

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA EM
CARCINOMAS DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS**

Júlia Andrade Pessoa Morales

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas.

BOTUCATU - SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA EM
CARCINOMAS DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS**

Júlia Andrade Pessoa Morales

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis
Co-orientador: Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas.

BOTUCATU - SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Morales, Julia Andrade Pessoa.

Identificação de alterações na expressão gênica em
carcinomas de pulmão de células não pequenas / Julia
Andrade Pessoa Morales. - Botucatu, 2016

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Patricia Pintor dos Reis

Coorientador: Robson Francisco Carvalho

Capes: 20200005

1. Pulmões - Câncer. 2. Expressão gênica. 3. Reação em
cadeia da polimerase. 4. Marcadores bioquímicos.

Palavras-chave: Biomarcadores; Câncer de pulmão; Expressão
gênica.

Júlia Andrade Pessoa Morales

Identificação de alterações na expressão gênica em carcinomas de pulmão de células não pequenas.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis
Co-orientador: Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

Dr. Fábio Eduardo Severino

Botucatu, ____ de Junho de 2016.

DEDICATÓRIA

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão dessa etapa, que me incentivaram e apoiaram ao longo da graduação, permitindo que esse sonho se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

À minha família por terem sido base para que eu alcançasse essa realização, por toda ajuda e apoio durante os anos de graduação. Devo a eles todas as minhas conquistas, sem eles nada disso seria possível.

Ao meu namorado Paulo Gabriel, pelo companheirismo e empenho ao longo dos anos de distância física, mas de sentimentos compartilhados.

À Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, por toda sua dedicação e empenho na condução desse projeto, por todos seus ensinamentos técnicos e científicos transmitidos e por incentivar o meu crescimento.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho, pela prontidão e dedicação, por estar sempre disponível para buscar soluções e colaborar com o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Rogério Antônio de Oliveira pela disponibilidade e ajuda com as análises estatísticas.

A toda equipe do laboratório Neogene: Dra. Sandra, Dr. Fábio, Jovita, Marco, Tatiane, Tainara e Natália, muito obrigada pela ajuda e convivência diárias. Agradeço especialmente ao Dr. Márcio, pelo empenho em colaborar dia a dia com o desenvolvimento desse trabalho e por sempre estar disponível para me ajudar. Agradeço também à Camila pela ajuda e companheirismo no trabalho diário.

À República TPM, minha família durante esses anos em Botucatu, pela amizade e pelos momentos incríveis que levarei para sempre comigo. As minhas amigas Giovana e Nathaliê, minhas amigas de todas as horas, por todos os momentos de apoio, carinho e companheirismo nesses anos juntas.

A minhas amigas de infância Beatriz e Heloá, que se fazem presentes em todas as fases importantes de minha vida, me apoiando e me incentivando.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade e financiamento no Programa Ciência sem Fronteiras – Edital 156 – Estados Unidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido para a viabilização deste trabalho.

RESUMO

MORALES, J.A.P. Identificação de alterações na expressão gênica em carcinomas de pulmão de células não pequenas. 2016. **Trabalho de conclusão de curso (Monografia)** – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

O câncer de pulmão é a principal causa de óbitos por câncer no mundo. Apesar das estratégias de tratamento disponíveis, a sobrevida em 5 anos dos pacientes permanece em aproximadamente 15%. Atualmente, avanços nas estratégias de tratamento incluíram o desenvolvimento de terapias com alvos moleculares, tais como inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Entretanto, essas novas terapêuticas beneficiam uma fração pequena de pacientes com subtipos histológicos específicos da doença. Portanto, é plenamente justificada a realização de estudos moleculares que levem à identificação de biomarcadores com potencial utilidade no tratamento. O objetivo desse projeto é validar um painel de genes associados ao câncer, sendo alguns deles especificamente associados aos carcinomas pulmonares de células não pequenas (NSCLC). Amostras de tumores primários e tecido histologicamente normal adjacentes ao tumor foram obtidas de 28 pacientes submetidos a tratamento cirúrgico no Hospital de Clínicas de Botucatu, SP. O RNA foi extraído e o cDNA foi sintetizado a partir das amostras de tecido congeladas seguindo protocolos padrão. A análise quantitativa da expressão dos genes *EGFR*, *K-RAS*, *NOTCH1*, *SATB2* e *ZEB1* foi realizada pela metodologia da PCR quantitativa em tempo real no equipamento QuantStudio 12K (Life Technologies). A análise dos dados seguiu o método Delta Delta Ct. Os dados foram normalizados com os genes endógenos *B2M* e *RPS13*. Análises estatísticas foram conduzidas utilizando o teste pareado não paramétrico de Wilcoxon (GraphPad Prisma v.6.0 software) com significância estatística definida como $p < 0,05$. Expressão relativa aumentada foi detectada em amostras tumorais comparadas a normais para os genes: *EGFR* ($p < 0,0001$), *K-RAS* ($p < 0,0001$), *SATB2* ($p < 0,0001$), *NOTCH1* ($p = 0,027$), e *ZEB1* ($p = 0,035$). Esse estudo confirmou que a expressão gênica de genes associados ao carcinoma pulmonar; *EGFR*, *K-RAS*, *ZEB1* e *NOTCH1* está significativamente aumentada em tumores comparados a tecido normal pulmonar. Além disso, o estudo demonstrou que *SATB2*, um gene ainda não relatado como envolvido na tumorigênese pulmonar, está com expressão aumentada em tumores. *SATB2* regula a expressão gênica pelo remodelamento da cromatina e pode regular a diferenciação tumoral. Interessantemente, *SATB2* foi relatado como um biomarcador prognóstico em pacientes com carcinoma de laringe de estadiamento avançado. Esse estudo valida achados anteriores em NSCLC e sugere o potencial envolvimento de *SATB2* na tumorigênese de carcinomas pulmonares.

Palavras-chave: Expressão Gênica, Biomarcadores, Câncer de Pulmão

ABSTRACT

MORALES, J.A.P. Identification of alterations in gene expression in non-small cell lung cancer. 2016. **Dissertation – Biosciences Institute of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.**

Lung Cancer is a leading cause of cancer-related deaths, worldwide. Despite the currently available treatments, patient survival rates within 5 years remain approximately 15%. Recent advances in treatment strategies included the development of therapies with molecular targets, such as the tyrosine kinase inhibitors (TKI) for Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). However, TKI benefit only a fraction of patients with specific histological subtypes of lung cancer. Therefore, the identification of novel, clinically useful targets is urgently needed. The objective of this study is to validate a subset of cancer-related genes in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). Primary tumors and histologically normal adjacent lung tissues were obtained from 28 patients who underwent surgical treatment at Botucatu Clinical Hospital, Botucatu, SP. Frozen sections were subjected to RNA extraction and cDNA was synthesized using standard protocols. Gene expression analyzes were performed by quantitative real-time RT-PCR in the QuantStudio 12K system (Life Technologies) for the following genes: *EGFR*, *K-RAS*, *NOTCH1*, *SATB2* and *ZEB1*. Relative gene expression quantification was performed using the Delta Delta CT method, the data was normalized using the endogenous genes *B2M* and *RPS13*. Statistical analysis was performed using Wilcoxon paired non-parametric test (GraphPadPrisma v.6.0 software) with statistical significance defined as $p < 0.05$. Over-expression was detected in tumors compared to normal lung samples, as follows: *EGFR* ($p < 0.0001$), *K-RAS* ($p < 0.0001$), *SATB2* ($p < 0.0001$), *NOTCH1* ($p = 0.027$), and *ZEB1* ($p = 0.035$). This study confirms that cancer-related genes (*EGFR*, *K-RAS*, *ZEB1*, *NOTCH1*) are significantly over-expressed in lung cancer samples compared to normal samples. Additionally, *SATB2*, which have not been previously associated with lung tumorigenesis, was detected as over-expressed. *SATB2* regulates gene expression through chromatin structure changes and is suggested to regulate tumor differentiation. Interestingly, *SATB2* has been shown as a prognostic biomarker in patients with advanced laryngeal carcinoma. Our study validates previous findings in NSCLC and highlights the potential involvement of *SATB2* in lung tumorigenesis.

Key-words: Gene Expression, Biomarkers, Lung Cancer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivos Específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes.....	14
3.2. Amostras de pacientes com carcinomas pulmonares	14
3.3. Extração de RNA.....	15
3.4. Síntese de cDNA	15
3.5. Análise da expressão gênica	16
3.6. Teste de eficiência dos primers	17
3.7. Reação da PCR quantitativa em tempo real (RT-QPCR).....	18
3.8. Análise dos dados	18
4. RESULTADOS.....	19
5. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
6. LISTA DE ABREVIATURAS	28
7. BIBLIOGRAFIA.....	29

1. INTRODUÇÃO

Carcinoma Pulmonar: O câncer de pulmão é um dos tipos de câncer mais frequentemente diagnosticados e a principal causa de mortalidade por câncer, mundialmente. Devido a presença de sintomas pouco evidentes e falta de estratégias de prevenção, o diagnóstico da doença é geralmente tardio, dificultando o sucesso do tratamento.¹

O carcinoma pulmonar é classificado em dois grupos histológicos principais: o carcinoma pulmonar de células pequenas (da sigla em inglês SCLC, *Small Cell Lung Carcinoma*) (~15% dos casos) e o carcinoma pulmonar de células não pequenas (da sigla em inglês NSCLC, *Non-Small Cell Lung Carcinoma*) (~85% dos casos). Esses grupos histológicos diferem-se pois se originam de células diferentes, determinam processos patológicos distintos e os processos de tumorigênese associados a esses tumores compreendem diferentes vias moleculares.² O SCLC se origina de células neuroendócrinas constituindo um tumor mais agressivo e de pior prognóstico.^{3; 4} O NSCLC se origina de células epiteliais e compreende uma variedade de subtipos histológicos, entre eles os mais frequentes são o adenocarcinoma (AD), o carcinoma de células escamosas (CEC) e o carcinoma de grandes células (LCC), nessa ordem. Recentemente, os adenocarcinomas foram classificados em subtipos com padrões histológicos predominantes: lepidico, acinar, acinar com componente lepidico, sólido, papilar e micropapilar, sendo esse último relacionado com pior prognóstico dos pacientes.⁵ A identificação dos subtipos histológicos tornou-se importante para o direcionamento das estratégias de tratamento, pois novas estratégias de terapias com alvos moleculares utilizam informações de biomarcadores específicos de cada subtipo histológico de doença.¹

Cerca de 85% dos carcinomas pulmonares estão associados ao consumo excessivo de tabaco, enquanto 15% dos casos ocorrem em fumantes leves (menos de 100 cigarros ao longo

da vida), ex-fumantes e não fumantes.⁶ Dentre os ex-fumantes, estes representam mais de 50% dos casos recém diagnosticados em países desenvolvidos como os Estados Unidos.⁶ Dessa forma, é importante o entendimento da etiologia da doença nos diversos grupos que são acometidos, bem como desenvolver estratégias de prevenção e tratamento eficazes.

As principais estratégias de tratamento para pacientes diagnosticados com NSCLC compreendem a cirurgia, quimioterapia ou radioterapia. Em geral, a prática clínica somente detecta 20% dos casos em estágios iniciais da doença, no qual a cirurgia resulta em cura em aproximadamente 70% desses casos.⁷ Entretanto, a maioria dos pacientes com NSCLC são diagnosticados com doença em estadiamento avançado e são elegíveis apenas a tratamentos incluindo quimioterapia citotóxica ou terapias com alvos moleculares, quando existentes.⁸

Alterações genéticas associadas aos carcinomas pulmonares: O entendimento das alterações moleculares envolvidas em câncer de pulmão e suas variações entre os diferentes subtipos histológicos tem permitido o desenvolvimento de terapias específicas. Certas alterações genéticas são comumente encontradas em carcinomas pulmonares, assim, esses achados podem ser aplicados à prática clínica como biomarcadores para a detecção da doença, avaliação de risco, terapia direcionada ou alvos terapêuticos para inibir seletivamente o crescimento de células tumorais.⁶

Algumas alterações genéticas são comumente encontradas em carcinomas pulmonares. Alguns dos oncogenes comumente ativos em NSCLC incluem *EGFR*, *K-RAS*, *MYC*, *PI3K/AKT/mTOR*, *ERBB2*, *MET*, *BCL2*. Alguns supressores tumorais comumente inativados incluem *TP53*, *RB1*, *STK11*, *PTEN*.

O receptor tirosina-quinase (TK) do EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) apresenta expressão aumentada ou ativação anormal em 50% a 90% dos NSCLC, principalmente do subtipo histológico adenocarcinoma. Dessa forma, vários estudos foram conduzidos com o objetivo de desenvolver inibidores para esse alvo.^{6;9} Mutações no domínio

TK do *EGFR* estão presentes preferencialmente em AD; mutações no domínio extracelular do EGFR são raras e encontradas principalmente no subtipo histológico CEC.^{10; 11} As mutações no domínio TK resultam em ativação constitutiva da proteína EGFR como resultado da desestabilização da auto inibição conformacional do receptor, levando à proliferação celular descontrolada.¹² O tratamento para pacientes com tumores contendo mutações em *EGFR* evoluiu nos últimos anos com o desenvolvimento dos inibidores TK erlotinibe e gefitinibe.^{13; 14; 15}

Mutações no proto-oncogene *K-RAS* ocorrem em aproximadamente 20% dos carcinomas pulmonares, especialmente adenocarcinomas em pacientes com histórico de tabagismo. No carcinoma de células escamosas, a mutação está presente em menos de 5% dos tumores.^{6; 16; 17} Da mesma forma que em mutações em *EGFR*, *K-RAS* pode existir em uma forma mutada, na qual uma ativação constitucional leva a proliferação celular aumentada e imortalidade.¹²

Em carcinomas pulmonares, outra via importante de sinalização é a PI3K/AKT/mTOR, cuja ativação ocorre em etapas iniciais do desenvolvimento tumoral, resultando no aumento da proliferação e diferenciação celular bem como na inibição da apoptose.¹⁸ A via PI3K/AKT/mTOR pode ser ativada por vários receptores do tipo TK, incluindo EGFR, e pode ser inibida por PTEN. Estudos tem sido conduzidos com inibidores da via PI3K/AKT/mTOR, os mesmos tem mostrado resultados satisfatórios em NSCLC e SCLC em presença de *AKT* ativado.^{6; 19; 20; 21; 22; 23; 24} Outra mutação frequente é a inativação do gene supressor tumoral *TP53*, presente em ~ 50% dos tumores de pacientes com NSCLC (AD e CEC).³

Terapia alvo-molecular em carcinomas pulmonares: O desenvolvimento de métodos moleculares avançados permitiu a identificação de biomarcadores envolvidos em vias de sinalização condutoras da tumorigênese pulmonar. Dentre os biomarcadores identificados,

muitos genes e proteínas foram associados ao prognóstico ou predição de resposta a um ou mais agentes terapêuticos. Dessa forma, biomarcadores são potencialmente úteis para a genotipagem de tumores, direcionando as estratégias de tratamento. Acredita-se que a utilização de terapias mais precisas aumentará as chances de obtenção de resposta ao tratamento, levando a um aumento na sobrevida de pacientes com câncer.

2. OBJETIVOS

Identificação e validação de biomarcadores em carcinoma pulmonar de células não-pequenas.

2.1. Objetivos Específicos

- Identificar alterações na expressão de um painel de genes em NSCLC;
- Correlacionar os resultados com os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto faz parte da linha de pesquisa em genética dos carcinomas pulmonares, liderada pela Dra. Patricia P. Reis. O trabalho visa validar a expressão de um conjunto de genes identificados como alterados em um estudo anterior do grupo intitulado “Biomarcadores prognósticos em carcinoma pulmonar de células não pequenas: identificação de alvos terapêuticos potenciais” e apoiado pela FAPESP (Processo 2011/13213-7). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo CEP # 4319/2012).

O estudo foi conduzido utilizando amostras (previamente coletadas e armazenadas no laboratório de pesquisa) de tumores ressecados cirurgicamente para o tratamento de pacientes diagnosticados com NSCLC, dos subtipos histológicos adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e outros subtipos menos frequentes de carcinoma pulmonar, como o tumor carcinoide, sarcoma sinovial pulmonar e carcinoma de células claras. Os pacientes são provenientes do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCB – FMB, UNESP). Os dados clínicos e histopatológicos foram coletados em colaboração com a equipe clínica-cirúrgica (Drs. Erica Hasimoto, Daniele Cataneo e Antônio Cataneo) e patologista (Dr. Júlio Defaveri) envolvidos nessa pesquisa.

3.1. Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes

Os critérios de inclusão foram: indivíduos maiores de 18 anos, capazes de entender o estudo e fornecer o consentimento informado; diagnóstico de carcinoma pulmonar; pacientes submetidos à biopsia para fins de diagnóstico ou cirurgia para fins de tratamento primário da doença, não sendo tratados previamente com quimioterapia ou radioterapia; com tumores de qualquer localização anatômica nos pulmões e de qualquer estadiamento e grau histológico. Os critérios de exclusão foram: pacientes com doença metastática pulmonar ou à distância, acometendo outros órgãos, pacientes apresentando comorbidades tais como diabetes ou em grave estado de saúde apresentando caquexia.

3.2. Amostras de pacientes com carcinomas pulmonares

As amostras utilizadas para análise da expressão gênica foram tecidos congelados provenientes de tumores e tecido histologicamente normal adjacente de 28 pacientes (13 CEC, 10 AD, 1 carcinoma misto (CEC/AD) e 4 pacientes com outros subtipos de tumores pulmonares, sendo 2 tumores do subtipo carcinoide, 1 sarcoma sinovial pulmonar e 1

carcinoma de células claras). As amostras foram submetidas à análise de congelação, para confirmar a histologia tumoral ou normal e subsequentemente congeladas em freezer a -80°C.

3.3. Extração de RNA

As amostras de tecido tumoral e normal foram cortadas (50-100mg), maceradas em nitrogênio líquido e imersas em 1 mL de trizol em tubos eppendorf de 2,0 mL e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguido da centrifugação a 12.000g por 15 minutos, resultando na separação de três fases: fase inferior (fenol-clorofórmio), interfase (resíduo do congelamento e proteínas) e sobrenadante (fase aquosa contendo ácidos nucleicos). A seguir, a fase aquosa foi transferida para outro tubo eppendorf, estéril e livre de RNase e foi adicionado um volume de 500 µL de isopropanol para precipitação do RNA. A seguir, foi realizada a purificação do RNA utilizando *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas utilizando *NanoDrop 8000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e posteriormente armazenadas em freezer a -80 °C até o seu uso para análise molecular.

3.4. Síntese de cDNA

A metodologia da Transcrição Reversa utilizou o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). Basicamente, 1µg de RNA foi adicionado à 10µL da reação 2X *RT Master Mix*, que contém 2µL de 10X *RT Buffer*, 0,8µL de 25X *dNTP Mix* (100mM), 2µL de 10X *RT Random Primers*, 1µL de *MultiScribeTM Reverse Transcriptase* e 4,2µL de *Nuclease-free water*, fornecidos pelo kit. A reação foi incubada em termociclador nas seguintes condições: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C. Após o término da reação, as amostras de cDNA foram imediatamente

congeladas e mantidas em freezer a -20°C. Controles negativos foram incluídos em cada reação de síntese de cDNA, para garantir a ausência de contaminação. Adicionalmente, um RNA de alta qualidade disponível comercialmente - *Universal Reference RNA* (Agilent Technologies) foi utilizado como controle positivo em todas as reações.

3.5. Análise da expressão gênica

Analizamos a expressão de um painel de 5 genes: *NOTCH1*, *SATB2*, *ZEB1*, *EGFR*, *K-RAS*. A maioria desses genes foram previamente descritos como associados a carcinomas pulmonares de células não-pequenas, tais como *EGFR*, *K-RAS*, *NOTCH1* e *ZEB1*, entretanto não há dados extensos de caracterização da expressão desses genes em tumores de pacientes brasileiros. Assim, nosso objetivo foi verificar alterações na expressão gênica em tumores de pacientes atendidos no HCB – FMB, UNESP, Botucatu, SP. Adicionalmente, alguns genes, como o *SATB2*, ainda não foram associados com carcinoma pulmonar e nosso objetivo foi investigar se há alterações na expressão de *SATB2* em carcinomas pulmonares comparado com tecidos pulmonares normais dos mesmos pacientes.

A seleção dos controles endógenos mais estáveis em tecido pulmonar normal e tumoral foi realizada previamente em outros projetos do grupo. Nessa etapa, foi utilizado o programa *LinReg PCR*, útil na análise de dados da PCR quantitativa utilizando corantes fluorescentes tais como o SYBR Green I. O programa usa uma linha de base de fluorescência para cada amostra, determina um valor de linearidade e em seguida utiliza uma análise de regressão linear para ajustar uma linha reta (originada a partir do valor do *slope*) a partir do conjunto de dados da quantificação da expressão gênica. Os resultados dessa análise indicaram que os genes endógenos mais estáveis em amostras de tecido normal e tumoral pulmonar foram os genes *RPS13* e *B2M*. Portanto, esses dois genes foram utilizados como controles endógenos nessa pesquisa. Nessa análise, o fator de normalização foi obtido através

da média geométrica dos valores de Ct dos genes controles endógenos. A sequência dos iniciadores ou *primers* utilizados está descrita na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1. Lista dos genes e sequência dos *primers* utilizados.

Gene	Sequência do <i>primer</i>
<i>B2M</i>	F-5'-gtctcgctccgtggccta-3' R-5'-tgaaacccagacacatagcaattc-3'
<i>RPS13</i>	F-5'-ccagtcggctttaccctatcg -3' R-5'-tgtgcaacacccatgtgaatctc -3'
<i>NOTCH1</i>	F-5'-tgcgagaccaacatcaacga-3' R-5'-aagcagaggtaggcggtggtc-3'
<i>SATB2</i>	F-5'-tctccccagcttagtccacaa-3' R-5'-gctaacggcaatctgttggttt-3'
<i>ZEB 1</i>	F-5'-tgtgaatggcgacccaaga-3' R-5'-gtgggactgcctggtgatg-3'
<i>EGFR</i>	F-5'-tccgtgagttgatcatcgaatt-3' R-5'-ccacgtcgtccatgtcttctt-3'
<i>KRAS</i>	F-5'-cattggtgaggagatccga-3' R-5'-agaaggcacatcaacaccca-3'

(F: *forward*; R: *reverse*)

3.6. Teste de eficiência dos *primers*

A eficiência da amplificação de sequências foi calculada a partir da construção de uma curva padrão usando diluições em série de quantidades conhecidas de cDNA em diferentes concentrações do *primer* (50nM, 150nM e 300nM). O modelo de regressão linear de Log(fluorescência) pelo número de ciclos de amplificação pela PCR quantitativa em tempo real (RT-QPCR) foi proposto como um método para calcular a concentração inicial de cDNA e a eficiência da amplificação em cada amostra. Foram utilizadas diluições seriadas (1000, 100, 10, 1 e 0,1 µg/µL) de cDNA de dois pools, cada um composto por pelo menos 10 amostras de tecido pulmonar normal (N) e tumoral (T), respectivamente. Os pools de cDNA foram testados em duplicata, nas reações de amplificação. O teste determinou a melhor concentração para a reação de amplificação para cada *primer* (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração determinada para cada *primer* na reação de amplificação, obtida pelo teste de eficiência dos primers.

Primer	Concentração utilizada na reação
<i>B2M</i>	50 nM
<i>RPS13</i>	50 nM
<i>NOTCH1</i>	50 nM
<i>SATB2</i>	300 nM
<i>ZEB 1</i>	50 nM
<i>EGFR</i>	300 nM
<i>KRAS</i>	300 nM

3.7. Reação da PCR quantitativa em tempo real (RT-QPCR)

O protocolo de amplificação utilizou mix de reação contendo 10 μ M de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 3,15 μ L de Power SYBR Green (Applied Biosystems, Warrington, UK) e ddH₂O livre de DNase/RNase (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). 1 μ L de cDNA sintetizado de acordo com o protocolo de transcrição reversa foi adicionado a cada reação.

Os dados de expressão gênica foram obtidos a partir da amplificação das amostras de RNA pela metodologia da RT-QPCR com o corante fluorescente SYBR Green I. O equipamento utilizado foi o *QuantStudio 12K* (Life Technologies). Curvas de dissociação foram incluídas em todas as amplificações para assegurar a produção de produtos específicos. Os valores de Ct (*threshold cycle*) gerados foram exportados para posterior análise dos dados (determinação da expressão gênica).

3.8. Análise dos dados

A expressão gênica foi avaliada para 28 amostras pareadas (Tumor e Normal) totalizando 56 amostras. A quantificação relativa da expressão gênica foi calculada pelo método DeltaDelta Ct.²⁷

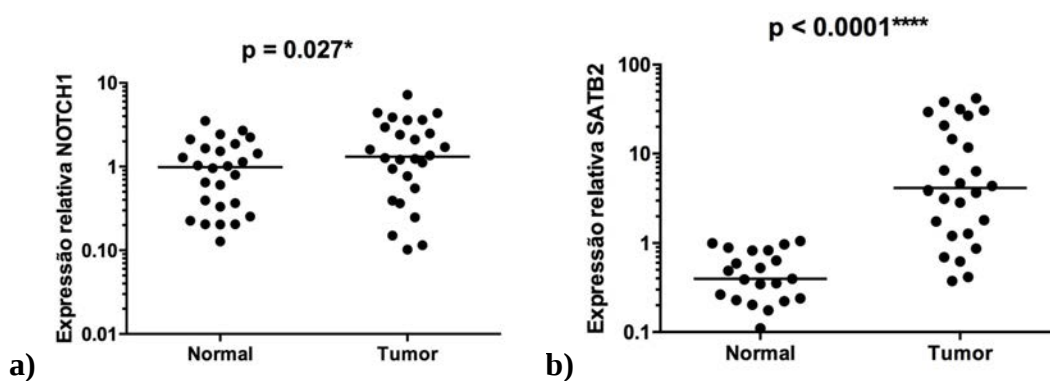
Análises estatísticas foram realizadas a fim de correlacionar os dados de expressão gênica com os dados histopatológicos. A análise pareada não paramétrica (Teste de Wilcoxon) foi utilizada para comparação entre os grupos, utilizando o software GraphPad

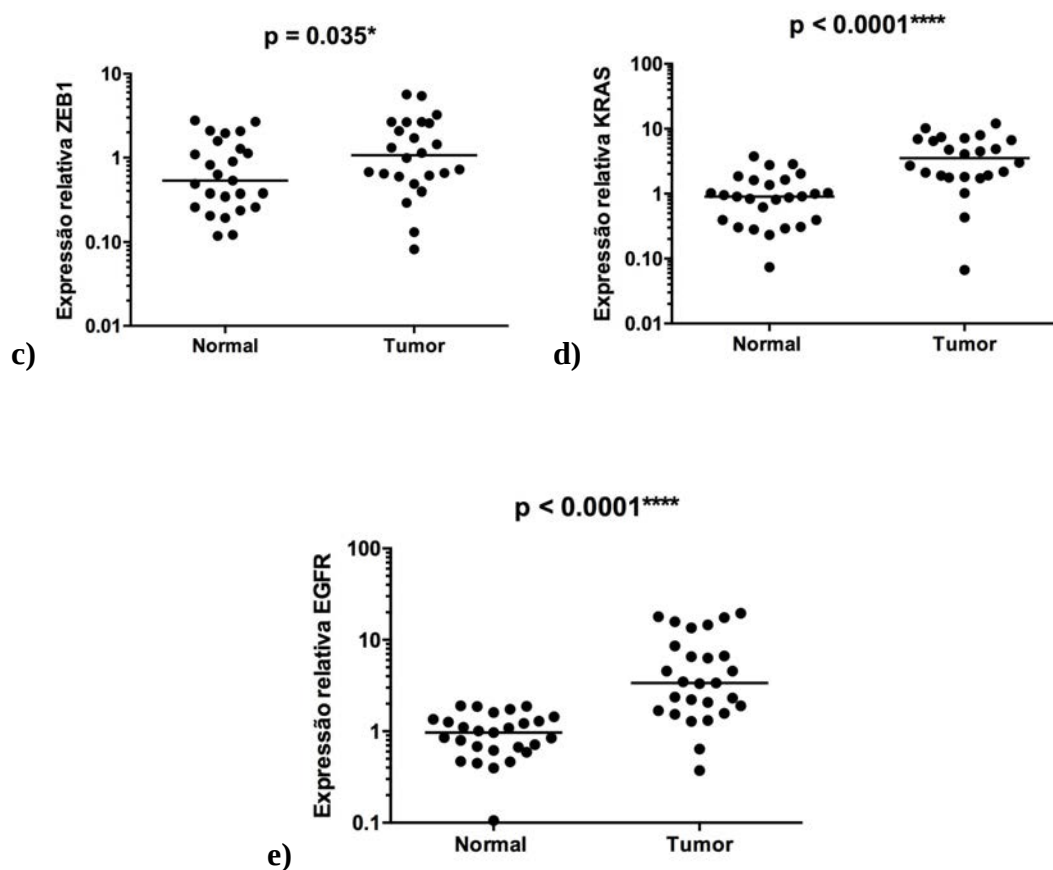
Prisma versão 6.0 para Windows. A expressão gênica relativa foi analisada em relação aos grupos histológicos CEC (carcinoma de células escamosas), AD (adenocarcinoma) e Outros (demais tipos histológicos). A significância estatística foi definida como $p < 0.05$. As análises foram realizadas em colaboração com o Dr. Rogério Oliveira, Departamento de Bioestatística – Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP.

4. RESULTADOS

A Figura 1 mostra os níveis de expressão gênica relativa ($\log_{10}$) em amostras tumorais comparadas a normais. Dos 5 genes analisados, todos estavam com expressão significativamente ($p < 0.05$) aumentada entre tumor e normal.

Figura 1. Gráficos representativos da expressão gênica relativa ($\log_{10}$) em tumor vs normal. Os dados são apresentados para todos os tumores independentemente do subtipo histológico. Variações nos níveis de expressão gênica são mostradas (Gráficos 1a-e) ($p < 0.05$, Wilcoxon test, GraphPad Prism software).





Adicionalmente, os dados de expressão gênica foram analisados de acordo com o tipo histológico (CEC vs AD vs Outros) (Figuras 2-6).

Figura 2. Gráficos representativos da expressão gênica relativa (log10) do gene *NOTCH1* nos diferentes grupos histológicos, sendo que o subtipo misto (AD + CEC) foi incluído em “Outros”. Variações estatisticamente significativas nos níveis de expressão gênica foram detectadas no subtipo histológico CEC (Gráfico 2a) ($p < 0.05$, Wilcoxon test, GraphPad Prism software).

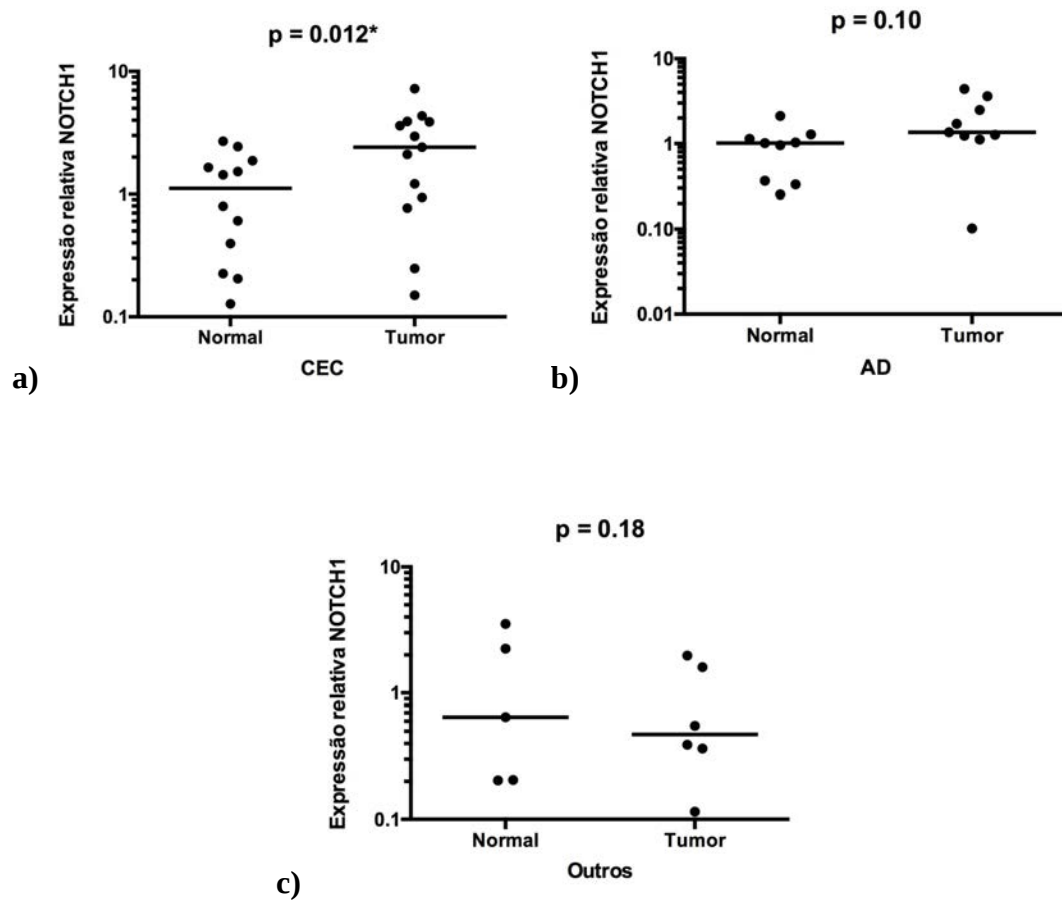
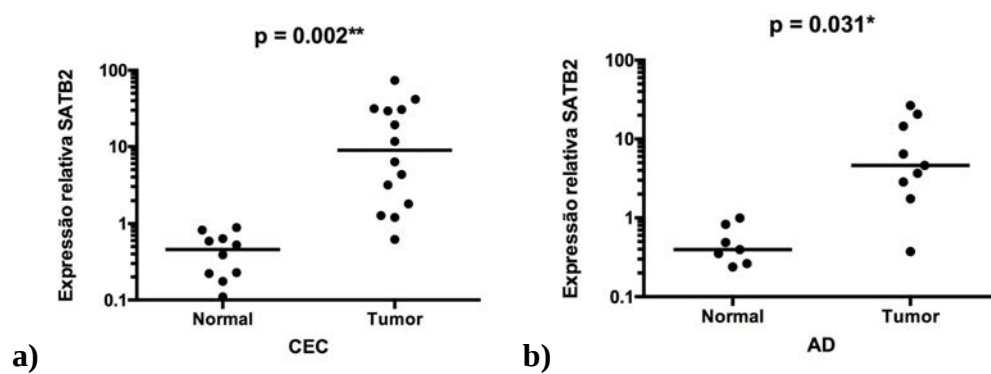


Figura 3. Gráficos representativos da expressão gênica relativa (log₁₀) do gene *SATB2* nos diferentes grupos histológicos, sendo que o subtipo misto (AD + CEC) foi incluído em “Outros”. Variações estatisticamente significativas nos níveis de expressão gênica foram detectadas nos grupos histológicos CEC e AD (Gráficos 3a-b) ($p < 0.05$, Wilcoxon test, GraphPad Prism software).



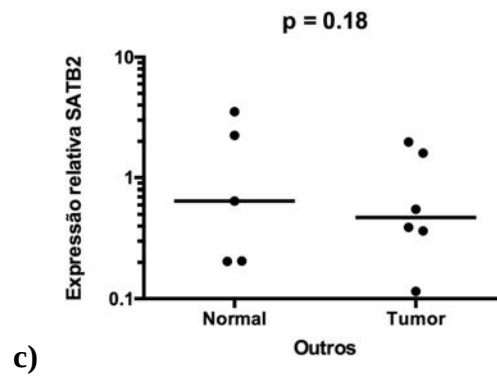


Figura 4. Gráficos representativos da expressão gênica relativa (log10) do gene *ZEB1* nos diferentes subtipos histológicos, sendo que o subtipo misto (AD + CEC) foi incluído em “Outros”. Variações estatisticamente significativas nos níveis de expressão gênica não foram detectadas nos diferentes subtipos histológicos. ($p < 0.05$, Wilcoxon test, GraphPad Prism software).

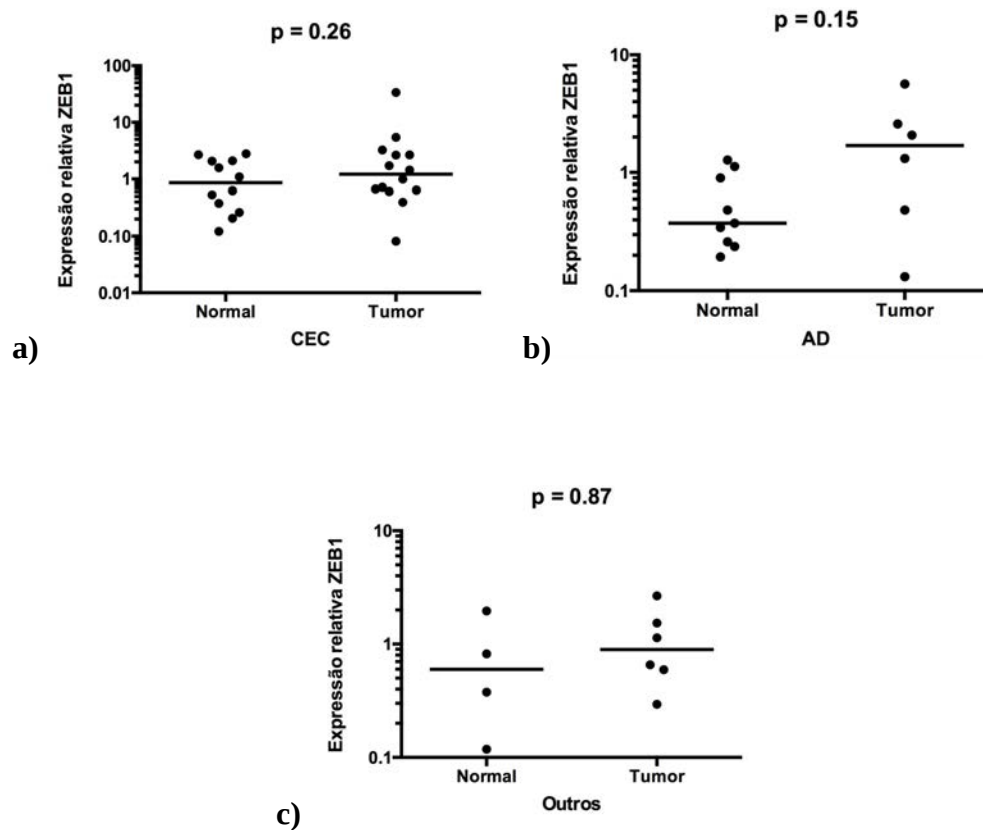


Figura 5. Gráficos representativos da expressão gênica relativa (log10) do gene *K-RAS* nos diferentes subtipos histológicos. Variações estatisticamente significativas nos níveis de expressão gênica foram detectadas entre os subtipos histológicos CEC e AD. (Gráficos 5a-b) ($p < 0.05$, Wilcoxon test, GraphPad Prism software).

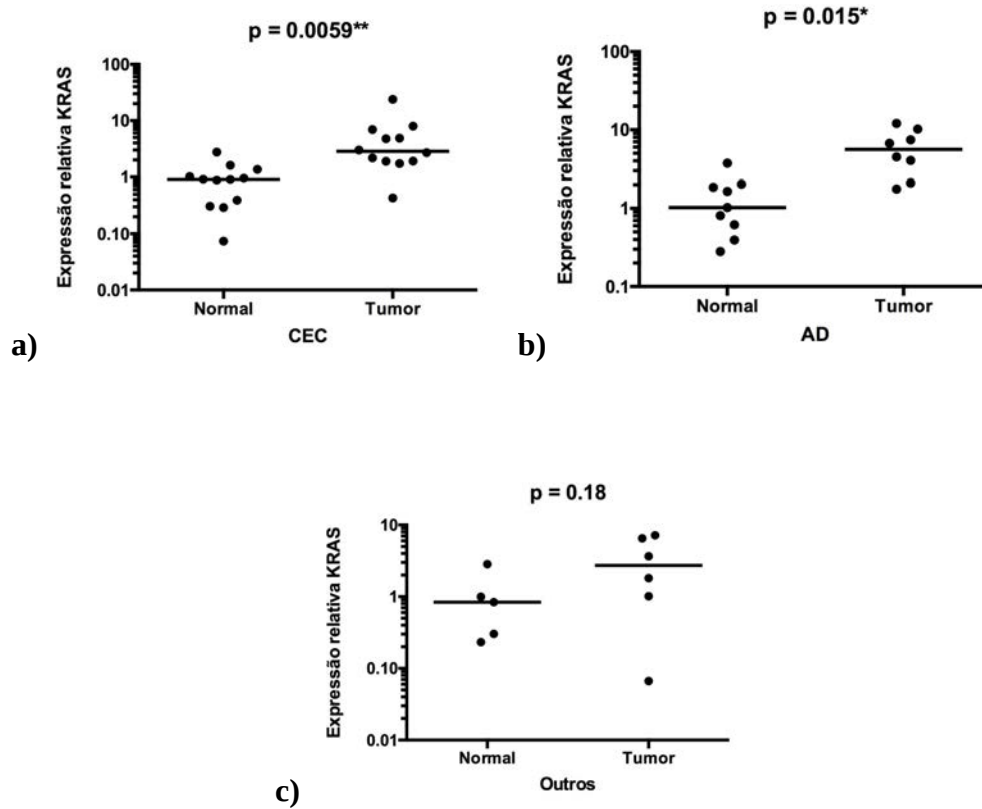
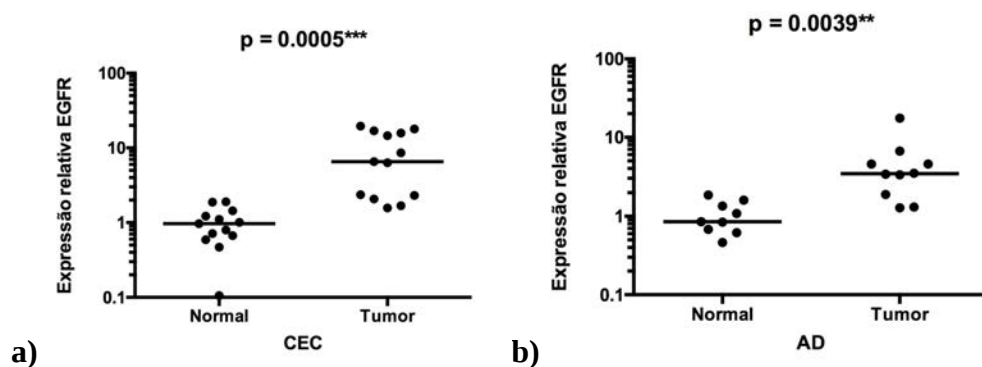
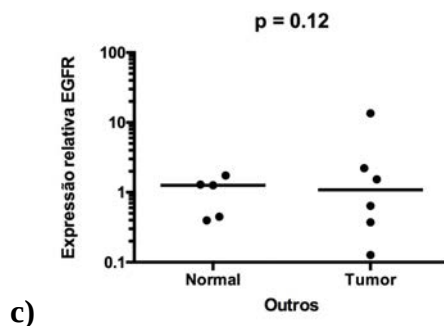


Figura 6. Gráficos representativos da expressão gênica relativa (log10) do gene *EGFR* nos diferentes subtipos histológicos. Variações estatisticamente significativas nos níveis de expressão gênica foram detectadas entre os subtipos histológicos CEC e AD. (Gráficos 6a-b) ($p < 0.05$, Wilcoxon test, GraphPad Prism software).





De acordo com os resultados obtidos, todos os genes apresentaram expressão relativa aumentada nas amostras tumorais comparadas a tecidos normais. Entretanto, a análise da expressão gênica entre os diferentes subtipos histológicos mostrou que apenas alguns genes estavam diferencialmente expressos entre os subtipos histológicos AD e CEC.

Adicionalmente, a expressão de *EGFR* e *K-RAS*, os quais estão frequentemente associados com NSCLC, embora detectada em todas as comparações (Tumor vs. Normal e Adeno vs. CEC), não foi detectada no grupo “Outros”, provavelmente devido ao pequeno número de amostras nesse subgrupo.

5. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O painel de genes analisado nesse trabalho permitiu a validação de alterações na expressão gênica em genes previamente descritos como associados ao câncer de pulmão, como *EGFR*, *K-RAS*, *NOTCH1*, *ZEB1* e, também, detectou alterações na expressão gênica em *SATB2*, gene até então não relatado como associado a carcinomas pulmonares.

O gene *EGFR* é amplamente descrito na literatura por sua associação com câncer de pulmão, especialmente NSCLC, inclusive a identificação de padrões de mutação em *EGFR* em pacientes permitiu o desenvolvimento de terapias alvo específicas para a inibição de sua atividade tirosina quinase.

O EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) consiste em um receptor transmembrana membro das proteínas quinases. A via de sinalização que envolve esse gene desempenha função em diversos processos celulares, tais como proliferação, adesão, migração e invasão.²⁸ Mutações em *EGFR* levam à ativação constitutiva do receptor, resultando em proliferação celular descontrolada.¹² O presente trabalho identificou expressão relativa aumentada de *EGFR* em tecidos primário de NSCLC, incluindo CEC e AD, corroborando os dados descritos na literatura.

O gene *K-RAS* (oncogene viral *K-RAS* de sarcoma de rato *Kirsten*) codifica uma proteína membro das pequenas GTPases e sua forma mutada está associada a vários tipos de câncer, incluindo o adenocarcinoma pulmonar. Mutações levam a uma ativação constitutiva do *K-RAS* e consequente ativação de seus efetores *downstream*, como as vias de sinalização RAF/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR²⁸, levando à proliferação celular descontrolada. A expressão aumentada de *K-RAS* em NSCLC, validada nesse trabalho corrobora o papel desse gene na tumorigênese pulmonar. Os membros da família *NOTCH* estão envolvidos em uma variedade de processos de desenvolvimento e controle do destino da célula. O gene *NOTCH1* codifica receptores transmembrana, cuja ativação promove crescimento celular e proliferação^{29; 30} Estudos demonstram o papel do *NOTCH1* em diversos tipos de câncer, entretanto seu papel na tumorigênese é complexo, uma vez que sua sinalização pode apresentar papel duplo, tanto na promoção quanto na inibição tumoral. Em câncer de pulmão, foi demonstrado que a expressão positiva de *NOTCH1* tem efeitos tumorais inibitórios, diminuindo a proliferação celular via apoptose em linhagens de carcinomas de células pequenas (SCLC) e linhagens de carcinomas de células não pequenas (NSCLC) do subtipo histológico adenocarcinoma (AD).²⁹

Ainda, a inibição da via no *NOTCH1* em AD e SCLC levou ao aumento da proliferação celular²⁹, enquanto outros estudos demonstraram que a sua inibição resultou na

diminuição da proliferação celular de NSCLC.^{29; 31; 32} Esses resultados ressaltam a complexidade da via de sinalização do *NOTCH* e a possibilidade de outros fatores influenciarem o efeito final de sua sinalização.

Os resultados estatisticamente significativos na análise da expressão do gene *NOTCH1* demonstram expressão relativa aumentada em tumores do subtipo CEC, o que sugere que esse gene pode desempenhar um papel oncogênico em CEC pulmonar.

As vias de sinalização envolvendo os genes *NOTCH1*, *EGFR* e *ZEB1* estão implicadas na modulação do processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT), processo no qual as células tumorais perdem a propriedade de adesão celular e adquirem capacidade de migração e invasão. Diversas vias moleculares podem facilitar o processo metastático pela indução da EMT; por exemplo, *NOTCH* induz EMT via ativação por TGF- β (*transforming growth factor- β*);^{33; 34} paralelamente, a ativação de vias moleculares por receptores tirosina quinase, como o *EGFR*, pode induzir EMT via *PI3K*, *MAPK*, *RHOA* e *SRC*.³⁵ Além disso, o fator de transcrição *ZEB1* (*Zinc finger E-box binding homeobox 1*) é regulado por várias vias de sinalização, incluindo a via do TGF- β , que também possui papel efetor da EMT.³⁵

O gene *ZEB1* codifica um fator de transcrição que promove invasão tumoral e metástase por meio da EMT em células tumorais.³⁶ A expressão anormal de *ZEB1* foi identificada em diversos tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão.^{36; 37; 38} Adicionalmente, estudos em linhagens celulares tumorais corroboram que a expressão aumentada de *ZEB1* induz EMT e promove metástase.^{36; 39}

A expressão aumentada de *ZEB1* em amostras tumorais comparadas a normais, como demonstrada nesse trabalho, pode representar a associação entre *ZEB1* e EMT. Entretanto, a ausência de significância estatística entre os diferentes subtipos histológicos de carcinomas pulmonares pode ser justificada pela expressão aumentada de *ZEB1* ser mais frequente em

carcinomas pobremente diferenciados (carcinomas de grandes células e carcinomas pleomórficos).³⁸

Outro fator de transcrição que recentemente tem sido descrito por seu papel no desenvolvimento do câncer é o *SATB2*. O *SATB2* (*special AT-rich sequence binding protein 2*) é um membro da família dos fatores de transcrição *SATB* e está envolvido com a regulação da expressão gênica por meio do remodelamento da cromatina.^{40; 41}

SATB2 foi descrito como altamente expresso em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço de estadiamento avançado e correlacionado com a quimiorresistência⁴² e em carcinomas de mama associado a um pior prognóstico das pacientes.⁴³ Em contraste, *SATB2* também pode estar envolvido com o desenvolvimento e progressão de carcinomas de laringe apresentando um papel de supressor tumoral.⁴⁴ Ainda, em carcinomas de esôfago, a expressão diminuída de *SATB2* é indicativa de baixa sobrevida.⁴⁰ No presente estudo, evidenciou-se a expressão aumentada de *SATB2* em amostras tumorais. Esses dados sugerem que mais estudos são necessários a fim de compreender o papel do gene no desenvolvimento tumoral.

Desta forma, concluímos que os genes *EGFR*, *K-RAS* e *NOTCH1* apresentam expressão relativa aumentada em amostras NSCLC nas amostras de estudo. O gene *ZEB1* não apresenta variação estatisticamente significativa entre os grupos CEC e AD, porém estudos de estadiamento tumoral são necessários a fim de compreender o envolvimento desse gene na progressão tumoral. Adicionalmente, a expressão relativa aumentada de *SATB2* em amostras NSCLC demonstra o possível envolvimento desse gene no processo tumoral pulmonar, configurando-se como um possível biomarcador.

6. LISTA DE ABREVIATURAS

AD: adenocarcinoma

AKT: *AKT serine/threonine kinase 1*

B2M: *beta-2-microglobulin*

BCL2: *B-cell CLL/lymphoma 2*

CEC: carcinoma de células escamosas

EGFR: *epidermal growth factor*

EMT: *epithelial-mesenchymal transition*

ERBB2: *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*

K-RAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LCC: *large cell carcinoma*

MET: *mesenchymal-epithelial transition factor*

MYC: *myelocytomatosis oncogene*

NOTCH1: *Notch homolog 1*

NSCLC: *non-small cell lung cancer*

PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

RB1: *Retinoblastoma 1*

RPS13: *ribosomal protein S13*

RT-QPCR: *real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*

SATB2: *special AT-rich sequence binding protein 2*

SCC: *squamous cell carcinoma*

SCLC: *small-cell lung cancer*

STK11: *serine/threonine kinase 11*

TGF- β : *transforming growth factor- β*

TK: *tyrosine kinase*

TKI: *tyrosine kinase inhibitor*

TP53: *tumor protein P53*

ZEB1: *zinc-finger E-box binding homeobox 1*

7. BIBLIOGRAFIA

- ¹ GRIDELLI, C. et al. **Non-small-cell lung cancer:** Nature Reviews. 1 2015.
- ² WU KE, W. E., CHAUDHRY SULTAN. Lung Cancer. McMaster Pathophysiology Review (MPR), Disponível em: < <http://www.pathophys.org/lung-cancer/> >.
- ³ HERBST, R. S.; HEYMACH, J. V.; LIPPMAN, S. M. Lung cancer. **N Engl J Med**, v. 359, n. 13, p. 1367-80, Sep 2008. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18815398> >.
- ⁴ PH, D. R.; M, Z. Tratamento atual do câncer de pulmão não pequenas células avançado. In: (Ed.). **Prática Hospitalar**, 2007. p.93-98.
- ⁵ TRAVIS, W. D.; BRAMBILLA, E.; RIELY, G. J. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 8, p. 992-1001, Mar 2013. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401443> >.
- ⁶ LARSEN, J. E.; MINNA, J. D. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. **Clin Chest Med**, v. 32, n. 4, p. 703-40, Dec 2011. ISSN 1557-8216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22054881> >.
- ⁷ H, D.; ROSEMBERG'S. Cancer Principles & Practice of Oncology. In: (Ed.). Jett DEMaJr, 2011. cap. Screening for lung cancer, p.625.
- ⁸ GUIDELINES), N. C. P. G. I. O. N. **Non-small cell lung cancer**. 4.2014.
- ⁹ HIRSCH, F. R. et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 20, p. 3798-807, Oct 2003. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12953099> >.
- ¹⁰ SCAGLIOTTI, G. V. et al. The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 12 Pt 2, p. 4227s-4232s, Jun 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217963> >.

- 11 SHARMA, S. V. et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 3, p. 169-81, Mar 2007. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17318210> >.
- 12 SUDHINDRA, A.; OCHOA, R.; SANTOS, E. S. Biomarkers, prediction, and prognosis in non-small-cell lung cancer: a platform for personalized treatment. **Clin Lung Cancer**, v. 12, n. 6, p. 360-8, Nov 2011. ISSN 1938-0690. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21729648> >.
- 13 LYNCH, T. J. et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **N Engl J Med**, v. 350, n. 21, p. 2129-39, May 2004. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15118073> >.
- 14 PAEZ, J. G. et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. **Science**, v. 304, n. 5676, p. 1497-500, Jun 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15118125> >.
- 15 PAO, W. et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 36, p. 13306-11, Sep 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15329413> >.
- 16 DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11-22, Jan 2003. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509763> >.
- 17 KARNOUB, A. E.; WEINBERG, R. A. Ras oncogenes: split personalities. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 7, p. 517-31, Jul 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568040> >.
- 18 LIU, P. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 8, p. 627-44, Aug 2009. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644473> >.
- 19 VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489-501, Jul 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12094235> >.
- 20 WEST, K. A. et al. Tobacco carcinogen-induced cellular transformation increases activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway in vitro and in vivo. **Cancer Res**, v. 64, n. 2, p. 446-51, Jan 2004. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744754> >.
- 21 HAY, N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. **Cancer Cell**, v. 8, n. 3, p. 179-83, Sep 2005. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169463> >.
- 22 MAULIK, G. et al. Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer. **J Cell Mol Med**, v. 6, n. 4, p. 539-53,

- 2002 Oct-Dec 2002. ISSN 1582-1838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12611639> >.
- 23 BROGNARD, J. et al. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. **Cancer Res**, v. 61, n. 10, p. 3986-97, May 2001. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358816> >.
- 24 TSURUTANI, J. et al. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway but not the MEK/ERK pathway attenuates laminin-mediated small cell lung cancer cellular survival and resistance to imatinib mesylate or chemotherapy. **Cancer Res**, v. 65, n. 18, p. 8423-32, Sep 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166321> >.
- 25 TSAO, M. S. et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. **N Engl J Med**, v. 353, n. 2, p. 133-44, Jul 2005. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16014883> >.
- 26 SEQUIST, L. V. et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 15, p. 2442-9, May 2008. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458038> >.
- 27 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.
- 28 CARDARELLA, S.; JOHNSON, B. E. The impact of genomic changes on treatment of lung cancer. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 188, n. 7, p. 770-5, Oct 2013. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23841470> >.
- 29 WAEL, H. et al. Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. **Lung Cancer**, v. 85, n. 2, p. 131-40, Aug 2014. ISSN 1872-8332. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24888228> >.
- 30 RIZZO, P. et al. Rational targeting of Notch signaling in cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 38, p. 5124-31, Sep 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18758481> >.
- 31 SULLIVAN, J. P. et al. Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling. **Cancer Res**, v. 70, n. 23, p. 9937-48, Dec 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21118965> >.
- 32 JI, X. et al. Inhibition of cell growth and induction of apoptosis in non-small cell lung cancer cells by delta-tocotrienol is associated with notch-1 down-regulation. **J Cell**

- Biochem**, v. 112, n. 10, p. 2773-83, Oct 2011. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21598300> >.
- 33 YANG, J.; WEINBERG, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. **Dev Cell**, v. 14, n. 6, p. 818-29, Jun 2008. ISSN 1878-1551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539112> >.
- 34 ZAVADIL, J. et al. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. **EMBO J**, v. 23, n. 5, p. 1155-65, Mar 2004. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976548> >.
- 35 JAKOBSEN, K. R. et al. The role of epithelial to mesenchymal transition in resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. **Transl Lung Cancer Res**, v. 5, n. 2, p. 172-82, Apr 2016. ISSN 2218-6751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186512> >.
- 36 ZHANG, P.; SUN, Y.; MA, L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. **Cell Cycle**, v. 14, n. 4, p. 481-7, 2015. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25607528> >.
- 37 ZHANG, J. et al. Involvement of ZEB1 and E-cadherin in the invasion of lung squamous cell carcinoma. **Mol Biol Rep**, v. 40, n. 2, p. 949-56, Feb 2013. ISSN 1573-4978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065281> >.
- 38 MATSUBARA, D. et al. Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer. **Pathol Int**, v. 64, n. 11, p. 560-8, Nov 2014. ISSN 1440-1827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25347933> >.
- 39 LIU, Y. et al. Zinc finger E-box binding homeobox 1 promotes invasion and bone metastasis of small cell lung cancer in vitro and in vivo. **Cancer Sci**, v. 103, n. 8, p. 1420-8, Aug 2012. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632166> >.
- 40 GENG, G. J. et al. Prognostic value of SATB2 expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 1, p. 423-31, 2015. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755730> >.
- 41 DOBREVA, G.; DAMBACHER, J.; GROSSCHEDL, R. SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression. **Genes Dev**, v. 17, n. 24, p. 3048-61, Dec 2003. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14701874> >.
- 42 CHUNG, J. et al. SATB2 augments Δ Np63 α in head and neck squamous cell carcinoma. **EMBO Rep**, v. 11, n. 10, p. 777-83, Oct 2010. ISSN 1469-3178. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829881> >.

- ⁴³ PATANI, N. et al. The mRNA expression of SATB1 and SATB2 in human breast cancer. **Cancer Cell Int**, v. 9, p. 18, 2009. ISSN 1475-2867. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19642980>>.
- ⁴⁴ LIU, T. R. et al. Decreased expression of SATB2: a novel independent prognostic marker of worse outcome in laryngeal carcinoma patients. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40704, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22815795>>.