para classificar os tipos celulares, os autores de *GSE127465* usaram um método de agrupamento não-supervisionado, baseado no padrão de expressão gênica. Após o agrupamento, as células foram classificadas de acordo com o conjunto de genes diferencialmente expressos em cada grupo. Realizamos as análises considerando a classificação de tipos celulares definidos em *ZILIONIS et al., 2019*. Inicialmente, os tipos celulares foram classificados como células imunes e não imunes. No total, são 18 918 células dos três pacientes analisados, sendo 12,8% de células não imunes e 87,2% de células classificadas como imunes (Figura 1.5a). Dividimos as células não imunes em três grupos: *PatientLow* (células classificadas pelos autores como específicas dos pacientes de estadio inicial de CPCNP), *PatientHigh* (células específicas dos pacientes de estadio avançado de CPCNP) e *NonImmune* (restante da células não-imunes). Na Figura 1.5b destacamos os grupos de células não imunes específicas dos pacientes com tumor em estadio inicial e estadio avançado. Destacamos também células imunes como linfócitos, células NK, neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas.



**Figura 1.5:** O conjunto de dados *GSE127465* possui mais de células imunes do que não imunes. As células foram agrupadas e subclassificadas de acordo com seu padrão de expressão gênica. (a) Proporção de células imunes e não-imunes do BD *GSE127465* por paciente e total. (b) Visualização bidimensional (SPRING plots) adaptada de *ZILIONIS et al., 2019* representando o padrão de expressão de células dos sete pacientes do banco de dados *GSE127465*.

Considerando os tipos celulares classificados pelos autores, podemos observar que os monócitos e macrófagos apresentam as maiores expressões de *EREG* (Figura 1.6a). O grupo dos monócitos foi subclassificado em três grupos (*tMono1-3*) e o dos macrófagos em nove grupos (*tMac1-9*). Um décimo grupo de macrófagos foi classificado por expressar genes do

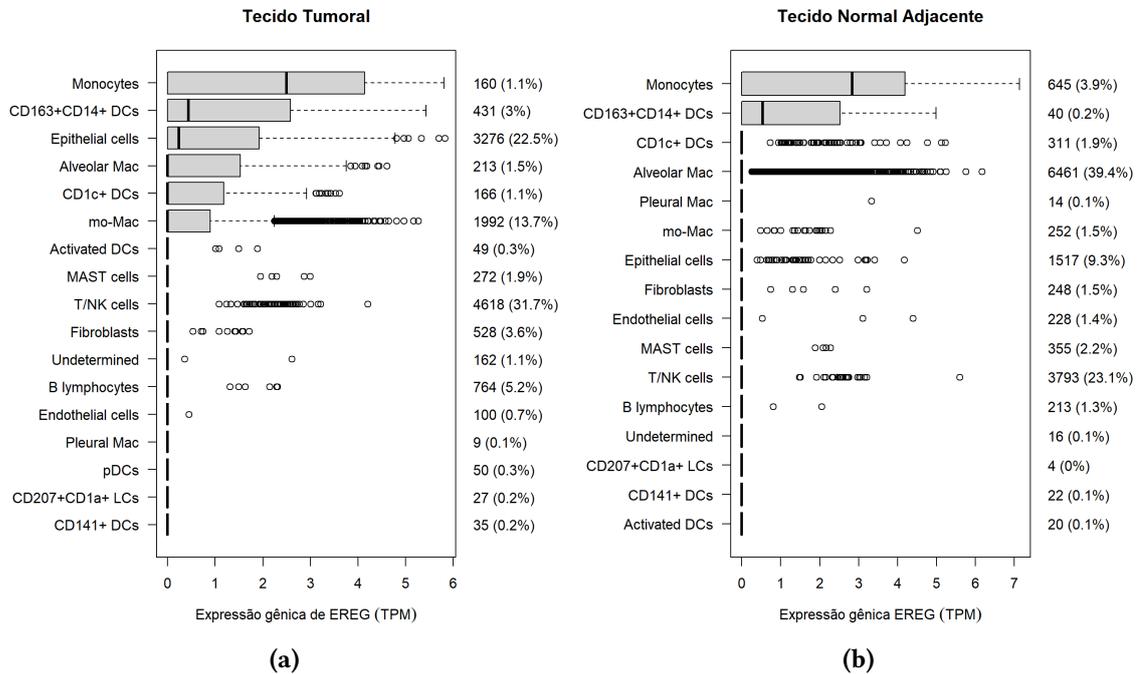
ciclo celular (*tMacCycl*) (Figura 1.6b). Os monócitos e os subgrupos de macrófagos 1 e 2 são os que apresentam maior expressão de *EREG*. Dentre os macrófagos, o subgrupo 1 (*tMac1*) é o que apresenta a maior expressão média de *EREG*. A análise de enriquecimento de vias, destaca que vias pró-inflamatórias como quimiotaxia e hipóxia está mais expressa nesse grupo de macrófagos. Já o grupo oito (*tMac8*), que apresenta a menor expressão de *EREG*, está relacionado à respostas anti-inflamatórias, de regulação de leucócitos, linfócitos e hematopoiese. Nas células não imunes e específicas dos pacientes, a expressão de *EREG* é próxima de zero.



**Figura 1.6:** O *EREG* é expresso principalmente por monócitos e macrófagos divididos em 13 subgrupos celulares de acordo com o padrão de expressão. (a) Expressão de *EREG* nos tipos celulares identificados no banco de dados GSE127465. O grupos estão dispostos em ordem decrescente, de cima para baixo, de acordo com o valor médio de expressão de *EREG* na escala TPM (b) Visualização bidimensional (SPRING plots) adaptada de ZILIONIS et al., 2019 representando o padrão de expressão de células do banco de dados GSE127465. Destacamos os subgrupos de macrófagos, monócitos e células dendríticas (DC). As demais células estão agrupadas como não-imunes (NonImmune), outras células imunes (Other Immune) e células específicas dos pacientes com CPCNP em estadio inicial (PatientLow).

Assim como para GSE127465, realizamos uma análise de expressão de *EREG* nos tipos celulares classificados em GSE131907. Selecionamos os dados dos quatro pacientes do estadio inicial e com o *status EGFR* selvagem. Considerando as amostras de tecidos tumorais, a expressão de *EREG* é predominante em monócitos, células dendríticas, células do tumor e macrófagos (Figura 1.7a). No tecido normal adjacente ao tumor, a principal expressão é das

células mieloides como macrófagos, monócitos e células dendríticas (Figura 1.7b).



**Figura 1.7:** Os monócitos, células dendríticas (DCs), epiteliais e macrófagos apresentam as maiores expressões de *EREG* no tecido tumoral. Já no tecido normal adjacente, as células epiteliais apresentam baixa expressão média de *EREG*. Expressão de *EREG* nos tipos celulares identificados no banco de dados GSE131907 para (a) tecido tumoral e (b) tecido normal adjacente. O grupos estão dispostos em ordem decrescente, de cima para baixo, de acordo com o valor médio de expressão de *EREG* na escala TPM. Os valores a direita dos gráficos representam o número de células identificadas em cada grupos com a respectiva porcentagem relativa ao total de células entre parênteses.

*Log2* da expressão de *EREG* nos tipos celulares pré definidos em GSE131907

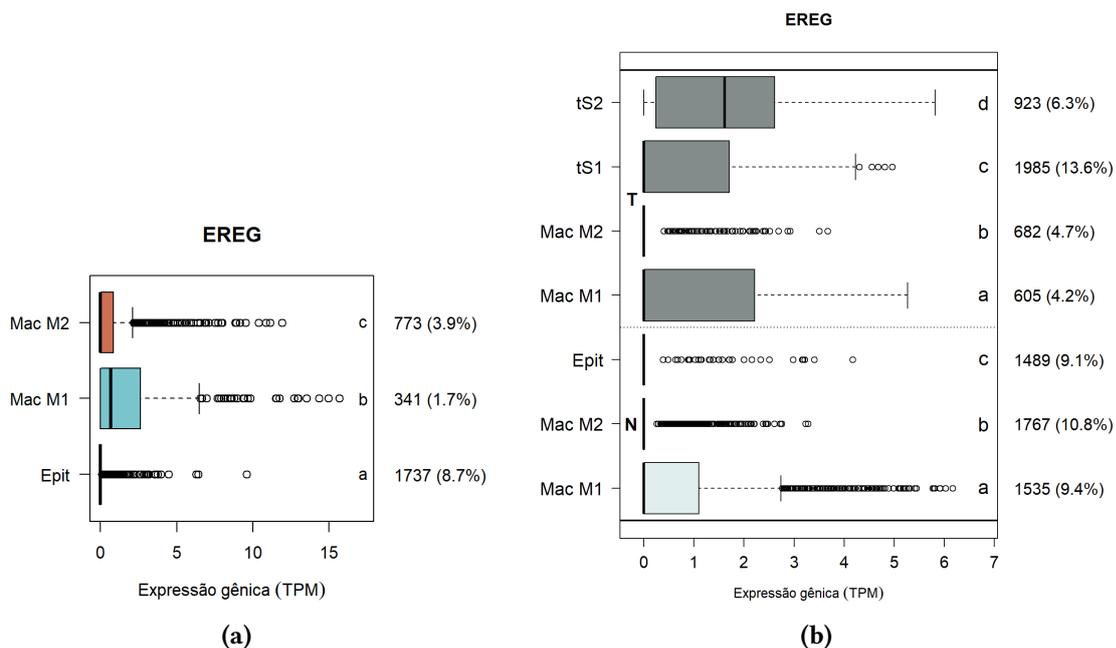
## 1.15 Análise de macrófagos segundo marcadores de polarização

Os resultados sugerem uma relação entre expressão de *EREG* e ativação de genes que codificam mediadores pró-inflamatórios. Para comparações com experimentos *in vitro* é importante entendermos diretamente qual fenótipo de macrófagos apresenta uma maior expressão de *EREG*. Nesse sentido, selecionamos as células identificadas como monócitos e macrófagos pelos autores de cada conjunto de dados e classificamos o fenótipo das células de acordo com os marcadores específicos. Os macrófagos M1 foram caracterizados pela expressão de *IL1 $\beta$* , *HLA-DR* e *CD86*. Os macrófagos M2 foram caracterizados pela expressão de *CD163*, *CD206* e pela não expressão de *IL1 $\beta$* . A identificação das células epiteliais seguiu a classificação dos autores. Realizamos essa reclassificação tanto no conjunto de dados de GSE127465 quanto para GSE131907.

No tecido tumoral, em GSE12745, os macrófagos M1 apresentaram expressão de *EREG* significativamente maior que os macrófagos M2 e as células epiteliais (Figura 1.8a). Já em

*GSE131907* a maior expressão de *EREG* é de células tumorais em estadios mais avançados, seguida pela expressão de *EREG* pelos macrófagos M1 e pelas células tumorais tS1 (estágio menos avançado) (Figura 1.8b). No tecido normal adjacente em *GSE131907*, o macrófago M1 também apresenta expressão de *EREG* mais alta que as células epiteliais e macrófagos M2 (Figura 1.8b). Os macrófagos classificados como M1 e M2 representam em média 12,7% das células infiltradas nos tecidos tumorais ou normal adjacente (Figura 1.8).

Analisando os pacientes de *GSE12745*, individualmente, vemos que o padrão de expressão entre eles é semelhante. Os macrófagos M1 apresentam expressão maior de *EREG* que os macrófagos M2 e que as células epiteliais (Apêndice A, Figura A.1). Por outro lado, em *GSE131907*, o padrão de expressão do *EREG* varia entre os quatro pacientes. Para os pacientes *pt.06* e *pt.09* os macrófagos M1 apresentam uma expressão significativamente maior que os demais tipos celulares, tanto no tecido normal quanto no tecido tumoral (Apêndice A, Figura A.2). O mesmo ocorre nos tecidos normais adjacentes dos pacientes *pt.20* e *pt.34*. Já nos tecidos tumorais desses dois pacientes, as células tumorais em estágio mais avançado (*tS2*) apresentam maior expressão de *EREG* que os demais tipos celulares. A segunda maior expressão nesses tecidos é dos macrófagos M1.



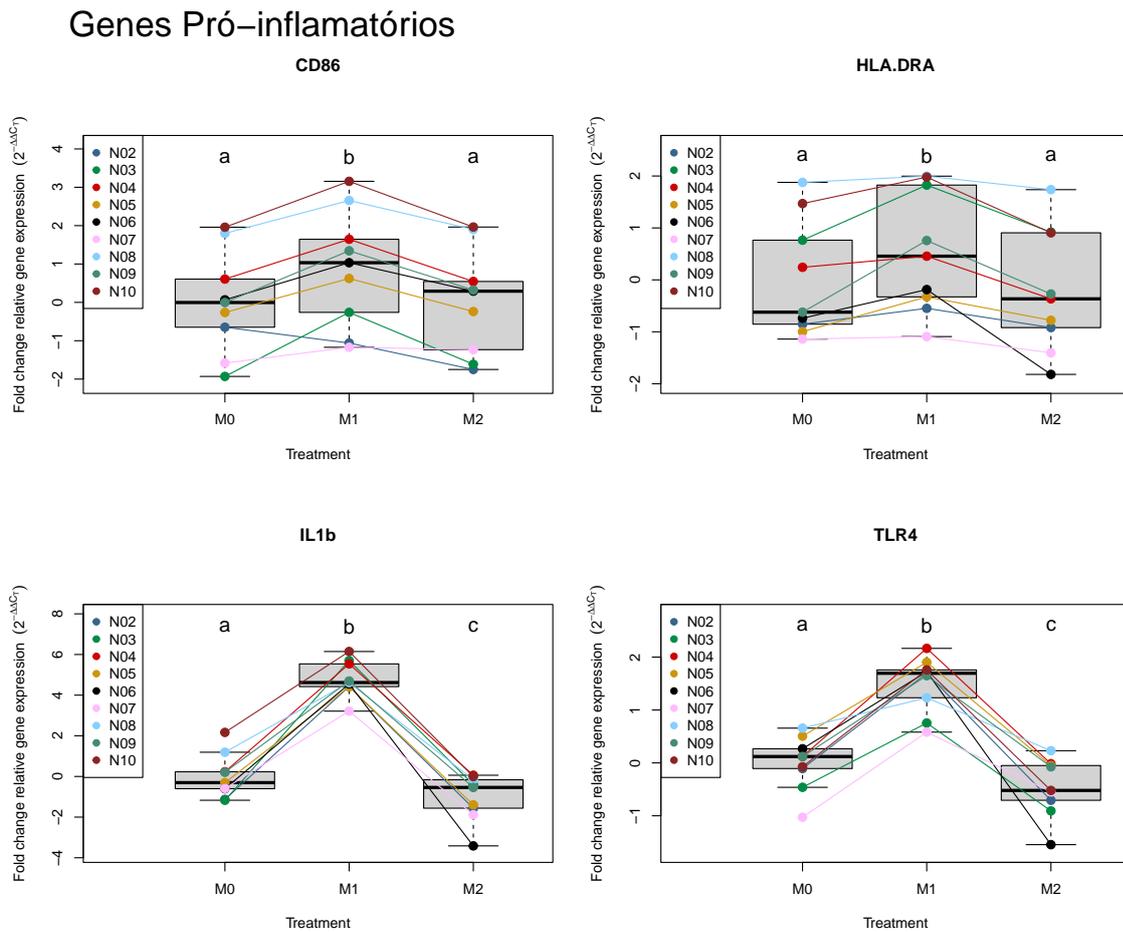
**Figura 1.8:** Os macrófagos classificados como M1 apresentam a maior expressão de *EREG* no tecido tumoral do BD *GSE127465* e no tecido normal adjacente do BD *GSE131907*. No tecido tumoral de *GSE131907* as células tumorais tS2 apresentam a maior expressão seguidas de Macrófagos M1 e tS1. Expressão de *EREG* em macrófagos M1, M2 e nas células epiteliais (Epit, tS1 e tS2) do (a) tecido tumoral do banco de dados *GSE127465* e dos tecidos (b) Tumoral (T) e Normal adjacente (N) de *GSE131907*, na escala TPM. Realizamos o teste de Wilcoxon comparando par-a-par a expressão gênica dos tipos celulares. Os *p*-valores foram ajustados por múltiplos testes pelo método False Discovery Rate (FDR). As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas par-a-par entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.

## 1.16 Expressão de *EREG* em macrófagos M1 de células mononucleares de sangue periférico

Após verificar em dados de *scRNAseq* que, de forma geral, os macrófagos M1 apresentaram uma alta expressão de *EREG*, queremos confirmar esse resultado *in vitro*. Anteriormente ao trabalho com *PBMC* realizamos testes de polarização de macrófagos com a linhagem monocítica THP1 (Apêndice A, Seção A.3.1). Os testes mostraram que a polarização de células monocíticas pode ocorrer pelo estímulo com *LPS* e *INF $\gamma$*  para o fenótipo M1 e com *IL13* e *IL4* para o fenótipo M2. Durante o teste, vimos também que os macrófagos M1 apresentam a maior expressão de *EREG* (Apêndice A, Figura A.5). Dessa forma, vamos verificar a replicabilidade desses resultados a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis.

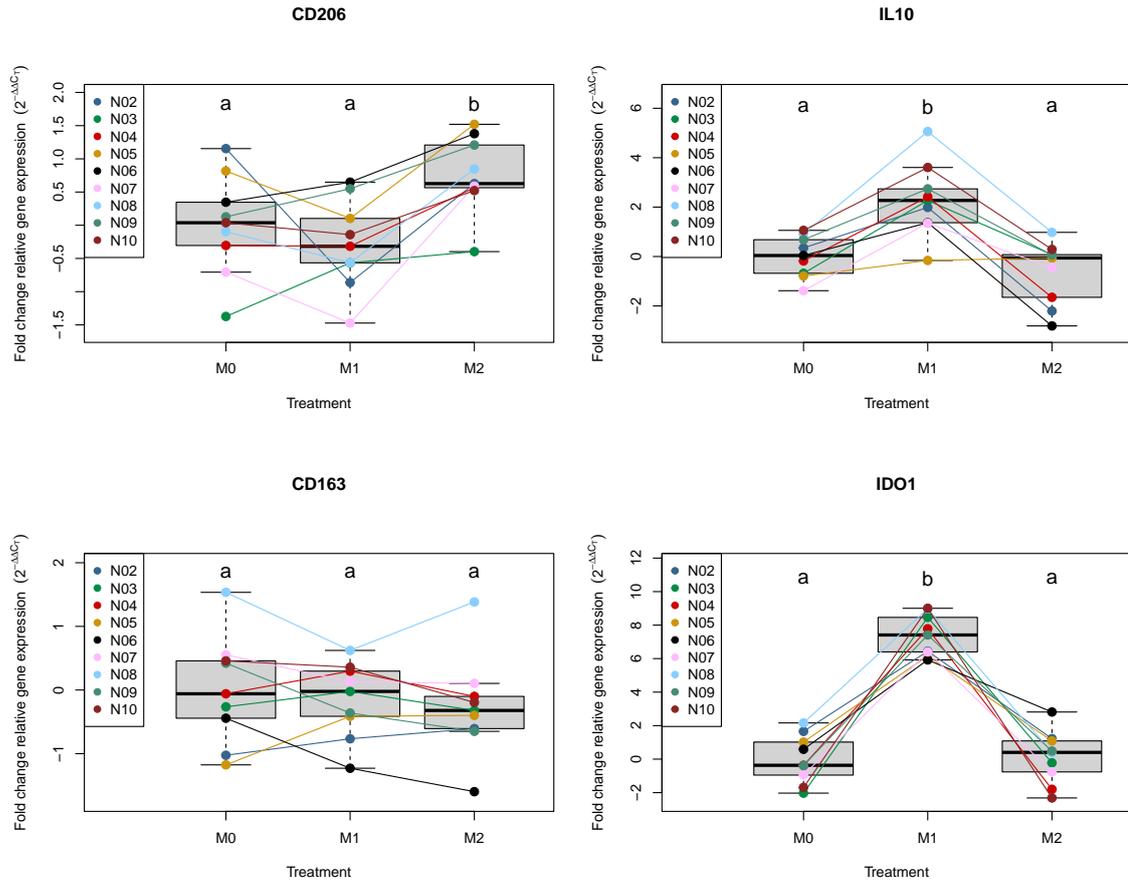
A partir do sangue periférico coletado de nove voluntários saudáveis, realizamos o isolamento dos monócitos. Diferenciamos os monócitos em macrófagos e posteriormente polarizamos os macrófagos em M0, M1 e M2. A fim de verificar a eficácia da polarização para macrófagos M1, analisamos a expressão de genes pró-inflamatórios (*CD86*, *HLA-DRA*, *IL1 $\beta$*  e *TLR4*). Conforme esperado, os marcadores pró-inflamatórios aparecem mais expressos nos macrófagos M1 que nos macrófagos M0 e M2 (Figura 1.9). Dessa forma, podemos afirmar que foi possível polarizar o macrófago para o fenótipo M1.

Para verificar a polarização para o fenótipo M2 usamos marcadores anti-inflamatórios, classicamente associados a esse fenótipo, como *CD163*, *CD206* (*MRC1*), *IL10* e *IDO1*. Como esperado, a expressão do gene *CD206* foi significativamente maior em M2 do que em M0 e M1 (Figura 1.9). Por outro lado, a expressão de *CD163* não apresentou diferenças entre os tratamentos e os genes *IL10* e *IDO1* tiveram expressão significativamente maior no macrófago M1. Os macrófagos polarizados para M2 ainda apresentaram uma expressão significativamente menor de genes pró-inflamatórios (*IL1 $\beta$*  e *TLR4*) do que M0 e M1 (Figura 1.9). De forma semelhante, podemos afirmar que foi possível polarizar o macrófago para o fenótipo M2.



**Figura 1.9:** Os genes marcadores pró-inflamatórios aparecem mais expressos nos macrófagos M1 que em M0 e M2, confirmando que a polarização *in vitro* obteve o fenótipo esperado. Expressão de genes pró-inflamatórios por macrófagos polarizados M0, M1 e M2. Expressão de genes marcadores de macrófagos M1 (*CD86*, *HLA-DRA*, *IL1β* e *TLR4*) por macrófagos derivados de Monócitos CD14 obtidos a partir de PBMC. As comparações par-a-par entre os fenótipos foram realizadas por teste-T pareado para voluntário. Realizamos uma correção por FDR nos *p*-valores dos testes par-a-par. Consideramos estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram *p*-valor corrigido  $< 0,05$ . As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.

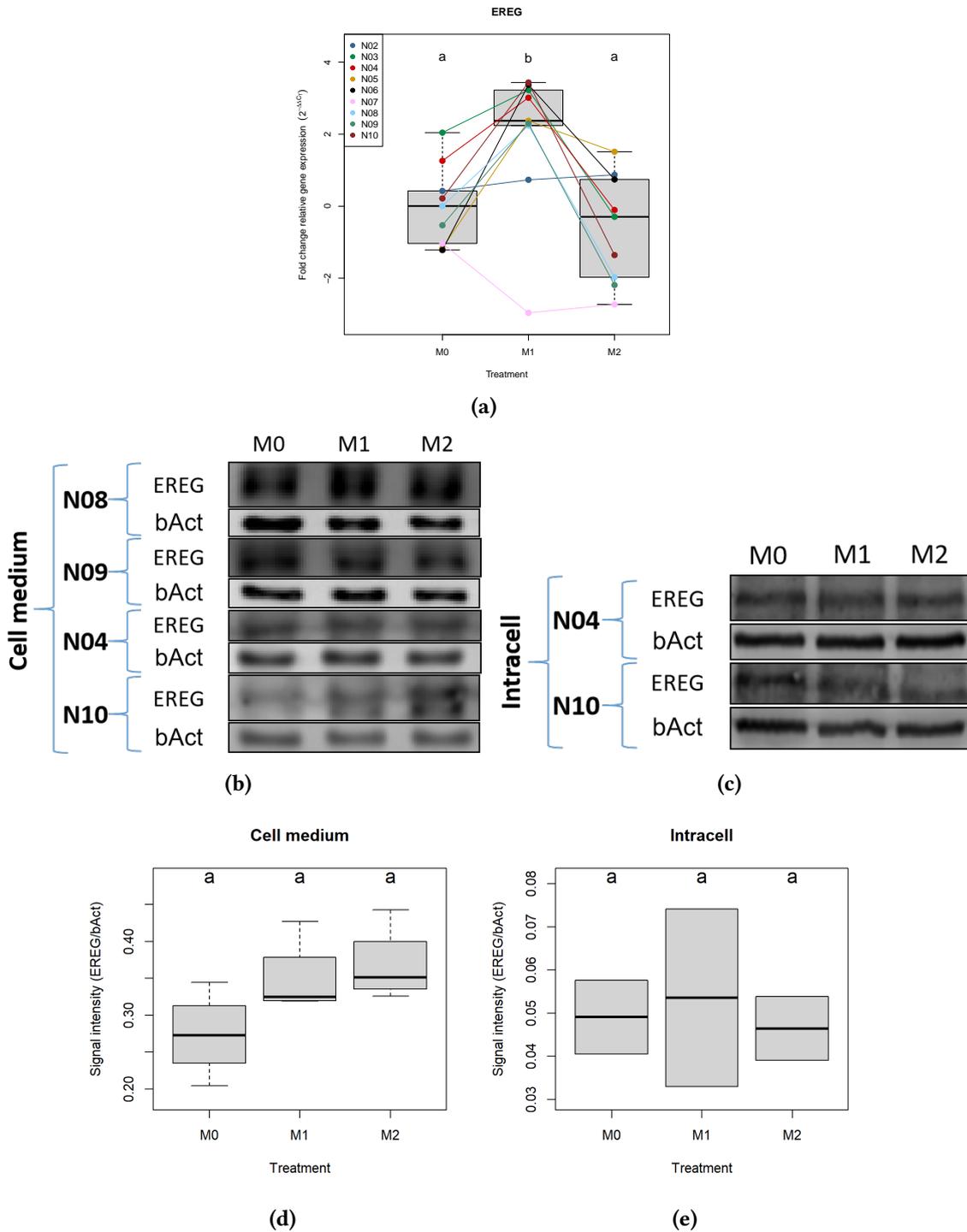
## Genes Anti-inflamatórios



**Figura 1.10:** O gene marcador anti-inflamatório CD206 aparece mais expresso nos macrófagos M2 que em M0 e M1, indicando que a polarização *in vitro* obteve o fenótipo esperado. Expressão de genes anti-inflamatórios por macrófagos polarizados M0, M1 e M2. Expressão de genes marcadores de macrófagos M2 (CD206, IL10, CD163 e IDO1 por macrófagos derivados de Monócitos CD14 obtidos a partir de PBMC. As comparações par-a-par entre os fenótipos foram realizadas por teste-T pareado para voluntário. Realizamos uma correção por FDR nos p-valores dos testes par-a-par. Consideramos estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram p-valor corrigido  $< 0,05$ . As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.

Considerando que os marcadores de macrófagos permitem diferenciar os macrófagos polarizados *in vitro*, verificamos que *EREG* é significativamente mais expresso por macrófagos M1 do que por M0 e M2 (Figura 1.11, painel A). Esse resultado corrobora os achados em dados *scRNAseq*.

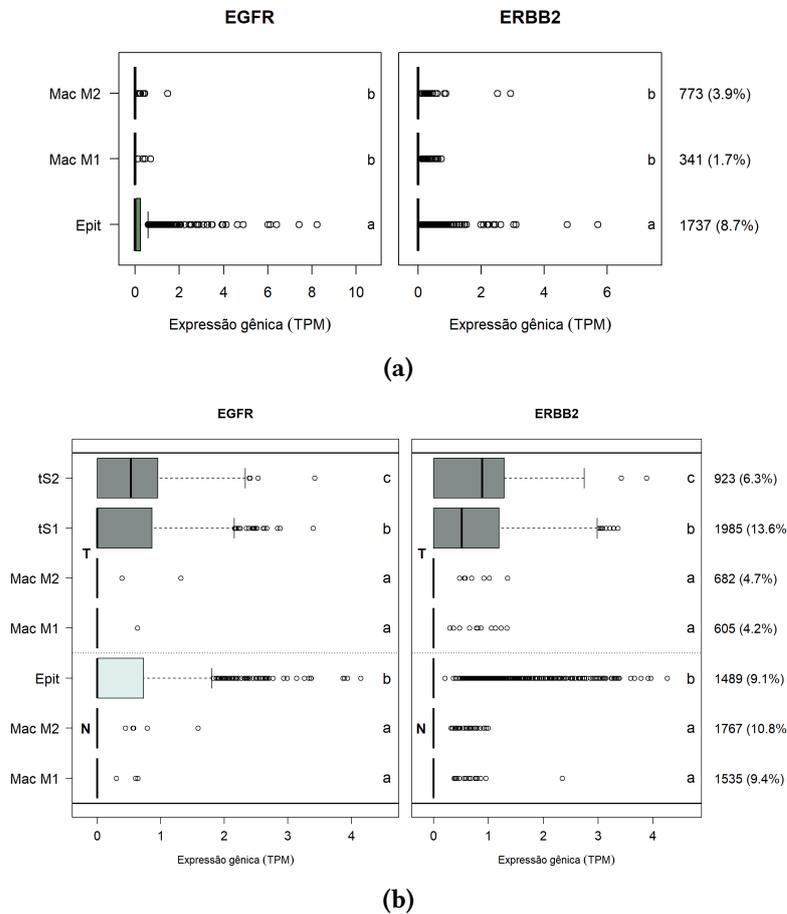
Além da expressão gênica, analisamos também a expressão da proteína epirregulina intracelular e no meio de cultura de macrófagos. Confirmamos a produção de epirregulina pelos macrófagos M0, M1 e M2. Diferente do observado na expressão gênica, não observamos uma diferença clara nas quantidades de epirregulina liberada no meio de cultura (Figura 1.11, painéis B e D) ou intracelular dos macrófagos (Figura 1.11, painéis C e E).



**Figura 1.11:** Os macrófagos polarizados *in vitro* para o fenótipo M1 expressam mais EREG que os fenótipos M0 e M2. Por outro lado, a detecção de proteína não apresentou diferença entre os fenótipos de macrófagos, tanto no meio de cultura quanto intracelular. Produção de EREG por macrófagos M0, M1 e M2. (a) Expressão gênica de EREG por macrófagos polarizados M0, M1 e M2. (b) Epirregulina detectada no meio de cultura de macrófagos derivados de Monócitos CD14 obtidos a partir de PBMC. (c) Detecção de epirregulina intracelular em macrófagos polarizados para M0, M1 e M2. (d) Análise de densidade óptica das bandas de (b) (n=4). (e) Análise de densidade óptica das bandas de (c) (n=2). Nos gráficos (a), (d) e (e), as comparações *par-a-par* entre os fenótipos foram realizadas por teste-T pareado para voluntário. Realizamos uma correção por FDR nos p-valores dos testes *par-a-par*. Consideramos estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram p-valor corrigido < 0,05. As letras (a e b) simbolizam as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.

## 1.17 Expressões dos receptores *EGFR* e *HER2* em dados de expressão de célula única

Utilizamos novamente os dados de expressão de célula única para avaliar quais tipos celulares expressam os genes receptores de epirregulina (*EGFR* e *ERBB2*). As células tumorais (nos tecidos tumorais) e epiteliais (no tecido normal adjacente) apresentaram a maior expressão de *EGFR* e *ERBB2*, tanto no banco de dados do *GSE127465* quanto no *GSE131907* (Figura 1.12). Além disso, as células *tS2* apresentam uma expressão significativamente maior tanto de *EGFR* quanto de *ERBB2* do que as células *tS1*. Para os genes *EGFR* e *ERBB2* os indivíduos apresentam padrão de expressão semelhante ao padrão geral (Apêndice A A.3).



**Figura 1.12:** As células tumorais e células epiteliais são os tipos celulares que mais expressam os receptores *EGFR* e *ERBB2*. As células tumorais mais desenvolvidas *tS2* apresentam um nível de expressão dos receptores *EGFR* e *ERBB2* maior que as células *tS1*. (a) Expressão de *EGFR* e *ERBB2* em macrófagos M1, M2 e nas células epiteliais do tecido Tumoral do banco de dados *GSE127465* (b) e do tecido Tumoral (T) e Normal adjacente (N) do banco de dados *GSE131907*. Realizamos o teste de Wilcoxon comparando par-a-par a expressão gênica dos tipos celulares. Os *p*-valores foram ajustados por múltiplos testes pelo método False Discovery Rate (FDR). As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas par-a-par entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.

## 1.18 Resultado de WB na via de H1299 com estímulo de EREG

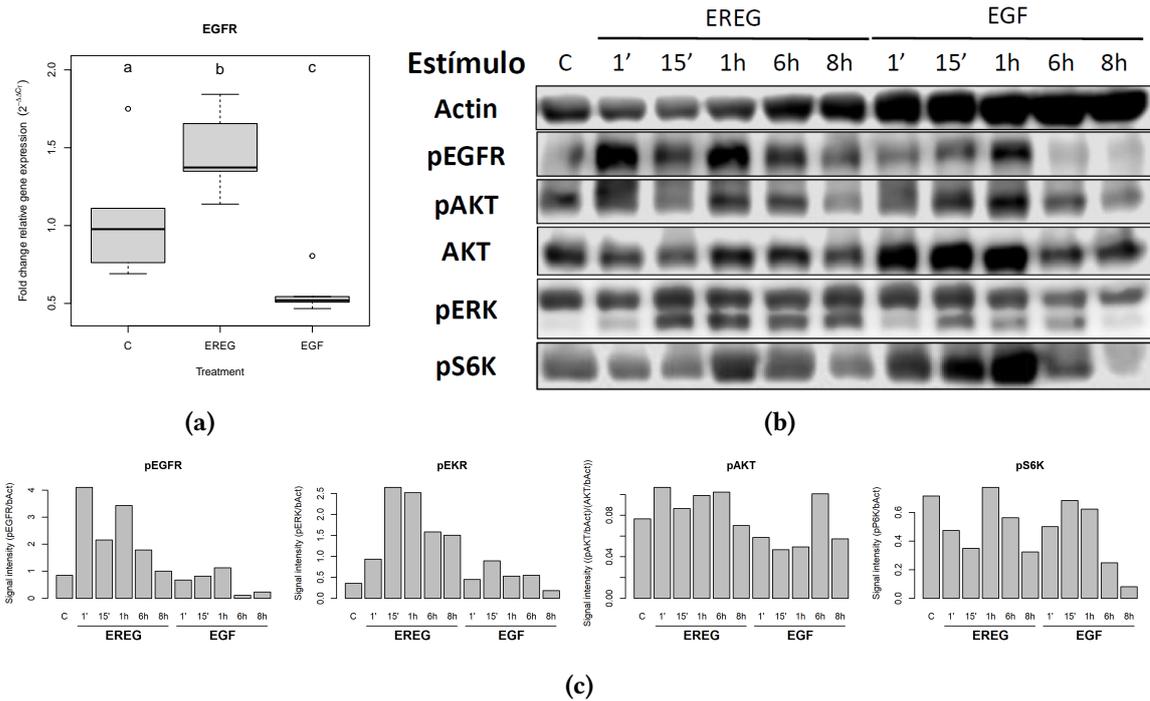
Para que possamos analisar os efeitos de EREG em linhagens de câncer de pulmão (H1299 e H1975), verificamos a expressão gênica basal de *EREG* nessas linhagens. A linhagem H1299 não apresentou expressão de epirregulina. Por outro lado, H1975 apresenta tanto expressão de epirregulina quanto mutação no gene *EGFR*. Dessa forma, a linhagem H1975 foi excluída das análises futuras. Seguimos apenas com a linhagem H1299.

### 1.18.1 Ativação da via EGFR pelos ligantes EREG e EGF

Inicialmente verificamos se os ligantes de EGFR (EREG e EGF) modulam a expressão gênica do receptor *EGFR*. Adicionamos epirregulina humana recombinante e EGF humana recombinante (ambos da *Peprtech*, Rocky Hill, NJ, USA) no meio de cultura da linhagem H1299 e realizamos a extração do RNA 6h após os estímulos. Observamos efeitos opostos com o estímulo de cada ligante. A epirregulina estimula o aumento da expressão de *EGFR* após 6 horas, já EGF leva a redução da expressão de *EGFR* (Figura 1.13a).

Considerando que os estímulos com os ligantes EREG e EGF tem efeitos na expressão de *EGFR*, queremos também analisar se esses estímulos modulam a ativação das vias de EGFR, AKT, ERK e mTOR por meio de fosforilações dessas proteínas. Após 1h de *starvation* (Meio de cultura *RPMI* sem soro fetal bovino), a linhagem H1299 foi estimulada por um e 15 minutos e por uma, seis e oito horas com EREG e EGF separadamente. Verificamos, por meio de *western blot*, a fosforilação das proteínas EGFR, AKT, ERK e S6K, em cada um dos tempos.

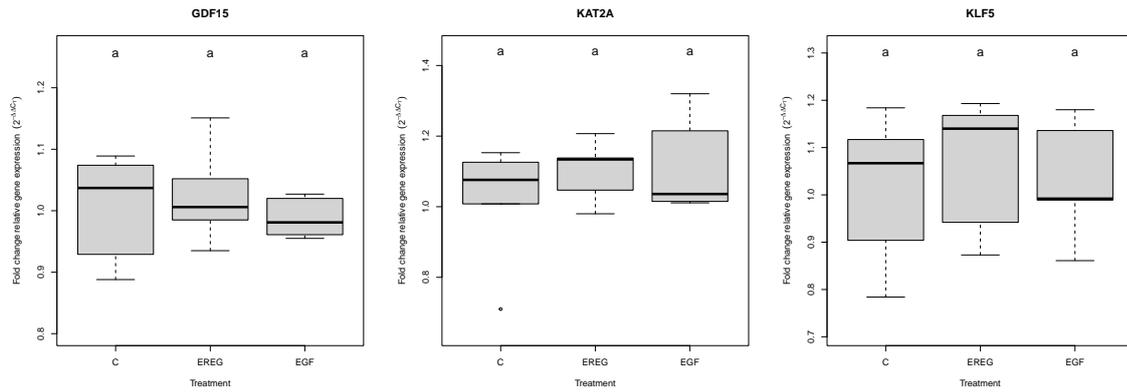
Vimos que EGFR e a via de AKT e ERK são ativados tanto pelo ligante EGF (ligante mais comum) quanto por EREG (Figuras 1.13b e 1.13c). Ocorre uma fosforilação mais intensa e duradoura de EGFR com o estímulo de EREG do que com EGF. Com estímulo de EREG, EGFR se mantém fosforilado de um minuto até uma hora, decaindo as seis e oito horas após o estímulo. Com EGF o estímulo de EGFR se inicia em um minuto, aumentando de intensidade até uma hora e com forte queda em seis e oito horas. Com estímulo de EREG, AKT apresentou uma fosforilação com pouca variação ao longo do tempo mas com uma ausência de fosforilação em 8h. Já o estímulo com EGF levou a uma subida na intensidade de fosforilação de AKT até uma hora com posterior decréscimo. A fosforilação de ERK aumentou após 15 minutos de estímulo com EREG e se manteve até oito horas após o estímulo. Já com o estímulo de EGF a fosforilação de ERK teve um pico aos 15 minutos, porém menor do que com a fosforilação por EREG. Após 15min, a fosforilação de ERK apresentou decréscimo. Por fim, com estímulo de EREG, S6K aparece fosforilado após uma hora. Já com EGF, a intensidade da fosforilação sobe até uma hora e depois passa a cair. É interessante destacar que S6K aparece fosforilado já no tratamento controle.



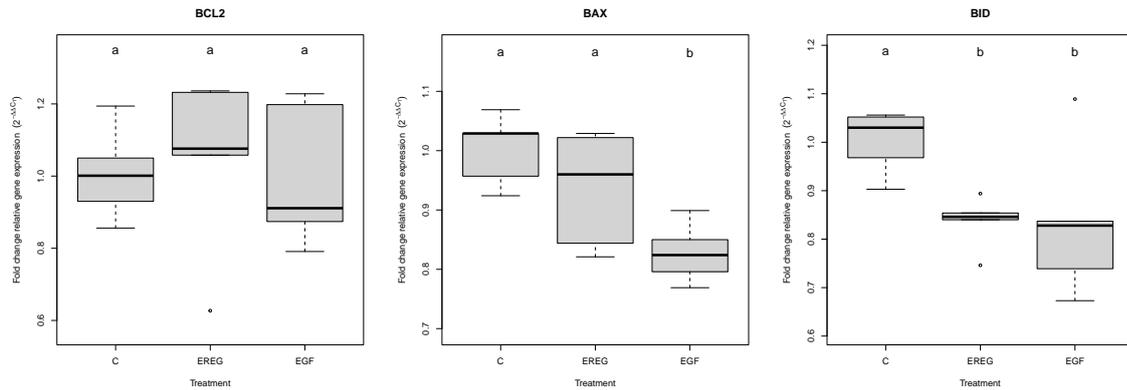
**Figura 1.13:** O estímulo com o ligante EREG aumenta a expressão de EGFR. Tanto EREG quanto EGF estimulam a fosforilação do receptor EGFR. Porém o estímulo com EREG fosforila EGFR e ERK por um tempo mais longo que o outro ligante EGF. (a) Expressão gênica de EGFR pela linhagem H1299 após seis horas de estímulo com EGF ou EREG. As comparações par-a-par entre os fenótipos foram realizadas por teste-T. Realizamos uma correção por FDR nos p-valores dos testes par-a-par. Consideramos estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram p-valor corrigido < 0,05. As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si (n=3). (b) Western Blot de H1299 após estímulo de 1 e 15 minutos e uma, seis e oito horas com EREG ou EGF. Verificamos a fosforilação de EGFR, ERK, AKT e S6K e usamos  $\beta$ Actina como controle positivo. (c) Análise de densidade óptica das bandas de b (n=1).

### 1.18.2 Modulação da expressão de conjuntos de genes chave após os estímulos com EREG e EGF

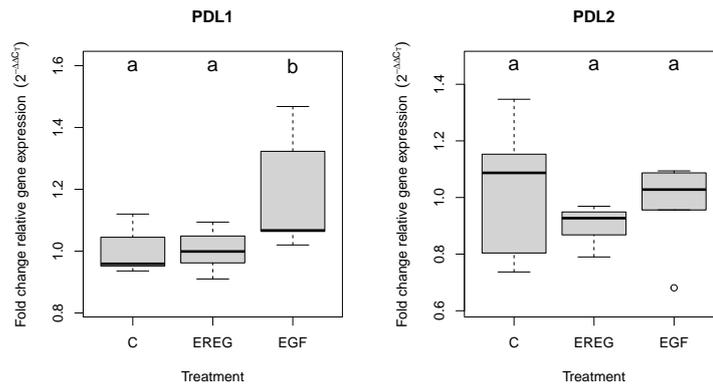
Além da modulação da expressão de *EGFR* com o estímulo de EREG e EGF, verificamos também a expressão de genes relacionados à proliferação e ciclo celular. Nenhum dos três genes analisados, *GDF15*, *KAT2A* e *KLF5* apresentaram modulação após seis horas de estímulo (Figura 1.14). Outro conjunto de genes analisado foi dos relacionados à apoptose. O gene *BCL2* é um gene anti-apoptótico e os genes *BID* e *BAX* apresentam papéis pró-apoptóticos. Não houve modulação no gene *BCL2*. O estímulo de EGF resultou ainda na queda da expressão dos genes pró-apoptóticos *BAX* e *BID*. O gene *BID* também é negativamente regulado com o estímulo de EREG. Isso indica que ambos os estímulos podem estar associados a uma queda na apoptose da linhagem H1299 (Figura 1.15). O terceiro grupo de genes analisados são os checkpoints *PDL1* e *PDL2*. A expressão do gene *PDL1* aumentou apenas após o estímulo com EGF. Não houve mudança na expressão de *PDL2* com os estímulos (Figura 1.16).



**Figura 1.14:** O estímulo com os ligantes EREG e EGF não modulam a expressão de genes relacionados a proliferação. Expressão de genes relacionados à proliferação GDF15, KAT2A e KLF5 pela linhagem H1299 após seis horas de estímulo com EGF ou EREG. As comparações par-a-par entre os fenótipos foram realizadas por teste-T. Realizamos uma correção por FDR nos p-valores dos testes par-a-par. Consideramos estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram p-valor corrigido  $< 0,05$ . As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si ( $n=3$ ).



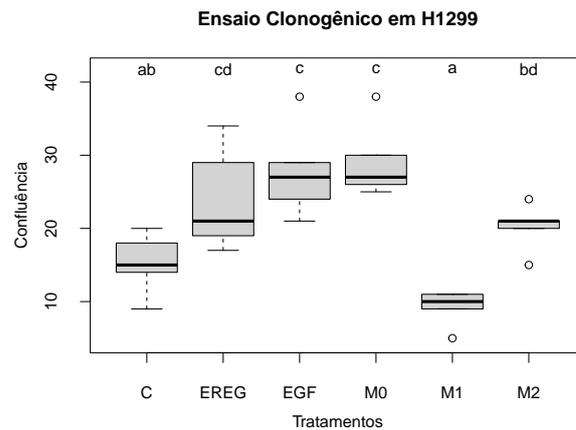
**Figura 1.15:** O estímulo com os ligantes EREG e EGF modulam negativamente a expressão do gene pró-apoptótico BID. Expressão de genes relacionados à apoptose BCL2, BAX e BID pela linhagem H1299 após seis horas de estímulo com EGF ou EREG. As comparações par-a-par entre os fenótipos foram realizadas por teste-T. Realizamos uma correção por FDR nos p-valores dos testes par-a-par. Consideramos estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram p-valor corrigido  $< 0,05$ . As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si ( $n=3$ ).



**Figura 1.16:** O estímulo com o ligante EGF aumenta a expressão do gene check-point PDL1. Expressão de genes checkpoints PDL1 e PDL2 pela linhagem H1299 após seis horas de estímulo com EGF ou EREG. As comparações par-a-par entre os fenótipos foram realizadas por teste-T. Realizamos uma correção por FDR nos p-valores dos testes par-a-par. Consideramos estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram p-valor corrigido  $< 0,05$ . As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si ( $n=3$ ).

### 1.18.3 Efeito na proliferação celular

Verificamos o efeito na proliferação da linhagem H1299 em resposta ao estímulo com ligantes EREG e EGF e com os sobrenadantes dos macrófagos polarizados para M0, M1 e M2. Os estímulos com os recombinantes (EREG e EGF) apresentaram aumento estatisticamente significativo com relação ao controle (Figura 1.17). O estímulo com sobrenadante de M0 apresentou proliferação maior que o controle. O sobrenadante de macrófagos M1 resultou em menor proliferação com relação ao estímulo com sobrenadante de M0 e com o recombinante EREG. Já o estímulo com M2 apresentou proliferação aumentada em relação a M1 e diminuída com relação a M0.

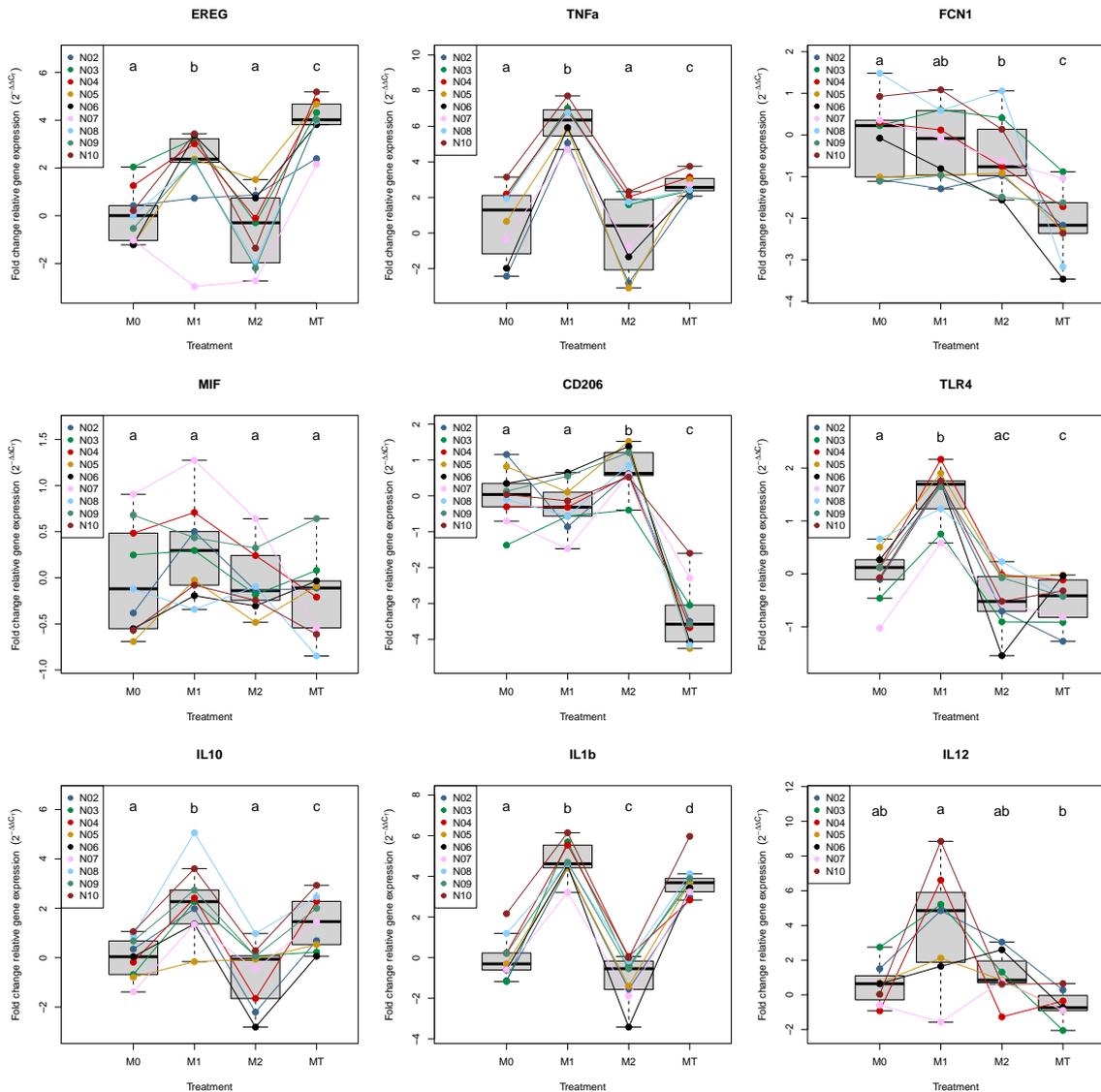


**Figura 1.17:** O estímulo da linhagem H1299 com o meio de cultura do macrófago M1 reduz a proliferação da linhagem, apesar da alta expressão de EREG. Ensaio de proliferação de H1299 após estímulos com EGF (30ng/ml), EREG (100ng/ml) e com os sobrenadantes de macrófagos M0, M1 e M2. A confluência é a proporção da área do poço ocupada por células após 9 dias, indicando a proliferação das células com determinado estímulo. As comparações par-a-par entre os fenótipos foram realizadas por teste-T. Realizamos uma correção por FDR nos p-valores dos testes par-a-par. Consideramos estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram p-valor corrigido < 0,05. As letras (a, b, c e d) simbolizam as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Caso os tratamentos não apresentem nenhuma letra em comum, significa que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.

## 1.19 Análises com macrófago tolerizado

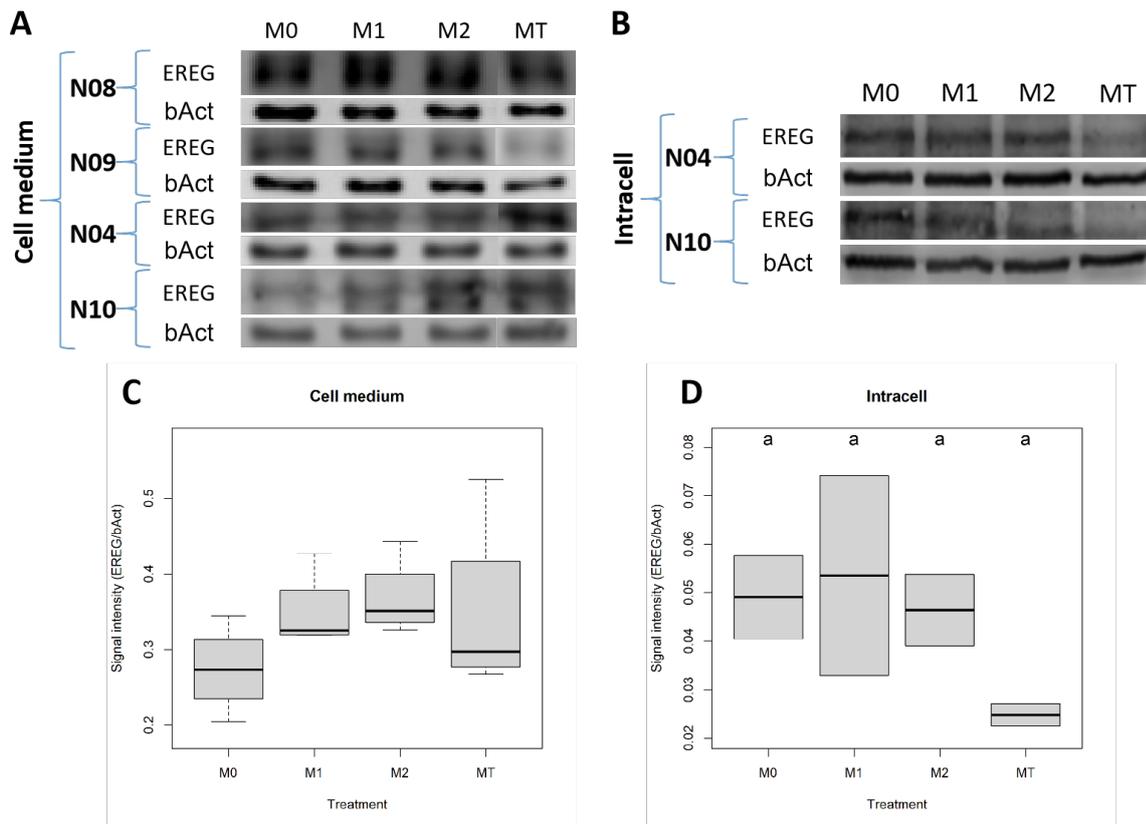
Associado ao experimento de polarização de macrófagos para os fenótipos M0, M1 e M2 realizamos a produção de um fenótipo de macrófago caracterizado como “tolerizado” (MT). Em ambientes não tumorais, a tolerização é um processo que ocorre para evitar que danos graves sejam causados ao tecido por um longo processo inflamatório. A exposição persistente a antígenos leva o macrófago ao processo de desativação que, de forma geral, é benéfico ao desenvolvimento do tumor. O estudo desse fenótipo de macrófago é parte do projeto da mestranda Bruna Sanromão com quem colaboramos no desenvolvimento dos experimentos *in vitro* dessa tese de doutorado. A produção *in vitro* desse fenótipo ocorre após intenso estímulo pró-inflamatório com duas doses de LPS (50ng/ml) de 24 horas, espaçadas de 24 horas entre os estímulos.

Avaliamos o perfil de expressão de MT em comparação aos fenótipos M0, M1 e M2. O MT apresentou menor expressão de *CD206* e *FCN1* (Figura 1.18). Além disso, observamos expressão significativamente menor que M1 e maior que M2 de *IL10*, *TNF $\alpha$*  e *IL1 $\beta$* . A diferença do Macrófago MT para o fenótipo M1 pode ainda ser reforçada por uma expressão significativamente menor de *IL12* e *TLR4*. Podemos afirmar que o perfil de expressão de MT é diferente dos demais fenótipos, principalmente de M1, já que ambos receberam estímulos pró-inflamatórios com LPS. Considerando essa diferença, é importante destacar que o MT apresentou expressão de *EREG* significativamente maior do que o fenótipo M1.



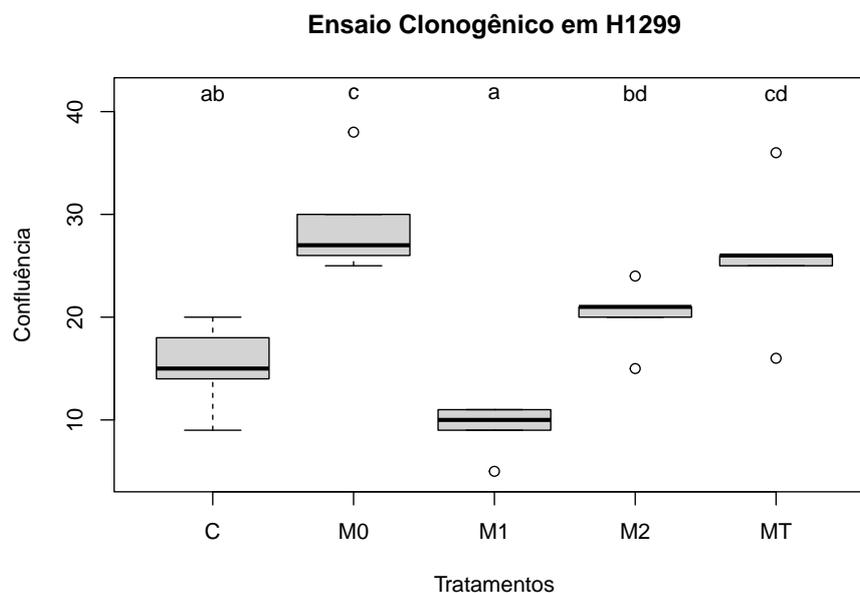
**Figura 1.18:** O fenótipo de macrófagos tolerizados apresenta um padrão de expressão diferente dos demais fenótipos. Esse fenótipo tolerizado apresenta uma expressão de EREG significativamente maior que o fenótipo M1. Expressão de genes por macrófagos polarizados M0, M1, M2 e MT. Expressão dos genes CD206, IL10, IL12, EREG, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , FCN1, MIF e TLR4 por macrófagos derivados de Monócitos CD14 obtidos a partir de PBMC. As comparações par-a-par entre os fenótipos foram realizadas por teste-T pareado para voluntário. Realizamos uma correção por FDR nos p-valores dos testes par-a-par. Consideramos estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram p-valor corrigido < 0,05. As letras (a, b, c e d) simbolizam as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Caso os tratamentos não apresentem nenhuma letra em comum, significa que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.

Apesar da maior expressão gênica de EREG, o fenótipo MT não apresentou uma concentração significativamente maior da proteína EREG que os demais fenótipos de macrófagos. Além disso, concentração de EREG intracelular parece ser menor em MT que nos demais tipos celulares (Figura 1.19).



**Figura 1.19:** Apesar do macrófago tolerizado apresentar uma expressão maior de EREG, não identificamos uma produção maior da proteína EREG nem no meio de cultura, nem intracelular. Produção de EREG por macrófagos M0, M1, M2 e MT. (A) Epirregulina detectada no meio de cultura de macrófagos derivados de Monócitos CD14 obtidos a partir de PBMC. (B) Detecção de epirregulina intracelular em macrófagos polarizados para M0, M1, M2 e MT. (C) Análise de densidade óptica das bandas de A ( $n=4$ ). (D) Análise de densidade óptica das bandas de B ( $n=2$ ). Para as análises de densidade óptica C e D, as comparações par-a-par entre os fenótipos foram realizadas por teste-T pareado para voluntário. Realizamos uma correção por FDR nos  $p$ -valores dos testes par-a-par. Consideramos estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram  $p$ -valor corrigido  $< 0,05$ . As letras (a e b) simbolizam as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Caso os tratamentos não apresentem nenhuma letra em comum, significa que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.

A análise do efeito funcional do meio de cultura do fenótipo MT em linhagem tumoral apresentou uma proliferação maior de H1299. Apesar do meio de cultura do fenótipo de macrófago conter epirregulina, não observamos o efeito esperado de aumento da proliferação da linhagem H1299. Diferente de M1 que produz diversas citocinas citotóxicas, o macrófagos MT parece ter uma expressão maior de EREG e de outros fatores de crescimento e anti-inflamatórios que levaram a linhagem tumoral a se proliferar mais (Figura 1.20).



**Figura 1.20:** A proliferação da linhagem H1299 é maior com o estímulo do meio de cultura de macrófagos tolerizados do que com o macrófago M1. Ensaio de proliferação de H1299 após estímulos com EGF (30ng/ml), EREG (100ng/ml) e com os sobrenadantes de macrófagos M0, M1, M2 e MT. A confluência é a proporção da área do poço ocupada por células após 9 dias, indicando a proliferação das células com determinado estímulo. As comparações par-a-par entre os fenótipos foram realizadas por teste-T. Realizamos uma correção por FDR nos p-valores dos testes par-a-par. Consideramos estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram p-valor corrigido  $< 0,05$ . As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos. Caso os tratamentos não apresentem nenhuma letra em comum, significa que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si ( $n=5$ ).

## Discussão

Os experimentos realizados com o banco de dados *TCGA* nos indicam que *EREG* é o único ligante da família *ERBB* que tem a expressão negativamente relacionada com a sobrevida dos 544 pacientes em estadio inicial de CPCNP (Tabela 1.5). Nos trabalhos publicados até o momento, a relação de *EREG* com a sobrevida de pacientes com CPCNP já é descrita, sendo relacionada a mutações condutoras e a resistência a *TKI* (CHENG *et al.*, 2021). A coocorrência de uma maior expressão de *EREG* e a mutação de *EGFR* ou *KRAS* está relacionada a um pior prognóstico de pacientes com CPCNP (N. SUNAGA *et al.*, 2013; Noriaki SUNAGA e KAIRA, 2015). Por outro lado, diferente dos demais trabalhos, relacionamos o nível de expressão de *EREG* com a sobrevida em uma grande quantidade de pacientes (1064 pacientes) sem a necessidade de categorizar a variável expressão (Tabela 1.6). A partir da relação da expressão de *EREG* com a sobrevida dos pacientes no banco de dados do *TCGA*, pudemos prever a sobrevida de pacientes de quatro bancos de dados independentes e com tipos de dados diferentes como *RNAseq* e *microarray* (Figura 1.4). Nossos resultados mostram que a expressão de epirregulina pelo tecido tumoral se mantém relacionada com a sobrevida de pacientes CPCNP sem a ocorrência de mutações condutoras, inclusive em *EGFR* (Figura 1.3). Isso significa que independente da presença de uma mutação que agrave o desenvolvimento tumoral, a maior expressão de *EREG* está relacionada à menor sobrevida dos pacientes. Esses resultados indicam a possibilidade do uso de *EREG* como marcador do prognóstico de pacientes com CPCNP já em estadios iniciais da doença.

Os dados de *scRNAseq* nos mostraram que tanto no tecido tumoral quanto no normal adjacente, as células identificadas como macrófagos apresentaram a maior expressão média de *EREG* (Seção 1.14). Assim como observamos em nossos resultados, a literatura indica que *EREG* é produzido por macrófagos infiltrados em tumores de CPCNP (KIM *et al.*, 2020; S. MA *et al.*, 2021), sendo também produzido por monócitos em sangue periférico (TOYODA *et al.*, 1997). Mesmo tendo observado indícios de que os macrófagos expressam *EREG*, S. MA *et al.*, 2021 não investigaram qual o fenótipo de macrófago é responsável pela sua expressão.

A partir da classificação dos macrófagos em dois fenótipos, pró-inflamatório (M1 - HLA-DRA+, CD86+ e IL1 $\beta$ +) e anti-inflamatório (M2 - CD206+, CD163+ e IL1 $\beta$ -), observamos que os macrófagos M1 apresentam a maior expressão de *EREG* (Seção 1.15). Obtivemos um resultado semelhante *in vitro*, corroborando as análises *in silico*, o fenótipo M1 apresentou a maior expressão de *EREG* (Figura 1.11). Nesse sentido, MASSIP-COPIZ *et al.*, 2018 relataram que a expressão *EREG* poderia ser induzida pela via pró-inflamatória IL-1 $\beta$ /NF $\kappa$ B. Até a publicação deste trabalho, não havia registro na literatura sobre qual fenótipo de macrófago seria o responsável pela expressão de *EREG* em tumores de pulmão. Dado o

papel pró-tumoral de EREG, esse resultado parece contraditório, já que os macrófagos M1 são associados a processos pró-inflamatórios, ou seja antitumorais (KEELEY *et al.*, 2019). Considerando que a definição de macrófagos M1 e M2 ocorreu segundo seus papéis em reparo de feridas, alguns autores defenderam que os macrófagos associados ao tumor (TAMs - *Tumor Associated Macrophages*) sejam apenas macrófagos M2, podendo ser classificados em subgrupos (KEELEY *et al.*, 2019). Além disso, vemos que a célula tumoral usa como estímulo ao seu desenvolvimento uma proteína que, a princípio, teria o papel de estimular a recuperação de um tecido saudável. Diversos trabalho defendem a existência de um espectro de fenótipos dos macrófagos (LI *et al.*, 2016; R. Y. MA *et al.*, 2022). Esse contexto reforça a ideia de que não ocorre uma polarização clara dos macrófagos em apenas dois fenótipos distintos (M1 e M2), tornando complexa a identificação de seus papéis como pró ou anti tumorais.

Considerando que células epiteliais, tanto normais adjacentes como tumorais, expressam mais os receptores *EGFR* e *ERBB2*, temos indícios de uma comunicação Ligante-Receptor (EREG-EGFR) entre os macrófagos e as células epiteliais. KIM *et al.*, 2020 estimaram essa possível comunicação EREG (Monócito e macrófagos)-EGFR (células tumorais) usando uma ferramenta de predição de interação intercelular. Como observado pela literatura, o estímulo com EREG leva à ativação mais prolongada de EGFR do que EGF. O tempo de ativação chegou a oito horas, maior do que o observado em outros trabalhos (FREED *et al.*, 2017; IJIMA *et al.*, 2017). Diferente do observado na literatura, (FREED *et al.*, 2017), vimos que a ativação de *AKT* estava ocorrendo mesmo antes do estímulo. S. MA *et al.*, 2021 associa a fosforilação de *AKT* como uma via de escape ao tratamento com *TKI-EGFR*. Em linhagens de CPCNP que apresentam a expressão intrínseca de *EREG*, o tratamento com *TKI-EGFR* inibe a ativação de *AKT* e a produção de EREG pela célula tumoral (S. MA *et al.*, 2021). Nesse caso, a resistência ao tratamento ocorreria a partir do estímulo com EREG proveniente de uma via parácrina. Com o estímulo de EREG a ativação de ERK segue padrão semelhante a ativação de EGFR, com valores máximos em até uma hora, sendo mantida até oito horas (Figura 1.13). A ativação prolongada de ERK por EREG, está associada à diferenciação celular (FREED *et al.*, 2017). Diferente de outro ligantes de EGFR, a ativação prolongada da via EGFR-ERK pelo estímulo com EREG é semelhante a observada com a mutações de EGFR (LIU *et al.*, 2020). LIU *et al.*, 2020 afirmam ainda que a alta expressão de *EREG* pode ser um bom marcador para o tratamento com *TKI-EGFR*. Porém, os autores não consideram que o EREG pode ser liberado por outros tipos celulares presentes no microambiente tumoral, levando a uma resistência no tratamento com *EGFR-TKI* (To *et al.*, 2021). Assim, tanto a inibição do receptor ERBB quanto a não ativação por EREG parácrino devem ser considerado para suprimir a sinalização via ERK, inibindo o estímulo à diferenciação celular e sensibilizando o tumor ao tratamento com *TKI-EGFR* (ZHANG *et al.*, 2022).

A ativação de EGFR é responsável por regular diversos processos carcinogênicos como proliferação celular, invasão, metástase, angiogênese e resistência a apoptose, sendo encontrada ativa em diversos tumores (Noriaki SUNAGA e KAIRA, 2015; CHENG *et al.*, 2021). Em nossos resultados, apenas com o estímulo de EGF, observamos maior expressão de *PDL1*, não tendo efeito com o estímulo de EREG. O EGF pode ser ainda associado à imunossupressão, onde o estímulo da via EGFR nas células tumorais leva a produção de *PD-L1* inibindo o reconhecimento de linfócitos T citotóxicos (CONCHA-BENAVENTE e FERRIS,

2017; *AKBAY et al., 2013*). Tanto EGF quanto EREG estimularam a redução da expressão de *BID*, um gene pró-apoptótico. Isso indica que a ativação da via EGFR em H1299 pode estar relacionada à redução da apoptose e possivelmente à resistência a quimioterapia (*ZHANG et al., 2022*).

Em acordo com o papel de ativação da via EGFR por EGF e EREG de estímulo ao crescimento tumoral (*CHENG et al., 2021*) observamos um aumento na proliferação da linhagem de câncer de pulmão. Ainda conforme a literatura, a linhagem H1299 apresentou uma menor proliferação com o meio de cultura de macrófagos M1, provavelmente, devido ao seu conhecido papel anti-tumoral (*KEELEY et al., 2019*). Por fim, considerando o papel pró tumoral de macrófagos M2 (*KEELEY et al., 2019*), esperávamos observar um aumento na proliferação da linhagem tumoral, o que não foi confirmado estatisticamente. Em suma, a proliferação de H1299 com os estímulos de EREG, EGF e meio de cultura de macrófagos M0, M1 e M2 estão dentro do esperado pela literatura. É importante ressaltar que apesar do macrófago M1 ser o fenótipo que apresenta a maior expressão de *EREG*, essa expressão não parece ser suficiente para estimular a proliferação da linhagem tumoral.

Tendo em vista que os *TAMs* adquirem um espectro de fenótipos dependentes do contexto em que estão inseridos, *R. Y. MA et al., 2022* mostram que uma diversidade de macrófagos pode ser observada nas análises de *scRNAseq*. O fenótipo *INF-TAMs*, mesmo expressando marcadores de macrófago M1 como *CD86* e *MHCII*, apresentam papel imunorregulador e pró-tumoral. Já o fenótipo *Angio-TAMs* apresenta alta expressão de proteínas angiogênicas e também alta expressão de *EREG*. Os macrófagos observados tanto nos dados de *scRNAseq* ou os analisados *in vitro* poderiam ser classificados em algum desses perfis. O perfil de macrófagos angiogênicos estaria mais associado ao macrófago tolerizado produzido *in vitro*. A maior expressão de *EREG* pelos macrófagos tolerizados nos indica que esse fenótipo pode explicar melhor a contradição entre a alta expressão de *EREG* e citocinas pró-inflamatórias como *IL1β*. A maior proliferação da linhagem H1299 em meio de cultura de MT vai ao encontro de sua maior expressão de *EREG*. Sabe-se que a inflamação é uma das *Hallmarks* do câncer (*HANAHAN, 2022*), a presença de macrófagos M1 classicamente ativados é pouco esperada. É mais provável que *TME* leve à tolerização do macrófago de forma semelhante ao processo *in vitro*. No *TME*, o macrófago tolerizado teria um papel de regulação inflamatória e de estímulo ao desenvolvimento do tumor. Considerando a expressão de *EREG* por MT, podemos esperar que esse seja o fenótipo de macrófago responsável pela resistência induzida ao tratamento com *TKI-EGFR* em câncer de pulmão. Como dito anteriormente, o tratamento com *TKI-EGFR* inibiria a resistência da célula tumoral pela via autócrina, já que a produção de *EREG* seria interrompida. Por outro lado, a produção de *EREG* pelo macrófago tolerizado continuaria estimulando o desenvolvimento e diferenciação tumorais pela via parácrina.

Outros trabalhos encontram origens diferentes de *EREG* no *TME*, porém estão especializados em outros tipos de tumor (*ZHANG et al., 2022*). Fica evidente a grande diversidade de estratégias e tipos de tumores em que *EREG* tem se mostrado relevante (*CHENG et al., 2021*). Conseguimos classificar a sobrevivência de novos pacientes em diferentes bancos de dados. Apesar disso, seria importante desenvolver um modelo prognóstico baseado na expressão de epirregulina que fosse individualizado para o paciente. O uso da expressão de epirregulina como marcador prognóstico ou de tratamento vem sendo explorado em diversos trabalhos, (*S. MA et al., 2021; CHENG et al., 2021*) mas ainda carece de aperfeiçoamento

para a aplicação clínica.

Na literatura encontramos estratégias terapêuticas para evitar a resistência ao tratamento com TKI-EGFR pelo esgotamento do TAMs ou pela redução do recrutamento do TAMs. Nesses casos, a diminuição de TAMs por lurbinectina, um inibidor de transcrição ativado, teve uma eficácia promissora em estudos pré-clínicos (CHENG *et al.*, 2021). Por outro, para evitar a depleção dos macrófagos do tecido tumoral, já que estes também podem apresentar papel antitumoral, é importante compreender melhor a via de ativação que estimula a expressão de eptirregulina. Em nossos resultados, observamos uma baixa expressão de *EGFR* em macrófagos, desconsiderando, assim, o estímulo de expressão de *EREG* por essa via. A literatura indica que essa regulação ocorra pela via  $IL-1\beta/NF\kappa B$  (MASSIP-COPIZ *et al.*, 2018). Dessa forma, consideramos relevante o estudo de tratamentos com TKI-EGFR combinados a inibidores da expressão de *EREG* em macrófagos pela via  $IL1\beta$ . Além disso, novos projetos são necessários para colocar os macrófagos polarizados em contato com linhagens de CPCNP, verificando o efeito desses macrófagos em diferenciação e metástase das linhagens de CPCNP. Por fim, sugerimos a realização de testes sobre os efeitos da interação MT com linhagens CPCNP na resistência ao tratamento com TKI-EGFR.

## Conclusão

O presente trabalho aprofundou o conhecimento sobre o microambiente tumoral de CPCNP. Corroboramos a relação de *EREG* com a sobrevida de pacientes CPCNP de estadio inicial. Podemos, assim, considerar a expressão de *EREG* como um importante marcador prognóstico. Entretanto, sua aplicação clínica que ainda carece de estudos mais aprofundados. Tanto no ambiente tumoral quanto no normal adjacente, os macrófagos com perfil de expressão pró-inflamatório apresentam alta expressão de *EREG*. Apesar do perfil pró-inflamatório, esses macrófagos também parecem desempenhar um papel pró-tumoral. Essa contradição ocorre em um microambiente inflamado que leva os macrófagos a apresentarem um fenótipo de exaustão (macrófagos tolerizados). Os macrófagos tolerizados apresentam alta expressão de epirregulina, e vêm sendo associados à resistência às terapias *TKI-EGFR*, mantendo o estímulo de EGFR pela via parácrina. Nossos resultados sugerem caminhos para o desenvolvimento de estratégias que foquem na expressão de epirregulina por macrófagos tolerizados afim de reduzir a resistência às terapias *TKI-EGFR*.



# Demais atividades realizadas no doutorado

Premiação na nona edição do *Latin America Research Awards*. **Link para reportagem da revista Agência FAPESP**. **Link para o blog da Google**. Projeto: Aplicação baseada no estudo randômico de metástases cerebrais em pacientes com câncer de pulmão para a predição de biomarcadores, e a melhora de fatores prognósticos.

## 1.20 Publicações e colaborações realizadas durante o doutorado

1. Mateus Trinconi Cunha, Ana Paula de Souza Borges, Vinicius Carvalho Jardim, André Fujita e Gilberto de Castro. **“Predicting survival in metastatic non-small cell lung cancer patients with poor ECOG-PS: A single-arm prospective study”**. Em: *Cancer Medicine* 12.4 (fev. de 2023), pgs. 5099–5109. issn: 2045-7634. doi: 10.1002/cam4.5254. url: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cam4.5254>
2. M. Cunha, A.P. Borges, V. Carvalho, A. Fujita e G.D. Castro. **“OA02.02 Development of Machine Learning Model to Estimate Overall Survival in Patients with Advanced NSCLC and ECOG-PS > 1”**. Em: *Journal of Thoracic Oncology* 16.10 (2021), S850. issn: 15560864. doi: 10.1016/j.jtho.2021.08.038. url:<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.08.038>
3. Cunha MT, Carvalho VJ, Loureiro RM, Brantis-de-Carvalho CE, Cintra MB, de Castro Junior G. **Letter to the editor: radiomics analysis for predicting pembrolizumab response in patients with advanced rare cancers**. *J Immunother Cancer*. 2021;9(7):e003044. doi:10.1136/jitc-2021-003044
4. Bernardo Pretti Becacici Macieira et al. **“Will climate change shift carbon allocation and stem hydraulics? Insights on a systemic view of carbon- and water-related wood traits in an anisohydric tropical tree species (*Hymenaea courbaril*, Leguminosae)”**. Em: *Ecological Indicators* 128 (2021). issn: 1470160X. doi: 10.1016/j.ecolind.2021.107798
5. C.J. Palacios, A. Grandis, V.J. Carvalho, A. Salatino e M.S.Buckeridge. **“Isolated and combined effects of elevated CO<sub>2</sub> and high temperature on the whole-plant biomass and the chemical composition of soybean seeds”**. Em: *Food Chemistry*

- 275 (mar. de 2019), pgs. 610–617. issn: 03088146. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.052. url: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618316236>
6. Vinícius Carvalho Jardim, Suzana de Siqueira Santos, Andre Fujita e Marcos Silveira Buckeridge. “**BioNetStat: A Tool for Biological Networks Differential Analysis**”. Em: *Frontiers in Genetics* 10.594 (jun. de 2019), pgs. 1–13. issn: 1664-8021. doi: 10.3389/fgene.2019.00594. url: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.00594/full>
  7. VINÍCIUS CARVALHO JARDIM e MARCOS SILVEIRA BUCKERIDGE. “**Análise sistêmica do município de São Paulo e suas implicações para o avanço dos casos de Covid-19**”. Em: *Estudos Avançados* 34.99 (2020), pgs. 157–174. issn: 0103-4014. doi: 10.1590/s0103-4014.2020.3499.010
  8. Tamires de Souza Rodrigues et al. “**Evaluation of Setaria viridis physiological and gene expression responses to distinct water-deficit conditions**”. Em: *Biotechnology Research and Innovation* 3 (2020), pgs. 42–58. issn: 2452-0721. doi: 10.1016/j.biori.2020.03.001. url: <https://doi.org/10.1016/j.biori.2020.03.001>
  9. **Resumo no congresso virtual europeu de oncologia ESMO 2020**. G. De Castro Jr., W. das Neves Silva, A.P. Borges, V. Jardim, P.C.B. Brum, A. Fujita. 2020 Impact of systemic inflammation, intramuscular adipose tissue content, and EORTC-QLQ-CAX24 symptom scale on the prognosis of patients with advanced non-small-cell lung cancer.
  10. Pedro A Fernandes et al. “**Melatonin-Index as a biomarker for predicting the distribution of presymptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 carriers**”. Em: *Melatonin Research* 4.1 (2021), pgs. 189–205. doi: 10.32794/mr11250090
  11. **Capítulo de livro: Jardim V.C., Moreno C.C., Fujita A. (2020) Computational Tools for Comparing Gene Coexpression Networks**. In: da Silva F.A.B., Carels N., Trindade dos Santos M., Lopes F.J.P. (eds) *Networks in Systems Biology. Computational Biology*, vol 32. Springer, Cham. DOI

# Apêndice A

## A.1 Análises de expressão gênica com TCGA

	EREG	EGFR	ERBB2	ERBB4	EGF	TGF $\alpha$	HB-EGF	BTC	AREG
EGFR	0								
ERBB2	0,14	0							
ERBB4	0,21	0	0,22						
EGF	0	0	0,1	0,11					
TGF $\alpha$	0,11	0,19	-0,11	0	0				
HB-EGF	0,13	0,18	-0,22	0	0,1	0,3			
BTC	0,19	0	0,27	0,34	0,2	0	0		
AREG	<b>0,61</b>	0	0,11	0,22	0	0,19	0,32	0,22	
EPGN	0	0,28	-0,3	-0,09	0	0,18	0,25	0	0

**Tabela A.1:** Análise de correlação de Pearson das expressões gênicas de ligantes e receptores da família ERBB.

Variável	HR	95% IC	p-valor
<b>EREG</b>	<b>1,28</b>	<b>1,11-1,49</b>	<b>&lt;0,001</b>
EGFR	0,94	0,8-1,11	0,473
ERBB2	1,13	0,9-1,41	0,294
ERBB3	0,94	0,77-1,16	0,573
ERBB4	1,03	0,88-1,2	0,753
Idade	1,11	0,95-1,3	0,201
Sexo (Masc)	1,06	0,77-1,45	0,731
Tipo (CCE)	1,48	0,95-2,29	0,081

**Tabela A.2:** Análise de Cox multivariado com a expressão de EREG e dos genes de receptores de membrana da família ERBB em pacientes CPCNP de estadió inicial. O Hazard Ratio (HR) se refere à probabilidade de ocorrência do evento de morte com o aumento do valor da variável e o intervalo de confiança de 95%. Essa análise considerou 544 pacientes com 193 eventos de morte.

Variável	HR	95% IC	p-valor
EREG	1,26	0,94-1,68	0,121
EGF	0,99	0,76-1,29	0,942
TGFA	1,15	0,86-1,53	0,351
HBEGF	1,07	0,81-1,41	0,633
BTC	0,85	0,64-1,13	0,270
EPGN	1,28	0,99-1,64	0,059
Idade	1,08	0,83-1,39	0,576
Sexo (Masc)	1,54	0,93-2,57	0,096
Tipo (CCE)	0,62	0,33-1,18	0,145

**Tabela A.3:** Análise de Cox multivariado com a expressão de EREG e dos demais genes ligantes da família ERBB em pacientes CPCNP de estadiado avançado. O Hazard Ratio (HR) se refere à probabilidade de ocorrência do evento de morte com o aumento do valor da variável e o intervalo de confiança de 95%. A linha com p-valor significativo (abaixo de 5%) está destacada em negrito. Essa análise considerou 139 pacientes com 79 eventos de morte.

Número de pacientes	EREG expression	
	Low	High
EGFRwt	299	218
EGFRmt	9	18

**Tabela A.4:** Contagem de pacientes do TCGA pertencentes aos grupos definidos de acordo com a presença (EGFRmt) ou ausência (EGFRwt) de alguma mutação no gene EGFR, e expressão de EREG abaixo da média (<mean) ou acima (>mean).

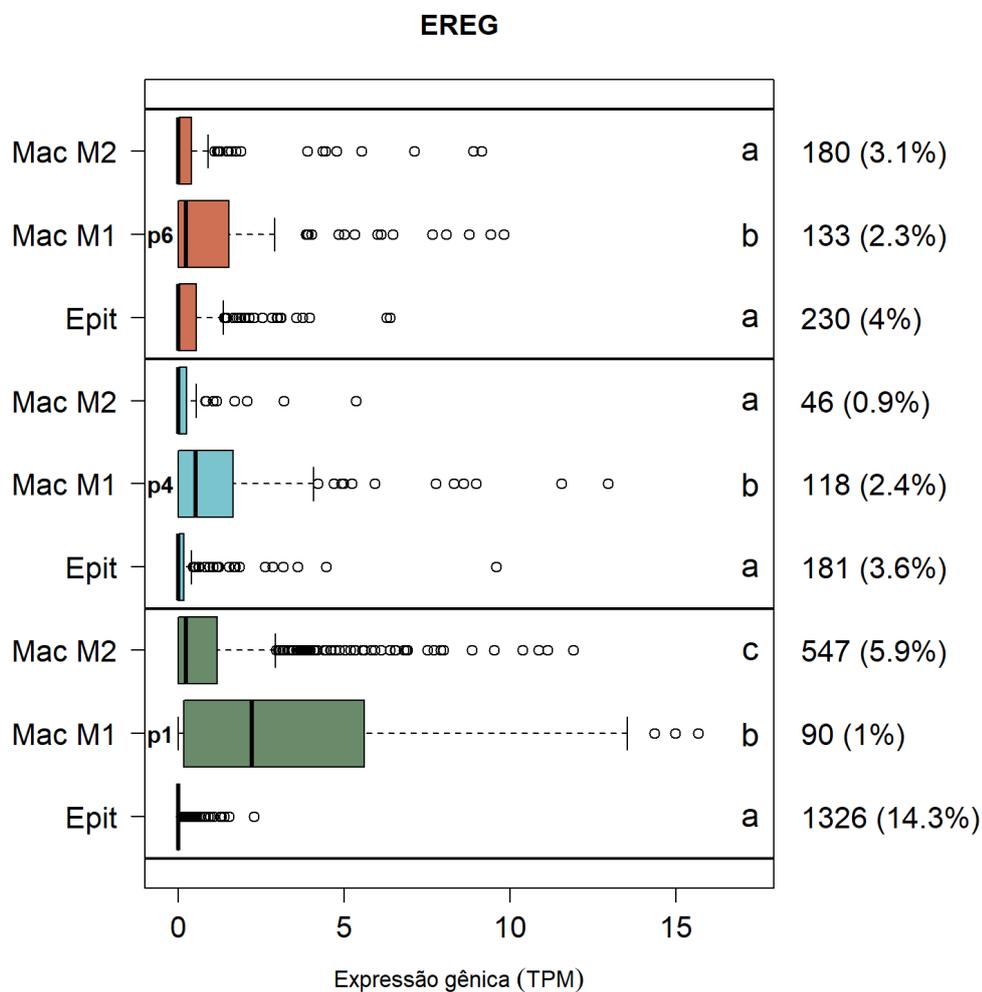
Número de pacientes	EREG expression	
	Low	High
DRIVERwt	213	157
DRIVERmt	95	79

**Tabela A.5:** Contagem de pacientes do TCGA pertencentes aos grupos definidos de acordo com a presença (DRIVERmt) ou ausência (DRIVERwt) de alguma mutação condutora, e expressão de EREG abaixo da média (<mean) ou acima (>mean).

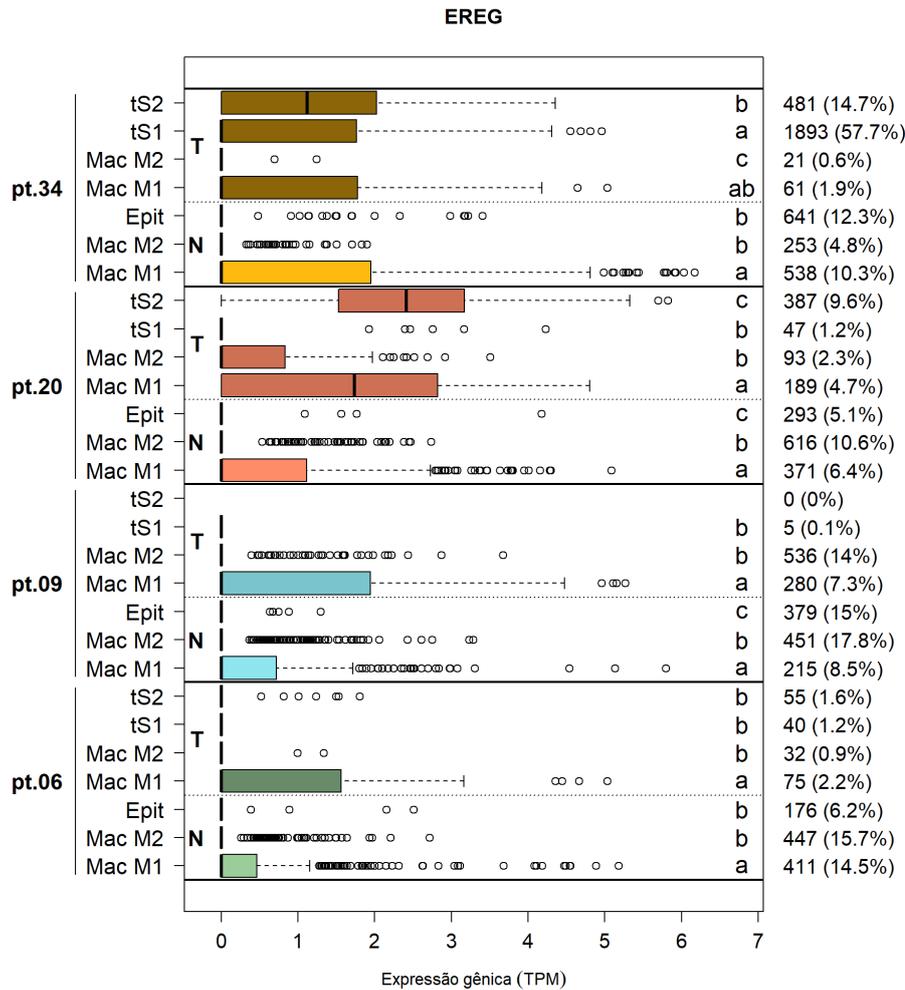
Variável	HR	95% IC	p-valor
<b>EREG</b>	<b>1,31</b>	<b>1,1-1,55</b>	<b>0,002</b>
Idade	1,03	0,86-1,24	0,748
Sexo (Masc)	1,05	0,71-1,57	0,798
Tipo (CCE)	1,3	0,86-1,96	0,218

**Tabela A.6:** *Análise da relação da expressão de EREG com a sobrevida de pacientes com CPCNP que não apresentam nenhum gene com mutações condutoras. Essa análise considerou 370 pacientes com 125 eventos de morte.*

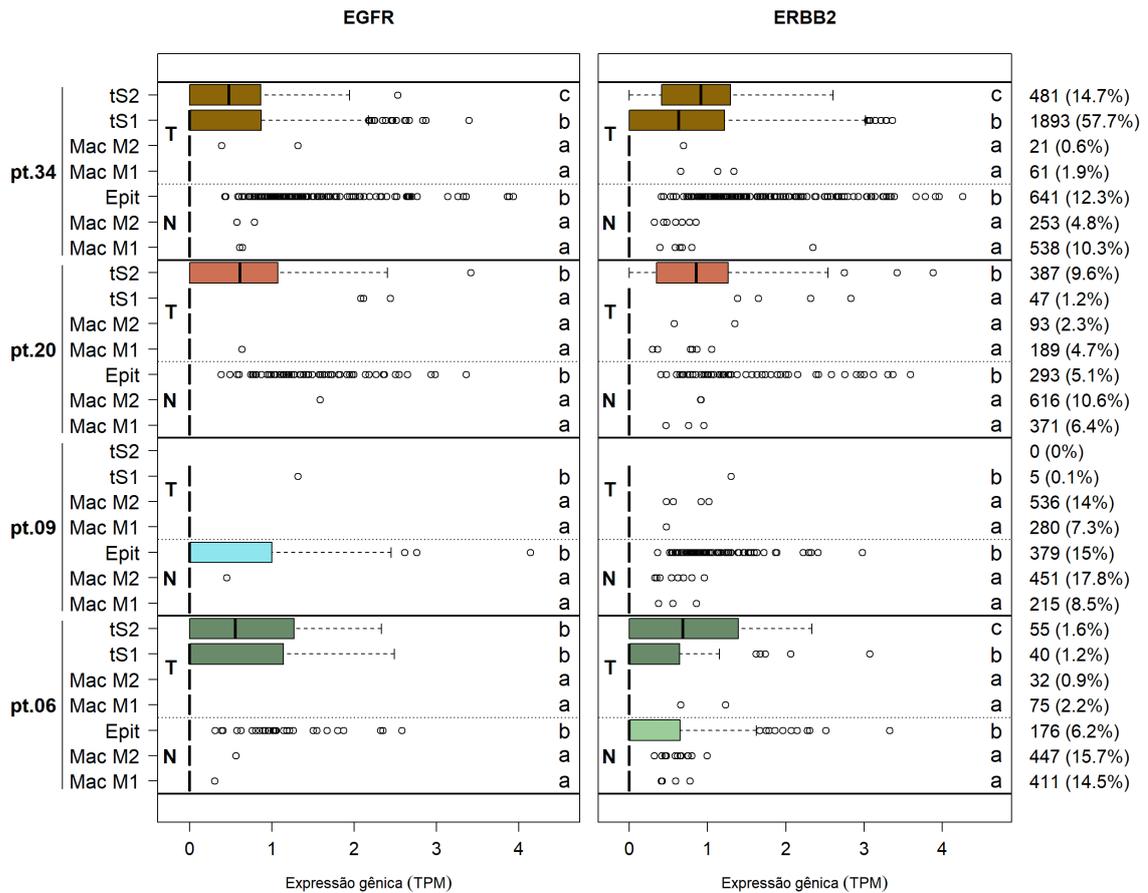
## A.2 Análise de expressão gênica scRNAseq



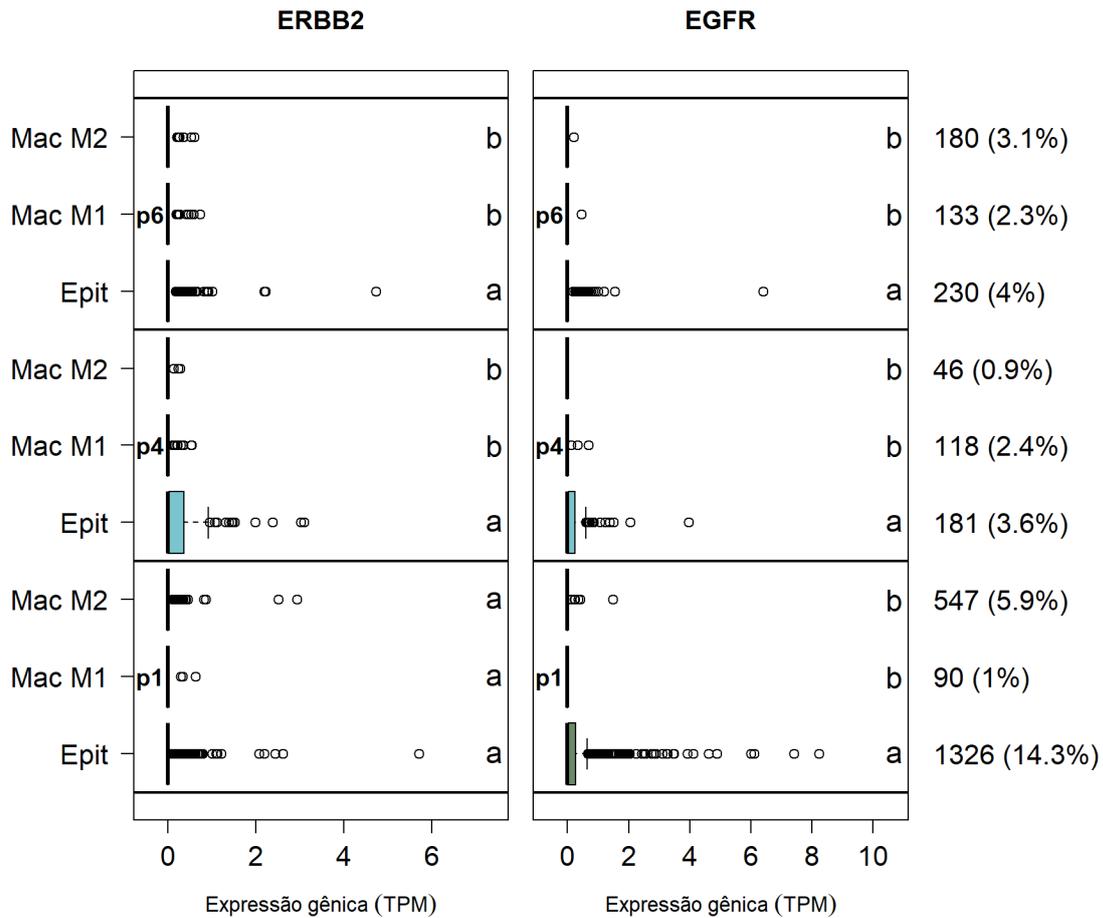
**Figura A.1:** Expressão de EREG em macrófagos M1, M2 e nas células epiteliais dos pacientes p1, p4 e p6, identificados no banco de dados GSE127465 separadamente. A Realizamos o teste de Wilcoxon comparando par-a-par a expressão gênica dos tipos celulares. Os p-valores foram ajustados por múltiplos testes pelo método False Discovery Rate (FDR). As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas par-a-par entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.



**Figura A.2:** Expressão de EREG em macrófagos M1, M2, M1/M2 e nas células epiteliais do tecido Tumoral dos pacientes pt.06, pt.09, pt.20 e pt.34, identificados no banco de dados GSE131907, separadamente. Realizamos o teste de Wilcoxon comparando par-a-par a expressão gênica dos tipos celulares. Os p-valores foram ajustados por múltiplos testes pelo método False Discovery Rate (FDR). As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas par-a-par entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.



**Figura A.3:** Expressão de EGFR e ERBB2 em macrófagos M1, M2 e nas células epiteliais do tecido Tumoral e normal adjacente dos pacientes pt.06, pt.09, pt.20 e pt.34, identificados no banco de dados GSE131907, separadamente. Realizamos o teste de Wilcoxon comparando par-a-par a expressão gênica dos tipos celulares. Os p-valores foram ajustados por múltiplos testes pelo método False Discovery Rate (FDR). As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas par-a-par entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.



**Figura A.4:** Expressão de EGFR e ERBB2 em macrófagos M1, M2 e nas células epiteliais do tecido Tumoral dos pacientes p1, p4 e p6, identificados no banco de dados GSE127465, separadamente. Realizamos o teste de Wilcoxon comparando par-a-par a expressão gênica dos tipos celulares. Os p-valores foram ajustados por múltiplos testes pelo método False Discovery Rate (FDR). As letras (a, b e c) simbolizam as diferenças estatísticas par-a-par entre as médias dos grupos. Letras diferentes significam que os grupos comparados possuem médias estatisticamente diferentes entre si.

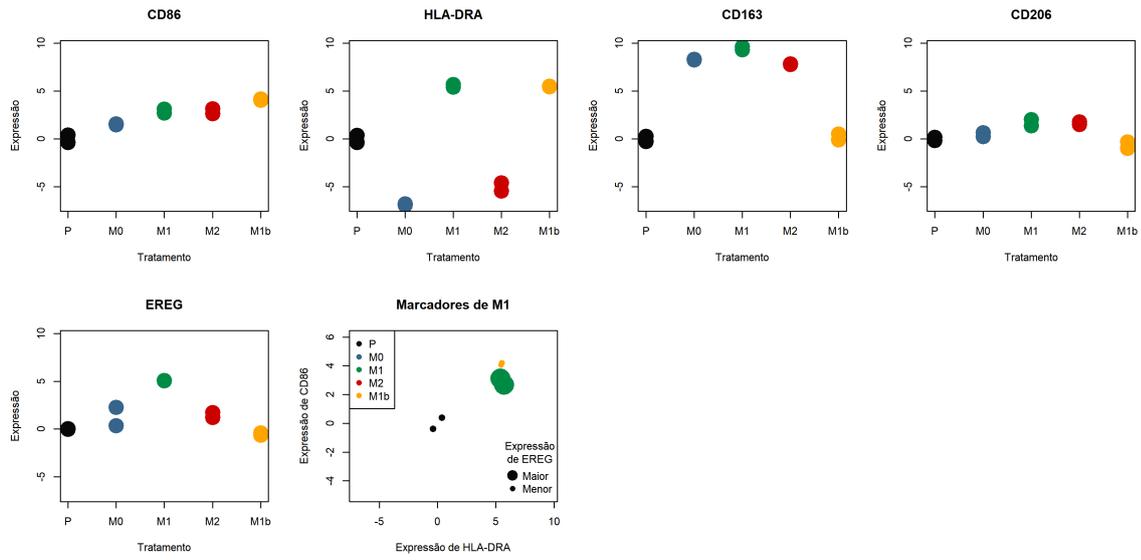
### A.3 Análise de experimento *in vitro*

<i>Gene</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>GUSB</i>	GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTT
<i>HPRT</i>	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>MRPL19</i>	CAGGAAGAGGACTTGGAGCTACTT	AAAGCAAATCTCGACACCTTGTC
<i>CD86</i>	CCAAAATGGATCCCCAGTGC	CTTCAGAGGAGCAGCACCAGA
<i>CD163</i>	AGGCCATTCTGAGCCACACT	AGGTATCTTAAAGGCTGAACTCACT
<i>CD206</i>	CTGGACCTTGGCTTCGT	TGACGAAATGTGGATCG
<i>IL1<math>\beta</math></i>	AGCCATGGCAGAAGTACCTG	CCTGGAAGGAGCACTTCATCT
<i>IL10</i>	GCCTAACATGCTTCGAGATC	TGATGTCTGGGTCTTGGTTC
<i>IL12</i>	AACTAATGGGAGTTGCCTGG	GGACCTCGCTTTTTAGGAAG
<i>PDL1</i>	CATGACCTACTGGCATTGCT	CCTTGGGAACCGTGACAGTA
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	GAGGCGCTCCCCAAGAAGACA	TGGGCCAGAGGGCTGATTAGAG
<i>HLA-DRA</i>	TCCGATCACCAATGTACCTCC	CACTGGTGGGGTGAACCTGT
<i>EREG</i>	CTGCTCTGCCTGGGTTTCCAT	CACTGGACTCTCCTGGGATACA
<i>IDO-1</i>	GCCCTTCAAGTGTTCACCA	CCAGCCAGACAAATATATGCGA
<i>FCN1</i>	CTGGGCAGTCTCAGTCGTG	CCGCTGGAAAACGGTCC
<i>MIF</i>	ACAGCATCGGCAAGATCGG	AATAGTTGATGTAGACCCTGTCCG

**Tabela A.7:** Tabela de primers utilizados durante os experimentos

#### A.3.1 Teste de polarização com THP1

Afim de confirmar experimentalmente se células monocíticas (como os macrófagos) expressam *EREG*, realizamos testes com uma linhagem tumoral monocítica, a THP1. Estimulamos a maturação das células (M0) e posteriormente a polarização para os fenótipos M1 e M2. Neste experimento realizamos também o estímulo apenas com INF- $\gamma$  e LPS sem estimular a maturação de THP1. Esse tratamento foi chamado de M1b. Podemos observar que macrófagos de fenótipo M1 expressam mais *EREG* que os demais tratamentos, bem como expressam mais os marcadores do fenótipo M1, como os genes CD86 e HLA-DRA (Figura A.5). A linhagem M1b também expressa marcadores de polarização pra M1 (HLA-DR e CD86) porém não expressa *EREG*. Esses resultados sugerem que a etapa de maturação é necessária para a expressão de *EREG* pelo macrófago.

A.3 | ANÁLISE DE EXPERIMENTO *IN VITRO*

**Figura A.5:** Expressão de genes marcadores de macrófagos M1 (CD86 (A) e HLA-DRA (B)) e M2 (CD163 (C) e CD206 (D)) e expressão de EREG (E) por macrófagos derivados da linhagem mieloide THP1.

## A.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

### IEP - Pesquisa

#### **Título do Estudo: O papel estimulador de Macrófagos M1 na proliferação celular em câncer de pulmão de células não pequenas**

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, o pesquisador responsável pelo estudo e a equipe desta pesquisa estarão disponíveis para esclarecê-los. A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

**OBSERVAÇÃO:** Caso o participante não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo participante.

#### **Objetivo do Estudo**

Verificar se células do sistema imune (células de defesa do sangue) podem produzir um fator de crescimento chamado epirregulina que afetaria a progressão tumoral.

#### **Duração do Estudo**

A duração total do estudo é de 12 meses. E a sua participação no estudo será de apenas um dia para a realização de uma única coleta de sangue.

#### **Descrição do Estudo**

Estudo prospectivo observacional descritivo e de caráter exploratório com coleta de material biológico, mas sem intervenção. Serão coletados 20 ml de sangue de aproximadamente 10 participantes saudáveis, para obtenção das células imunes. Este estudo será realizado no Hospital Sírio-Libanês (HSL), unidade Bela Vista, São Paulo.

O (a) Senhor (a) foi escolhido (a) a participar do estudo por atender aos critérios gerais de inclusão, que são ter mais de 18 anos, não apresentar comorbidades e não ser tabagista.

#### **Procedimento do Estudo**

Após entender e concordar em participar, será realizada uma coleta de 20mL de sangue de uma veia periférica com um tubo EDTA (tubo de coleta de sangue padrão) por um membro autorizado da equipe. Esta amostra será processada para separar as células de interesse (leucócitos), e assim realizar **a avaliação das características destas células no laboratório**. Essa coleta ocorrerá apenas uma vez.

#### **Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto**

Riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Riscos relacionados à confidencialidade são mínimos, e os pesquisadores e equipe envolvida no estudo se comprometem a zelar pela segurança dos dados dos pacientes, bem como a manter a anonimização na divulgação de dados decorrentes do estudo.

Versão 1 - 07 de janeiro de 2021

Rubrica do Participante de pesquisa ou responsável: \_\_\_\_\_  
Rubrica do aplicador: \_\_\_\_\_

1 de 3

**Benefícios para o participante**

Não há benefício direto para o participante desse estudo. Trata-se de estudo no qual, após coleta de sangue do voluntário, testaremos em laboratório a hipótese de que um subtipo específico de leucócito pode interferir no desenvolvimento do tumor.

Porém, de forma indireta, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a entender melhor o papel dos leucócitos no desenvolvimento do tumor, e contribuirá para uma melhor compreensão da relação das células de defesa com as células câncer no futuro. Colaborando para o desenvolvimento de tratamentos do câncer no futuro.

**Compensação**

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

**Participação Voluntária / Desistência do Estudo / Descontinuação do Estudo**

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma consequência. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar.

Importante esclarecer, que o pesquisador poderá retirá-lo do estudo, caso os procedimentos do estudo possam apresentar algum risco para a sua saúde, ou em casos de complicações devido aos procedimentos. Mas isso tudo será devidamente informado ao Sr(a). Além disso, tanto o pesquisador, como as autoridades regulatórias (Comitê de ética em pesquisa, ANVISA), poderá interromper o estudo, caso julgue que o mesmo possa apresentar algum dano aos participantes.

**Novas Informações**

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito. Se você decidir continuar neste estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

**Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa**

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

**Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade**

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do voluntário a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

**Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida**

Em qualquer momento você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são Vinícius Jardim Carvalho e Dra. Mariane Tamí Amano que poderão ser encontradas no Instituto Sírio-Libanês de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês ou nos respectivos telefones: 011 99691-6436, 011 99152-5974.

Versão 1 - 07 de janeiro de 2021

Rubrica do Participante de pesquisa ou responsável: \_\_\_\_\_  
Rubrica do aplicador: \_\_\_\_\_

2 de 3

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o CEPESQ – Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras Hospital Sírio Libanês - Rua Dona Adma Jafet, 91, nº 91 – Bloco C - 11º andar – Sala 1117 - Bela Vista – São Paulo/SP – 01308-050 - Brasil, através do telefone (11) 3394-5701 ou pelo e-mail: [cepesq@hsl.org.br](mailto:cepesq@hsl.org.br).

**Importante:** Este documento é elaborado e deverá ser assinado em duas vias: uma será entregue ao participante (sujeito da pesquisa) e a outra via ficará com o pesquisador. Todas as páginas deverão ser rubricadas pelo pesquisador, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, em atendimento à

#### **Declaração de Consentimento**

Concordo em participar do estudo intitulado "O papel estimulador de Macrófagos M1 na proliferação celular em câncer de pulmão de células não pequenas".

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando (abrindo mão) de nenhum de meus direitos legais.

**Eu autorizo a utilização dos meus registros médicos (prontuários médico) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição.**

_____ Nome do Participante da Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina	_____ Data
_____ Assinatura do Participante da Pesquisa	
_____ Nome do Representante Legal do Participante da Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina (quando aplicável)	_____ Data
_____ Assinatura do Representante Legal do Participante de Pesquisa (quando aplicável)	
_____ Nome da pessoa obtendo o Consentimento	_____ Data
_____ Assinatura da Pessoa Obtendo o Consentimento	
_____ Nome do Pesquisador Principal	_____ Data
_____ Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal	

CARTA CIRCULAR Nº 003/2011 CONEP/CNS/MS disponível no site da CONEP:  
[http://conselho.saude.gov.br/web\\_comissoes/conep/index.html](http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/index.html).

Versão 1 - 07 de janeiro de 2021

Rubrica do Participante de pesquisa ou responsável: _____ Rubrica do aplicador: _____
--

3 de 3

## Referências

- [AKBAY *et al.* 2013] Esra A AKBAY *et al.* “Activation of the PD-1 Pathway Contributes to Immune Escape in EGFR-Driven Lung Tumors”. Em: *Cancer Discovery* 3.12 (dez. de 2013), pgs. 1355–1363. ISSN: 2159-8274. DOI: [10.1158/2159-8290.CD-13-0310](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0310). URL: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2159-8290.CD-13-0310> (citado na pg. 39).
- [ANDERSEN e GILL 1982] P K ANDERSEN e R D GILL. “Cox’s Regression Model for Counting Processes: A Large Sample Study”. Em: *The Annals of Statistics* 10.4 (mar. de 1982), pgs. 1100–1120. ISSN: 00905364. URL: <http://www.jstor.org/stable/2240714> (citado na pg. 6).
- [BALKWILL *et al.* 2012] Frances R. BALKWILL, Melania CAPASSO e Thorsten HAGEMANN. “The tumor microenvironment at a glance”. Em: *Journal of Cell Science* 125.23 (2012), pgs. 5591–5596. ISSN: 00219533. DOI: [10.1242/jcs.116392](https://doi.org/10.1242/jcs.116392) (citado na pg. 3).
- [BAUER *et al.* 2016] Alison K. BAUER *et al.* “Epiregulin is required for lung tumor promotion in a murine two-stage carcinogenesis model”. Em: *Molecular Carcinogenesis* 56.1 (2016), pgs. 94–105. ISSN: 10982744. DOI: [10.1002/mc.22475](https://doi.org/10.1002/mc.22475) (citado na pg. 2).
- [BENJAMINI e HOCHBERG 1995] Yoav BENJAMINI e Yosef HOCHBERG. *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. 1995. DOI: [10.2307/2346101](https://doi.org/10.2307/2346101) (citado nas pgs. 9, 13).
- [CARROT-ZHANG *et al.* 2021] Jian CARROT-ZHANG *et al.* “Genetic ancestry contributes to somatic mutations in lung cancers from admixed latin american populations”. Em: *Cancer Discovery* 11.3 (2021), pgs. 591–598. ISSN: 21598290. DOI: [10.1158/2159-8290.CD-20-1165](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1165) (citado na pg. 1).
- [CHENG *et al.* 2021] Wan Li CHENG *et al.* “The role of ereg/egfr pathway in tumor progression”. Em: *International Journal of Molecular Sciences* 22.23 (2021), pgs. 1–27. ISSN: 14220067. DOI: [10.3390/ijms222312828](https://doi.org/10.3390/ijms222312828) (citado nas pgs. 1, 2, 37–40).
- [CONCHA-BENAVENTE e FERRIS 2017] Fernando CONCHA-BENAVENTE e Robert L. FERRIS. “Reversing EGFR mediated immunoescape by targeted monoclonal antibody therapy”. Em: *Frontiers in Pharmacology* 8.MAY (2017), pgs. 1–8. ISSN: 16639812. DOI: [10.3389/fphar.2017.00332](https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00332) (citado na pg. 38).

- [DE LUCA *et al.* 2008] Antonella DE LUCA *et al.* “The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment”. Em: *Journal of Cellular Physiology* 214.3 (mar. de 2008), pgs. 559–567. ISSN: 00219541. DOI: [10.1002/jcp.21260](https://doi.org/10.1002/jcp.21260). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.21260> (citado na pg. 2).
- [DONG *et al.* 2020] Qiaofeng DONG *et al.* “Levels and Clinical Significance of Regulatory B Cells and T Cells in Acute Myeloid Leukemia”. Em: *BioMed Research International* 2020 (2020). ISSN: 23146141. DOI: [10.1155/2020/7023168](https://doi.org/10.1155/2020/7023168) (citado na pg. 9).
- [EDGE *et al.* 2010] Stephen B EDGE *et al.* *AJCC cancer staging manual*. 7ª ed. Vol. 7. Springer, 2010 (citado na pg. 5).
- [FREED *et al.* 2017] Daniel M. FREED *et al.* “EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics”. Em: *Cell* 171.3 (2017), pgs. 683–695. ISSN: 10974172. DOI: [10.1016/j.cell.2017.09.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.017). URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.017> (citado nas pgs. 2, 38).
- [GALDIERO *et al.* 2013] Maria Rosaria GALDIERO *et al.* “Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer”. Em: *Immunobiology* 218.11 (2013), pgs. 1402–1410. ISSN: 01712985. DOI: [10.1016/j.imbio.2013.06.003](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.003). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.003> (citado na pg. 3).
- [HANAHAHAN 2022] Douglas HANAHAHAN. “Hallmarks of Cancer: New Dimensions”. Em: *Cancer Discovery* 12.1 (2022), pgs. 31–46. ISSN: 21598290. DOI: [10.1158/2159-8290.CD-21-1059](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059) (citado nas pgs. 3, 39).
- [IJIMA *et al.* 2017] Mariko IJIMA, Motonobu ANAI, Tatsuhiko KODAMA e Yoshikazu SHIBASAKI. “Epiregulin-blocking antibody inhibits epiregulin-dependent EGFR signaling”. Em: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 489.1 (2017), pgs. 83–88. ISSN: 10902104. DOI: [10.1016/j.bbrc.2017.03.006](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.006). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.006> (citado nas pgs. 2, 38).
- [KAPLAN e MEIER 1958] E L KAPLAN e Paul MEIER. “Nonparametric Estimation from Incomplete Observations”. Em: *Journal of the American Statistical Association* 53.282 (jun. de 1958), pgs. 457–481. ISSN: 0162-1459. DOI: [10.1080/01621459.1958.10501452](https://doi.org/10.1080/01621459.1958.10501452). URL: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01621459.1958.10501452> (citado na pg. 6).
- [KEELEY *et al.* 2019] Tyler KEELEY, Diane L. COSTANZO-GARVEY e Leah M. COOK. “Unmasking the Many Faces of Tumor-Associated Neutrophils and Macrophages: Considerations for Targeting Innate Immune Cells in Cancer”. Em: *Trends in Cancer* 5.12 (2019), pgs. 789–798. ISSN: 24058033. DOI: [10.1016/j.trecan.2019.10.013](https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.10.013). URL: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.10.013> (citado nas pgs. 3, 38, 39).
- [KIM *et al.* 2020] Nayoung KIM *et al.* “Single-cell RNA sequencing demonstrates the molecular and cellular reprogramming of metastatic lung adenocarcinoma”. Em: *Nature Communications* 11.1 (2020). ISSN: 20411723. DOI: [10.1038/s41467-020-16164-1](https://doi.org/10.1038/s41467-020-16164-1) (citado nas pgs. 3, 8, 19, 37, 38).

## REFERÊNCIAS

- [LI *et al.* 2016] Dan LI *et al.* “MiR-146a modulates macrophage polarization in systemic juvenile idiopathic arthritis by targeting INHBA”. Em: *Molecular Immunology* 77 (2016), pgs. 205–212. ISSN: 18729142. DOI: [10.1016/j.molimm.2016.08.007](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.08.007). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2016.08.007> (citado na pg. 38).
- [LIU *et al.* 2020] Shuli LIU *et al.* “EREG-driven oncogenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma exhibits higher sensitivity to Erlotinib therapy”. Em: *Theranostics* 10.23 (2020), pgs. 10589–10605. ISSN: 18387640. DOI: [10.7150/thno.47176](https://doi.org/10.7150/thno.47176) (citado na pg. 38).
- [LIVAK e SCHMITTGEN 2001] Kenneth J. LIVAK e Thomas D. SCHMITTGEN. “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method”. Em: *Methods* 25.4 (2001), pgs. 402–408. ISSN: 10462023. DOI: [10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262) (citado na pg. 12).
- [R. Y. MA *et al.* 2022] Ruo Yu MA, Annabel BLACK e Bin Zhi QIAN. “Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics”. Em: *Trends in Immunology* 43.7 (2022), pgs. 546–563. ISSN: 14714981. DOI: [10.1016/j.it.2022.04.008](https://doi.org/10.1016/j.it.2022.04.008). URL: <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.04.008> (citado nas pgs. 3, 38, 39).
- [S. MA *et al.* 2021] Shiqi MA *et al.* “Epiregulin confers EGFR-TKI resistance via EGFR/ErbB2 heterodimer in non-small cell lung cancer.” Em: *Oncogene* 40.14 (abr. de 2021), pgs. 2596–2609. ISSN: 1476-5594. DOI: [10.1038/s41388-021-01734-4](https://doi.org/10.1038/s41388-021-01734-4). URL: <http://www.nature.com/articles/s41388-021-01734-4> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33750895> (citado nas pgs. 1, 2, 37–39).
- [MASSIP-COPIZ *et al.* 2018] Macarena MASSIP-COPIZ, Mariángeles CLAUZURE, Ángel G. VALDIVIESO e Tomás A. SANTA-COLOMA. “Epiregulin (EREG) is upregulated through an IL-1 $\beta$  autocrine loop in Caco-2 epithelial cells with reduced CFTR function”. Em: *Journal of Cellular Biochemistry* 119.3 (mar. de 2018), pgs. 2911–2922. ISSN: 0730-2312. DOI: [10.1002/jcb.26483](https://doi.org/10.1002/jcb.26483). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.26483> (citado nas pgs. 37, 40).
- [MEZHEYEUSKI *et al.* 2018] Artur MEZHEYEUSKI *et al.* “Multispectral imaging for quantitative and compartment-specific immune infiltrates reveals distinct immune profiles that classify lung cancer patients.” eng. Em: *The Journal of pathology* 244.4 (abr. de 2018), pgs. 421–431. ISSN: 1096-9896 (Electronic). DOI: [10.1002/path.5026](https://doi.org/10.1002/path.5026) (citado na pg. 18).
- [MIA *et al.* 2014] S. MIA, A. WARNECKE, X. M. ZHANG, V. MALMSTRÖM e R. A. HARRIS. “An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- $\beta$  yields a dominant immunosuppressive phenotype”. Em: *Scandinavian Journal of Immunology* 79.5 (2014), pgs. 305–314. ISSN: 13653083. DOI: [10.1111/sji.12162](https://doi.org/10.1111/sji.12162) (citado na pg. 9).

- [MIDHA *et al.* 2015] Anita MIDHA, Simon DEARDEN e Rose McCORMACK. “EGFR mutation incidence in non-Small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: A systematic review and global map by ethnicity (mutMapII)”. Em: *American Journal of Cancer Research* 5.9 (2015), pgs. 2892–2911. ISSN: 21566976 (citado na pg. 1).
- [MOK *et al.* 2009] Tony S MOK *et al.* “Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma”. Em: *New England Journal of Medicine* 361.10 (set. de 2009), pgs. 947–957. ISSN: 0028-4793. DOI: [10.1056/NEJMoa0810699](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699). URL: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0810699> (citado na pg. 15).
- [PIREAUX *et al.* 2020] Valérie PIREAUX *et al.* “M2 monocyte polarization in dialyzed patients is associated with increased levels of M-CSF and myeloperoxidase-associated oxidative stress: Preliminary results”. Em: *medRxiv* (2020). DOI: [10.1101/2020.05.07.20094011](https://doi.org/10.1101/2020.05.07.20094011) (citado na pg. 9).
- [RIESE e CULLUM 2014] David J. RIESE e Richard L. CULLUM. “Epiregulin: Roles in normal physiology and cancer”. Em: *Seminars in Cell and Developmental Biology* 28 (2014), pgs. 49–56. ISSN: 10963634. DOI: [10.1016/j.semcdb.2014.03.005](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.005). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.005> (citado na pg. 2).
- [SINGHAL *et al.* 2019] Sunil SINGHAL *et al.* “Human tumor-associated monocytes/macrophages and their regulation of T cell responses in early-stage lung cancer”. Em: *Science Translational Medicine* 11.479 (2019). ISSN: 19466242. DOI: [10.1126/scitranslmed.aat1500](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat1500) (citado na pg. 3).
- [SORIA *et al.* 2018] Jean-Charles SORIA *et al.* “Osimertinib in Untreated EGFR -Mutated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer”. Em: *New England Journal of Medicine* 378.2 (2018), pgs. 113–125. ISSN: 0028-4793. DOI: [10.1056/nejmoa1713137](https://doi.org/10.1056/nejmoa1713137) (citado na pg. 2).
- [N. SUNAGA *et al.* 2013] N. SUNAGA *et al.* “Oncogenic KRAS-induced epiregulin overexpression contributes to aggressive phenotype and is a promising therapeutic target in non-small-cell lung cancer”. Em: *Oncogene* 32.34 (2013), pgs. 4034–4042. ISSN: 09509232. DOI: [10.1038/onc.2012.402](https://doi.org/10.1038/onc.2012.402) (citado na pg. 37).
- [Noriaki SUNAGA e KAIRA 2015] Noriaki SUNAGA e Kyoichi KAIRA. “Epiregulin as a therapeutic target in non-small-cell lung cancer”. Em: *Lung Cancer: Targets and Therapy* 6 (2015), pgs. 91–98. ISSN: 11791314. DOI: [10.2147/LCTT.S60427](https://doi.org/10.2147/LCTT.S60427) (citado nas pgs. 2, 37, 38).
- [SUNG *et al.* 2021] Hyuna SUNG *et al.* “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”. Em: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71.3 (2021), pgs. 209–249. ISSN: 0007-9235. DOI: [10.3322/caac.21660](https://doi.org/10.3322/caac.21660) (citado na pg. 1).

## REFERÊNCIAS

- [To *et al.* 2021] Kenneth K.W. To, Winnie FONG e William C.S. CHO. “Immunotherapy in Treating EGFR-Mutant Lung Cancer: Current Challenges and New Strategies”. Em: *Frontiers in Oncology* 11.May (2021), pgs. 1–17. ISSN: 2234943X. DOI: [10.3389/fonc.2021.635007](https://doi.org/10.3389/fonc.2021.635007) (citado na pg. 38).
- [TOYODA *et al.* 1997] Hitoshi TOYODA, Toshi KOMURASAKI, Daisuke UCHIDA e Sigeo MORIMOTO. “Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family”. Em: *Biochemical Journal* 326.1 (1997), pgs. 69–75. ISSN: 02646021. DOI: [10.1042/bj3260069](https://doi.org/10.1042/bj3260069) (citado na pg. 37).
- [TRAVIS *et al.* 2015] WD TRAVIS, E BRAMBILLA, AP BURKE, A MARX e AG NICHOLSON. *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. 4ª ed. 2015. ISBN: 978-92-832-4495-0 (citado na pg. 1).
- [VARGA *et al.* 2020] Zsófia VARGA *et al.* “Differences in the sensitivity of classically and alternatively activated macrophages to TAK1 inhibitor-induced necroptosis”. Em: *Cancer Immunology, Immunotherapy* 69.11 (2020), pgs. 2193–2207. ISSN: 14320851. DOI: [10.1007/s00262-020-02623-7](https://doi.org/10.1007/s00262-020-02623-7). URL: <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02623-7> (citado na pg. 9).
- [C. WANG *et al.* 2022] Changxu WANG *et al.* “Targeting epiregulin in the treatment-damaged tumor microenvironment restrains therapeutic resistance”. Em: *Oncogene* 41.45 (2022), pgs. 4941–4959. ISSN: 14765594. DOI: [10.1038/s41388-022-02476-7](https://doi.org/10.1038/s41388-022-02476-7) (citado nas pgs. 2, 3).
- [L. x. WANG *et al.* 2019] Le xun WANG, Sheng xi ZHANG, Hui juan WU, Xiang lu RONG e Jiao GUO. “M2b macrophage polarization and its roles in diseases”. Em: *Journal of Leukocyte Biology* 106.2 (2019), pgs. 345–358. ISSN: 19383673. DOI: [10.1002/JLB.3RU1018-378RR](https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR) (citado na pg. 3).
- [YAMAUCHI *et al.* 2012] Mai YAMAUCHI *et al.* “Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Defines Critical Prognostic Genes of Stage I Lung Adenocarcinoma”. Em: *PLoS ONE* 7.9 (2012). ISSN: 19326203. DOI: [10.1371/journal.pone.0043923](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043923) (citado na pg. 1).
- [YARDEN e PINES 2012] Yosef YARDEN e Gur PINES. “The ERBB network: At last, cancer therapy meets systems biology”. Em: *Nature Reviews Cancer* 12.8 (2012), pgs. 553–563. ISSN: 1474175X. DOI: [10.1038/nrc3309](https://doi.org/10.1038/nrc3309) (citado na pg. 1).
- [ZHANG *et al.* 2022] Yujia ZHANG *et al.* “Epiregulin increases stemness-associated genes expression and promotes chemoresistance of non-small cell lung cancer via ERK signaling”. Em: *Stem Cell Research and Therapy* 13.1 (2022), pgs. 1–13. ISSN: 17576512. DOI: [10.1186/s13287-022-02859-3](https://doi.org/10.1186/s13287-022-02859-3). URL: <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02859-3> (citado nas pgs. 38, 39).

- [ZHAO *et al.* 2020] Weihua ZHAO *et al.* “Immunosuppressive Functions of M2 Macrophages Derived from iPSCs of Patients with ALS and Healthy Controls”. Em: *iScience* 23.6 (2020), pg. 101192. ISSN: 25890042. DOI: [10.1016/j.isci.2020.101192](https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101192). URL: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101192> (citado na pg. 9).
- [ZILIONIS *et al.* 2019] Rapolas ZILIONIS *et al.* “Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species”. Em: *Immunity* 50.5 (2019), pgs. 1317–1334. ISSN: 10974180. DOI: [10.1016/j.immuni.2019.03.009](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.009). URL: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.009> (citado nas pgs. 8, 19–21).