



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM
ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANÁLISE DE CITOCINAS NO SORO DE PACIENTES
COM CÂNCER GÁSTRICO**

Pedro Antônio Mufarrej Hage

BELÉM -
PA 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM
ONCOLOGIA
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

ANÁLISE DE CITOCINAS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO

Autor: Pedro Antônio Mufarrej
Hage Orientador: Profa. Dra. Danielle Queiroz
Calcagno

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Doutor em Oncologia e Ciências Médicas.

PEDRO ANTÔNIO MUFARREJ HAGE

ANÁLISE DE CITOCINAS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Doutor em Oncologia e Ciências Médicas.

Tese de Doutorado apresentado e aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Danielle Queiroz Calcagno
Universidade Federal do Pará
(UFPA) Orientadora

Prof. Dr. Rommel Rodriguez Burbano
Universidade Federal do Pará
(UFPA) Membro

Prof^ª. Dr^ª. Samia Demachki
Universidade Federal do Pará
(UFPA) Membro

Prof. Dr. Fábio Miyajima
Universidade Federal do Ceará
(UFC) Membro

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Danielle Lima de Lima
Universidade do Estado do Pará
(UEPA) Membro

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”. (George
Bernard Shaw)

*Dedico esta tese às Pessoas mais importantes da
minhavidá.*

*Meu Pai Francisco (in memoriam) e minha Mãe
Janete.*

Minha esposa Cláudia e Meu Filho Lucas.

AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a DEUS por ter me dado a oportunidade de realizar e concluir este doutorado.

À minha esposa Cláudia pelo seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, pontos fundamentais para que este trabalho pudesse ter sido concretizado.

Ao meu Filho Lucas razão da minha vida, pela paciência, compreensão e apoio tão amoroso nos momentos em que me dediquei à realização deste Doutorado.

A minha Orientadora Prof. Dra. Danielle Queiroz Calcagno pelo incentivo, paciência e orientação para que eu pudesse realizar esta tese.

Aos doutorandos, mestrandos e estagiários do Núcleo de Pesquisas em Oncologia pela ajuda para que eu pudesse concluir esta tese.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Figura 1 | CEA, CA 19-9, CA 72-4 e AFP utilizados como biomarcadores em diferentes tipos tumorais. | 3 |
| Figura 2 | Células que participam da resposta imune inata e adaptativa. Macrófago, célula dendrítica, célula NK e neutrófilo são as principais células responsáveis pela resposta imune inata. Células B e T são células características da imunidade adaptativa. | 7 |
| Tabela 1 | Principais características e funções das células imunológicas, diferenciando-se do sistema imune inato e adaptativo. | 8 |
| Tabela 2 | Células responsáveis pela produção e função específica de interleucinas. | 12 |
| Figura 3 | Estrutura das quimiocinas baseada na posição do resíduo de cisteína. | 14 |
| Tabela 3 | Células responsáveis pela produção e função específica de quimiocinas. | 15 |
| Tabela 4 | Células responsáveis pela produção e função específica de fatores de crescimento. | 16 |
| Figura 4 | Liberação de citocinas na inflamação pode levar ao desenvolvimento do tumor. | 21 |
| Figura 5 | Etapas do ensaio de expressão de proteínas do sistema MAGPIX. | 30 |
| Tabela 5 | Características de pacientes e controles. | 32 |
| Tabela 6 | Citocinas no soro de controle saudáveis e pacientes com câncer gástrico (mediana \pm desvio interquartilico). | 33 |
| Tabela 7 | Citocinas no soro de controle saudáveis e pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana \pm desvio interquartilico). | 34 |
| Figura 6 | Análise de curva ROC das citocinas IL1 β , IL1RA, IL2, IL6, IL8, IL10, IL12, IL15, GCSF, GMCSF, IFNG, MIP1 α , RANTES e VEGF de controles e pacientes com adenocarcinoma gástrico. | 35 |
| Tabela 8 | Ponto de corte da curva ROC, sensibilidade, especificidade, intervalo de confiança de 95%, área e valor de significância como predição de alterações dos níveis de citocinas em grupos saudáveis e pacientes com adenocarcinoma gástrico. | 38 |
| Quadro 1 | Análise da correlação de Spearman entre as citocinas IL1 β , IL1RA, IL2, IL6, IL8, IL10, IL12, IL15, GCSF, GMCSF, IFNG, MIP1 α , RANTES e VEGF. | 40 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabela 9 | Análise de citocinas IL-17A, IL-1 β , IL-5, IL-1RA, IL-2, IL-4 e IL-5 correlacionada aos dados clinicopatológicos de pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana \pm IQR). | 43 |
| Tabela 10 | Análise de citocinas IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 correlacionadas aos dados clinicopatológicos de pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana \pm IQR). | 44 |
| Tabela 11 | Análise de citocinas IL-13, IL-15, Eotoxin, FGF basic, GCSF, GM-CSF correlacionadas aos dados clinicopatológicos de pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana \pm IQR). | 45 |
| Tabela 12 | Análise de citocinas IFN- γ , IP-10, MPC1, MIP1 α , PDGFbb correlacionadas aos dados clinicopatológicos de pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana \pm IQR). | 46 |
| Tabela 13 | Análise de citocinas MIP1 β , RANTES, TNF- α e VEGF correlacionada aos dados clinicopatológicos dos pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana \pm IQ). | 47 |
| Tabela 14 | Associação de citocinas, OS e PFS em pacientes com câncer gástrico. | 48 |
| Figura 7 | Associação da expressão de citocinas e a sobrevida global de pacientes com câncer gástrico. | 49 |
| Figura 8 | Associação da expressão de citocinas e a sobrevida livre de doença de pacientes com câncergástrico. | 54 |

LISTA DE ABREVEATURAS

| | |
|--------------------------------|--|
| AFP | Alfa-fetoproteína |
| CA 19-9 | Antígeno de carboidrato 19-9 |
| CA 72-4 | Antígeno de carboidrato 75-4 |
| <i>cagA</i> | <i>citotoxina associada ao gene A</i> |
| CEA | Antígeno carcinoembrionário |
| COX-2 | Ciclo-oxigenase-2 |
| CTCs | Células tumorais circulantes |
| DNA | Acido desoxirribonucléico |
| EGF | Fator de crescimento epidérmico |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| FGF basic | Fator de crescimento básico de fibroblastos |
| G-CSF | Fator estimulador de colônias de granulócitos |
| GM-CSF | Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos |
| HDACs | Histonas desacetilases |
| HUJBB | Hospital Universitário João de Barros Barreto |
| IFN-γ | Interferão gama |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-13 | Interleucina 13 |
| IL-15 | Interleucina 15 |
| IL-17A | Interleucina 17A |
| IL-1RA | Receptor antagonista de interleucina 1 |
| IL-1β | Interleucina 1 beta |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| IL-5 | Interleucina 5 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-7 | Interleucina 7 |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| IL-9 | Interleucina 9 |
| iNOS | Síntese do óxido nítrico indutível |

| | |
|--------------------------------|---|
| IP-10 | Proteína induzida por Interferão gama 10 |
| IQR | Intervalo Interquartilico |
| MDSC | Células supressoras derivadas de mielóides |
| MEC | Matriz extracelular |
| MIP1α | Proteínas inflamatórias de macrófagos 1 alfa |
| MIP1β | Proteínas inflamatórias de macrófagos 1 beta |
| MMPs | Metaloproteinases da matriz |
| MPC-1 | Proteína quimio atraiante de monócito 1 |
| NF-κB | Fator Nuclear Kappa B |
| NK | Células <i>natural killer</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OS | Sobrevida Global |
| PDGFbb | Fator de crescimento derivado de plaquetas-bb |
| PFS | Sobrevida livre de doença |
| PML | Promyelocytic leukemia protein |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| SA-PE | Conjugado estreptavidina-ficoeritrina |
| SPR | Ressonância de plasmão de superfície |
| STAT | Transdutor de sinal e ativador de transcrição |
| TAMs | Macrófagos Associado a Tumor |
| TANs | Neutrófilos Associado a Tumor |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| TEM | Transição epitélio-mesenquimal |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral alfa |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |

RESUMO

ANÁLISE DE CITOCINAS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO

Apesar da redução na incidência mundial do câncer gástrico, essa neoplasia continua sendo a segunda maior causa de morte por câncer no mundo. O diagnóstico tardio ocorre, principalmente, devido à ausência de sintomas ou à presença de sintomas não específicos nos estágios iniciais da doença. Nesse caso, poucas opções terapêuticas eficientes estão disponíveis, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade. O estudo contínuo de novas estratégias para o diagnóstico precoce, definição do prognóstico e identificação de novos métodos terapêuticos é de grande interesse nesse tipo neoplásico. No presente estudo, foi realizada a quantificação de proteínas inflamatórias candidatas a biomarcadores no soro de 19 pacientes com adenocarcinoma gástrico e 13 indivíduos saudáveis para constituírem o grupo controle do experimento. A metodologia utilizada para quantificação de proteínas foi o sistema MAGPIX e o painel de biomarcadores *Bio-Plex Pro Human Pro-Cytokine, Chemokine and Growth Factors*. Na comparação entre pacientes com adenocarcinoma e grupo controle, foi observado níveis elevados de IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α , RANTES e VEGF no soro de pacientes com adenocarcinoma. Em relação as características clinicopatológicas, foi observado aumento da expressão de IL-5, IL-7, IL-10 e IL-17A no adenocarcinoma gástrico do tipo difuso em relação ao intestinal. Adicionalmente, a associação da expressão das citocinas em tumores gástricos com a sobrevida global (OS) e sobrevida livre de recaída (PFS) foram realizadas usando a KM Plotter Online Tool. A superexpressão de G-CSF, GM-CSF e VEGF no tumor foi associado com a menor OS e PFS dos pacientes com câncer gástrico, entretanto a superexpressão de IL-10 foi associada apenas com PFS. Assim, podemos concluir que as citocinas IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α , RANTES e VEGF são potenciais biomarcadores de câncer gástrico, e que o adenocarcinoma do tipo difuso pode está relacionados a uma maior resposta inflamatória em relação ao tipo intestinal. A análise de sobrevida sugere que elevados níveis de IL-10, G-CSF, GM-CSF e VEGF no soro possam ser utilizados como biomarcadores de prognóstico dos pacientes com câncergástrico.

Palavras-chave: adenocarcinoma gástrico, linfoma, biomarcador, interleucinas, quimiocinas, fatores de crescimento.

ABSTRACT

CYTOKINES LEVELS IN THE SERUM OF PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

Despite the reduction in the worldwide incidence of gastric cancer, this neoplasm remains the second largest cause of cancer death in the world. Late diagnosis occurs mainly due to the absence of symptoms or the presence of non-specific symptoms in the early stages of the disease. In this case, few effective therapeutic options are available, resulting in high rates of morbidity and mortality. The continuous study of new strategies for the early diagnosis, definition of the prognosis and identification of new therapeutic methods is of great interest in this neoplastic type. In the present study was quantified inflammatory proteins candidate to biomarkers in the serum of 19 patients with gastric adenocarcinoma before surgical resection and 13 healthy individuals as control. The methodology used for quantification of proteins was the MAGPIX system and panels of cancer biomarkers inventoried by the manufacturer (Bio-Plex Pro Human Pro-Cytokine, Chemokine and Growth Factors). In the comparison between patients with gastric adenocarcinoma and control group was observed the levels of IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α , RANTES and VEGF were higher in serum of gastric adenocarcinoma patients. According clinicopathological characteristics, was observed elevated levels of IL-5, IL-7, IL-10 and IL-17A in diffuse-type gastric adenocarcinoma in relation intestinal-type. In addition, the association of the expression of the cytokines studied with overall survival (OS) and relapse-free survival (PFS) were performed using the KM Plotter Online Tool. Overexpression of G-CSF, GM-CSF and VEGF in tumor was associated with lower OS and PFS of gastric cancer patients. However, the overexpression of IL-10 was associated only with PFS. Thus, we can conclude that the IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α , RANTES and VEGF cytokines are potential biomarkers of gastric cancer, and diffuse-type adenocarcinoma can related to a greater inflammatory response than intestinal-type. Survival analysis suggests that elevated levels of IL-10, G-CSF, GM-CSF and VEGF in serum are potential biomarkers of prognosis in gastric cancerpatients.

Key words: gastric adenocarcinoma, lymphoma, biomarker, interleukins, chemokines, growth factors.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Considerações gerais | 1 |
| 1.2 Biomarcadores | 2 |
| 1.3 Detecção de proteínas no soro | 4 |
| 1.4 Inflamação | 6 |
| 1.4.1 Tipos de resposta inflamatória | 6 |
| 1.4.2 Mediadores inflamatórios | 10 |
| 1.5 Inflamação e câncer | 17 |
| 1.5.1 Inflamação crônica e sua relação com o câncer | 17 |
| 1.5.2 O papel das células imunes na promoção tumoral | 18 |
| 1.5.3 Inflamação, fatores de transcrição e câncer | 19 |
| 1.5.4 O papel dos mediadores inflamatórios no microambiente tumoral | 21 |
| 1.5.5 Inflamação e alterações epigenéticas no câncer | 24 |
| 1.5.6 Aspectos entre inflamação e câncer gástrico | 25 |
| 1.6 Aplicabilidade clínica | 27 |
| 2 OBJETIVOS | 28 |
| 2.1 Objetivo geral | 28 |
| 2.2 Objetivos específicos | 28 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 3.1 Casuística | 29 |
| 3.2 Detecção de proteínas no soro | 29 |
| 3.3 Análise estatística | 31 |
| 3.4 Análise de sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (PFS) | 31 |
| 4 RESULTADO | 32 |
| 4.1 Caracterização da amostra | 32 |
| 4.2 Comparação dos níveis de citocinas no soro entre os diferentes grupos | 32 |
| 4.3 Curva ROC das citocinas estatisticamente significantes | 35 |
| 4.4 Correlação de Spearman | 39 |
| 4.5 Associação dos níveis de citocinas no soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico e dados clinicopatológicos | 42 |
| 4.6 Associação da expressão de citocinas com sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (PFS) | 48 |
| 5 DISCUSSÃO | 59 |
| 6 CONCLUSÃO | 73 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 74 |
| ANEXO I | 95 |
| ANEXO II | 101 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

O câncer constitui um dos principais problemas de saúde pública do mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou, para o ano de 2030, 27 milhões de casos novos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas anualmente com câncer (IARC, 2012).

Dentre todos os diferentes tipos de câncer que afetam o homem, o câncer gástrico (CID-1° C16) ocupa a quinta posição quanto ao tipo tumoral mais frequente e constitui a segunda maior causa de morte por câncer no mundo (FERLAY et al., 2015).

A sobrevida média cumulativa 5 anos após o diagnóstico do câncer gástrico varia de 10 a 53% em países desenvolvidos e de 11 a 21% em países em desenvolvimento (INCA, 2016). Essa baixa taxa de sobrevida média em relação a países desenvolvidos deve-se em parte ao diagnóstico tardio dessa patologia (BRENNER et al., 2009).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 20.520 casos novos de câncer gástrico para o ano de 2016, sendo o quarto tipo de câncer mais frequente entre homens e o quinto entre mulheres. Na região norte do país, o câncer gástrico é o segundo tipo de tumor mais incidente entre homens (11,62 casos/100 mil habitantes) e quarto entre mulheres (5,82 casos/100 mil habitantes) (INCA, 2016).

O adenocarcinoma é o tipo mais comum de câncer gástrico, correspondendo aproximadamente a 95% dos casos (SMITH et al., 2006). Há várias propostas de classificação microscópica para o adenocarcinoma gástrico, porém a classificação mais utilizada e reconhecida no ocidente é a que se baseia nos estudos de Laurén (LAURÉN, 1965), que classifica os adenocarcinoma gástricos em dois tipos principais: difuso e intestinal.

O adenocarcinoma do tipo difuso é mais frequente em mulheres e jovens, e possui um pior prognóstico em relação ao tipo intestinal. Por sua vez, o tipo histológico intestinal é mais frequente em homens, pessoas com idade avançada e em regiões consideradas de alto risco, além de possuir um melhor prognóstico em relação ao difuso e ter sua origem ligada a lesões pré-cancerosas, como a atrofia gástrica e metaplasia intestinal (CREW e NEUGUT, 2006).

Em geral, 80% dos pacientes com câncer gástrico são diagnosticados em estágios avançados da doença devido à falta de sintomas ou à presença de sintomas não específicos nos estágios iniciais da doença. A detecção da doença em estágio avançado limita a utilização das abordagens terapêuticas disponíveis em mais de 50% dos casos. Adicionalmente, a cirurgia é o principal tratamento curativo para esse tipo de neoplasia (SHI e ZHOU, 2010).

As taxas de recorrência em pacientes com câncer gástrico submetidos a cirurgia também são elevadas, como metástases em linfonodos, hepáticas e peritoneal. Como consequência, o câncer gástrico apresenta um mau prognóstico e a sobrevida média cumulativa após 5 anos é estimada em aproximadamente 20% (ZHANG et al., 2016). Diante destes fatores, estudos que busquem identificar novos métodos de diagnóstico se mostram importantes para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

O conhecimento da carcinogênese gástrica ainda é fragmentado e o uso clínico de biomarcadores moleculares no câncer gástrico ainda não é consistente. Esses fatos reforçam a gravidade dessa patologia e a necessidade do desenvolvimento de novos estudos que possam ajudar na identificação de biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico de câncer gástrico, ampliando a capacidade de detecção precoce e permitindo o estabelecimento de conduta terapêutica mais precisa.

1.2 Biomarcadores

Biomarcadores se referem a genes, proteínas e qualquer molécula bioquímica sinalizada pela célula. Um biomarcador é, portanto, indicador das atividades biológicas da célula. Em particular, os biomarcadores de câncer incluem substâncias de natureza bioquímica, tais como ácidos nucleicos, proteínas, açúcares, lipídios e pequenos metabolitos, parâmetros citogenéticos e citocinéticos, bem como células tumorais que

podem ser encontradas na circulação (BHATT et al., 2010).

Um biomarcador considerado ideal deve ser estável e mensurável no plasma ou sangue e deve aparecer nestes fluídos antes que surjam os sintomas clínicos, além de poder diferir o câncer de qualquer outra doença inflamatória. Outra característica essencial é a especificidade para determinados tipos de câncer. Por fim, o biomarcador deve ser fiel a dinâmica do tumor, sendo eliminado da circulação após a ressecção e deve ser capaz de detectar sinais de recidiva da doença. (KALNINA et al., 2016).

Do ponto de vista médico e clínico, os biomarcadores podem ser definidos como sinais médicos que indicam o estado do paciente. Eles são uma característica que avalia processos biológicos normais e patogênicos. Em uma definição mais abrangente, um biomarcador é qualquer substância, estrutura, processo ou seus produtos que podem ser medidos no corpo e prever um determinado estado clínico do paciente. Portanto, os biomarcadores são características objetivas e quantificáveis dos processos biológicos (STRIMBU e TAVEL, 2010).

No que diz respeito ao câncer gástrico, os testes não invasivos para sua detecção fornecem relativamente baixa sensibilidade e especificidade (Figura 1), incluindo antígeno carcinoembrionário (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno de carboidrato (CA) 19-9 e 72-4 (LIU, 2014; JIN et al., 2015).

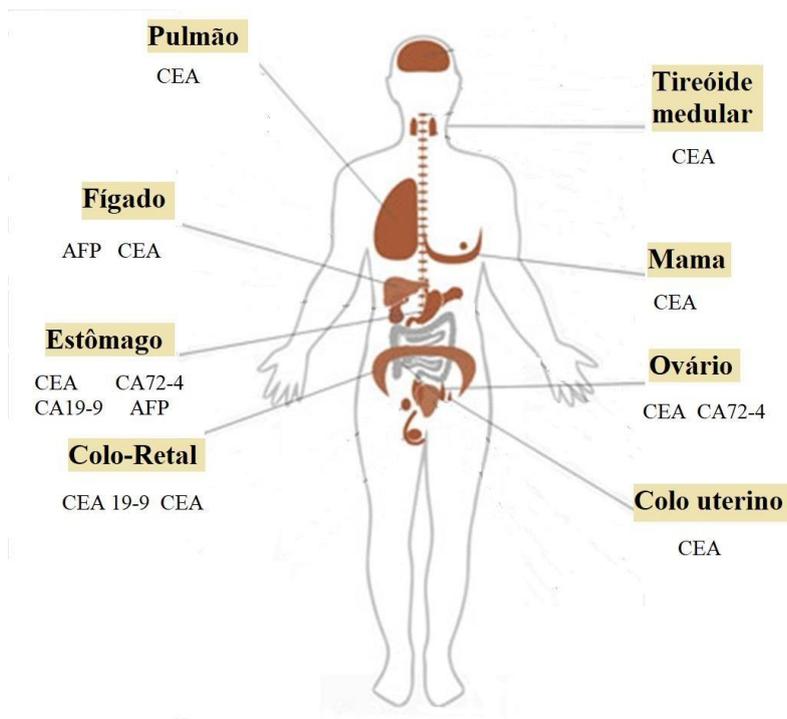


Figura 1: CEA, CA 19-9, CA 72-4 e AFP utilizados como biomarcador em diferentes tipos tumorais.

Atualmente, o CEA é considerado como o mais importante biomarcador de proteína sérica para identificar precocemente pacientes com risco de desenvolver câncer gástrico. No entanto, o CEA sérico não apresenta sensibilidade e especificidade para o câncer gástrico, pois pode ser indicativo da gênese de vários tipos tumorais (JIN et al., 2015).

O CA 19-9 é uma proteína com função na adesão celular importante para prever o estágio do câncer gástrico. Níveis elevados de CA 19-9 no soro de pacientes após dois meses de serem submetidos a ressecção cirúrgica implicam em um mau prognóstico. Além disso, a quantificação de CA 19-9 se mostrou útil no monitoramento dos pacientes para prever recidiva. Porém, assim como o CEA, o CA 19-9 não apresenta a especificidade e sensibilidade que deve ser característica de um marcador de diagnóstico.

Adicionalmente, outros biomarcadores são descritos no câncer gástrico. Elevados níveis séricos de AFP no soro foi associado ao pior prognóstico de pacientes com câncer gástrico, e pode prever metástases hepáticas após a ressecção total do estômago. Esse biomarcador também foi associado a metástases em linfonodos e invasão vascular (LIU et al., 2010; ZUO e JU, 2015).

Além disso, o antígeno de carboidrato (CA) 72-4 foi descrito como biomarcador mais sensível e específico em pacientes com câncer gástrico, e sua positividade foi associada com estágio de tumor avançado, metástase de linfonodo e metástase à distância (SUN e ZHANG, 2015). No entanto, a dosagem no soro de CA 72-4 é limitada nos aspectos de sensibilidade de aproximadamente 50%, e precisão não superior a 80%. Portanto, somente o teste de CA 72-4 sérico não pode satisfazer a exigência da prática clínica (CHEN et al., 2012). Desta forma, estudos que visem a identificação de novos biomarcadores de diagnóstico são de extrema relevância para melhorar o tratamento do câncer gástrico (CAINAP et al., 2015).

1.3 Detecção de proteínas no soro

A detecção de biomarcadores em líquidos corporais tem se mostrado importante

tanto para o diagnóstico precoce quanto para o tratamento e monitoramento de doenças. Apesar disso, as limitações das técnicas utilizadas na detecção desses biomarcadores impedem que eles sejam explorados de forma mais ampla na prática clínica. Outro ponto limitante é que geralmente os biomarcadores estão presentes em concentrações baixas e estão presentes nos fluidos juntamente com outras proteínas, o que dificulta identificá-los (MIMSE et al., 2015).

Várias biomoléculas têm demonstrado seu potencial para biomarcadores, como antígenos, DNA, mRNA e enzimas. Todavia, os biomarcadores de proteínas são os mais comumente utilizados na prática médica. Há vários métodos de detecção que podem ser utilizados para a identificação de biomarcadores, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), eletroforese em gel e ressonância de plasma de superfície (SPR) (MIMSE et al., 2015).

O ELISA é a principal ferramenta para a detecção de proteínas de interesse em amostras biológicas para pesquisa e no diagnóstico clínico. O sistema Luminex xMAPTechnology, além de oferecer os benefícios do ELISA, também permite maior rendimento, o aumento da flexibilidade, volume reduzido da amostra e um menor custo. Esse sistema é capaz de realizar análises qualitativas e quantitativas de proteínas e ácidos nucleicos de uma variedade de fontes amostrais, baseadas em ensaios magnéticos multiplex com leitura por sistema de fluorescência (HUMPHRIES et al., 2014; FULTON et al., 1997; CARSON et al., 1999).

A análise e quantificação de proteínas em amostras como soro através das plataformas multiplex tem se tornado cada vez mais importante e utilizada na investigação de biomarcadores (CHISTIANSSON et al.2014).

Os ensaios do MAGPIX são essencialmente imunoenaios formatados em *beads* magnéticas. O princípio do ensaio é semelhante a metodologia do ELISA em sanduíche. Os anticorpos de captura dirigidos contra o biomarcador desejado são acoplados covalentemente às esferas. Os grânulos acoplados reagem com a amostra que contém o biomarcador de interesse. Após uma série de lavagens para remover a proteína não ligada, é adicionado um anticorpo de detecção biotilado para criar um complexo de sanduíche. O complexo de detecção final é formado com a adição de conjugado estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE). A ficoeritrina atua como um indicador fluorescente

ou repórter (BIO-RAD,2016).

No presente trabalho, foi realizada a pesquisa de biomarcadores inflamatórios no soro de pacientes com câncer gástrico, tais como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento utilizando a tecnologia *Luminex* MAGPIX. Para entender a estreita relação entre os biomarcadores inflamatórios e o câncer a seguir foi realizado o esclarecimento dos tipos de resposta inflamatória, a participação dos diferentes tipos celulares e a relação da inflamação e câncer.

1.4 Inflamação

1.4.1 Tipos de resposta inflamatória

A principal função do sistema imune é coordenar a reação do organismo diante da invasão de agentes estranhos, sejam estes patógenos ou não. A defesa contra a ação de microorganismos é mediada através de duas formas: a imunidade inata ou adaptativa. (ABBAS et al., 2005).

A imunidade inata é responsável pela defesa inicial contra agentes estranhos e sua forma de ação é por meio de mecanismos celulares e bioquímicos, os quais já estão presentes antes mesmo da infecção, garantindo uma resposta mais rápida. Esse tipo imunidade é composta principalmente por barreiras físicas e químicas, células fagocitárias, que são representadas essencialmente por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células *natural killer* (NK), além de proteínas que auxiliam na mediação da resposta inflamatória (ABBAS et al., 2005). Já a constituição do sistema imune adaptativo é basicamente de células T e B, e as quais expressam os receptores específicos do antígeno, portanto, são especializados para antígenos individuais, e também células dendríticas (VARN et al., 2016). A Figura 2 ilustra as células que participam da resposta imune inata e adaptativa. Além disso, a Tabela 1 resume suas características e funções.

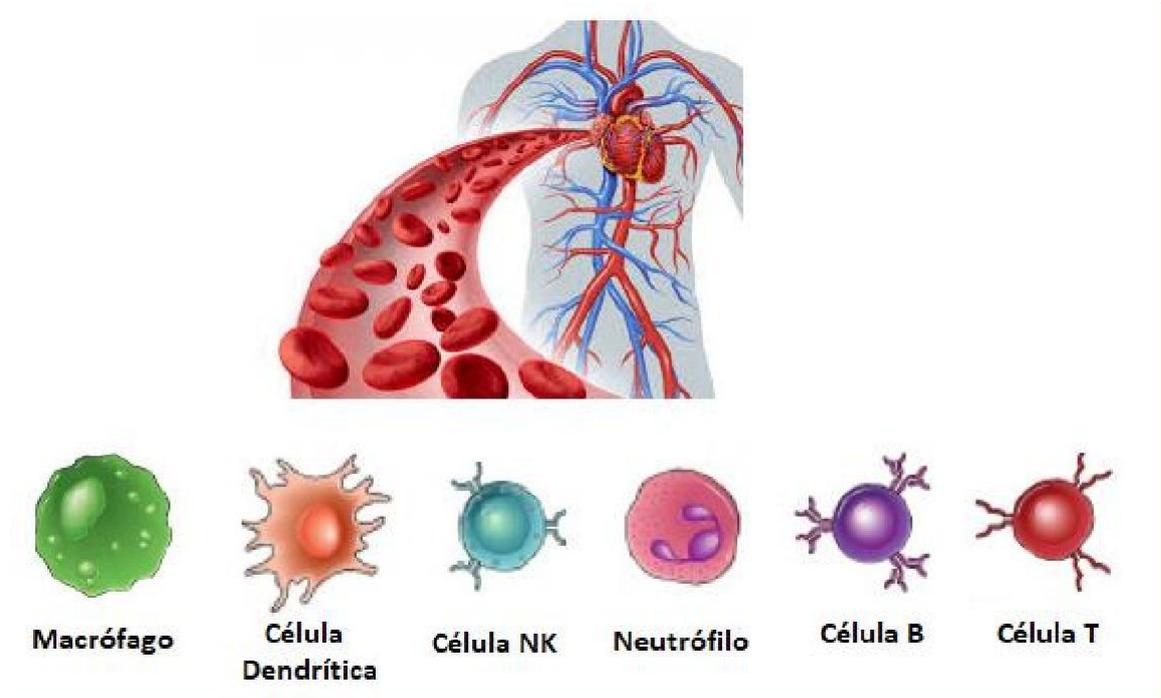


Figura 2: Células que participam da resposta imune inata e adaptativa. Macrófago, célula dendrítica, célula NK e neutrófilo são as principais células responsáveis pela resposta imune inata. Células B e T são células características da imunidade adaptativa. Adaptado de ABBAS, LICHTMAN e PILLAI (2011).

Tabela 1. Principais características e funções das células imunológicas, diferenciando-se células do sistema imune inato e adaptativo. Fonte: ABBAS e LICHTMAN, 2009.

| Células do sistema imune inato | Características | Funções |
|-------------------------------------|--|---|
| Macrófagos | <p>Produto da diferenciação dos monócitos no tecido</p> <p>Utilizam receptores do tipo <i>Toll</i> (TLRs) para reconhecer micro-organismos no tecido</p> | <p>Faz fagocitose de patógenos</p> <p>Destroem os micro-organismos presentes em vesículas intracelulares</p> |
| Neutrófilos | <p>Mais abundante no sangue</p> <p>Utilizam receptores do tipo <i>Toll</i> (TLRs) para reconhecer micro-organismos no sangue</p> | <p>Faz fagocitose de patógenos</p> <p>Destroem os micro-organismos presentes em vesículas intracelulares</p> |
| Células NK | <p>Presente no sangue e nos órgãos linfóides periféricos</p> <p>Expressam marcadores de superfície específicos</p> | <p>Reconhecem as células infectadas e estressadas e as destroem</p> <p>Capaz de ativar macrófagos</p> |
| Células dendríticas | <p>Importante ponte entre a imunidade inata e adaptativa</p> <p>Pode ser imatura ou madura</p> | <p>Quando imaturas, utilizam receptores para capturar e fazer endocitose dos micro-organismos</p> <p>Quando maduras, se despreendem do epitélio e migram para os linfonodos</p> |
| Células do sistema imune adaptativo | Características | Funções |
| Linfócitos B | <p>Possuem receptores de antígenos</p> | <p>Seus receptores podem reconhecer substâncias químicas e macromoléculas ligadas à superfície celular</p> |
| Linfócitos T | <p>Possuem receptores de antígenos</p> | <p>Seus receptores identificam fragmentos peptídicos de antígenos proteicos</p> |

As principais características da resposta imune adaptativa são flexibilidade e memória. A flexibilidade é devido à especificidade dos linfócitos T e B para o

reconhecimento de antígenos. Essas células reconhecem antígenos que persistem temporalmente em um organismo, proporcionando respostas específicas e rápidas a patógenos, e uma memória imunológica (CLARK e KUPPER, 2005).

Geralmente, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio inflamatório, sob a regulação de moléculas produzidas em resposta a macrófagos, que já estão ativos nos tecidos. Conforme a inflamação progride, uma variedade de interleucinas, quimiocinas e fatores de crescimento sinalizam a ativação e migração de uma variedade de células, incluindo leucócitos, linfócitos e outras células inflamatórias para o tecido inflamado (LU et al., 2006).

Os monócitos deixam a circulação sanguínea e migram para o tecido que sofreu dano e lá diferenciam-se em macrófagos. As funções dos macrófagos variam no contexto do sistema imune, com papéis na iniciação e regulação das reações de defesa (inflamação), exercendo primordialmente a fagocitose e, além disso, a destruição de células tumorais, a eliminação de detritos celulares, a apresentação de antígenos e a cicatrização de feridas (REICHRATH, 2016).

Fenotipicamente, os macrófagos são classificados em M1 e M2. De forma geral, os macrófagos do tipo M1 estão associados à indução da resposta imune e possuem atividades antitumorais. Por sua vez, os macrófagos M2 atuam em oposição à vigilância imunológica e estimulando a neovascularização (ZAJAC et al., 2013).

Assim, a função mais importante do macrófago é a fagocitose de microorganismos e outros corpos estranhos. Um grande número de lisossomos está presente no citoplasma dos macrófagos. As enzimas líticas contidas nos lisossomos contribuem para a eliminação do patógeno e é através deste processo que ocorre a “ativação” dos macrófagos, que resulta na secreção de citocinas, que regulam o processo inflamatório (REICHRATH, 2016).

Os linfócitos são uma das principais células do sistema imunológico e sua resposta é direcionada especificamente a antígenos estranhos. Os linfócitos são subdivididos em T e B, baseados em suas maneiras específicas de reconhecer antígenos. Os linfócitos B são as únicas células produtoras de anticorpos e reconhecem antígenos extracelulares, enquanto os

linfócitos. Reconhecemos antígenos de microorganismos intracelulares. Uma população funcional de linfócitos T, denominada de células T auxiliares, secretam as citocinas (ABBAS et al., 2005).

Além disso, as células T amplificam-se e são diferenciadas em diferentes classes, como: Th1, Th2, Th17 e Treg após estimulação de antígenos, cada uma com diferentes funções para patógenos específicos (HUANG e CHEN, 2016).

As células NK são uma linhagem específica de linfócitos, tanto em relação à sua citotoxicidade quanto em relação às funções efetoras produtoras de citocinas. O sistema de detecção de células NK inclui os mais variados receptores de ativação e de inibição da superfície celular, o que regula as atividades das células NK. As células NK detectam a presença de ligantes em células sob estresse. Além disso, a atividade citotóxica das células NK abrange citotoxicidade celular dependente de anticorpos, através da expressão do receptor Fc de baixa afinidade CD16. Esse receptor é encontrado na superfície de algumas células, como as NK, e são classificados de acordo com o tipo de anticorpos que reconhecem (VIVIER et al., 2008).

A célula dendrítica imatura reconhece características únicas de uma variedade de patógenos através dos receptores em sua superfície. O reconhecimento de tais características estimula as células dendríticas a fagocitarem os patógenos e a degradá-los intracelularmente. Sendo assim, as células dendríticas são as principais responsáveis pelas respostas primárias a antígenos (JANEWAY et al., 2001; STOCKWIN et al., 2000).

Apesar de destruir patógenos, a função primordial das células dendríticas não é esta, mas sim apresentar os agentes patogênicos aos linfócitos T, presentes nos órgãos linfóides periféricos. A partir do momento em que uma célula dendrítica reconhece um patógeno, ela se ativa e amadurece para uma célula apresentadora de antígenos. Durante o processo de ativação, as células dendríticas secretam citocinas que medeiam as respostas imunes tanto inatas quanto adaptativas, tornando estas células essenciais para determinar a resposta aos patógenos (JANEWAY et al., 2001).

1.4.2 Mediadores Inflamatórios

As citocinas são proteínas responsáveis por mediar as respostas celulares da imunidade inata e adaptativa que diferentes tipos de células podem secretar, incluindo células imunes como macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e mastócitos, mas também por células endoteliais, fibroblastos e várias células estromais (COSTANTINI et al.,2009).

Esses mediadores inflamatórios são um grupo muito distinto de proteínas solúveis que podem ser agrupadas em diferentes famílias, baseadas nas diferenças de homologia entre as sequências de aminoácidos e características estruturais. Adicionalmente, de acordo com sua atividade biológica, as citocinas incluem interleucinas, quimiocinas, fatores de crescimento, interferons e fator de necrose tumoral (HASEGAWA et al.,2016).

I) Interleucinas

As interleucinas são proteínas que se ligam aos seus receptores específicos e desempenham um papel na comunicação intercelular entre os leucócitos (AKDIS et al., 2016).

Por sua vez, as respostas celulares a interleucinas são iniciadas através dos receptores localizados na membrana. Além disso, as respostas específicas a de uma determinada célula dependem dos ligantes envolvidos, dos receptores celulares e das cascatas de sinalização que são ativadas. Da mesma forma que possuem um papel importante na comunicação entre leucócitos, as interleucinas também atuam sobre o crescimento, diferenciação e ativação de células imunes, de modo que podem atuar de forma pró ou anti-inflamatória (BROCKER et al., 2010).

Em relação à classificação das interleucinas, diversos grupos de pesquisa já tentaram classificá-las de acordo com sua função biológica, estrutura, propriedades de ligação ao receptor, sequência de homologia e diversas outras características. Esses fatos fazem com que as interleucinas não possuam uma classificação muito bem definida (BROCKER et al.,2010).

Tabela 2. Células responsáveis pela produção e função específica de interleucinas.

| Interleucina | Síntese | Características | Referências |
|--------------|---|--|---|
| IL-1 β | Macrófagos, monócitos, linfócitos e outros | Induz proteínas pró-inflamatórias e atua na hematopoiese | RAZAVI et al., 2015 |
| IL-1RA | Células epiteliais | Induz proteínas pró-inflamatórias | PERRIER et al., 2006 |
| IL-2 | Linfócitos T, células dendríticas e células NK | Atua na proliferação de linfócitos T ativados | NELSON, 2004; WALDMANN, 2015 |
| IL-4 | Linfócitos T, basófilos e eosinófilos | Regula a proliferação, diferenciação e apoptose de linhagens hematopoiéticas e não hematopoiéticas | AKIDS et al., 2011; LUTZ et al., 2002 |
| IL-5 | Células Th2 | Atua na maturação, proliferação e ativação de eosinófilos | FLOOD-PAGE et al., 2007; BENTLEY et al., 1992 |
| IL-6 | Linfócitos T e B, granulócitos, células do músculo liso, eosinófilos, condrócitos, osteoblastos, mastócitos, células da glia e queratinócitos | Mediadora de eventos imunológicos e inflamatórios | TRIKHA et al., 2013; AKDIS et al., 2011 |
| IL-7 | Células epiteliais do intestino e queratinócitos | Atua como fator de regulação para os linfócitos da mucosa intestinal | RAZAVI et al., 2015; NCBI, 2017 |
| IL-9 | Linfócitos T | Tem efeito proliferativo sobre linfócitos T ativados e transformados | DONAHUE et al., 1990 |
| IL-10 | Macrófagos e monócitos | Atua como imunossupressor e regula a | SARAIVA e O'GARRA, 2010; |

| | | | |
|--------|----------------------------------|---|--|
| | | diferenciação e proliferação de células imunes | ASADULLAH et al., 2003 |
| IL-12 | Células dendríticas e macrófagos | Estimula a produção de IFN α | CHAN et al., 1992 |
| IL-13 | Células T e NK | Participa da defesa contra helmintos e da resposta alérgica | RAZAVI et al., 2015; ABBAS et al., 2009 |
| IL-15 | Monócitos | Estimula a proliferação de células T | RAZAVI et al., 2015; BURTON et al., 1994 |
| IL-17A | Células Th17 | Faz o recrutamento de neutrófilos para as áreas infectadas | INFANTE-DUARTE et al., 2000; YE et al., 2001 |

I I) Quimiocinas

As quimiocinas são uma família de citocinas com funções quimiotáticas, as quais possuem um grau relativamente elevado de especificidade para a quimioatração de populações específicas de leucócitos. As quimiocinas também recrutam células efetoras e são fundamentais na evolução natural da resposta inflamatória, como mostra a Tabela 3 (COUSSENS e WERB,2002).

As quimiocinas são membros de uma família de proteínas definidas pela presença de um resíduo de cisteína N-terminal conservado nas suas sequências de proteínas maduras. Elas são divididas estruturalmente nas subfamílias CC, CXC, XC e CX₃C de acordo com a natureza específica da cisteína, como mostra a Figura 3 (ABBAS et al., 2005).

A subfamília CC agrupa as quimiocinas com os resíduos de cisteína adjacentes e medeiam, em sua maior parte, o recrutamento de neutrófilos e linfócitos. A família CXC contém as quimiocinas cujos resíduos estão separados por um aminoácido e recrutam os monócitos e linfócitos. Estas duas subfamílias são produzidas principalmente por leucócitos. Já a família XC de quimiocinas possui apenas uma cisteína e elas medeiam o recrutamento de células NK e linfócitos T CD8+. Por fim, a família CX₃C possui quimiocinas com as cisteínas separadas por três aminoácidos e têm atividade quimiotática para células mononucleadas do sangue periférico (ABBAS et al., 2005; BONECCHI e GRAHAM,2016).

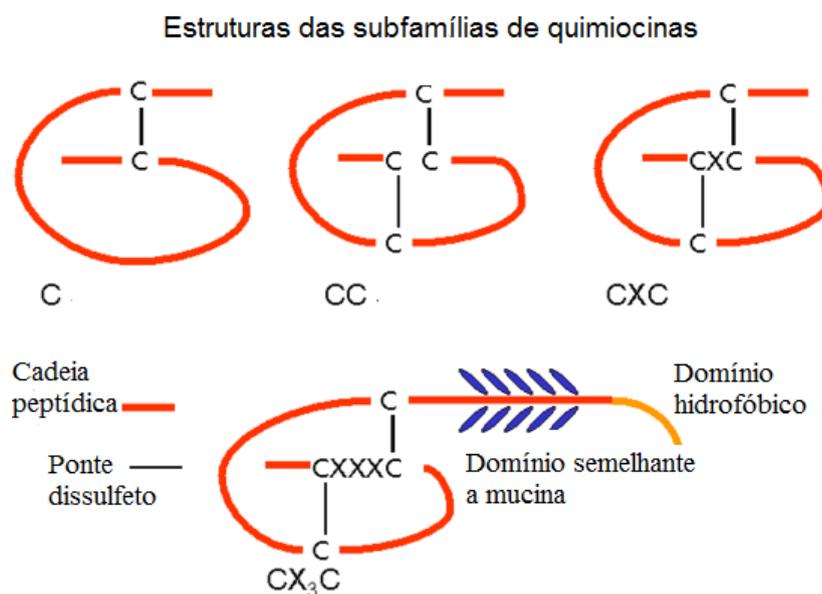


Figura 3: Estrutura das quimiocinas baseada na posição do resíduo de cisteína.

Tabela 3. Células responsáveis pela produção e função específica de quimiocinas.

| Quimiocinas | Síntese | Características | Referências |
|--------------------|---|--|---|
| IL-8 | Macrófagos, monócitos, neutrófilos e outros | Participa de respostas inflamatórias e doenças infecciosas | CHANG et al., 2014; REN et al., 2001 |
| MIP1 α | Macrófagos | Atividade quimiotática envolvendo monócitos, linfócitos e outros | DING et al., 2014; CHOI et al., 2000 |
| MIP1 β | Macrófagos | É um quimio atraente de monócitos e células NK | NATH et al., 2006 |
| Eotaxin | Eosinófilos | Participa de respostas alérgicas | PONATH et al., 1996 |
| IP-10 | Monócitos e outros tipos celulares | Faz recrutamento de linfócitos sob condições inflamatórias | BONDAR et al., 2014; NEVILLE et al., 1997 |
| RANTES | Células T | Participa do recrutamento de leucócitos para o local da inflamação | IGNATOV et al., 2006 |
| MPC1 | Células endoteliais | Controla o metabolismo do piruvato mitocondrial | LI et al., 2016; SCHELL et al., 2014 |

III) Fatores de crescimento

Outra classe de moléculas fundamental no processo inflamatório, os fatores de crescimento, são moléculas polipeptídicas de sinalização liberadas pelas células, em especial no ambiente inflamatório, as quais estimulam as células a proliferarem. Dentre os principais fatores de crescimento há o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator estimulante das colônias 3 (G-CSF), fator de crescimento endotelial (VEGF) e Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Tabela 4).

Tabela 4. Células responsáveis pela produção e a função específica de fatores de crescimento.

| Fatores de Crescimento | Síntese | Características | Referências |
|-------------------------------|---|--|------------------------------------|
| GM-CSF | Células T e monócitos | Responsável pelo crescimento, diferenciação e aumento funcional de granulócitos e macrófagos | LEE e MARGOLIN, 2011; BEALES, 2002 |
| G-CSF | Macrófagos e em pequena escala por monócitos e fibroblastos | Estimula a divisão e diferenciação de neutrófilos | VARELLA e FORTE, 2001 |
| FGF basic | Adipócitos e outras células | Importante fator de divisão celular | ZHANG et al., 2016 |
| PDGFbb | Plaquetas | Atua na angiogênese | HANNINK et al., 2010 |
| VEGF | Células epiteliais | Atua na angiogênese e promove permeabilidade vascular | COOPER et al., 1999 |

A proliferação celular mediada por via dos fatores de crescimento é desencadeada através da ligação destes fatores a receptores transmembrana específicos nas células alvo (CROSS e DEXTER, 1991).

Os fatores de crescimento atuam por meio de difusão de curto alcance através da matriz extracelular (MEC). A capacidade de um fator de crescimento em transmitir uma mensagem singular a uma classe distinta de células depende da identidade do fator de crescimento, da sua capacidade de difusão através da MEC, do número de células alvo, do tipo de receptores e da transdução de sinal intracelular após a ligação do fator (LEE et al., 2010).

Cabe ressaltar que o mesmo fator de crescimento é capaz de variar as instruções transmitidas dependendo do tipo de receptor e da célula ao qual se liga. As respostas celulares aos fatores de crescimento podem ser reguladas por meio de sinalização célula-célula, afetando, desta forma, a proliferação celular, a diferenciação e possuindo papel importante na regeneração tecidual (LEE et al., 2010).

1.5 Inflamação ecâncer

1.5.1 Inflamação crônica e sua relação com ocâncer

A inflamação pode apresentar-se de duas formas: aguda e crônica. As características principais da inflamação aguda são a durabilidade curta, com extravasamento de proteínas e migração de leucócitos para a área extravascular (MARKIEWSK e LAMBRIS, 2007).

A resposta inflamatória crônica pode ser resultado de infecções persistentes, agentes químicos ou físicos que não podem ser reparados, resultado da susceptibilidade genética, inflamação aguda recorrente ou patógenos específicos. A inflamação crônica é geralmente persistente, resultando em respostas que levam à degeneração dos tecidos (FERGUSON, 2010; CAMPISI, 2014).

A inflamação é, portanto, uma resposta benéfica para o organismo. Quando a resposta inflamatória cumpre seus principais objetivos, os quais são o reparo tecidual e a eliminação de agentes estranhos, o estado homeostático é restaurado. No entanto, se a

inflamação não é regulada, pode tornar-se crônica, induzindo a transformação de células malignas no tecido circundante (LANDSKORN, 2014).

Ao longo dos últimos anos, estudos têm demonstrado que a inflamação crônica está envolvida no desenvolvimento e progressão do câncer. Proteínas de sinalização inflamatória, denominadas citocinas, são mediadores do processo inflamatório, e assim, favorecem o crescimento tumoral, facilitando a instabilidade genômica e estimulando a angiogênese (CONSTANTINI et al.,2009).

As células que estão em proliferação podem apresentar lesões no DNA, que podem ser causadas pelas células inflamatórias, através de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio, as quais, em condições normais, são produzidas por estas células para combater a infecção. Essas espécies reagem com peroxinitrito, um agente mutagênico. Assim, sucessivos danos no tecido e erros no reparo tecidual, na presença de espécies de nitrogênio e oxigênio altamente reativas liberadas de células inflamatórias, interagem com DNA em proliferação do epitélio, resultando em alteração genômica permanente, tais como mutações pontuais, deleções ou rearranjos (COUSSENS e WERB, 2002).

1.5.2 O papel das células imunes na promoção tumoral

No contexto tumoral, as células imunes, que normalmente protegem o organismo de agentes estranhos, são “alternativamente ativadas” para atuar contra o hospedeiro, favorecendo o crescimento do tumor (SIONOV et al., 2015).

A interação de células do sistema imune com células cancerígenas no microambiente tumoral favorece o processo de carcinogênese. O papel dos Macrófagos Associados aos Tumores (TAMs) são bem descritos no desenvolvimento do câncer. As propriedades dos macrófagos que auxiliam na progressão do câncer incluem o estímulo da angiogênese através da liberação de fatores angiogênicos, como o VEGF e citocinas pró-inflamatórias (KOVALEVA et al., 2016).

Além disso, os TAMs podem aumentar a proliferação, invasão e metástase de células tumorais e inibir a resposta imune antitumoral mediada por células T e remodelamento da matriz extracelular proporcionando um contexto favorável ao desenvolvimento tumoral (LIU e CAO, 2015). Em geral, os tumores apresentam um considerável infiltrado linfocítico,

o que não é perceptível em tecidos normais (BONINI e MONDINO, 2015).

Além de induzir respostas imunes no microambiente tumoral através da secreção de anticorpos e de citocinas inflamatórias, os linfócitos B são capazes de reconhecer antígenos, regular o processamento e apresentação dos mesmos e modular as respostas imunológicas inatas. O microambiente tumoral é composto por diferentes classes de linfócitos B que contribuem tanto para as respostas pró quanto para as respostas anti- imunes. O equilíbrio entre ambas pode determinar se os linfócitos B assumem características pró ou antitumorais. Os linfócitos B contribuem na tumorigênese através da formação de um microambiente angiogênico e pró-inflamatório (TSOU et al., 2016).

Os neutrófilos são frequentemente encontrados em tumores sólidos e compõem grande parte das células infiltrantes tumorais. Estas células podem promover a tumorigênese através da instabilidade genômica. A genotoxicidade causada por neutrófilos tem sido relacionada à indução de danos oxidativos ao DNA através da liberação de ROS. As funções dos Neutrófilos Associados a Tumores (TANs) estão relacionadas ao crescimento tumoral, produzindo fatores angiogênicos e enzimas que degradam a matriz. Os neutrófilos podem também levar a aquisição de um fenótipo metastático (SIONOV et al., 2015).

1.5.3 Inflamação, fatores de transcrição e câncer

O fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) é um fator de transcrição capaz de controlar diversas vias de sinalização celular e por consequência, controlam genes relacionados a processos tumorigênicos, como genes antiapoptóticos, genes que controlam a proliferação celular, genes respondedores a estresse e genes que codificam fatores pró-angiogênicos. A ativação de NF- κ B é essencial para a ação adequada do sistema imune, pois, durante a inflamação aguda, a ativação deste fator de transcrição é acompanhada de uma atividade elevada de células imunes citotóxicas (LAWRENCE, 2009).

Entretanto, em condições inflamatórias crônicas, a presença persistente de estímulos ativadores de NF- κ B altera o feedback negativo que controla a ação de NF- κ B, levando a uma elevada atividade deste fator de transcrição. Em geral, o NF- κ B induz citocinas que regulam a resposta imune, assim como moléculas de adesão que levam ao recrutamento de leucócitos para sítios de inflamação (HOESEL e SCHMID, 2013).

Além disso, a sinalização NF- κ B influencia os processos de transição epitélio-mesenquimal e metástase, através da regulação positiva das metaloproteinases da matriz (MMPs), as quais afrouxam a matriz extracelular para uma evasão de células malignas. Do mesmo modo, o NF- κ B também atua sobre a vascularização dos tumores através da regulação positiva do VEGF e dos seus receptores. Por fim, NF- κ B pode inibir a apoptose, estimular a proliferação celular e a migração, contribuindo, assim, para a progressão tumoral (GRIVENNIKOV e KARIN,2009).

Os mecanismos pelos quais o tumor eleva a atividade de NF- κ B envolvem mutações de genes *NF- κ B* e/ou oncogenes que ativam a via de sinalização deste fator de transcrição. Por outro lado, o tumor pode aumentar a liberação de citocinas que influenciam as atividades do NF- κ B (HOESEL e SCHMID,2013).

A família de proteínas STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição) regula muitos processos de crescimento, sobrevivência e diferenciação celular. Particularmente, a STAT3 é um fator de resposta em fase aguda que é ativado após estímulo pela interleucina 6 (IL-6). Este fator, além da IL-6, pode ser ativado por uma ampla gama de citocinas, fatores de crescimento e oncogenes (LEVY e LEE, 2002).

Dentre os diversos papéis de STAT3 na oncogênese, está a supressão da imunidade antitumoral por antagonização da expressão de citocinas antitumorais, como a interleucina 12 (IL-12). Atuando ainda em favor do crescimento tumoral, STAT3 é frequentemente ativada em células malignas, induzindo à expressão de vários genes associados à tumorigênese, além de regular a expressão de citocinas e outros mediadores inflamatórios cruciais para manter o microambiente tumoral favorável ao desenvolvimento do tumor (YU et al., 2009).

A ativação de STAT3 em células tumorais também ativa interleucinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que por sua vez ativam STAT3 em células estromais. As células estromais e inflamatórias agem em conjunto com mediadores inflamatórios, tornando a via IL6-STAT3 uma importante mediadora da inflamação no câncer (FAN et al., 2012).

1.5.4 O papel dos mediadores inflamatórios no microambiente tumoral

Os mediadores inflamatórios proporcionam um microambiente ideal para o crescimento e sobrevivência de células malignas. O acúmulo de determinados patógenos e a necrose dos tecidos ativam fatores de transcrição (Figura 4), os quais são essenciais para a expressão de uma variedade de fatores pró-angiogênicos (VEGF), fatores de crescimento (GM-CSF), fatores anti-apoptóticos (Bcl), quimiocinas (CCL2 e CCL20), promotores de invasão (MMP-2, MMP-7, MMP-8), e citocinas pró-inflamatórias (IL-6) que, em conjunto, dão suporte à sobrevivência tumoral (MULTHOFF et al., 2012). A Figura 4 ilustra a liberação de citocinas durante a inflamação que pode levar ao desenvolvimento do tumor.

O microambiente inflamatório é considerado ideal para a elevação das taxas de mutações e para a proliferação de células mutadas. Assim, o processo inflamatório é importante para a iniciação tumoral e progressão (GRIVENNIKOV e KARIN, 2009).

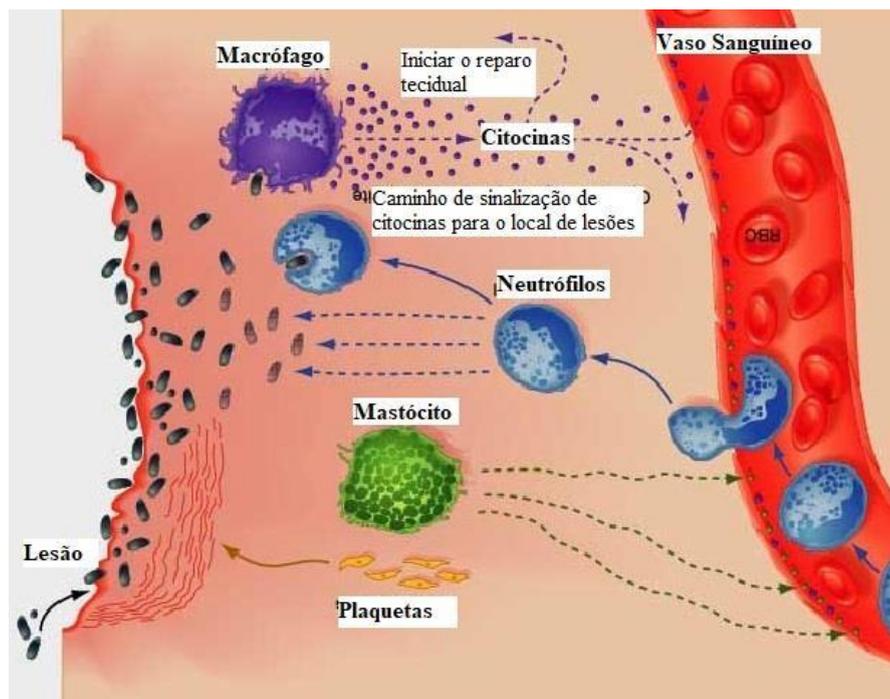


Figura 4: Liberação de citocinas na inflamação pode levar ao desenvolvimento do tumor. Em lesões crônicas, as células do sistema imune liberam mediadores inflamatórios em excesso, promovendo o crescimento e desenvolvimento tumoral. A lesão tecidual permite a entrada de bactérias e outros patógenos. Plaquetas liberam proteínas de coagulação sanguínea no local da lesão. Os mastócitos secretam fatores que medeiam a vasodilatação e a constrição vascular. Neutrófilos secretam fatores que degradam os patógenos, e junto com os macrófagos realizam fagocitose. Macrófagos secretam citocinas que atraem células do sistema imune para o sítio e ativam as células envolvidas com o reparo do tecido Adaptado de PEARSON PRENTICE HALL et al.,2005.

As células inflamatórias ativadas produzem ROS, que são capazes de induzir dano ao DNA e provocam instabilidade genômica. Além disso, as células inflamatórias podem utilizar citocinas, tais como TNF- α para estimular o acúmulo de ROS em células epiteliais vizinhas (RAKOFF-NAHOUM, 2006).

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos, os chamados oxidantes ou ROS, e sua eliminação por antioxidantes. Este desequilíbrio provoca danos celulares, o que envolve as ROS em uma ampla gama de doenças, incluindo inflamação crônica e em uma variedade de diferentes tipos de câncer (BURTON e JAUNIAUX, 2011).

Além disso, no microambiente tumoral, os mediadores inflamatórios, como interleucinas, quimiocinas e fatores de crescimento podem romper a membrana basal, processo que facilita a invasão e migração de células neoplásicas (ANUJA, 2016).

Através da produção de mediadores solúveis, as células produzem mais espécies reativas. Estes mediadores, por sua vez, ativam cascatas de transdução de sinal e levam à alterações nos fatores de transcrição, dentre eles o NF- κ B que medeia respostas de estresse celular imediatas (NODA e WAKASUGI, 2001).

A indução da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), a síntese do óxido nítrico indutível (iNOS), a expressão alterada de citocinas inflamatórias, assim como alterações na expressão de microRNAs específicos, também desempenham um papel na inflamação induzida por estresse oxidativo. Este ambiente inflamatório / oxidativo desarmônico pode induzir ao dano de células epiteliais e estromais vizinhas saudáveis e levar à carcinogênese (REUTER et al.,2010).

Para que o crescimento tumoral seja efetivo, é necessário que seja induzida a angiogênese, a formação de novos vasos a partir de pré-existentes, para que o tumor seja suprido de oxigênio e nutrientes. O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos pode ser desencadeado pela hipóxia tumoral e pelo recrutamento de TAMs, que sinalizam sinais hipóxicos e, por sua vez, produzem quimiocinas e fatores pró-angiogênicos, como VEGF (ONO, 2008).

A promoção tumoral é o estágio de desenvolvimento do tumor caracterizado pelo crescimento deste através de uma única célula iniciada para um tumor primário desenvolvido. Este processo depende do equilíbrio entre a proliferação e a morte celular, mecanismos que podem ser afetados pela inflamação e por células imunes infiltradas no tumor, especialmente leucócitos (GRIVENNIKOV e KARIN, 2009).

A IL-6 e TNF- α , por exemplo, podem ser secretados por células pré-malignas como fatores de sobrevivência para que elas se tornem totalmente desenvolvidas. Além disso, as citocinas liberadas por células pré-malignas e células imunes infiltradas ativam fatores de transcrição, como NF- κ B, STAT3 para induzir genes que estimulam a proliferação e sobrevivência celular (KURASHIY et al., 2011).

A metástase tumoral é um processo que envolve vários fenômenos, como a motilidade de células tumorais, intravasão, transporte, sobrevivência de células tumorais na circulação, extravasão e colonização de novos tecidos e órgãos. Um evento fundamental para o aumento da motilidade e migração de células tumorais é a transição epitélio-mesenquimal (TEM) (VALASTYAN e WEINBERG, 2011).

Durante este processo, basicamente, as células epiteliais adquirem propriedades fibroblásticas, reduzindo a adesão intracelular e aumentando a motilidade. Na TEM, as células epiteliais adquirem propriedades semelhantes a fibroblastos e exibem uma adesão intercelular reduzida e uma motilidade aumentada. A característica principal da TEM é a perda da expressão da E-caderina, molécula responsável pela adesão célula-célula (KALLURI e WEINBERG, 2009).

A TEM é controlada por sinais que as células recebem de seu microambiente, particularmente, do microambiente tumoral, que é composto por matriz extracelular (MEC), células estromais, células endoteliais, células inflamatórias infiltradas, e células supressoras derivadas de mielóides (MDSC). Estas células imunitárias infiltradas segregam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, tais como TNF- α , TGF- β , IL-6, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), que induzem a TEM (WU e ZHOU, 2013).

Uma vez as células livres, para a sua migração é necessário a ruptura da membrana basal e a remodelação da matriz extracelular (MEC), fenômeno que é

coordenado por enzimas e metaloproteinases de matriz (MMPs) (YAMAGUCHI et al., 2005).

Estas enzimas proteolíticas podem ser secretadas por células inflamatórias, especialmente por macrófagos. A secreção de proteases por TAMs, pode ser regulada pela produção de IL-6 a partir de células neoplásicas. Durante a migração, as células imunes secretam outras citocinas que promovem a intravasão de células tumorais na circulação sanguínea, tais como a interleucina 1 (IL-1), TNF- α e IL-6, que estimulam a expressão de MMP em células tumorais através da sinalização NF- κ B e STAT3 (HEATH, 2013).

Para sobrevivência, as células tumorais circulantes (CTCs) podem se fundir com macrófagos, se associar com linfócitos e promover a agregação de plaquetas em torno de si, para se proteger de células NK. A ligação de receptores de quimiocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4) e C-C tipo 7 (CCR7) aos seus respectivos ligantes (CXCL12 e CCL21) no lúmen de células endoteliais ajuda na detenção das CTCs no endotélio e as protege da morte por apoptose (HEATH,2013).

1.5.5 Inflamação e alterações epigenéticas no câncer

A inflamação crônica não é capaz somente de levar a alterações genéticas, mas sim também de induzir alterações epigenéticas que podem desencadear ou acelerar o processo carcinogênico. A iniciação e progressão do câncer estão associadas a modificações epigenéticas, como metilação do DNA ou modificações nas histonas. A inflamação possui uma importante função na modulação da metilação do DNA durante a iniciação e progressão do câncer. Por exemplo, o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β) induz à expressão e atividade das DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B), enzimas responsáveis pela metilação do DNA. Essa indução de expressão acarreta em modificações na metilação do DNA durante a TEM no câncer de ovário. AIL-6 também influencia a metilação, incluindo a de genes supressores tumorais como MASPIN (ROKAVEC et al., 2015).

Outros importantes mecanismos epigenéticos reguladores da expressão gênica são modificações de histonas, as quais permitem a remodelação da cromatina. Por sua vez, estas modificações também são associadas à inflamação. A sinalização de NF- κ B, por

exemplo, pode ser mediada pela ativação de IKK α após estímulo de citocinas, o que resulta na regulação da expressão de genes alvo de NF- κ B. Este processo induz à fosforilação de resíduos específicos de histona. (ROKAVEC et al., 2015).

O estresse oxidativo em fibroblastos inibe as histonas desacetilases (HDACs), ativando assim genes silenciados desacetilados. Além disso, a produção em excesso de ROS também contribui para a desassociação do complexo NF- κ B/IB e, conseqüentemente, o NF- κ B induz um conjunto de acetilações e desacetilações de histonas, resultando no início da transcrição. O efeito dessa gama de processos é um aumento de citocinas pró- inflamatórias, os quais podem ser influenciados pelo estilo de vida (BACKDAHL et al., 2009). Portanto, a inflamação pode induzir diversas alterações epigenéticas que promovem câncer.

1.5.6 Aspectos clínicos entre inflamação e câncer gástrico

Em todas as partes do mundo, a *H. pylori* é o fator de risco mais importante para o câncer gástrico. Regiões do mundo com baixa prevalência de infecção causada por essa bactéria tendem a ter uma incidência relativamente baixa dessa neoplasia, embora a variação geográfica nas taxas de câncer gástrico não seja determinada somente pela prevalência de *H. pylori* (COVER, 2016).

De fato, a mucosa gástrica infectada por *H. pylori* mostrou possuir níveis elevados de citocinas, por exemplo, interleucina (YAMAOKA et al. 2001). De acordo com GO et al. (2002) e QUEIROZ et al. (2009), a IL-6 e IL-8 aparecem precocemente na cascata de moléculas inflamatórias relacionada a infecção por *H. pylori* no estômago. Além disso, essa bactéria também estimula a produção de IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α e interferon (IFN- γ) durante a resposta imune.

Inflamações induzidas por *H. pylori* levam a alta rotatividade de células endoteliais gástricas, e a desregulação dessa inflamação, particularmente associada com cepas mais virulentas de *H. pylori*, como as cepas *cagA*, *vacA*, *iceA* e *babA* positiva, podem desencadear câncer gástrico (SMITH et al., 2006).

O gene *cagA* (citotoxina associada ao gene A) é o marcador de virulência de *H. pylori* descrito em 60-88% das cepas dessa bactéria na população ocidental com câncer gástrico (DE SOUZA et al., 2015). Adicionalmente, o polimorfismo funcional em genes de

citocinas ligados a resposta inflamatória pode contribuir para diferenças individuais na susceptibilidade e persistência da infecção pela *H. Pylori*. Depois de entrar na célula, CagA é fosforilada e se liga à tirosina fosfatase, que induz secreção de IL-8, uma proteína mediadora no processo inflamatório (KEATES et.al.; 1999).

Alguns estudos demonstraram alta correlação com a presença do gene *cagA* e processo inflamatório (NAMEKATA et al., 2000; RUDI et al., 2000). *H. pylori cagA* positiva é associada com atrofia da mucosa gástrica e câncer gástrico (HAMLET et al., 1999; ANDERSON et al., 2002; Podzorski et al., 2003). QUEIROZ et al. (1998) demonstraram que existe uma correlação entre a presença de *cagA* e o desenvolvimento de câncer gástrico distal.

O aumento da expressão de IL-8 é encontrado em pacientes com doenças gástricas que são infectados com *H. pylori* e existe uma possível associação entre os marcadores de virulência e a expressão de IL-8 (SIDDIQUE et al., 2014; FAN et al., 1995; CRABTREE et al., 1994; NAGASHIMA et al., 2015). Além do mais, os níveis de IL-8 foram observados significativamente correlacionados com a adesão, migração e invasão de células de câncer gástrico. Entretanto, a presença do genótipo *cagA* não foi associado com a gravidade da gastrite ou a indução de expressão de IL-8 na mucosa gástrica (LEE et al., 2013; SHI e WEI,2014).

Recentemente, GIGEK et al., (2017) descreveram diferentes estudos de associação de polimorfismos em genes que codificam citocinas, a infecção por *H. pylori* e o risco aumentado para o desenvolvimento de câncer gástrico. Além disso, o genótipo combinado de bactérias/hospedeiros pode prover uma importante ferramenta na definição do risco do desenvolvimento de câncer gástrico. Por exemplo, o polimorfismo 511C>T (rs16944) no gene codificante de IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória induzida por infecção de *H. pylori* e um forte inibidor de secreção gástrica ácida (Santos et al., 2012), pode conferir risco aumentado de câncer gástrico. Segundo FIGUEREIDO (2002) a combinação do alelo T e marcadores de virulência da bactéria foram associados com um alto risco de desenvolver câncer gástrico.

Muitos autores demonstraram que o polimorfismo 251A>T (rs4073) no gene que codifica IL-8 parece influenciar a susceptibilidade a doenças gástricas relacionadas a *H. Pylori* na população japonesa. Similarmente, o valor de neutrófilos infiltrados, o qual é

associado com infecção por *H. pylori*, foi significativamente maior no genótipo A/A do que no genótipo T/T; assim sendo, esse polimorfismo foi associado com a alta expressão de IL-8, infiltração mais grave de neutrófilos, e um risco aumentado de gastrite atrófica e câncer gástrico (OHYAUCHI et al., 2005; TAGUCHI et al., 2005). Em contraste, o risco aumentado de câncer gástrico no indivíduo com o alelo T polimórfico foi reportado (Lee et al., 2005).

1.6 Aplicabilidade Clínica

A produção e o controle de citocinas são altamente complexos e multifatoriais, e seus efeitos são refletidos através de múltiplas sub-redes reguladoras. De fato, a resposta celular aos estímulos requer uma coordenação perfeita entre receptores celulares e a rede metabólica intracelular para integrar estímulos externos e ativar respostas metabólicas efetivas. A resposta celular efetiva é, por sua vez, mediada por citocinas (COUSSENS e WERB, 2002; GERMANO et al., 2008). As citocinas possuem um fluxo que é essencialmente externo à célula, as células remetem (secretam) moléculas informativas sem aguardar a resposta, mas a mensagem (citocina) passa por um meio bastante homogêneo até um receptor de espera, que é o receptor de outra célula do mesmo tipo ou diferente. Por sua vez, o receptor, que é um intermediário, recebe, autentica e transporta a mensagem para o interior da célula receptora por meio de caminhos de sinalização específicos, para alcançar o receptor verdadeiro que normalmente é o núcleo da célula (NGUYEN et al., 2013; CAPONE et al., 2016). O excesso de citocinas produzido durante a iniciação, desenvolvimento e progressão tumoral pode alcançar a corrente sanguínea. Essa complexidade do mecanismo em que ocorre a comunicação celular e a formação da resposta inflamatória sugere que apenas um conhecimento integral e simultâneo do papel das diferentes citocinas pode ajudar a descrever seu papel no câncer em vez de uma avaliação de citocinas isoladas.

No presente estudo, realizamos a quantificação dos níveis de 27 citocinas (IL-17A, IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, Eotaxin, FGF basic, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP10, MPC1, MIP1 α , PDGFbb, MIP1 β , RANTES, TNF- α e VEGF) no soro de pacientes com câncer gástrico e indivíduos saudáveis, utilizando a tecnologia multiplex. Adicionalmente, realizamos a análise *in silico* da associação da expressão dessas citocinas nos tumores gástricos com sobrevida global (OS) e sobrevida

livre de doença (PFS) para testar a hipótese de que os níveis circulantes de citocinas poderiam funcionar como indicadores indiretos do dano tecidual e que sua medida poderia ser um biomarcador útil para o diagnóstico e prognóstico do doente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar o nível de citocinas no soro de pacientes com câncer gástrico e determinar potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico para esse tipo de neoplasia.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar o nível das citocinas no soro dos pacientes com câncer gástrico e grupo controle;
- Comparar o nível das citocinas no soro dos pacientes com adenocarcinoma gástrico e grupo controle;
- Verificar associação do nível das citocinas no soro com os dados clinicopatológicos dos pacientes com adenocarcinomagástrico;
- Analisar a associação entre a expressão de citocinas e a sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (PFS) em pacientes com tumores de gástricos;
- Identificar potenciais biomarcadores sorológicos úteis para determinar o diagnóstico e prognóstico do paciente com câncergástrico.

3 MATERIAL EMÉTODOS

3.1 Casuística

Foram coletadas amostras de 5mL de sangue em tubo com gel separador BD Vacutainer SST™ II Advance (Beckon Dickinson, Reino Unido) de 21 pacientes com câncer gástrico primário antes de serem submetidos à ressecção cirúrgica no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), localizado na cidade de Belém, no Estado do Pará.

Adicionalmente, foram coletadas amostras de soro de 13 voluntários saudáveis para controle do experimento sem doenças inflamatória e histórico de câncer, pareados por idade e sexo aos pacientes incluídos no estudo.

Durante o estudo foi realizado um contato prévio com cada paciente e voluntário, onde serão fornecidas informações acerca do objetivo da pesquisa, além do formulário para assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo I) e preenchimento do questionário (Anexo II) para posterior coleta do material. O presente trabalho faz parte do projeto “Biomarcadores no soro de pacientes com câncer gástrico”, aprovado pelo comitê de Ética do HUJBB (095988/2015).

As coletas foram realizadas por um profissional capacitado, utilizando luvas, algodão, garrote, seringas e agulhas estéreis. No laboratório de base do Núcleo de Pesquisas em Oncologia, essas amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 15 minutos, em seguida, o soro foi dividido em alíquotas e transferido para criotubos, foram identificados e armazenados em freezer a -80°C, até o momento do experimento.

3.2 Detecção de proteínas

O sistema MAGPIX foi utilizado para mensurar as proteínas candidatas a biomarcadores séricos em câncer gástrico de acordo com metodologia estabelecida pelo fabricante (Figura 5). Foi utilizado um painel *Bio-Plex Pro Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays* (Bio-rad), contendo proteínas candidatas a biomarcadores em câncer (IL-17A, IL-1β, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP10, MPC-1, MIP1α, PDGFbb,

MIP1 β , RANTES, TNF- α e VEGF), totalizando 27 proteínas



Figura 5: Etapas do ensaio de expressão de proteínas do sistema MAGPIX.

3.3 Análise estatística

Devido o número amostral, os dados foram analisados utilizando testes não paramétricos, Mann-Whitney e correlação de Spearman. Diferenças estatísticas significantes foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

Para análise de correlação foi utilizado o teste de correlação de Spearman, dependendo da normalidade dos dados. A correlação foi classificada como: fraca quando $r < 0,40$, moderada quando $0,40 < r < 0,59$, forte quando $0,60 < r < 0,79$ e muito forte quando $r > 0,8$. Foi realizado também a curva ROC para avaliar a sensibilidade e especificidade das citocinas.

3.4 Análise de sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (PFS).

O KM Plotter Online Tool (<http://www.kmplot.com>) foi utilizado para avaliar a associação entre a presença da expressão dos mediadores inflamatórios e a sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (PFS) em pacientes com tumores degástricos.

4. RESULTADO

4.1 Caracterização da amostra

A análise das citocinas foi realizada em 21 pacientes com câncer gástrico, sendo 19 pacientes com adenocarcinoma e dois pacientes sugestivos de linfoma, e 13 indivíduos saudáveis utilizados como controle. Dentre os 19 pacientes com adenocarcinoma gástrico, apenas 16 foram submetidos à ressecção cirúrgica e utilizados para a análise de associação do nível de citocinas e características clinicopatológicas dos pacientes.

As características do grupo controles e pacientes, divididos em três grupos (câncer gástrico, adenocarcinoma e linfoma) podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5. Características de controles e pacientes.

| Características | Controles | Câncer Gástrico | Adenocarcinoma | Linfoma |
|-------------------------|------------|-----------------|----------------|---------|
| Gênero | | | | |
| Masculino | 10 | 16 | 15 | 1 |
| Feminino | 3 | 5 | 4 | 1 |
| Idade | | | | |
| ≤45 | 8 | 3 | 3 | 0 |
| >45 | 5 | 18 | 16 | 2 |
| (MED±IQR) | 47,8±10,01 | 57±15 | 57±10,47 | 68±6 |
| Tipo Histológico | | | | |
| Difuso | - | 5 | 5 | - |
| Intestinal | - | 11 | 11 | - |
| Não se aplica | 13 | 5 | 3 | 2 |

4.2 Comparação dos níveis de citocinas no soro entre os diferentes grupos.

Na comparação da expressão no soro das 27 citocinas estudadas entre o grupo pacientes com câncer gástrico (adenocarcinoma e linfoma gástrico) e grupo controle, os níveis de IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α e VEGF no soro foram significativamente maiores no grupo de pacientes com câncer gástrico (Tabela 6).

Tabela 6. Citocinas no soro de controle saudáveis e pacientes com câncer gástrico (mediana \pm desvio interquartilico).

| Proteínas | Controle | Câncer Gástrico | p |
|---------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| IL-1 β | 45,5 \pm 6,85 | 51,0 \pm 10,50 | 0,035* |
| IL-1RA | 35,5 \pm 7,90 | 40,3 \pm 3,88 | 0,016* |
| IL-2 | 49 \pm 11,25 | 60,5 \pm 12,10 | 0,004* |
| IL-4 | 63,5 \pm 16,15 | 79,0 \pm 61,50 | 0,261 |
| IL-5 | 38,5 \pm 10,15 | 40,5 \pm 16,10 | 0,529 |
| IL-6 | 36,3 \pm 6,90 | 59,0 \pm 44,0 | 0,0001* |
| IL-7 | 18,3 \pm 4,00 | 20,5 \pm 8,25 | 0,104 |
| IL-8 | 47,8 \pm 10,40 | 67,0 \pm 61,25 | 0,0001* |
| IL-9 | 79,8 \pm 19,75 | 90,0 \pm 18,5 | 0,027* |
| IL-10 | 33,5 \pm 4,75 | 40,0 \pm 14,5 | 0,004* |
| IL-12 | 50 \pm 12,90 | 61,0 \pm 19,25 | 0,055 |
| IL-13 | 15 \pm 4,25 | 16,5 \pm 5,75 | 0,070 |
| IL-17A | 119,3 \pm 27,60 | 139,5 \pm 43,50 | 0,104 |
| IL-15 | 54,8 \pm 12,25 | 63,0 \pm 29,15 | 0,009* |
| Eotaxin | 157 \pm 92,25 | 98,5 \pm 76,25 | 0,076 |
| FGF basic | 60,5 \pm 10,00 | 68,0 \pm 24,75 | 0,076 |
| G-CSF | 48 \pm 7,15 | 53,5 \pm 6,60 | 0,012* |
| GM-CSF | 89,3 \pm 11,75 | 105,0 \pm 27,0 | 0,004* |
| IFN γ | 37 \pm 7,50 | 40,8 \pm 9,40 | 0,042 |
| IP10 | 416 \pm 489,75 | 567,5 \pm 510,15 | 0,420 |
| MPC-1 | 705 \pm 22,20 | 71,8 \pm 23,50 | 0,441 |
| MIP1 α | 33,8 \pm 6,25 | 40,0 \pm 12,75 | 0,008* |
| PDGFbb | 2223 \pm 1320,60 | 2216,0 \pm 1353,0 | 0,889 |
| MIP1 β | 649,8 \pm 305,40 | 745,0 \pm 498,3 | 0,727 |
| RANTES | 21386,5 \pm 1054,85 | 20345,5 \pm 3143,25 | 0,060 |
| TNF- α | 49 \pm 7,85 | 56,0 \pm 10,50 | 0,129 |
| VEGF | 74 \pm 19,50 | 90,5 \pm 30,40 | 0,016* |

Ao realizar a comparação dos níveis de citocinas no soro de pacientes com

adenocarcinoma gástrico e grupo controle, observamos IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α , RANTES e VEGF estatisticamente elevadas no grupo de pacientes com adenocarcinoma gástrico (Tabela 7).

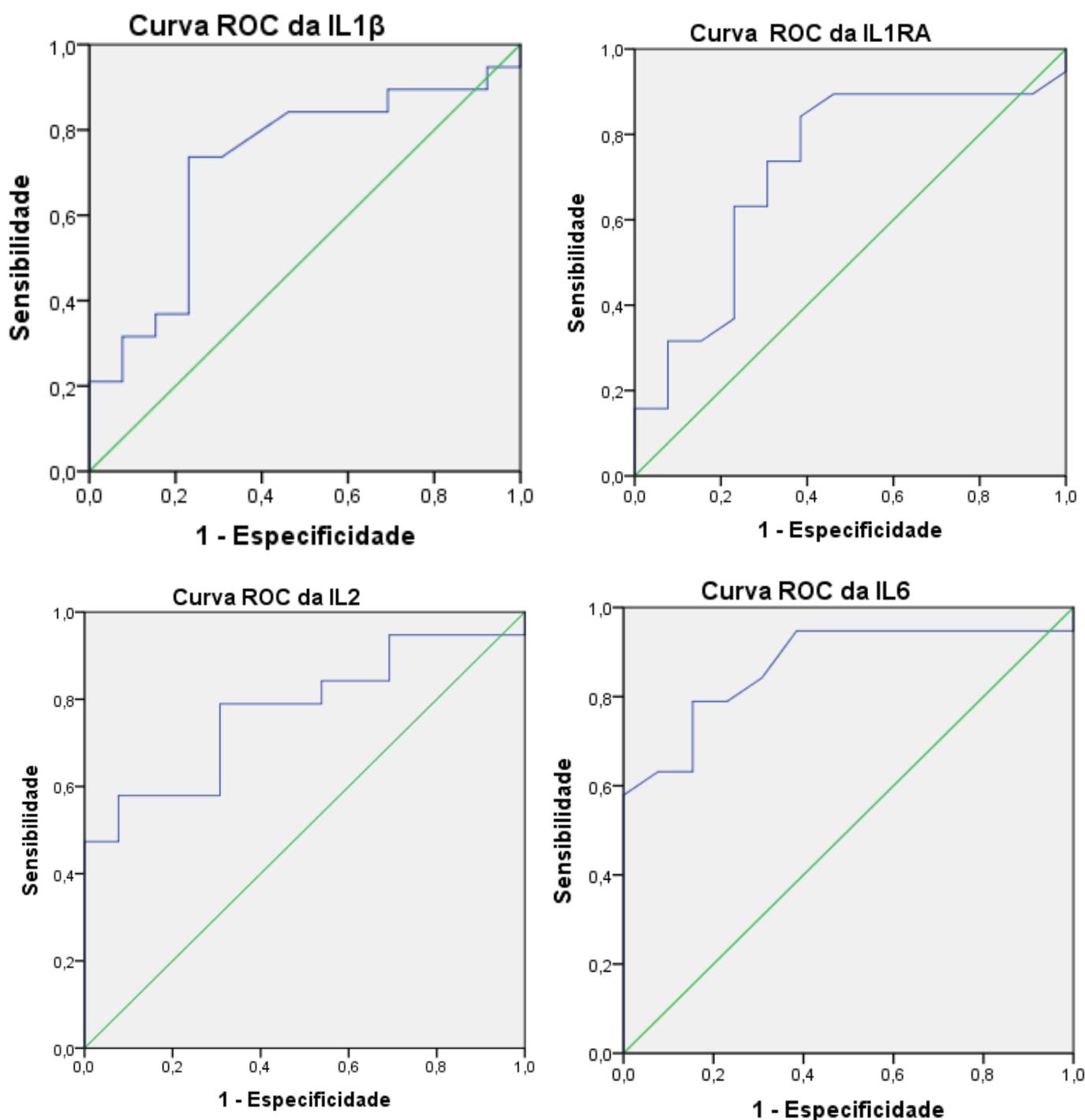
Tabela 7: Citocinas no soro de controle saudáveis e pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana \pm desvio interquartilico).

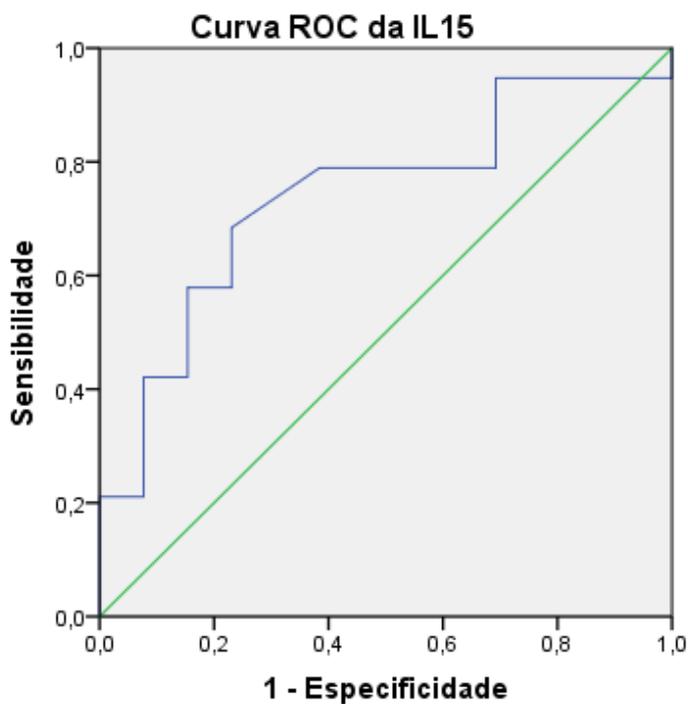
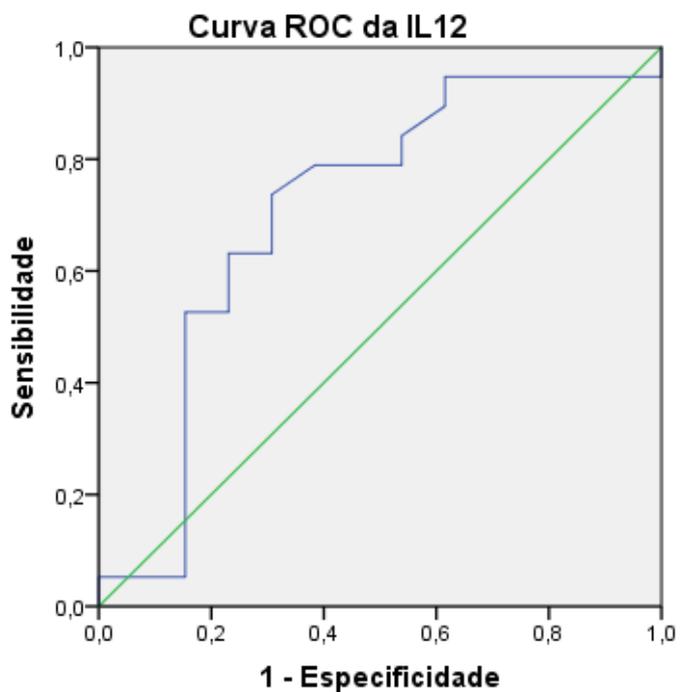
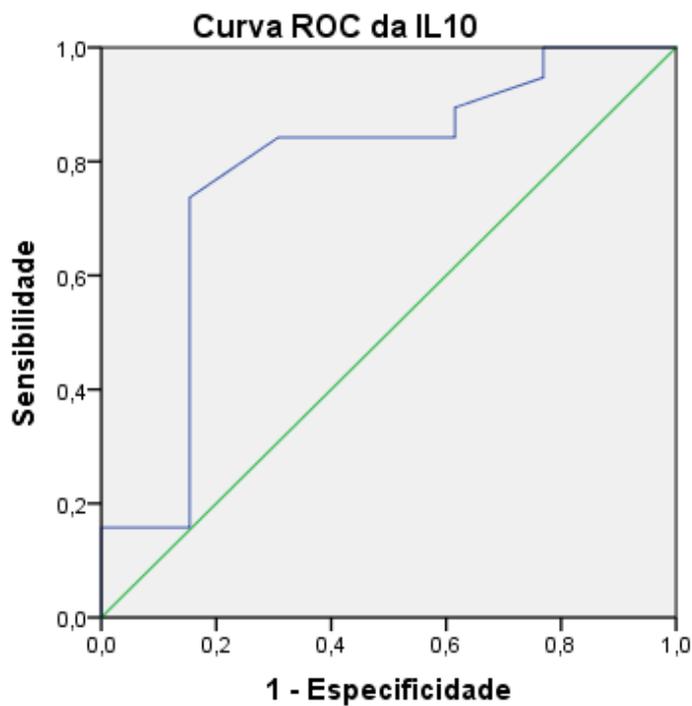
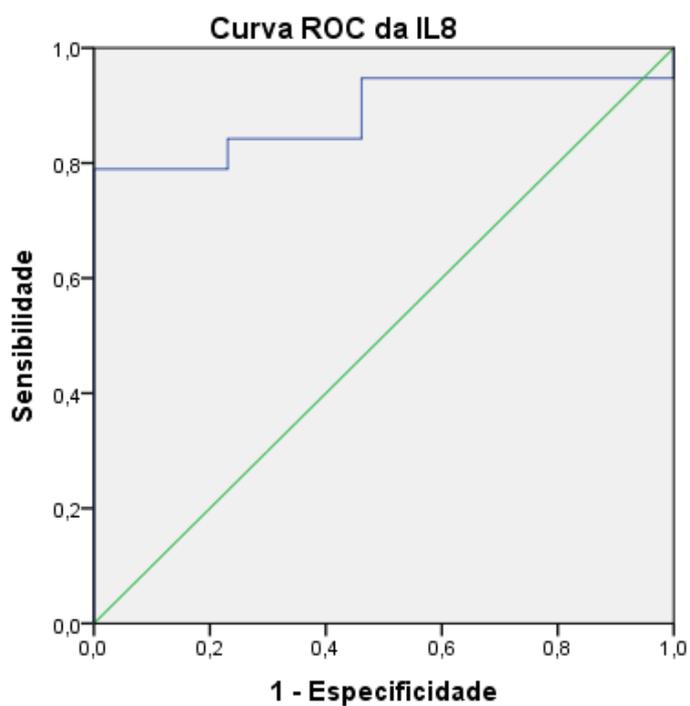
| Proteínas | Controle | Adenocarcinoma | p |
|----------------|-----------------------|----------------------|---------|
| IL-1 β | 45,5 \pm 6,85 | 51,0 \pm 10,0 | 0,037* |
| IL-1RA | 35,5 \pm 7,90 | 41,0 \pm 6,00 | 0,037* |
| IL-2 | 49 \pm 11,25 | 59,3 \pm 11,2 | 0,009* |
| IL-4 | 63,5 \pm 16,15 | 79,0 \pm 27,5 | 0,238 |
| IL-5 | 38,5 \pm 10,15 | 40,5 \pm 12,0 | 0,545 |
| IL-6 | 36,3 \pm 6,90 | 59,0 \pm 39,0 | 0,0001* |
| IL-7 | 18,3 \pm 4,00 | 20,5 \pm 8,00 | 0,092 |
| IL-8 | 47,8 \pm 10,40 | 67,0 \pm 96,0 | 0,0001* |
| IL-9 | 79,8 \pm 19,75 | 90,0 \pm 16,50 | 0,054 |
| IL-10 | 33,5 \pm 4,75 | 40,0 \pm 13,50 | 0,008* |
| IL-12 | 50 \pm 12,90 | 61,0 \pm 19,5 | 0,049* |
| IL-13 | 15 \pm 4,25 | 16,5 \pm 5,00 | 0,077 |
| IL-17A | 119,3 \pm 27,60 | 139,5 \pm 39,0 | 0,084 |
| IL-15 | 54,8 \pm 12,25 | 62,5 \pm 15,3 | 0,022* |
| Eotaxin | 157 \pm 92,25 | 98,5 \pm 59,5 | 0,084 |
| FGF basic | 60,5 \pm 10,00 | 68,0 \pm 25,0 | 0,071 |
| G-CSF | 48 \pm 7,15 | 53,5 \pm 8,00 | 0,020* |
| GM-CSF | 89,3 \pm 11,75 | 104,5 \pm 16,5 | 0,009* |
| IFN - γ | 37 \pm 7,50 | 40,8 \pm 8,30 | 0,049* |
| IP10 | 416 \pm 489,75 | 563,0 \pm 675,0 | 0,448 |
| MPC-1 | 705 \pm 22,20 | 71,0 \pm 19,8 | 0,623 |
| MIP1 α | 33,8 \pm 6,25 | 40,0 \pm 13,50 | 0,011* |
| PDGFbb | 2223 \pm 1320,60 | 2216,0 \pm 1161,5 | 0,880 |
| MIP1 β | 649,8 \pm 305,40 | 745,0 \pm 570,8 | 0,762 |
| RANTES | 21386,5 \pm 1054,85 | 20311,3 \pm 3244,0 | 0,033* |
| TNF- α | 49 \pm 7,85 | 56,0 \pm 8,00 | 0,108 |
| VEGF | 74 \pm 19,50 | 90,0 \pm 20,80 | 0,027* |

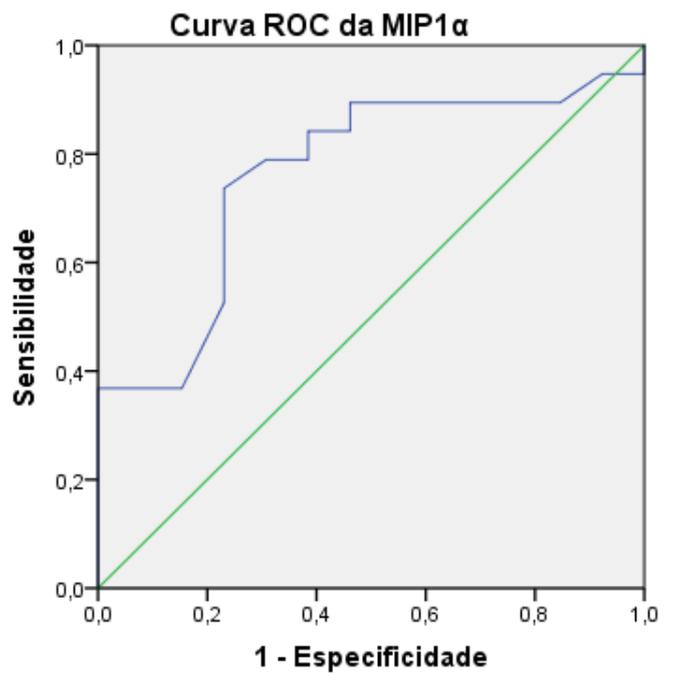
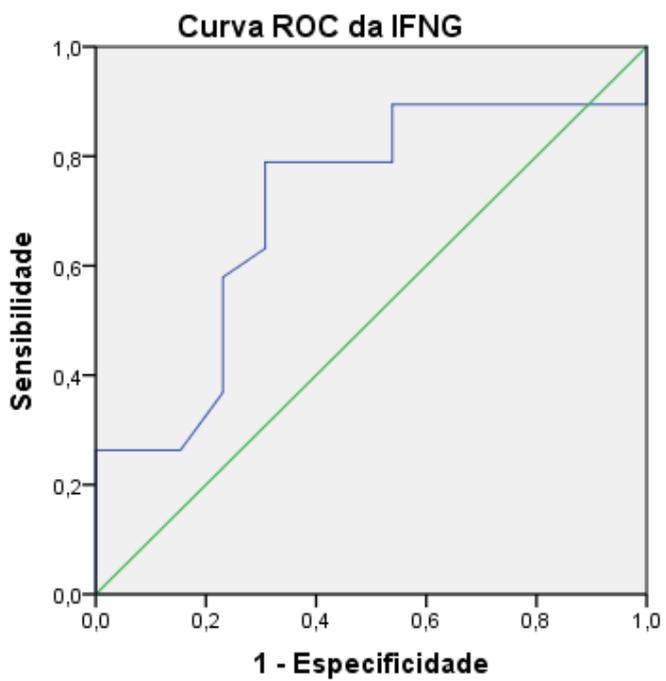
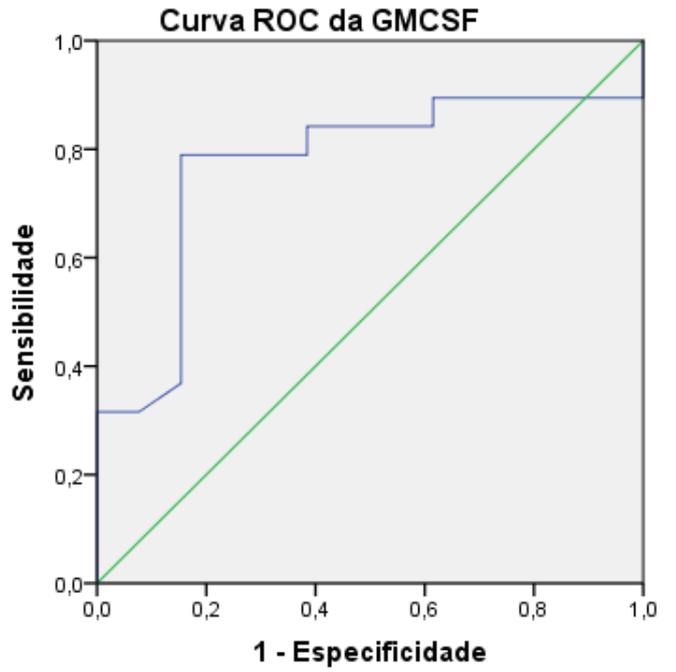
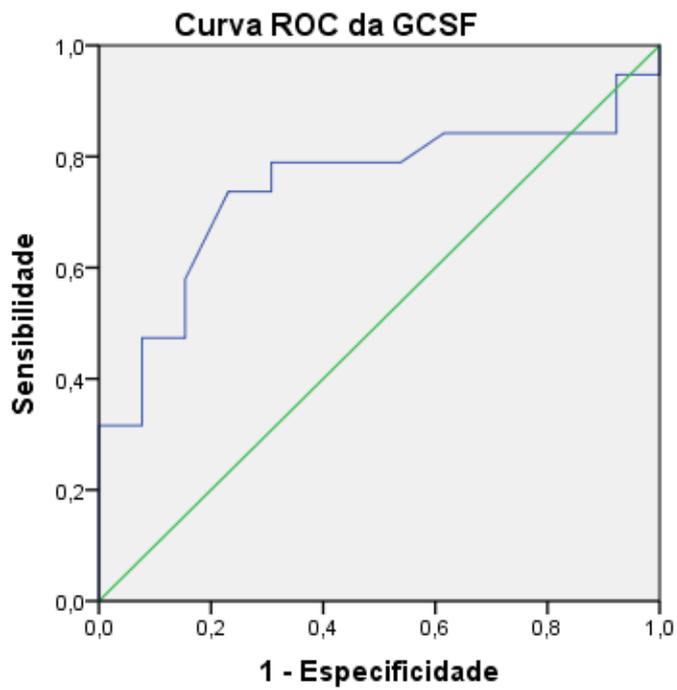
4.3 Curva ROC das citocinas estatisticamente significativas

Foi realizado a curva ROC das citocinas (IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α , RANTES e VEGF) presentes no soro dos controles e pacientes com adenocarcinoma gástrico que apresentaram $p \leq 0,05$ (Figura 6). Os principais dados avaliados foram o ponto de corte de cada gráfico, a sensibilidade, a especificidade, o intervalo de confiança de 95%, a área do gráfico (AUG) e o valor de p (Tabela 8).

Figura 6: Análise de curva ROC das citocinas IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α , RANTES e VEGF de controles e pacientes de adenocarcinoma gástrico.







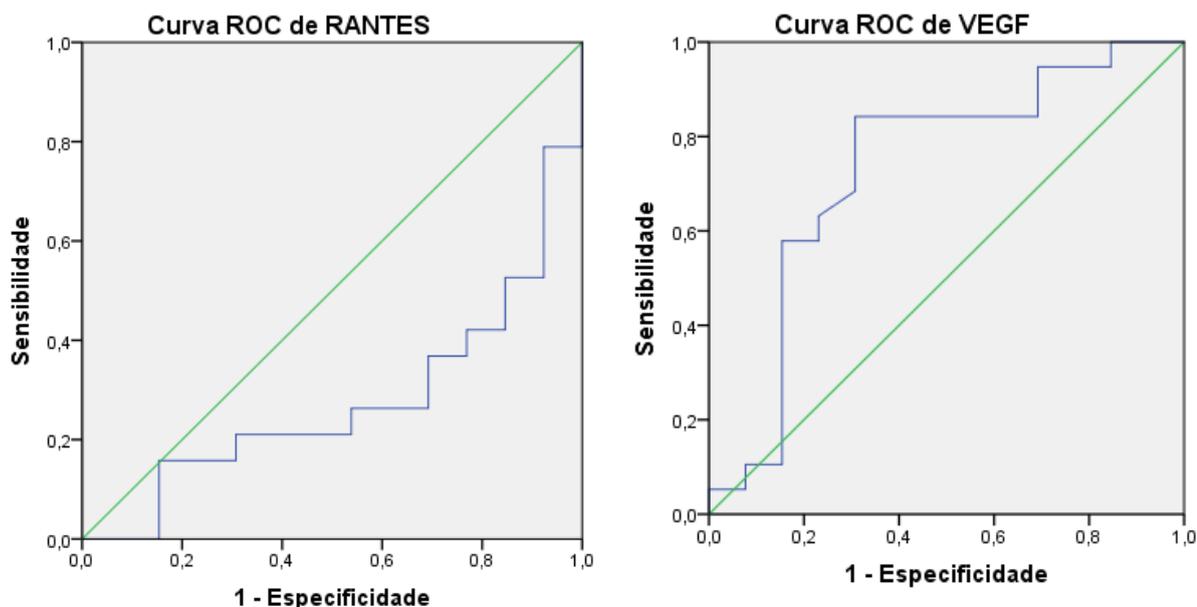


Tabela 8. Ponto de corte da curva ROC, sensibilidade, especificidade, intervalo de confiança de 95%, área e valor de significância como predição de alterações dos níveis de citocinas em grupos saudáveis e pacientes com adenocarcinoma gástrico.

| Citocina | Ponto de Corte | Sensibilidade | Especificidade | IC (95%) | Área(AUC) | p |
|--------------------------------|----------------|---------------|----------------|-----------|-----------|--------|
| IL-1β | $\leq 47,5$ | 0,769 | 0,737 | 0,53-0,90 | 0,721 | 0,037 |
| IL-1RA | ≤ 36 | 0,615 | 0,842 | 0,52-0,90 | 0,719 | 0,038 |
| IL-2 | ≤ 57 | 0,923 | 0,579 | 0,61-0,93 | 0,773 | 0,010 |
| IL-6 | $\leq 40,8$ | 0,846 | 0,789 | 0,74-0,99 | 0,870 | 0,0001 |
| IL-8 | $\leq 55,5$ | 1,00 | 0,789 | 0,76-1,00 | 0,887 | 0,0001 |
| IL-10 | $\leq 35,5$ | 0,846 | 0,737 | 0,59-0,95 | 0,777 | 0,009 |
| IL-12 | ≤ 52 | 0,692 | 0,737 | 0,50-0,90 | 0,709 | 0,048 |
| IL-15 | ≤ 58 | 0,769 | 0,684 | 0,56-0,91 | 0,741 | 0,022 |
| G-CSF | $\leq 50,8$ | 0,769 | 0,737 | 0,56-0,92 | 0,745 | 0,020 |
| GM-CSF | ≤ 96 | 0,846 | 0,789 | 0,59-0,94 | 0,771 | 0,010 |
| IFN-γ | $\leq 37,5$ | 0,692 | 0,789 | 0,51-0,89 | 0,706 | 0,050 |
| MIP1α | ≤ 36 | 0,769 | 0,737 | 0,59-0,93 | 0,763 | 0,013 |
| RANTES | > 20856 | 0,692 | 0,737 | 0,09-0,45 | 0,275 | 0,033 |
| VEGF | $\leq 77,5$ | 0,692 | 0,842 | 0,53-0,92 | 0,731 | 0,029 |

A curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) permite avaliar a variação da

sensibilidade e da especificidade para diferentes valores de corte de cada citocina. Entre as 14 citocinas analisadas, as que apresentaram menor valor de significância foram IL-6 e IL-8, com valores de $p=0,0001$. A análise da curva ROC demonstrou que o melhor ponto de corte da IL-6 foi $\leq 40,8$ com índice de Youden de 0,62, a sensibilidade de 84,6% e especificidade de 78,9%. Para IL-8, o melhor ponto de corte foi $\leq 55,5$. Neste ponto, o índice de Youden, sensibilidade e especificidade foram 0,78, 100% e 78,9%, respectivamente.

4.4 Correlação de Spearman

Devido a natureza não paramétrica, os dados foram analisados utilizando o coeficiente de correlação não paramétrica de Spearman (r). Foram avaliadas as correlações entre as citocinas IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α , RANTES e VEGF presentes no soro de pessoas saudáveis e pacientes com adenocarcinoma gástrico, como mostra o Quadro 1.

As correlações muito forte, ou sejam, com $r>0,80$, foram observadas entre as citocinas IL-1 β e IL-1RA, IL-1 β e G-CSF, IL-1 β e IFN- γ , IL-1RA e G-CSF, IL-1RA e IFN- γ , IL-2 e GM-CSF, IL-2 e MIP1 α , IL-6 e IL-8, IL-10 e IL-12, IL-10 e VEGF, G-CSF e IFN- γ (Quadro 1).

Quadro 1: Análise da correlação de Spearman entre as citocinas IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α , RANTES e VEGF.

| | | IL1 β | IL1RA | IL2 | IL6 | IL8 | IL10 | IL12 | IL5 | GCSF | GMCSF | IFNG | MIP1 α | RANTES | VEGF |
|-------------|---------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------|--------|--------|
| IL1 β | Coef. de Correlação | 1,000 | ,914** | ,681** | ,733** | ,663** | ,658** | ,483** | ,512** | ,940** | ,628** | ,922** | ,673** | ,116 | ,523** |
| | Sig. (bilateral) | . | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,005 | ,003 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,527 | ,002 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| IL1RA | Coef. de Correlação | ,914** | 1,000 | ,606** | ,761** | ,714** | ,579** | ,367* | ,521** | ,850** | ,586** | ,868** | ,621** | ,061 | ,491** |
| | Sig. (bilateral) | ,000 | . | ,000 | ,000 | ,000 | ,001 | ,039 | ,002 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,742 | ,004 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| IL-2 | Coef. de Correlação | ,681** | ,606** | 1,000 | ,707** | ,603** | ,706** | ,494** | ,349 | ,650** | ,836** | ,698** | ,839** | -,183 | ,654** |
| | Sig. (bilateral) | ,000 | ,000 | . | ,000 | ,000 | ,000 | ,004 | ,050 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,317 | ,000 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| IL-6 | Coef. de Correlação | ,733** | ,761** | ,707** | 1,000 | ,885** | ,681** | ,496** | ,337 | ,745** | ,719** | ,750** | ,654** | -,228 | ,629** |
| | Sig. (bilateral) | ,000 | ,000 | ,000 | . | ,000 | ,000 | ,004 | ,060 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,209 | ,000 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| IL-8 | Coef. de Correlação | ,663** | ,714** | ,603** | ,885** | 1,000 | ,612** | ,543** | ,286 | ,677** | ,601** | ,765** | ,640** | -,150 | ,546** |
| | Sig. (bilateral) | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | . | ,000 | ,001 | ,113 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,413 | ,001 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| IL-10 | Coef. de Correlação | ,658** | ,579** | ,706** | ,681** | ,612** | 1,000 | ,849** | ,182 | ,709** | ,715** | ,694** | ,662** | -,179 | ,894** |
| | Sig. (bilateral) | ,000 | ,001 | ,000 | ,000 | ,000 | . | ,000 | ,318 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,326 | ,000 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| IL-12 | Coef. de Correlação | ,483** | ,367* | ,494** | ,496** | ,543** | ,849** | 1,000 | ,012 | ,564** | ,546** | ,558** | ,470** | -,179 | ,782** |
| | Sig. (bilateral) | ,005 | ,039 | ,004 | ,004 | ,001 | ,000 | . | ,947 | ,001 | ,001 | ,001 | ,007 | ,327 | ,000 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| IL-5 | Coef. de Correlação | ,512** | ,521** | ,349 | ,337 | ,286 | ,182 | ,012 | 1,000 | ,485** | ,092 | ,467** | ,346 | ,259 | ,182 |
| | Sig. (bilateral) | ,003 | ,002 | ,050 | ,060 | ,113 | ,318 | ,947 | . | ,005 | ,617 | ,007 | ,053 | ,152 | ,320 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| G-CSF | Coef. de Correlação | ,940** | ,850** | ,650** | ,745** | ,677** | ,709** | ,564** | ,485** | 1,000 | ,606** | ,860** | ,602** | ,019 | ,571** |
| | Sig. (bilateral) | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,001 | ,005 | . | ,000 | ,000 | ,000 | ,918 | ,001 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| GM-CSF | Coef. de Correlação | ,628** | ,586** | ,836** | ,719** | ,601** | ,715** | ,546** | ,092 | ,606** | 1,000 | ,645** | ,752** | -,252 | ,594** |
| | Sig. (bilateral) | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,001 | ,617 | ,000 | . | ,000 | ,000 | ,164 | ,000 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| IFN- γ | Coef. de Correlação | ,922** | ,868** | ,698** | ,750** | ,765** | ,694** | ,558** | ,467** | ,860** | ,645** | 1,000 | ,758** | ,056 | ,553** |
| | Sig. (bilateral) | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,001 | ,007 | ,000 | ,000 | . | ,000 | ,760 | ,001 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| MIP1 α | Coef. de Correlação | ,673** | ,621** | ,839** | ,654** | ,640** | ,662** | ,470** | ,346 | ,602** | ,752** | ,758** | 1,000 | -,082 | ,594** |
| | Sig. (bilateral) | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | ,007 | ,053 | ,000 | ,000 | ,000 | . | ,655 | ,000 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| RANTES | Coef. de Correlação | ,116 | ,061 | -,183 | -,228 | -,150 | -,179 | -,179 | ,259 | ,019 | -,252 | ,056 | -,082 | 1,000 | -,117 |
| | Sig. (bilateral) | ,527 | ,742 | ,317 | ,209 | ,413 | ,326 | ,327 | ,152 | ,918 | ,164 | ,760 | ,655 | . | ,525 |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| VEGF | Coef. de Correlação | ,523** | ,491** | ,654** | ,629** | ,546** | ,894** | ,782** | ,182 | ,571** | ,594** | ,553** | ,594** | -,117 | 1,000 |
| | Sig. (bilateral) | ,002 | ,004 | ,000 | ,000 | ,001 | ,000 | ,000 | ,320 | ,001 | ,000 | ,001 | ,000 | ,525 | . |
| | N | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |

** . A correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

* . A correlação é significativa no nível 0,05 (bilateral).

4.4 Associação do nível de citocinas no soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico e dados clinicopatológicos

Em relação às características clinicopatológicas dos pacientes com adenocarcinoma gástrico que realizaram ressecção cirúrgica, observamos diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-17A ($150,5 \pm 48,80$, $p=0,01$; mediana \pm desvio interquartilico), IL-5 ($49 \pm 12,75$, $p=0,02$), IL-7 ($22 \pm 32,25$, $p=0,03$) e IL-10 ($45,5 \pm 46,25$, $p=0,02$) no tipo histológico difuso em relação ao intestinal, da IP-10 ($493,25 \pm 233,75$; $0,033$) no câncer localizado na cárdia em relação ao localizado no antro e piloro e da IL-5 ($48,5 \pm 16,63$; $0,007$) e IL-17A ($128,5 \pm 45,13$; $0,042$) no estadiamento N (N1-N3 em relação a N0) (Tabela 9 - 13)

Tabela 9. Análise dos níveis de proteínas IL-17A, IL-1 β , IL-5, IL-1RA, IL-2, IL-4 e IL-5 correlacionada aos dados clinicopatológicos de pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana \pm IQR).

| Características clinicopatológicas | IL-17A | p | IL-1 β | P | IL-1RA | p | IL-2 | p | IL-4 | p | IL-5 | P |
|------------------------------------|--------------------|--------|-------------------|-------|------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|------------------|---------|
| Gênero | | | | | | | | | | | | |
| Masculino | 134 \pm 33 | 0,239 | 49,5 \pm 12,00 | 0,521 | 39,3 \pm 7,00 | 0,296 | 62 \pm 13,35 | 0,90 | 73,5 \pm 33,75 | 0,146 | 38 \pm 19,00 | 0,296 |
| Feminino | 150,5 | | 51 | | 41 | | 58 | | 82 | | 41,5 | |
| Idade | | | | | | | | | | | | |
| \leq 45 | 123 | 0,146 | 48 | 0,189 | 38 | 0,439 | 52,3 | 0,296 | 77 | 0,439 | 38 | 0,296 |
| $>$ 45 | 140 \pm 32,75 | | 51 \pm 10,00 | | 40,5 \pm 5,75 | | 59,3 \pm 10,35 | | 79 \pm 25,00 | | 40,5 \pm 15,50 | |
| Local | | | | | | | | | | | | |
| Cárdia | 162 | 0,70 | 63,25 | 0,70 | 54,4 | 0,70 | 67,75 | 0,817 | 76,4 | 0,933 | 49,75 | 0,15 |
| Antro/Piloro | 137,75 \pm 26,13 | | 50,5 \pm 7,00 | | 40,4 \pm 4,13 | | 58,65 \pm 10,30 | | 78 \pm 33,43 | | 38 \pm 15,63 | |
| Histopatológico | | | | | | | | | | | | |
| Difuso | 150,5 \pm 48,80 | 0,013* | 51 \pm 19,00 | 0,115 | 42 \pm 18,65 | 0,069 | 62 \pm 19,25 | 0,267 | 81,3 \pm 11,25 | 0,145 | 49 \pm 12,75 | 0,0001* |
| Intestinal | 124 \pm 40,00 | | 48 \pm 36,50 | | 39,3 \pm 5,00 | | 53,3 \pm 15,50 | | 73,5 \pm 36,20 | | 38 \pm 16,00 | |
| Estadiamento | | | | | | | | | | | | |
| I – II | 141 \pm 41,3 | 0,174 | 51 \pm 10,50 | 0,606 | 41 \pm 7,50 | 0,351 | 62 \pm 23,0 | 0,142 | 79 \pm 18,0 | 0,681 | 48 \pm 19,50 | 0,091 |
| III - IV | 134 \pm 42,5 | | 49,5 \pm 9,50 | | 39,3 \pm 4,25 | | 53 \pm 15,65 | | 77 \pm 34,10 | | 38 \pm 13,75 | |
| T | | | | | | | | | | | | |
| T1 | 143,25 | 0,600 | 51 | 0,817 | 41,5 | 0,333 | 56 | 0,817 | 80,75 | 0,333 | 44,75 | 0,267 |
| T2 - T4 | 136,75 \pm 32,75 | | 49,75 \pm 10,75 | | 39,8 \pm 5,25 | | 60,65 \pm 12,28 | | 75,25 \pm 32,77 | | 38 \pm 15,50 | |
| N | | | | | | | | | | | | |
| N0 | 145,75 \pm 43,30 | 0,042* | 51 \pm 14,50 | 0,220 | 41,5 \pm 12,60 | 0,093 | 60 \pm 15,30 | 0,428 | 80,15 \pm 11,50 | 0,220 | 48,5 \pm 16,63 | 0,007* |
| N1 – N3 | 128,5 \pm 45,13 | | 48,75 \pm 11,00 | | 38,65 \pm 6,88 | | 56,15 \pm 15,75 | | 74,25 \pm 36,53 | | 38 \pm 16,93 | |

Tabela 10. Análise dos níveis de proteínas IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 correlacionadas aos dados clinicopatológicos de pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana ± IQR).

| Características clinicopatológicas | IL-6 | p | IL-7 | P | IL-8 | p | IL-9 | p | IL-10 | p | IL-12 | P |
|------------------------------------|-------------|-------|------------|--------|--------------|-------|------------|-------|-------------|--------|-------------|-------|
| Gênero | | | | | | | | | | | | |
| Masculino | 49±45,50 | 0,439 | 20±5,00 | 0,189 | 71,3±63,75 | 0,239 | 88±14,50 | 0,90 | 39±13,00 | 0,90 | 65±16,85 | 0,111 |
| Feminino | 41,5 | | 21 | | 58 | | 84 | | 40 | | 49,5 | |
| Idade | | | | | | | | | | | | |
| ≤45 | 41,5 | 0,80 | 18,5 | 0,364 | 75,3 | 0,239 | 79 | 0,239 | 35,5 | 0,189 | 65 | 0,90 |
| >45 | 49±33,75 | | 20,5±6,75 | | 58,5±29,40 | | 90±14,90 | | 40±12,25 | | 58±18,75 | |
| Local | | | | | | | | | | | | |
| Cárdia | 84,5 | 0,417 | 26,25 | 0,817 | 117,25 | 0,15 | 108,65 | 0,50 | 81,5 | 0,70 | 65,75 | 0,50 |
| Antro/Piloro | 45,5±31,00 | | 20,25±4,13 | | 59,75±25,05 | | 86±14,83 | | 39,5±10,25 | | 59,5±17,13 | |
| Histopatológico | | | | | | | | | | | | |
| Difuso | 49±55,00 | 0,827 | 22±32,25 | 0,038* | 58,5±29,40 | 0,743 | 90±34,15 | 0,583 | 45,5±46,25 | 0,019* | 66±19,50 | 0,441 |
| Intestinal | 44±40,50 | | 19±4,00 | | 67±96,00 | | 81±15,30 | | 36,5±4,50 | | 57±16,50 | |
| Estadiamento | | | | | | | | | | | | |
| I – II | 49±27,00 | 0,837 | 21±15,50 | 0,351 | 56±27,30 | 0,174 | 84±11,50 | 1 | 44±12,50 | 0,142 | 61±18,20 | 0,606 |
| III - IV | 44±45,50 | | 20±4,50 | | 71,3±102,50 | | 88±19,65 | | 36,5±10,25 | | 57±17,75 | |
| T | | | | | | | | | | | | |
| T1 | 52,5 | 0,600 | 46 | 0,150 | 53,75 | 0,333 | 79,5 | 0,417 | 42 | 0,600 | 53,5 | 0,333 |
| T2 - T4 | 46,5±42,25 | | 20±4,50 | | 69,15±45,13 | | 89±15,10 | | 37,75±12,75 | | 63±16,50 | |
| N | | | | | | | | | | | | |
| N0 | 54±39,50 | 0,713 | 21,5±23,88 | 0,093 | 57,25±27,35 | 0,492 | 87±24,20 | 0,958 | 44,75±29,50 | 0,056 | 63,5±16,50 | 0,428 |
| N1 – N3 | 42,75±43,63 | | 19,25±5,13 | | 69,15±101,38 | | 84,5±17,22 | | 36,25±7,38 | | 55,15±17,13 | |

Tabela 11. Análise dos níveis de proteínas IL-13, IL-15, Eotaxin, FGF basic, GCSF, GM-CSF correlacionadas aos dados clinicopatológicos de pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana \pm IQR).

| Características clinicopatológicas | IL-13 | P | IL-15 | P | Eotaxin | p | FGF basic | p | GCSF | p | GM-CSF | p |
|------------------------------------|-----------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|------------------|-------|--------------------|-------|
| Gênero | | | | | | | | | | | | |
| Masculino | 16,3 \pm 5,00 | 0,611 | 61 \pm 44,65 | 0,80 | 86 \pm 73,25 | 0,90 | 62 \pm 27,65 | 0,80 | 53,5 \pm 12,75 | 0,704 | 103,8 \pm 47,50 | 0,90 |
| Feminino | 16 | | 62 | | 107 | | 68 | | 53 | | 104,5 | |
| Idade | | | | | | | | | | | | |
| \leq 45 | 16 | 0,521 | 50,5 | 0,521 | 70 | 0,521 | 61,5 | 0,189 | 53 | 0,296 | 99 | 0,90 |
| $>$ 45 | 16,3 \pm 4,50 | | 62 \pm 24,55 | | 98,5 \pm 65,65 | | 69,5 \pm 25,65 | | 55 \pm 7,25 | | 104,5 \pm 23,00 | |
| Local | | | | | | | | | | | | |
| Cárdia | 24,15 | 0,10 | 76 | 0,93 | 144,75 | 0,267 | 82,75 | 0,267 | 58,65 | 0,817 | 105,4 | 0,817 |
| Antro/Piloro | 16 \pm 2,38 | | 61,5 \pm 21,80 | | 85,65 \pm 59,23 | | 64,25 \pm 15,08 | | 53,5 \pm 7,00 | | 104,15 \pm 19,63 | |
| Histopatológico | | | | | | | | | | | | |
| Difuso | 16 \pm 10,40 | 0,583 | 63 \pm 24,90 | 0,267 | 107 \pm 116,00 | 0,913 | 70 \pm 22,40 | 0,441 | 57 \pm 9,40 | 0,115 | 106 \pm 20,25 | 0,441 |
| Intestinal | 16,3 \pm 3,00 | | 58 \pm 41,30 | | 86 \pm 59,50 | | 62 \pm 25,00 | | 53 \pm 13,30 | | 99,8 \pm 57,50 | |
| Estadiamento | | | | | | | | | | | | |
| I – II | 16 \pm 5,50 | 0,681 | 63 \pm 39,00 | 0,114 | 98,5 \pm 52,50 | 0,918 | 69,5 \pm 20,50 | 0,606 | 55 \pm 6,50 | 0,408 | 106 \pm 37,00 | 0,252 |
| III - IV | 16,5 \pm 3,00 | | 57,5 \pm 29,90 | | 85,3 \pm 76,25 | | 62 \pm 29,90 | | 53 \pm 10,65 | | 99,8 \pm 43,85 | |
| T | | | | | | | | | | | | |
| T1 | 15,5 | 0,417 | 61,5 | 1 | 87 | 0,500 | 69 | 0,700 | 54 | 1 | 102,25 | 0,817 |
| T2 - T4 | 16,4 \pm 4,25 | | 62 \pm 42,22 | | 92,25 \pm 63,88 | | 64,25 \pm 26,33 | | 53,5 \pm 10,38 | | 104,15 \pm 42,50 | |
| N | | | | | | | | | | | | |
| N0 | 16 \pm 7,82 | 0,875 | 62,5 \pm 19,35 | 0,428 | 96,5 \pm 84,25 | 0,958 | 69 \pm 23,45 | 0,713 | 56 \pm 8,08 | 0,118 | 105,5 \pm 15,50 | 0,635 |
| N1 – N3 | 16,4 \pm 3,50 | | 59,25 \pm 47,22 | | 91,9 \pm 67,88 | | 64,25 \pm 27,45 | | 53 \pm 13,97 | | 101,8 \pm 68,18 | |

Tabela 12. Análise dos níveis de proteínas IFN γ , IP-10, MPC1, MIP1 α , PDGFbb correlacionadas aos dados clinicopatológicos de pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana \pm IQR).

| Características clinicopatológicas | IFNG | p | IP-10 | p | MPC1 | p | MIP1 α | p | PDGFbb | p |
|------------------------------------|------------------|-------|---------------------|--------|------------------|-------|------------------|-------|-----------------------|-------|
| Gênero | | | | | | | | | | |
| Masculino | 40,5 \pm 7,40 | 0,80 | 563 \pm 316,40 | 0,189 | 71 \pm 23,40 | 0,90 | 39 \pm 18,00 | 0,80 | 2210 \pm 1029,05 | 0,20 |
| Feminino | 41 | | 397 | | 71 | | 40 | | 2974 | |
| Idade | | | | | | | | | | |
| \leq 45 | 40,5 | 1 | 528 | 0,704 | 68 | 0,80 | 39 | 0,521 | 2110 | 0,521 |
| >45 | 40,8 \pm 7,40 | | 563 \pm 352,65 | | 71 \pm 17,05 | | 40 \pm 17,00 | | 2216 \pm 1287,50 | |
| Local | | | | | | | | | | |
| Cárdia | 52 | 0,50 | 3386,65 | 0,033* | 76,75 | 0,93 | 155,75 | 0,267 | 2027,75 | 0,60 |
| Antro/Piloro | 40,65 \pm 5,00 | | 493,25 \pm 233,75 | | 71 \pm 15,67 | | 38,75 \pm 9,75 | | 2242,9 \pm 1443,88 | |
| Histopatológico | | | | | | | | | | |
| Difuso | 41 \pm 17,25 | 0,267 | 580 \pm 346,15 | 0,827 | 71 \pm 27,40 | 0,441 | 40 \pm 127,75 | 0,510 | 2517 \pm 1948,15 | 0,661 |
| Intestinal | 40,5 \pm 6,50 | | 528 \pm 283,50 | | 71 \pm 16,30 | | 39 \pm 9,50 | | 2214 \pm 1256,30 | |
| Estadiamento | | | | | | | | | | |
| I – II | 40 \pm 11,50 | 0,837 | 563 \pm 347,00 | 0,758 | 71 \pm 27,50 | 0,536 | 40 \pm 235,50 | 0,408 | 2216 \pm 1508,00 | 0,837 |
| III - IV | 40,8 \pm 4,00 | | 528 \pm 626,50 | | 71 \pm 19,55 | | 39 \pm 8,25 | | 2214 \pm 1094,65 | |
| T | | | | | | | | | | |
| T1 | 40,5 | 1 | 327,25 | 0,200 | 68,5 | 0,700 | 38,5 | 1 | 2745,75 | 0,333 |
| T2 - T4 | 40,65 \pm 5,95 | | 560,25 \pm 284,95 | | 71,4 \pm 21,60 | | 39,5 \pm 15,75 | | 2162 \pm 1325,98 | |
| N | | | | | | | | | | |
| N0 | 40,5 \pm 14,38 | 0,635 | 571,5 \pm 276,83 | 0,713 | 68,5 \pm 27,95 | 0,713 | 38,5 \pm 75,00 | 0,958 | 2366,75 \pm 1540,32 | 0,635 |
| N1 – N3 | 40,65 \pm 7,50 | | 493,25 \pm 473,13 | | 71,4 \pm 17,92 | | 39,5 \pm 10,25 | | 2162 \pm 1325,98 | |

Tabela 13. Análise dos níveis de proteínas MIP1 β , RANTES, TNF- α e VEGF correlacionada aos dados clinicopatológicos dos pacientes com adenocarcinoma gástrico (mediana \pm IQ).

| Características clinicopatológicas | MIP1 β | P | Rantes | p | TNF- α | p | VEGF | p |
|------------------------------------|---------------------|-------|------------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|
| Gênero | | | | | | | | |
| Masculino | 481 \pm 500,75 | 0,521 | 20237 \pm 4887,90 | 1 | 55,5 \pm 12,75 | 0,80 | 90 \pm 24,05 | 0,11 |
| Feminino | 879,3 | | 21877 | | 54 | | 90 | |
| Idade | | | | | | | | |
| \leq 45 | 356 | 0,20 | 20237 | 1 | 53 | 1 | 67 | 0,21 |
| >45 | 835,5 \pm 503,80 | | 20311,5 \pm 6145,75 | | 55,5 \pm 9,75 | | 90,5 \pm 17,15 | |
| Local | | | | | | | | |
| Cárdia | 2669,2 | 0,267 | 19029,5 | 0,50 | 68,25 | 0,10 | 84,5 | 0,70 |
| Antro/Piloro | 509,25 \pm 516,82 | | 20506,4 \pm 8136,45 | | 53,5 \pm 11,25 | | 90 \pm 21,58 | |
| Histopatológico | | | | | | | | |
| Difuso | 879,3 \pm 2394,00 | 0,090 | 19111,3 \pm 6419,25 | 0,913 | 56 \pm 21,25 | 0,441 | 90,5 \pm 23,80 | 0,267 |
| Intestinal | 481 \pm 486,20 | | 20311,3 \pm 7546,50 | | 54 \pm 15,00 | | 86,5 \pm 24,30 | |
| Estadiamento | | | | | | | | |
| I – II | 860,3 \pm 777,50 | 0,091 | 19111,3 \pm 9047,50 | 0,536 | 55,5 \pm 14,50 | 0,918 | 90,5 \pm 9,80 | 0,091 |
| III - IV | 481 \pm 369,85 | | 20311,3 \pm 4644,40 | | 54 \pm 11,00 | | 82,8 \pm 29,15 | |
| T | | | | | | | | |
| T1 | 865,9 | 0,333 | 16842,75 | 0,933 | 51,5 | 0,700 | 94,9 | 0,500 |
| T2 - T4 | 509,25 \pm 528,70 | | 20274,15 \pm 3964,13 | | 54,75 \pm 10,38 | | 88,25 \pm 18,42 | |
| N | | | | | | | | |
| N0 | 865,9 \pm 1685,50 | 0,181 | 19950,3 \pm 4594,63 | 0,958 | 55,75 \pm 15,88 | 0,428 | 90,9 \pm 16,80 | 0,147 |
| N1 – N3 | 509,25 \pm 497,10 | | 20274,1 \pm 8445,45 | | 53,5 \pm 17,38 | | 84,65 \pm 26,45 | |

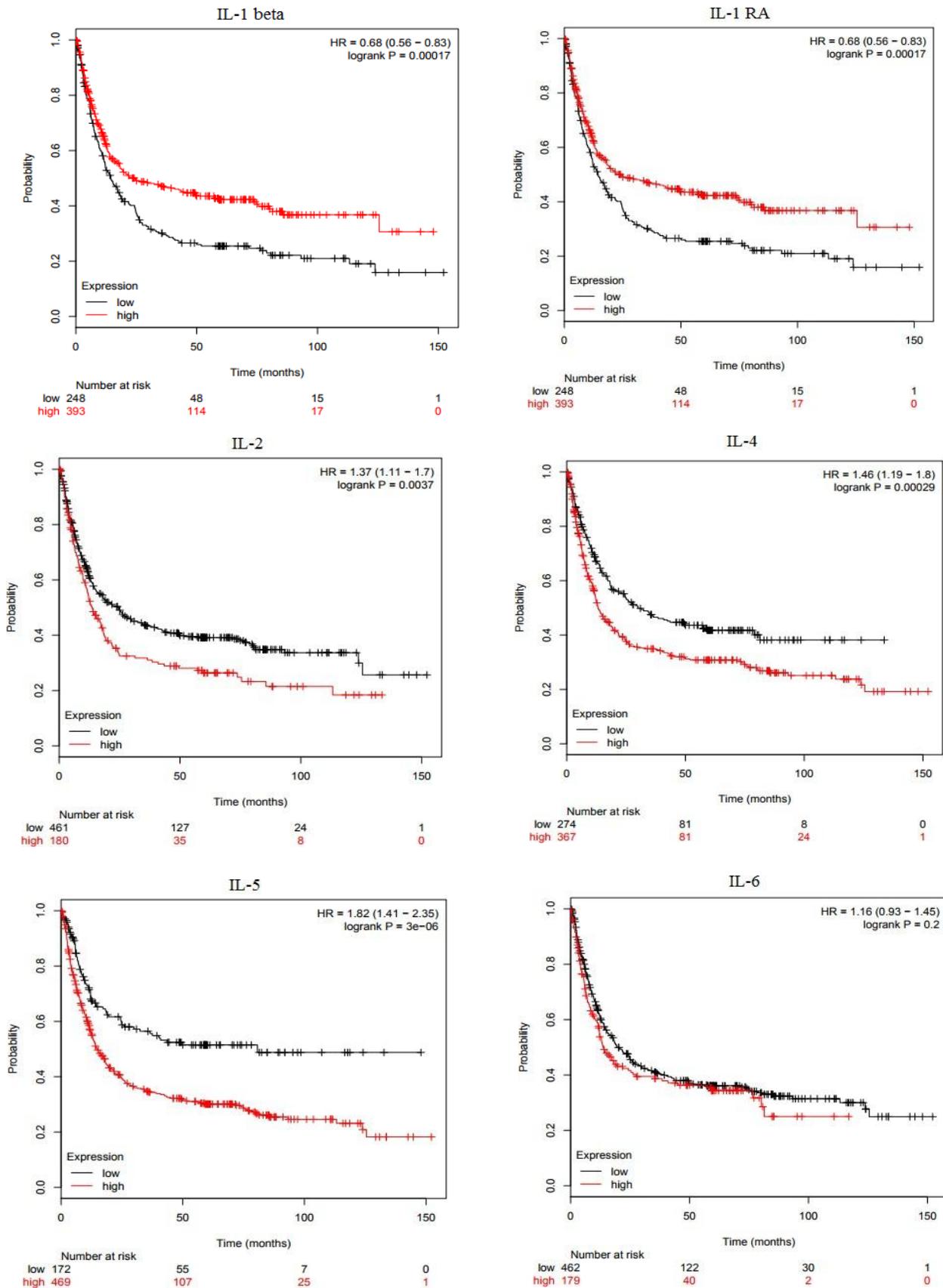
4.5 Associação da Expressão de Citocinas com sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença(PFS).

Entre as 27 citocinas estudadas, identificamos o aumento da expressão de 12 e 13 citocinas no tumor significativamente associados a uma baixa OS e PFS em pacientes com câncer gástrico, respectivamente. Enquanto que a diminuição de 13 citocinas estão associadas a uma baixa OS e PFS (Tabela 14). A Figura 6 e 7 ilustra as curvas de OS e PFS associadas a cada uma das 27 citocinas estudadas. Além disso, o número de pacientes com baixa (em preto) e alta (em vermelho) expressão no tumor de cada citocina também esta representado na parte inferior de cada curva.

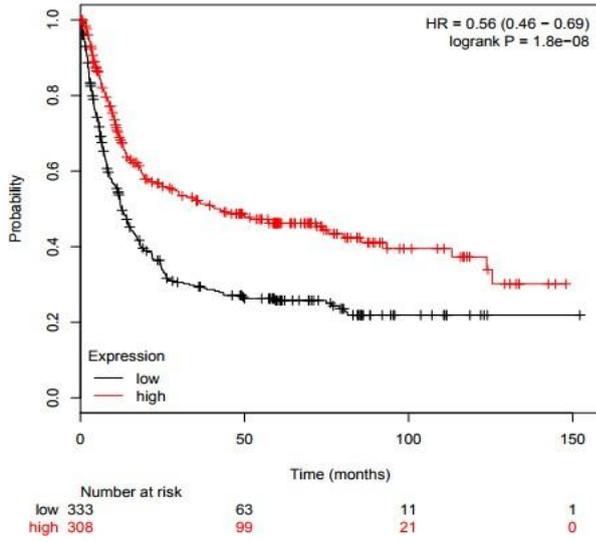
Tabela 14. Associação de Citocinas, OS e PFS em pacientes com câncer gástrico.

| Citocina | Sobrevida global | | Sobrevida livre de doença | |
|------------|--------------------|-----------|---------------------------|-----------|
| | Harzard ratio | Logrank P | Harzard ratio | Logrank P |
| IL-17A | 1,6 (1,33-1,92) | 5e-07 | 1,42 (1,14 – 1,78) | 0,0017 |
| IL-1β | 0,68 (0,56 – 0,81) | 1,7e-05 | 0,73 (0,57 – 0,92) | 0,0071 |
| IL-1RA | 0,88 (0,74 – 1,05) | 0,16 | 0,68 (0,56 – 0,83) | 0,00017 |
| IL-2 | 1,59 (1,32 – 1,9) | 5,2e-07 | 1,37 (1,11 – 1,7) | 0,0037 |
| IL-4 | 1,58 (1,29 – 1,93) | 7,3e-06 | 1,46 (1,19 – 1,8) | 0,00029 |
| IL-5 | 1,52 (1,23 – 1,89) | 9,6e-05 | 1,82 (1,41 – 2,35) | 3e-06 |
| IL-6 | 1,1 (0,91 – 1,32) | 0,33 | 1,16 (0,93 – 1,45) | 0,2 |
| IL-7 | 0,65 (0,53 – 0,79) | 1,4e-05 | 0,56 (0,46 – 0,69) | 1,8e-08 |
| IL-8 | 0,65 (0,53 – 0,79) | 1,4e-05 | 0,74 (0,59 – 0,92) | 0,0073 |
| IL-9 | 1,59 (1,3 – 1,96) | 7,2e-06 | 1,39 (1,11 – 1,74) | 0,004 |
| IL-10 | 1,36 (1,14 – 1,64) | 0,00085 | 1,17 (0,94 – 1,45) | 0,17 |
| IL-12 | 0,8 (0,67 – 0,95) | 0,0088 | 0,77 (0,63 – 0,95) | 0,012 |
| IL-13 | 1,41 (1,15 – 1,74) | 0,001 | 1,3 (1,05 – 1,59) | 0,013 |
| IL-15 | 0,59 (0,49 – 0,71) | 8,3e-09 | 0,6 (0,49 – 0,73) | 6,6e-07 |
| Eotaxin | 0,7 (0,59 – 0,83) | 4,2e-05 | 0,75 (0,62 – 0,92) | 0,006 |
| FGF basic | 1,38 (1,14 – 1,66) | 0,00089 | 1,34 (1,08 – 1,66) | 0,0067 |
| GCSF | 1,3 (1,09 – 1,56) | 0,0035 | 1,27 (1,03 – 1,57) | 0,023 |
| GM-CSF | 1,35 (1,13 – 1,62) | 8e-04 | 1,3 (1,06 – 1,59) | 0,012 |
| IFN -γ | 0,81 (0,66 – 0,99) | 0,043 | 0,67 (0,52 – 0,86) | 0,0019 |
| IP10 | 0,58 (0,47 – 0,71) | 1e-07 | 0,59 (0,45 – 0,76) | 3,6e-05 |
| MPC1 | 0,54 (0,45 – 0,65) | 7,8e-11 | 0,55 (0,45 – 0,67) | 3,2e-09 |
| MIP1α | 0,62 (0,5 – 0,76) | 4,3e-06 | 0,71 (0,56 – 0,9) | 0,0039 |
| PDGF bb | 1,64 (1,37 – 1,95) | 2,6e-08 | 1,77 (1,45 – 2,16) | 1,9e-08 |
| MIP-1 beta | 0,54 (0,44 – 0,68) | 2,4e-08 | 0,61 (0,47 – 0,78) | 1e-04 |
| Rantes | 0,7 (0,59 – 0,83) | 4,6e-05 | 0,65 (0,53 – 0,79) | 2,8e-05 |
| TNF-alpha | 1,36 (1,15 – 1,61) | 0,00034 | 1,43 (1,17 – 1,76) | 0,00057 |
| VEGF | 1,53 (1,27 – 1,85) | 5,7e-06 | 1,75 (1,41 – 2,17) | 2,9e-07 |

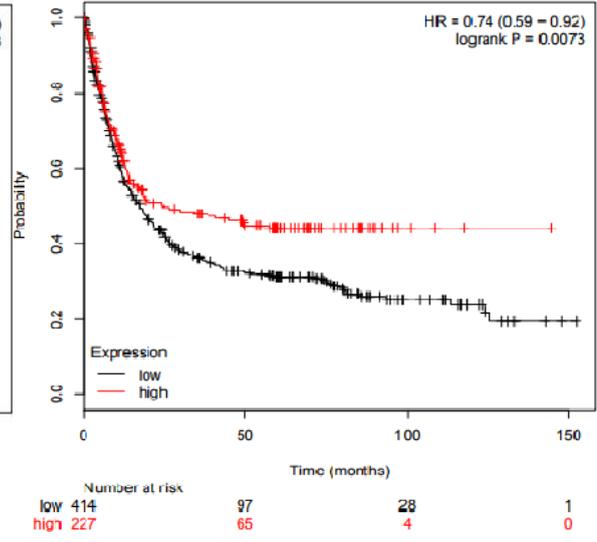
Figura 7: Associação da expressão de citocinas e a sobrevida global (OS) de pacientes com câncer gástrico.



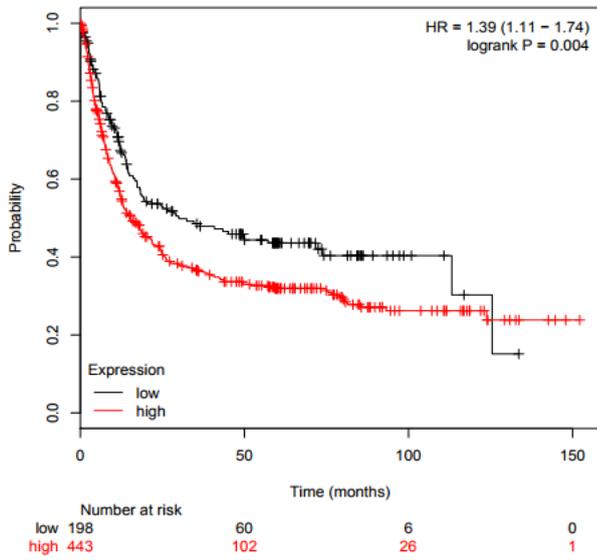
IL-7



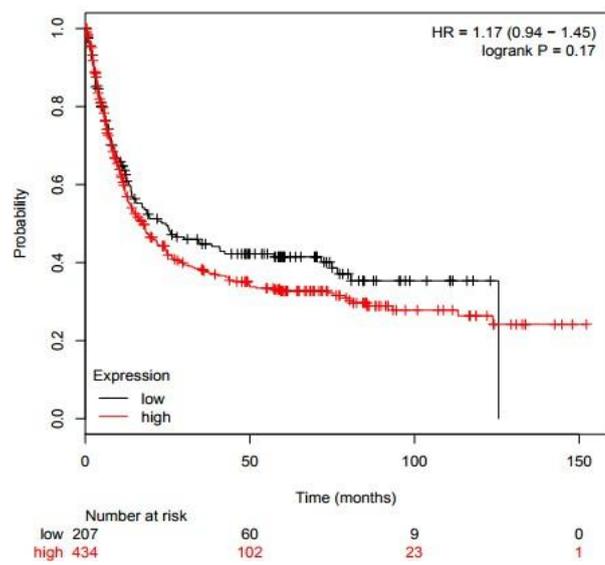
IL-8



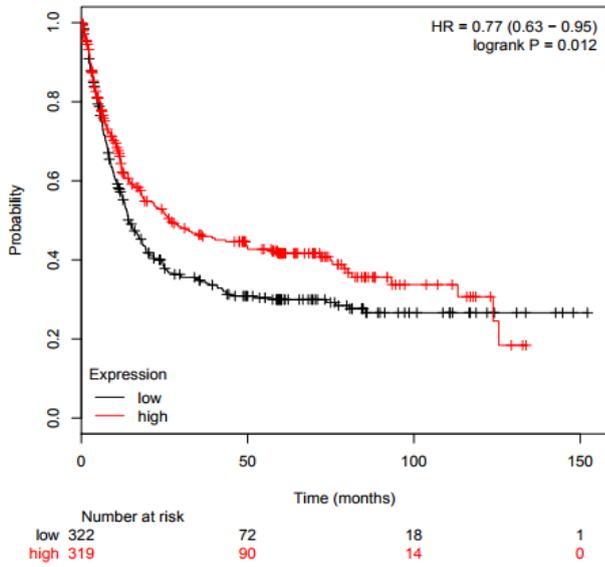
IL-9



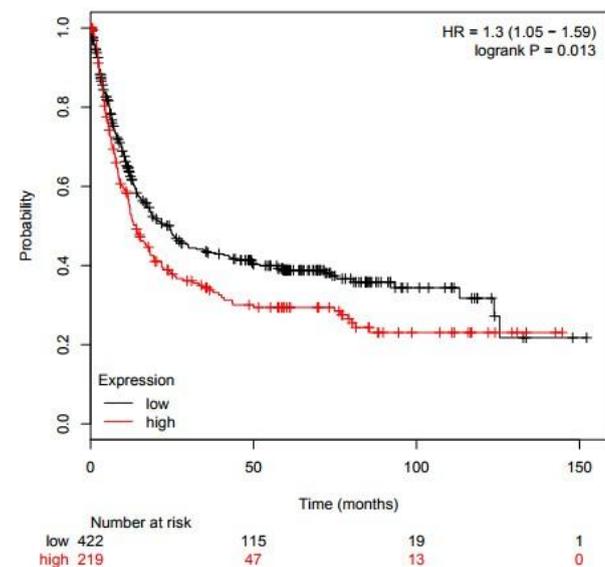
IL-10

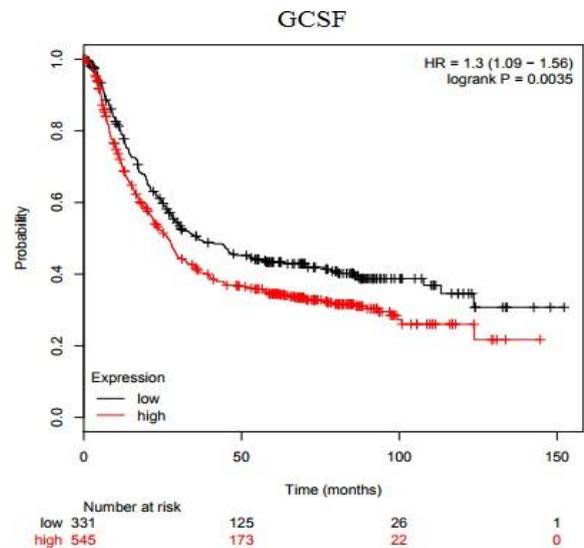
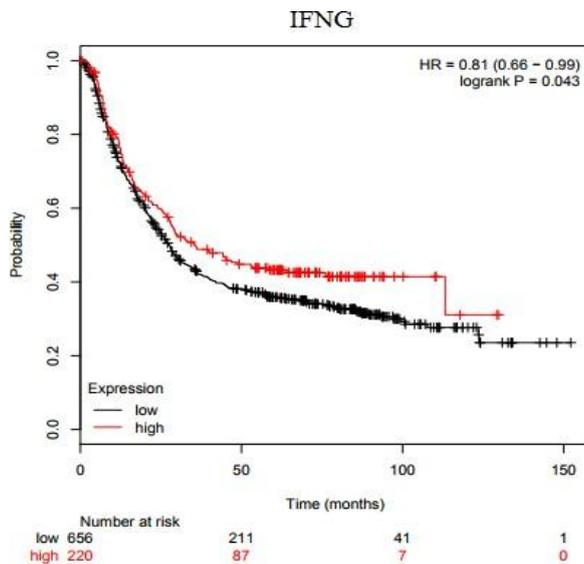
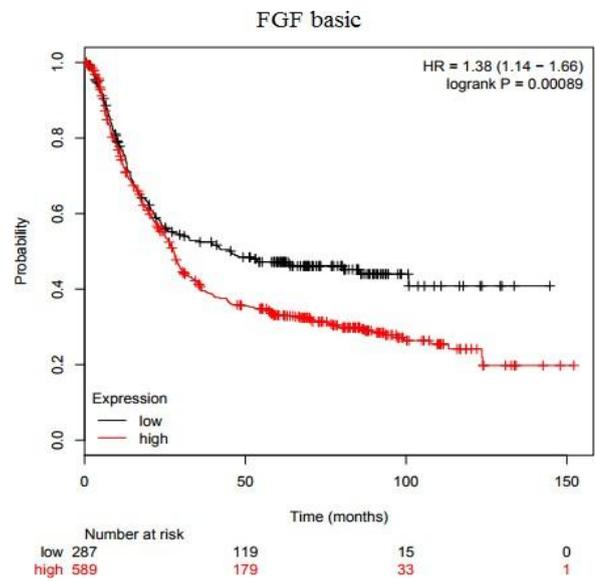
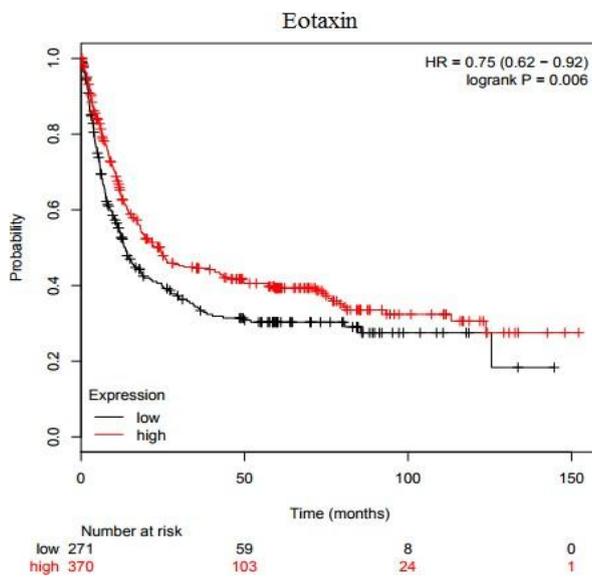
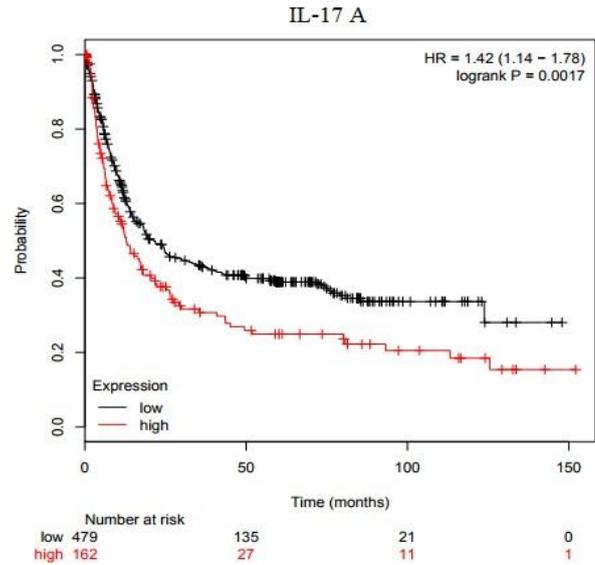
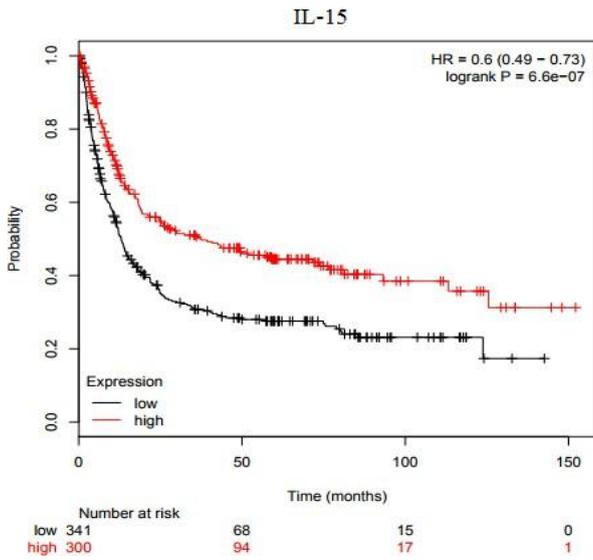


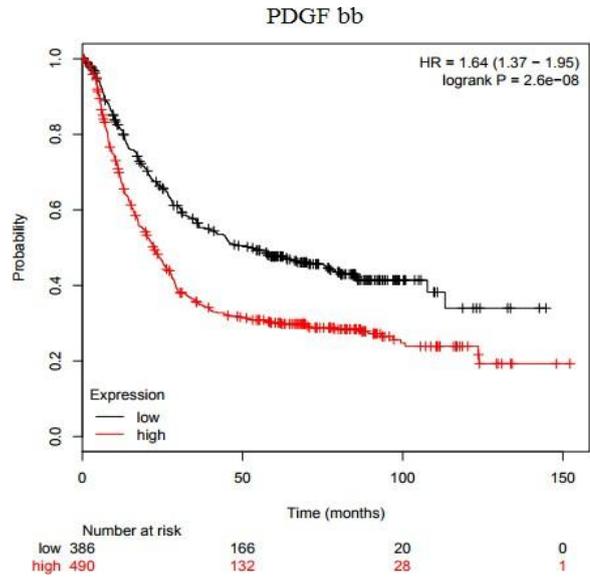
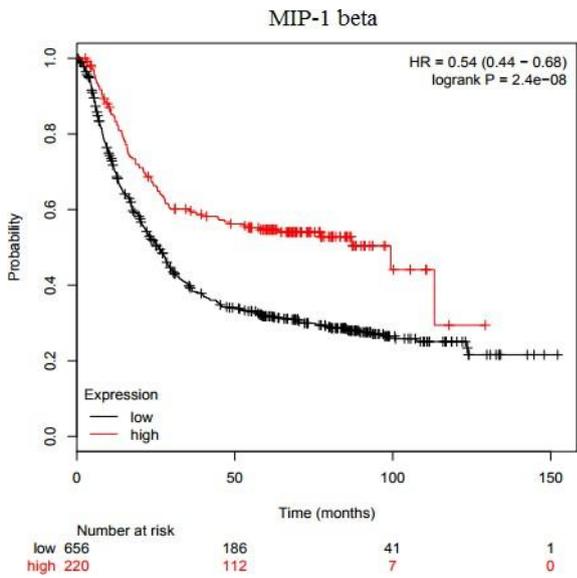
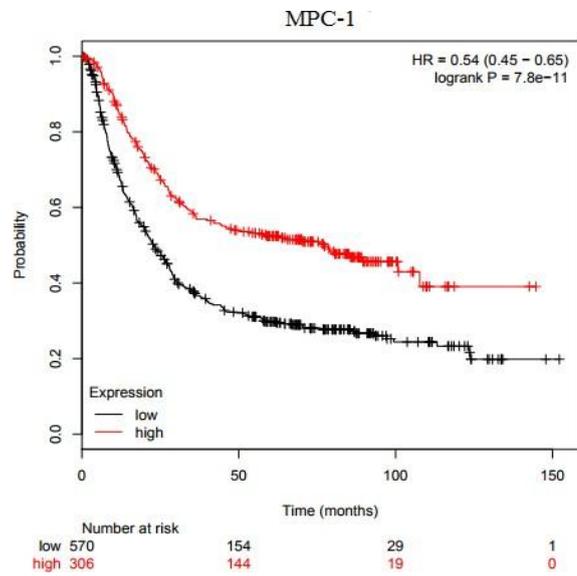
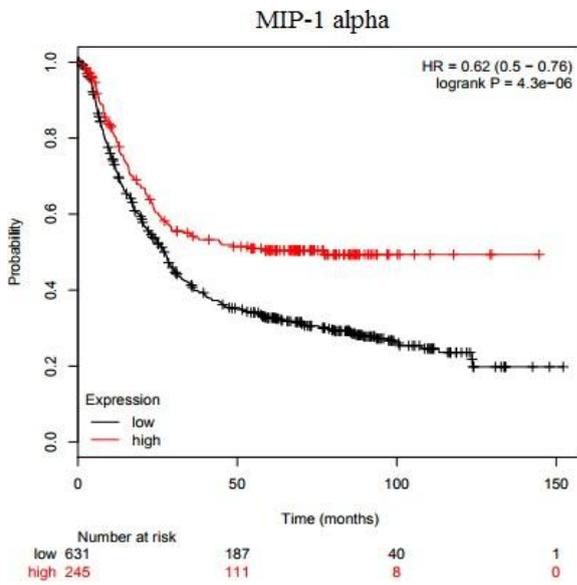
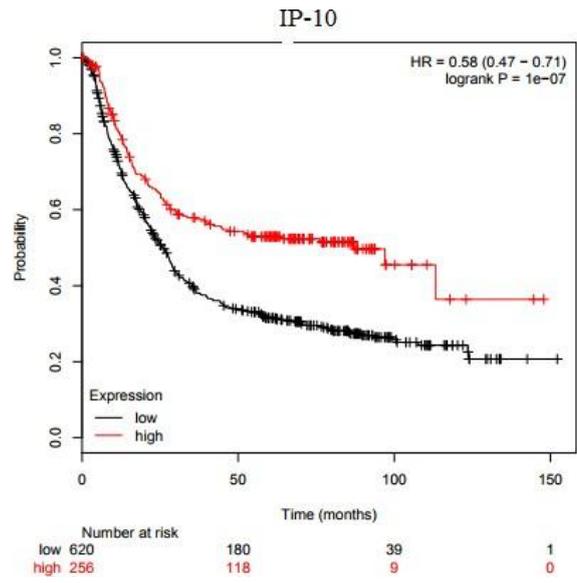
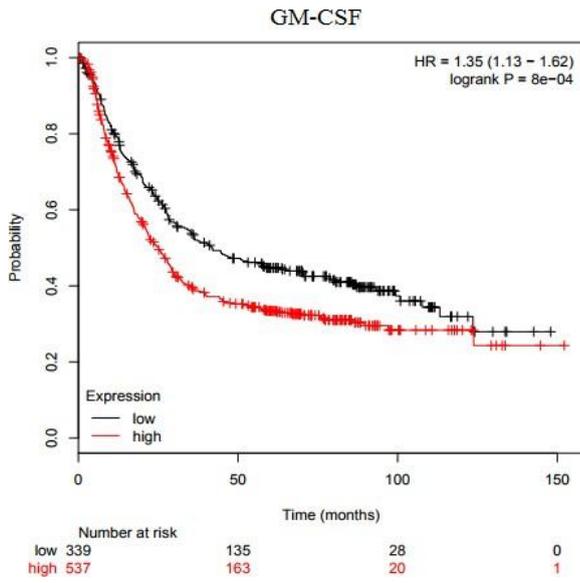
IL-12



IL-13







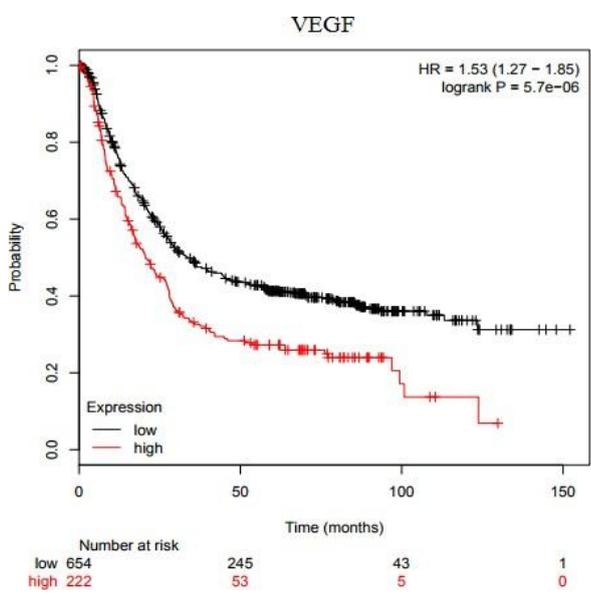
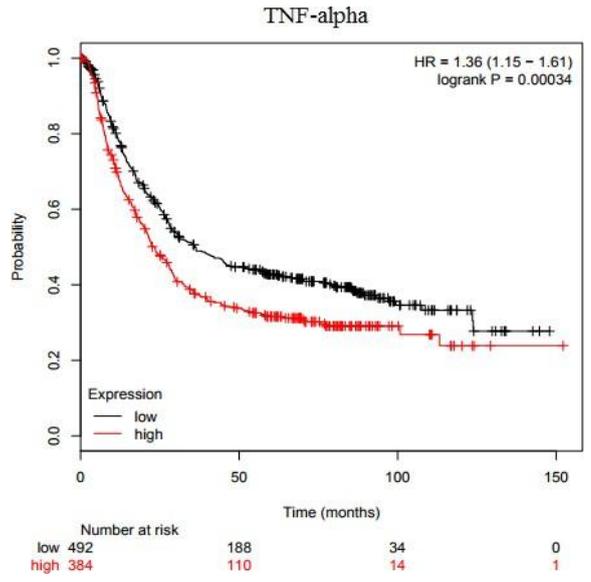
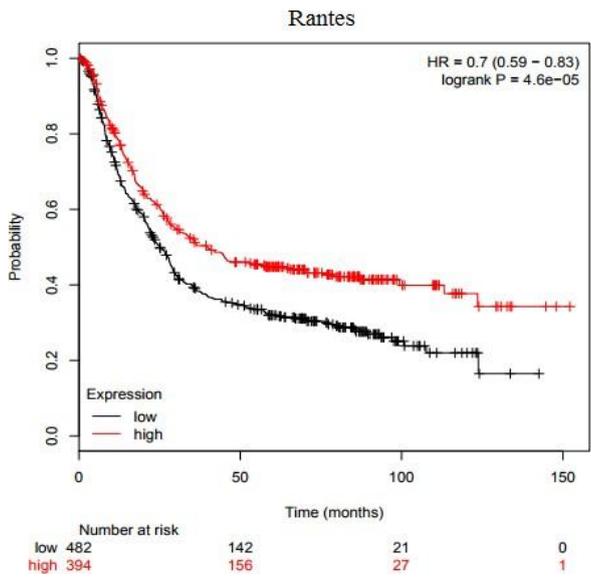
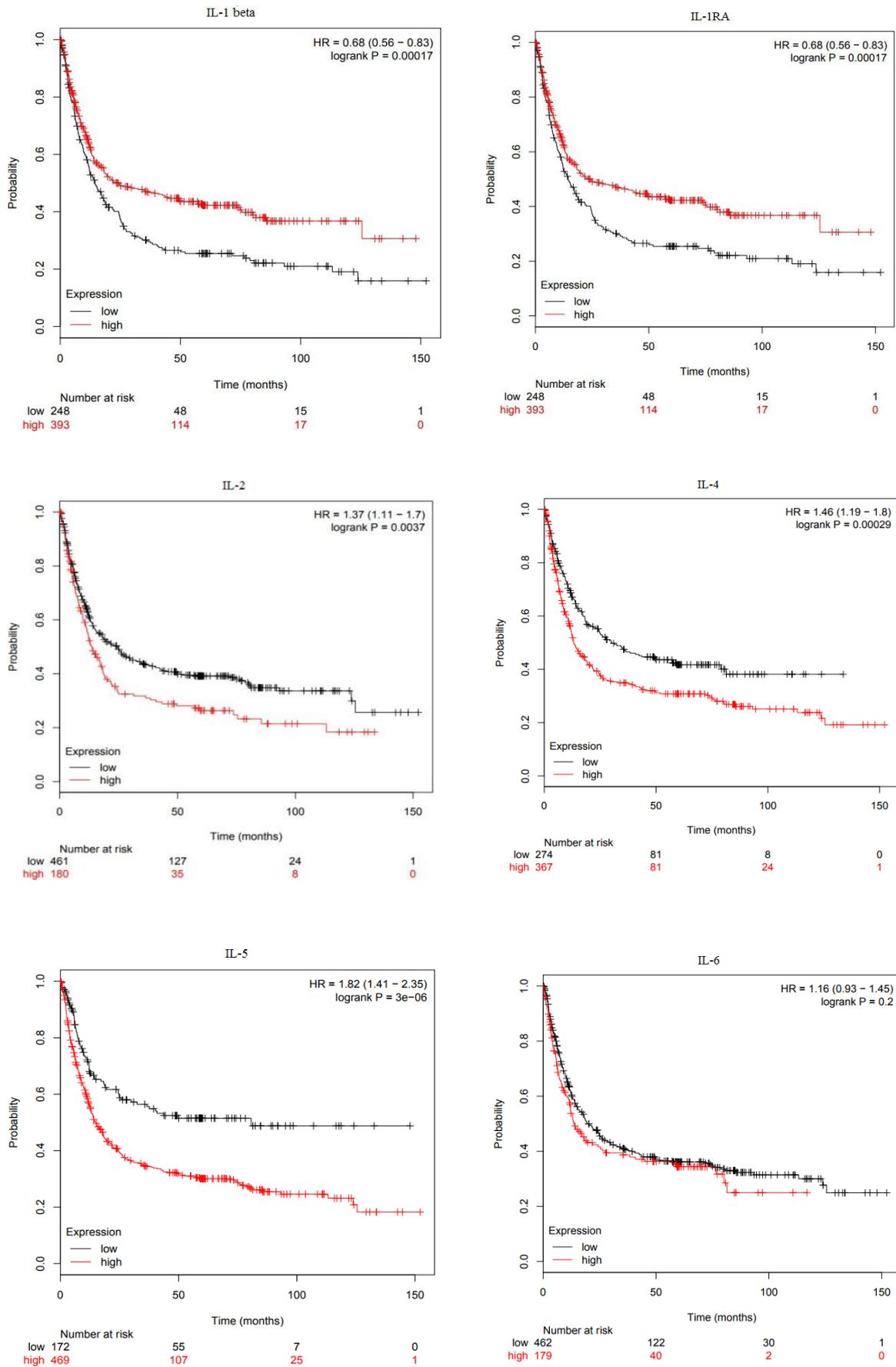
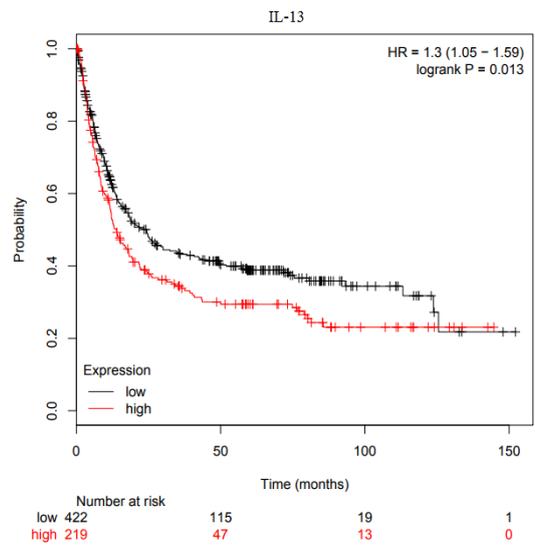
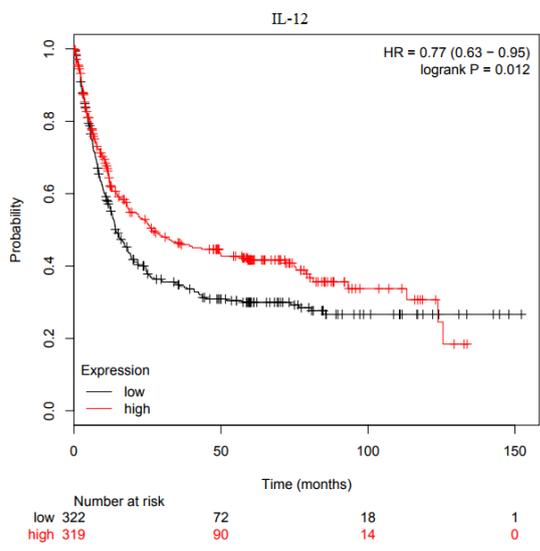
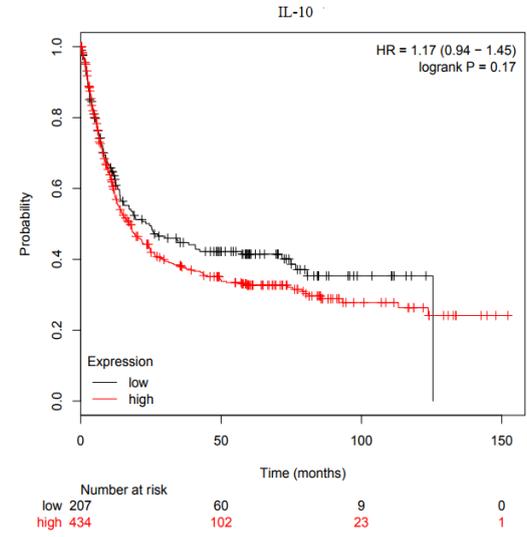
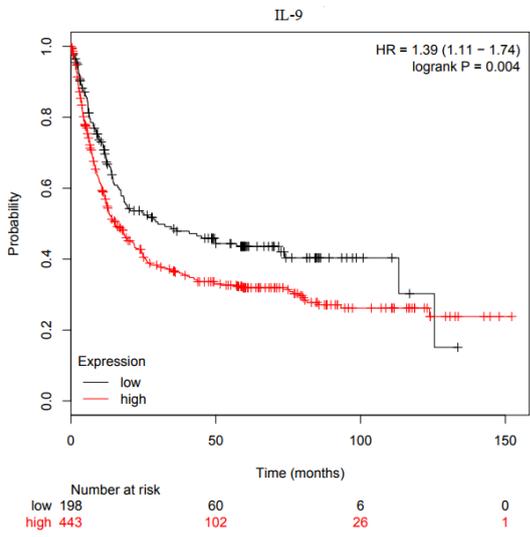
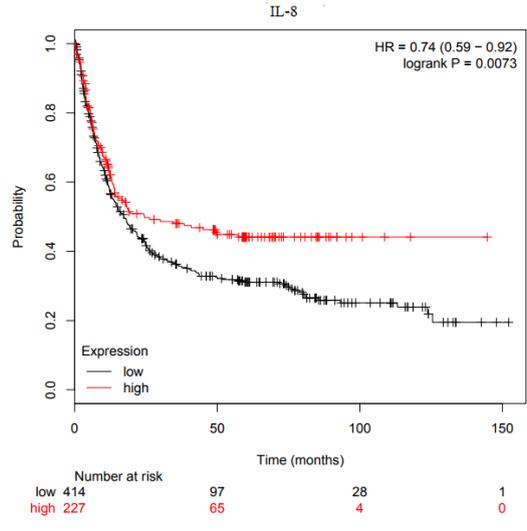
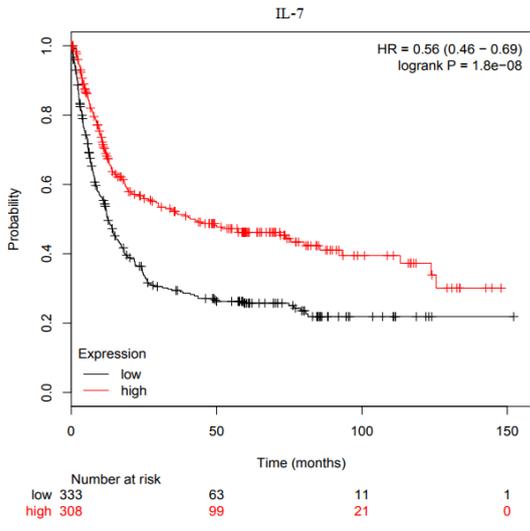
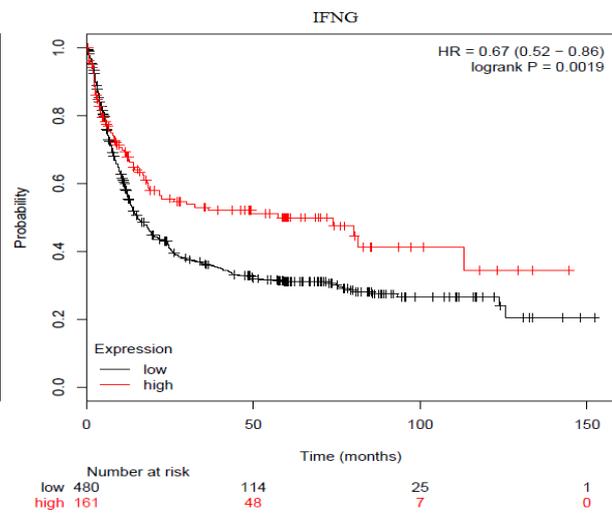
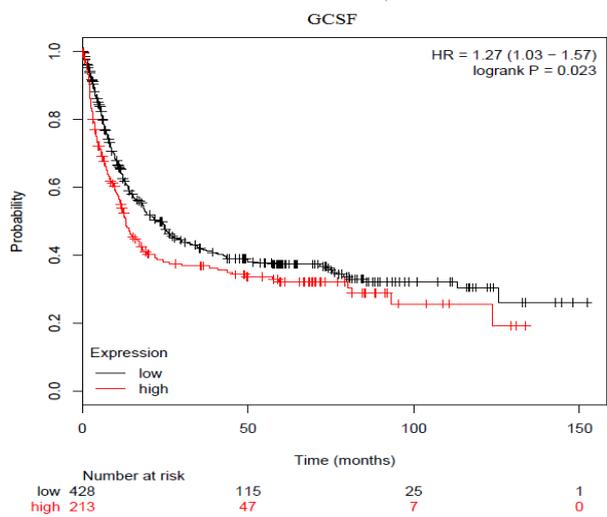
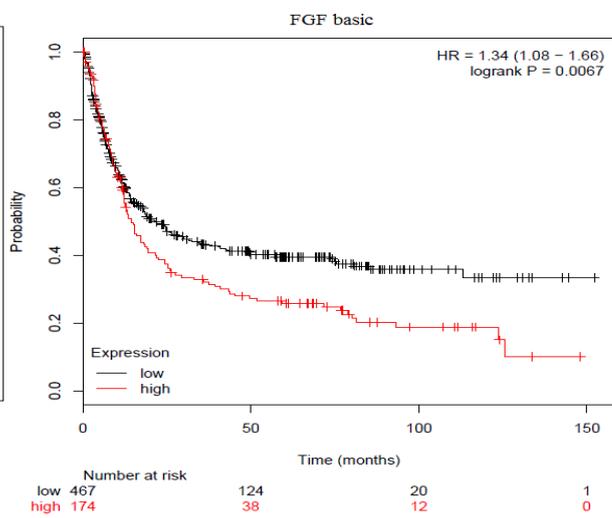
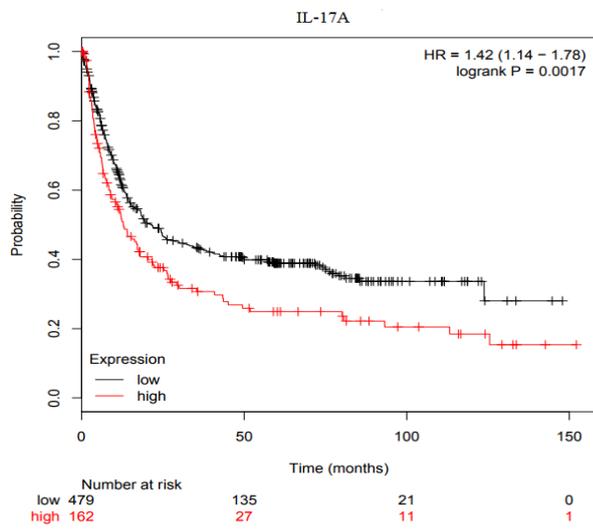
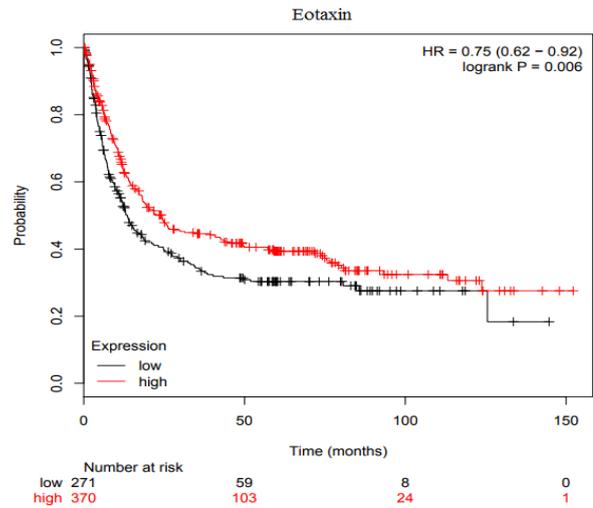
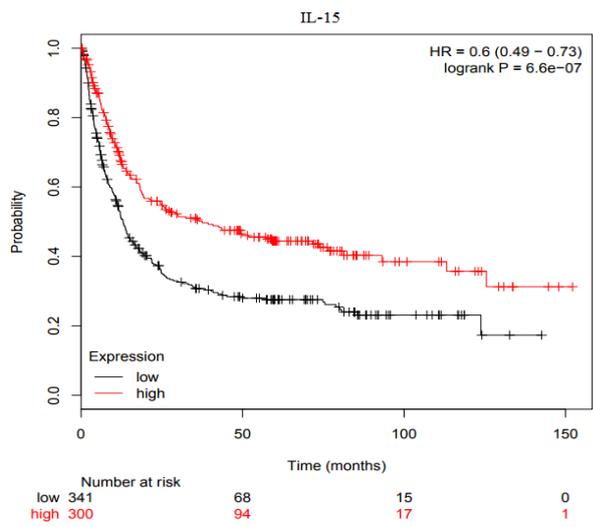
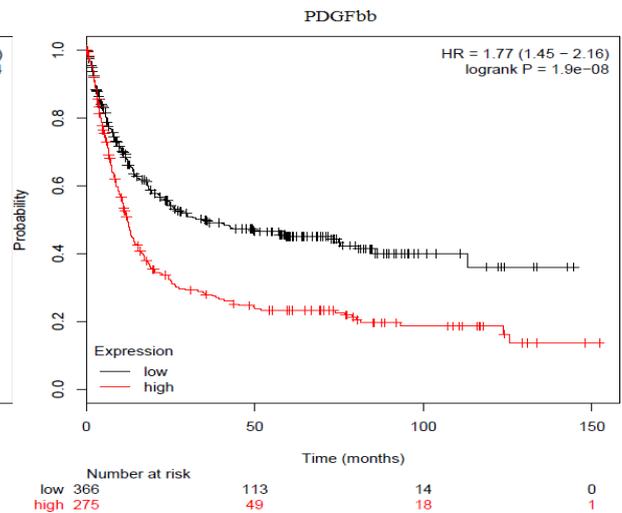
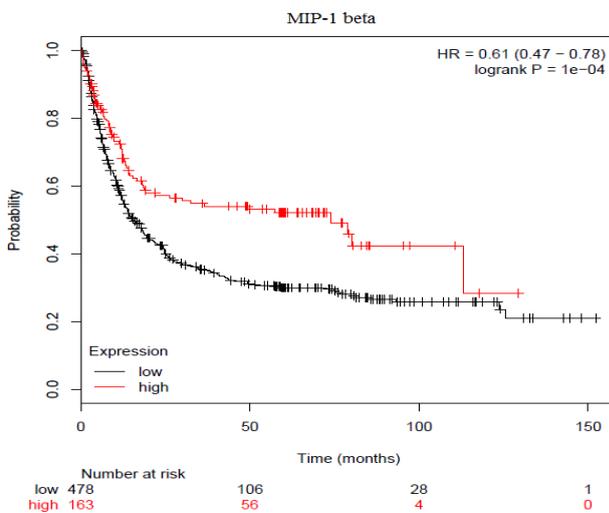
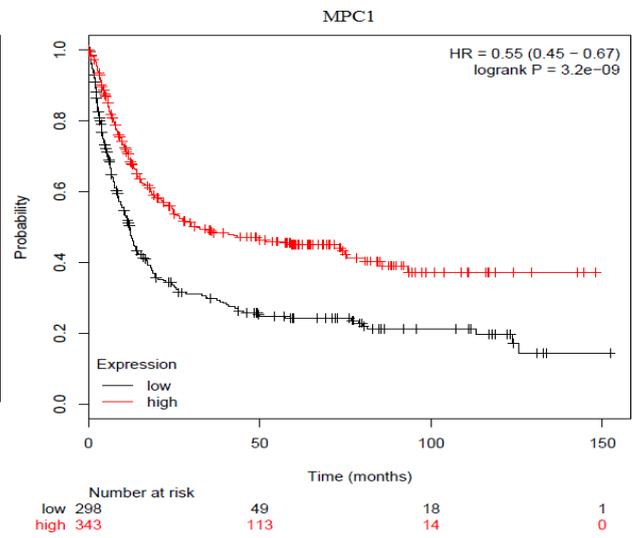
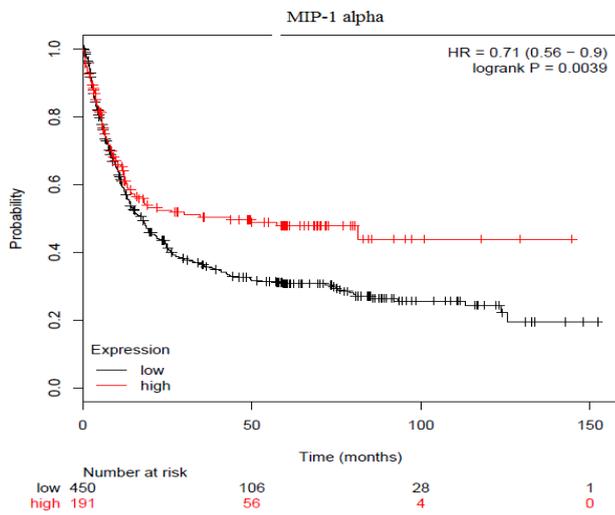
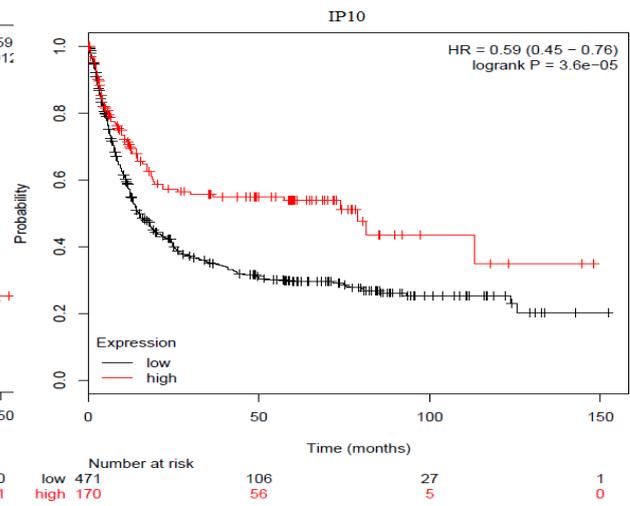
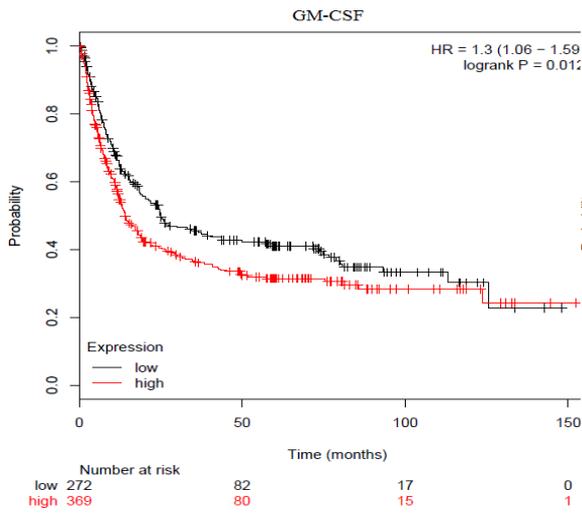


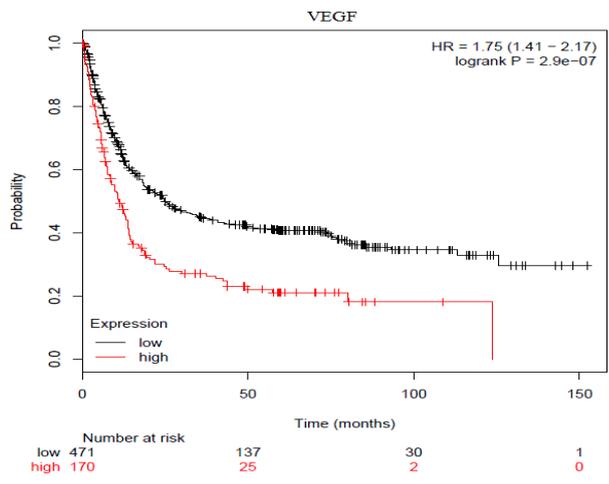
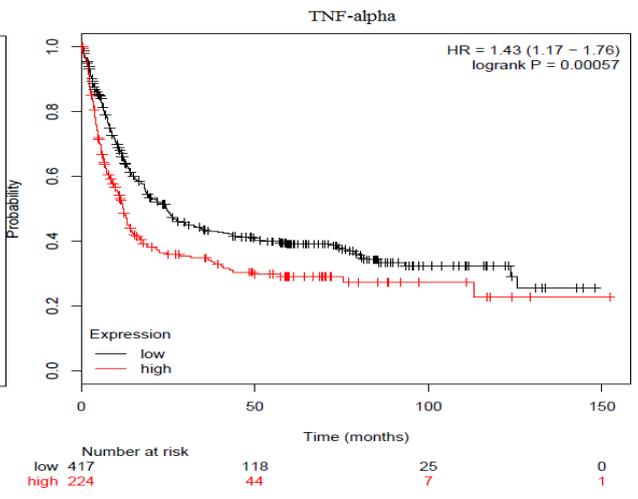
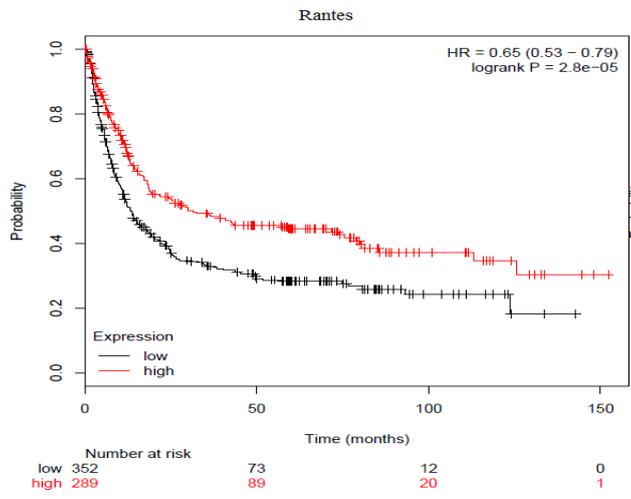
Figura 8: Associação da expressão e citocinas e a sobrevida global livre de doença de pacientes com câncer gástrico.











5 DISCUSSÃO

Muitos estudos revelaram potenciais biomarcadores no soro para o câncer gástrico, como CEA, AFP, CA 19-9 e CA 72-4 e outros. Entretanto, esses não são biomarcadores séricos específicos para essa neoplasia e possuem baixa sensibilidade. Assim, é necessária a busca por biomarcadores mais específicos e sensíveis para o câncer gástrico.

Nos últimos anos, estudos têm destacado a importância no vínculo entre inflamação e câncer. A inflamação está envolvida no desenvolvimento e supressão do tumor, estimulando a resposta imune. Em particular, a transição da inflamação crônica para o câncer produz fatores angiogênicos e de crescimento capazes de reparar o tecido e promover a sobrevivência, implantação e crescimento de células tumorais. Neste concurso, as citocinas contribuem para o desenvolvimento desses processos se tornando ativos antes e durante o processo inflamatório e desempenhando uma função importante nos vários estágios da doença. Assim, essas proteínas podem representar biomarcadores específicos do desenvolvimento e progressão do tumor (CAPONE et al.,2016).

No presente estudo, a análise estatística do nível de citocinas no soro de pacientes com câncer gástrico, incluindo adenocarcinoma e linfoma gástrico, comparada com a expressão no soro de voluntários saudáveis demonstrou que os níveis IL-1 β (mediana \pm IQR, respectivamente; valor de p) (51,0 \pm 10,50 e 45,5 \pm 6,85; 0,035) IL-1RA (41,0 \pm 9,25 e 35,5 \pm 7,90; 0,016), IL-2 (60,5 \pm 12,10 e 49 \pm 11,25; 0,004), IL-6 (59,0 \pm 44,0 e 36,3 \pm 6,90; 0,005), IL-8 (67,0 \pm 61,25e 47,8 \pm 10,40; 0,0001), IL-9 (90,0 \pm 18,25 e 79,8 \pm 19,75; 0,027) IL-10 (40,0 \pm 14,5 e 33,5 \pm 4,75; 0,005), G-CSF (53,5 \pm 6,60 e 48 \pm 7,15; 0,041), GM-CSF (105,0 \pm 27,0 e 89,3 \pm 11,75; 0,005), MIP1 α , (40,0 \pm 12,75 e 33,8 \pm 6,25; 0,034) e VEGF (90,5 \pm 30,40 e 74 \pm 19,50; 0,034) foram significativamente elevadas no soro dos pacientes com câncer gástrico.

Ao realizar a comparação dos níveis de citocinas no soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico e grupo controle, observamos IL-6 (59,0 \pm 39,0 e 36,3 \pm 6,90; 0,010), IL-8 (67,0 \pm 96,0 e 47,8 \pm 10,40; 0,0001), IL-10 (33,5 \pm 4,75 e 40,0 \pm 13,50; 0,004), IL-15 (62,5 \pm 15,3 e 54,8 \pm 12,25; 0,031), MIP1 α (40,0 \pm 13,50 e 33,8 \pm 6,25; 0,011), G-CSF (53,5 \pm 8,00 e 48 \pm 7,15; 0,042), GM-CSF (104,5 \pm 16,5 e 89,3 \pm 11,75; 0,004) IFNG (40,8 \pm 8,30 e 37 \pm 7,50; 0,049) e RANTES (20311,3 \pm 3244,0 e 21386,5 \pm 1054,85; 0,033) estatisticamente elevadas no grupo de pacientes com adenocarcinoma gástrico.

Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de citocinas no soro de pacientes com linfoma e o grupo controle. Essa falta de significância estatística pode ser explicada pelo número amostral reduzido do grupo de pacientes com linfoma.

A IL-1 β é uma interleucina secretada principalmente por monócitos e macrófagos, mas também podem ser produzidas por células dendríticas, NK, linfócitos B e células malignas. Em condições homeostáticas, a IL-1 β é produzida em baixos níveis. No entanto, durante as respostas imunes, seus níveis de expressão aumentam, resultando em febre, vasodilatação e hipotensão (SIMS e SMITH, 2010; DINARELLO, 2009).

Através de sua capacidade de aumentar a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, associada à indução de quimioquinas, a IL-1 β promove a infiltração de células inflamatórias e imunocompetentes a partir da circulação para o espaço extra vascular, para que estas possam promover o remodelamento tecidual (DINARELLO, 2009).

Esta resposta inflamatória induzida pela IL-1 β é bem delimitada. Neste contexto, a IL-1 β é facilmente detectada em fluidos corporais, assim como em situações de inflamação crônica, nas quais são detectadas altas doses desta citocina. (APTE et al., 2006).

A IL-1 β também é associada a processos relacionados à carcinogênese, como a angiogênese, disseminação e crescimento de células malignas. No microambiente tumoral, esta citocina é secretada principalmente por células dendríticas, macrófagos, monócitos e neutrófilos (DMITRIEVA et al., 2016).

Em relação ao câncer gástrico, tem sido relatado que polimorfismos no gene da IL-1 β são importantes no desenvolvimento desta neoplasia. Além disso, o polimorfismo da IL-1 β concomitante à infecção por *H. pylori* é considerado fator de risco para o desenvolvimento da doença (EL-OMAR et al., 2000; FIGUEIREDO et al., 2002; CHANG et al., 2004; RAZA et al., 2017).

A detecção de IL-1 β no soro de pacientes com câncer gástrico em relação a controles apresenta resultados conflitantes na literatura. Enquanto MARCI et al. (2005) encontraram níveis mais elevados de IL-1 β em controles saudáveis em relação a pacientes com câncer gástrico, KABIR et al. (1995) encontram níveis mais elevados desta citocina nos pacientes acometidos pela neoplasia em relação aos controles saudáveis. Isto pode ser devido ao fato de os níveis mais elevados de

IL-1 β estarem associados à infecção por *H. pylori*, a qual não é relatada em 70 % dos pacientes envolvidos no primeiro estudo (EL-OMAR, 2001). Nossos resultados reforçam que níveis elevados de IL-1 β estão relacionados à carcinogênese gástrica. Além disso, o aumento dos níveis séricos de IL-1 β nos pacientes em relação aos controles demonstra que esta citocina é candidata a biomarcador de diagnóstico para a doença.

A IL-1RA é secretada principalmente por monócitos, macrófagos e neutrófilos. Esta citocina age como um antagonista específico do receptor de IL-1 por ligação ao receptor de interleucina1 do tipo I(IL-1RI). Quando o IL-1RA se liga ao receptor IL-1RI, a IL-1 não transmite seus sinais, bloqueando os eventos pró-inflamatórios que esta citocina induz (AREND, 2002; VOLAREVIC et al., 2009).

Como já descrito, a IL-1 (que engloba tanto IL-1 α como a IL-1 β) é uma citocina pró-inflamatória essencial que estimula respostas imunes. Entretanto, também pode ter um efeito prejudicial em situações de inflamação crônica. A IL-1RA, por sua vez, delimita as respostas inflamatórias excessivas através da sua antagonização sobre a IL-1 (GABAY et al., 2010).

Enquanto a IL-1 estimula o desenvolvimento tumoral, a IL-1RA demonstrou reduzir a angiogênese e o crescimento tumoral *in vitro*. A administração local de IL-1RA demonstrou ser efetiva prevenir na regressão dos tumores da próstata. Além disso, a IL-1RA também demonstrou bloquear a produção de CSF e VEGF em células de leucemia e adenocarcinoma de cólon, respectivamente (VORONOV et al., 2003; RICOTE et al., 2004; LEWIS et al., 2006).

Embora o papel da IL-1RA seja delimitar respostas inflamatórias excessivas e tenha demonstrado potencial para regredir o desenvolvimento de alguns tipos tumorais, os níveis de IL-1RA estão geralmente elevados na circulação de pacientes com resposta inflamatória crônica, pois são necessários altos níveis desta citocina para inibir os efeitos pró-inflamatórios da IL-1 (AREND, 2002).

O aumento do nível sérico da IL-1RA em pacientes com câncer colorretal em relação a controles saudáveis foi relatado por ITO e MIKI (1999). Isto pode ser devido ao fato do aumento concomitante dos níveis de IL-6 nos pacientes do referido estudo, já que esta interleucina pode induzir a produção da IL-1RA (JORDAN et al., 1995). No mesmo tipo de câncer, KAMINSKA et al. (2000) relataram níveis séricos elevados da IL-1 RA em pacientes com doença avançada, o que pode significar que esta citocina possui um valor prognóstico.

Não foram encontrados estudos na literatura em relação ao câncer gástrico. Os níveis elevados de IL-1RA em pacientes com câncer gástrico em relação aos controles no nosso estudo pode significar uma resposta sistêmica ao aumento de IL-1 β , na tentativa de controlar os efeitos pró-inflamatórios desta citocina. O aumento da IL-1 RA também pode ter sido induzido pelos níveis elevados da IL-6. Estes achados sugerem que, em conjunto, o aumento destas citocinas no soro de pacientes com câncer gástrico pode auxiliar no diagnóstico da doença.

A IL-2 é uma citocinapleiotrópica que possui funções diversificadas e é produzida principalmente por células T helper CD4 + em órgãos linfóides secundários e, em menor grau, por células T CD8 +(LIAO et al., 2011; BOYMMAN e SPRENT, 2012).

Esta interleucina é um fator de crescimento para linfócitos T estimulados por antígenos e é responsável pela expansão clonal de células T após o reconhecimento de antígeno na imunidade adaptativa, além de atuar na expansão secundária de células T CD8 +. A exposição prolongada de células T a antígenos, juntamente com sinais de IL-2, também pode induzir à expressão do receptor de morte FAS e do ligante FAS nas células T, o que pode promover a apoptose dessas células (LIAO et al., 2011; BOYMMAN e SPRENT, 2012; LIPPITZ, 2013).

Por conta de seus efeitos no estímulo de células imunes, a IL-2 é uma citocina eficiente na imunoterapia contra o câncer. A IL-2 foi uma das citocinas a serem aprovadas pelo FDA para tratamento de carcinoma de células renais metastático e melanoma metastático (SIM e RADVANYI, 2012). Embora a IL-2 seja efetiva, sua utilização como monoterapia não é adequada devido à sua propriedade em células T e efeito adverso grave em altas doses. Atualmente, a terapia com IL-2 está focada na sua combinação com outras imunoterapias anti-câncer (JIANG et al., 2016).

Apesar do seu papel importante nas respostas imunes anti-inflamatórias, FORONES et al. (2001) relataram níveis elevados de IL-2 em pacientes com câncer gástrico em relação a controles saudáveis. Da mesma forma, também foi constatado um aumento desta citocina nos pacientes em relação aos controles no nosso estudo. Isto pode ser devido ao fato de pacientes com câncer gástrico poderem apresentar um infiltrado de linfócitos T Reg na mucosa neoplásica. Ainda não estão esclarecidos os mecanismos pelos quais isso ocorre, mas é provável que haja expansão específica de T-regs em resposta à inflamação contínua induzida pelo tumor (ICHIHARA et al., 2003).

A IL-6 é uma citocina multifuncional inflamatória produzida em resposta a estímulos durante a inflamação sistêmica por células do sistema imune e não-imune, tais como células T e B, células do músculo liso, eosinófilos, condrócitos, osteoblastos, mastócitos, células glia e queratinócitos (AKDIS et al., 2011). Essa citocina é promotora do crescimento, anti-apoptótica, e também um dos sinais efetores na promoção da carcinogênese (QI et al., 2014; NAUGLER et al., 2007; KINOSHITA et al., 2013). No câncer gástrico, YIN et al. (2013) descreveram que a IL-6 possui papel crucial no desenvolvimento e progressão do câncer gástrico, esta citocina está relacionada com a promoção da neoangiogênese e adesão de células neoplásicas ao endotélio vascular, assim corroborando para a disseminação sistêmica das células tumorais.

Semelhante aos nossos resultados, alguns estudos descreveram o nível mais elevado de IL-6 no soro de pacientes com câncer gástrico em relação a indivíduos saudáveis (MADEJ-MICHNIEWICZ et al., 2015; JUDD et al.; 2014; SÁNCHEZ-ZAUCO e tal., (2017). Além disso, MADEJ-MICHNIEWICZ et al. (2015) observaram maiores níveis de IL-6 em pacientes com câncer gástrico em relação a pacientes com outras neoplasias (tumor do estroma gastrointestinal, neoplasia neuroendócrina e linfoma). No estudo realizado por KIM et al. (2003), os níveis plasmáticos de IL-6 foram significativamente elevados nos pacientes com câncer gástrico avançado em relação a câncer gástrico precoce.

Sabe-se que a IL-6 pode aumentar o nível de DNA metiltransferases, resultando na modificação do estado de metilação dos genes associados à supressão tumoral (FORAN et al., 2010). A superexpressão de DNA metiltransferases é um achado frequente em tumores gástricos (CALCAGNO et al., 2013; CALCAGNO et al., 2015), podendo estar relacionado com os níveis elevados de IL-6.

A IL-8 é uma quimiocina da família CXC, produzida por macrófagos e outros tipos celulares. Ela está envolvida na quimiotaxia de leucócitos, respostas inflamatórias e doenças infecciosas (CHANG et al., 2014; REN et al., 2001). Essa quimiocina tem sido caracterizada como um fator angiogênico e de crescimento com funções autócrina e parácrina (ARAKI et al., 2007; YU et al., 2013).

Em relação ao câncer, a IL-8 aumenta a proliferação, a migração e a sobrevivência das células endoteliais, potencializa a transição epitélio-mesenquimal (TEM) e a sobrevivência das células cancerosas, também ativa macrófagos e respostas imunes no local do tumor (YUAN et al., 2005).

Em modelos de câncer gástrico descobriu-se que a IL-8 regula positivamente a expressão de MMP-9 e conseqüente aumento da neoangiogênese é observada. *In vivo*, a IL-8 desempenha papel importante na profundidade de invasão tumoral venosa e linfática, e pode ser um fator independente de prognóstico no câncer gástrico (KIDO et al., 2001). *In vitro*, o nível de IL-8 está significativamente associado com a adesão, migração, invasão e quimiosensibilidade de células de câncer gástrico (JU et al., 2012; KUAI et al., 2012). Adicionalmente, estudos demonstraram que a inibição de IL-8 diminui a angiogênese nos tumores gástricos (KUAI et al., 2012; JU et al., 2012; WAUGH e WILSON, 2008; KITADAI et al., 1998).

A IL-9 é produzida principalmente por populações de linfócitos T e atua estimulando a sua proliferação e diferenciação. Além destas, mastócitos ativados e células NK também são capazes de produzir IL-9 (RENOLD et al., 1993).

Durante a diferenciação de células T *naive* em Th17, estas células apresentam uma co-produção de IL-17 A e IL-9. Além disso, a IL-9 e IL-17 podem ser produzidas concomitantemente também por células T CD4+. Esta co-produção de IL-17A e IL-9 por células T CD4+ pode ser ainda estimulada por IL-1 β ou por IL-21 isoladamente (NOWACK e NOELLE, 2010).

A secreção de IL-9 de forma isolada por linfócitos TCD4+ é estimulada por uma ação sinérgica de IL-2, TGF- β e IL-4 e é inibida por IFN- γ . Outra subpopulação de linfócitos T, as células Th2, também secretam IL-9 de forma dependente de IL-4 e TGF- β (ROJAS-ZULETA e SANCHEZ, 2017).

Não foram encontrados estudos na literatura que reportassem níveis mais elevados de IL-9 no soro de pacientes com câncer gástrico. No entanto, o aumento dos níveis séricos desta citocina está relacionado a um mau prognóstico em pacientes com linfoma de Hodgkin. Além disso, devido seu papel na diferenciação de células T, é mais comum o aumento dos níveis de IL-9 em tumores hematológicos do que em tumores sólidos. Isto pode explicar o fato de esta citocina estar elevada no soro pacientes com câncer gástrico no geral (linfoma e adenocarcinoma), mas não em adenocarcinoma quando analisado isoladamente (FISCHER et al., 2003; (ROJAS-ZULETA e SANCHEZ, 2017).

A IL-10 é uma potente citocina pleiotrópica que tem a capacidade dupla de suprimir ou estimular a atividade anticancerígena (MANNINO et al., 2015). A elevada quantidade de IL-

10 encontrada no soro de pacientes com câncer gástrico descrita neste estudo sugere que esta citocina está agindo suprimindo as respostas anticâncer.

Essa citocina pode ser produzida por vários tipos celulares, principalmente macrófagos (SARAIVA e O’GARRA, 2010). FORTIS et al. (1996) e SZKARADKIEWICZ et al. (2010) descreveram que as células tumorais gástricas também podem secretar IL-10, o que pode explicar sua redução em pacientes com câncer gástrico após a remoção cirúrgica de seu tumor. Segundo SÁNCHEZ-ZAUCO et al. (2017), níveis elevados de IL-10 no sangue em pacientes com câncer gástrico avançado levam à incapacidade de eliminar células tumorais.

Em relação aos dados clinicopatológicos, elevados níveis de IL-10 no soro também foram descritos em pacientes com câncer digestivo com pior prognóstico, incluindo câncer gástrico (IKEGUCHI et al., 2009). Adicionalmente, SZAFLARSKA et al. (2009) observaram que a IL-10 é significativamente elevada em pacientes com câncer gástrico comparados ao controle e uma maior prevalência observada em estágio IV da doença.

O G-CSF é uma glicoproteína que influencia a sobrevivência, proliferação e maturação dos neutrófilos através da interação com um receptor específico (ROBERT, 2005). Essa citocina também foi associada ao crescimento de células tumorais *in vitro* (BERDEL et al., 1989). Na maioria dos casos, os tumores produtores de G-CSF parecem avançar e, portanto, seu diagnóstico está associado a um pior prognóstico. Os tumores que produzem G-CSF são caracterizados por leucocitose marcada no hospedeiro e na produção constitutiva dessa citocina por células tumorais. Embora a leucocitose seja a mudança hematológica mais proeminente em tais pacientes, os tumores produtores de G-CSF causaram leucocitose periférica notável e produção de neutrófilos na medula óssea (YOSHINAGA et al., 2011).

Evidências têm demonstrado que a produção de G-CSF por células tumorais com receptores de G-CSF aumentam o crescimento autocrino (BALDWIN et al., 1989; TACHIBANA et al., 1995). No entanto, YAMANO et al. (2007) relataram que a expressão do receptor de G-CSF não foi detectada em um tumor avançado produtor de G-CSF. Em 2011, YOSHINAGA et al. relataram um caso de câncer gástrico metastático produtor de G-CSF de um câncer de pulmão e sugeriram que o nível sérico pré e pós-operatório de G-CSF deve ser verificado se a contagem de leucócitos no pós-operatório diminui em casos envolvendo câncer de pulmão de células grandes com leucocitose. MIZUGUCHI et al. (2005) também observaram que os tumores produtores de G-CSF podem ser diagnosticados por alterações pós-operatórias no

nível sérico de G-CSF. O G-CSF pode sair rapidamente da célula, o que pode ser o motivo da coloração imunoistológica negativa de G-CSF (SHIMAMURA et al., 1990; NOMURA et al., 1996). Assim, fortalecendo ainda mais a possibilidade do uso de G-CSF como biomarcador sérico no câncer.

Interessantemente, o papel de *extracellular high-mobility group box-1* (HMGB1) na TEM e angiogenese através da mediação de IL-8, como um mecanismo potencial de micrometastases e formação de novos vasos em câncer gástrico, levaram a formulação de estratégias de combinação de HMGB1 e IL-8 como potencial biomarcador de diagnóstico e alvo terapêutico no controle de micrometastases e angiogenese tumoral nesse tipo de neoplasia (CHUNG et al., 2015; CHUNG et al., 2017).

O GM-CSF, fator de crescimento produzido por células T e células monocíticas, é responsável pelo crescimento, diferenciação e aumento funcional de granulócitos e macrófagos. Essa citocina é um potente estimulante da proliferação celular que possui um importante papel nas respostas imunitárias antitumorais (MEROGI et al., 1997; BEALES, 2002; LEE e MARGOLIN, 2011).

Elevados níveis de GM-CSF são descritos no soro de pacientes com diferentes tumores, porém o presente estudo é o primeiro a descrever em pacientes com câncer gástrico (KEELEY et al., 2014; KIM et al., 2014). DENG et al. (2016) observaram níveis elevados de GM-CSF no soro de pacientes com câncer pulmonar e esofágico durante a radioterapia foram correlacionados com favorável OS ePFS.

Alguns fatores de crescimento, como o GM-CSF, são utilizados para a produção de vacinas contra o câncer. Essas vacinas são à base de células modificadas com citocinas clinicamente testadas como terapia imuno-genética. A citocina GM-CSF, por exemplo, é o mais potente estimulador de tumores específicos e de imunidade tumoral de longa duração. Ela pode recrutar células dendríticas, que serão ativadas e levadas para os linfonodos, onde se inicia a resposta das células T (CD4 e CD8). Assim, as células da vacina exibem todos os antígenos tumorais relevantes, a imunização com estas células induz a imunidade anti- tumoral nos pacientes (KIM et al., 2008; BANCHEREAU et al., 1998; INABA et al., 1992).

Essa vacina que secreta GM-CSF, reduziu os tumores estabelecidos em ratos e mostrou resultados promissores em pacientes com melanoma, carcinomas de próstata e células

renais (DRANOFF et al., 1993; GRETEN e JAFFEE, 1999; SOIFFER et al., 1998; SIMONS et al., 1999).

A MIP1 α , também conhecida como CCL3, é uma pequena proteína quimiotática que já foi encontrada em vários tipos de amostras de tecido tumoral e funciona como reguladora chave da progressão do câncer (DING et al., 2014). Essa quimiocina de baixo peso molecular está principalmente associada à adesão celular e migração, e suas funções quimiotáticas envolvem monócitos, linfócitos, células dendríticas, eosinófilos e células NK, além de participar do processo inflamatório. Estudos demonstraram níveis aumentados de MIP1 α em mieloma múltiplo, câncer de pulmão e carcinoma hepatocelular (CHOI et al., 2000). Em 2009, TSAI-TURTON et al. descreveu elevados níveis de MIP1 α no soro de pacientes com câncer de ovário com doença de alto grau e avançada.

Até o momento não há estudos na literatura que investigaram os níveis de MIP1 α no tumor nem no soro de pacientes com câncer gástrico. Portanto, o presente estudo foi o primeiro a descrever o elevado nível dessa quimiocina no soro de pacientes com essa neoplasia.

O IFN- γ é uma citocinapleiotrópica secretada principalmente por linfócitos T CD8 + , certos subconjuntos de células T CD4 + e células NK. A produção de IFN- γ é intermediada pela ação de outras citocinas, como IL-2 e IL-1 (IJZERMANS e MARQUET, 1989).

O INF- γ possui diversas funções, como atividade antiviral, regula o metabolismo e a diferenciação celular. Devido a uma combinação de efeitos antiproliferativos e imunomediadores, o IFN- γ também possui atividade antitumoral, além de atuar diretamente em células NK, células apresentadoras de antígenos, macrófagos e células T (JONASCH e HALUSKA, 2001).

Não foram encontrados na literatura estudos que reportassem níveis elevados de INF- γ no soro de pacientes com câncer gástrico. Nossos resultados apontam níveis elevados desta citocina nos pacientes em relação aos controles, que podem ter sido induzidos em resposta ao elevado nível de IL-2. Os resultados demonstram que, em conjunto, estas citocinas são candidatas a biomarcadores de diagnóstico para o câncer gástrico.

A RANTES é uma quimiocina que atua em uma diversidade de células, como células T, e monócitos, basófilos, eosinófilos, NK, células dendríticas e mastócitos. Esta quimiocina é secretada predominantemente por células T CD8 + , células epiteliais, fibroblastos e plaquetas,

promovendo a infiltração de leucócitos (APPAY e ROWLAND-JONES, 2001).

A quimiocina RANTES liberada por estas células nos tecidos danificados funciona como um sinalizador para o recrutamento de células imunes. Portanto, a expressão de altos níveis de RANTES está associada com uma variedade de doenças inflamatórias (KRENSKY e AHN, 2007).

Durante a carcinogênese, a RANTES atua através de diversas vias de sinalização celular. Esta quimiocina contribui para a migração celular através da ativação da via PI3K / Akt, que por sua vez, ativa NF- κ B. Uma vez ativada, o NF- κ B pode promover a invasão celular através da secreção de MMPs. A migração celular pode ainda ser induzida por RANTES via MEK, ERK e, em seguida, NF- κ B, resultando nas ativações da integrina α v β 3. Por fim, RANTES pode estimular a proliferação celular via mTOR, levando a uma rápida regulação positiva da expressão de ciclina D1, c-Myc e Dad-1 (ALDINUCCI e COLOMBATTI, 2014).

KIM et al. (2003) relataram que os níveis de RANTES estão mais elevados em pacientes com câncer gástrico avançado em relação a estágios mais precoces e aumenta o risco de metástases em até três vezes. Em nosso estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre pacientes avançados em relação aos mais precoces, no entanto, níveis mais elevados desta citocina foram detectados nos pacientes em relação aos controles. Estes achados reforçam o papel de RANTES no desenvolvimento do câncer gástrico, cujos receptores hiperexpressos aumentam a proliferação celular e estão relacionados a uma menor sobrevivência do paciente (SUGASAWA et al., 2008 TSUJIMOTO et al., 2010).

O VEGF desempenha papel chave na regulação do desenvolvimento vascular fisiológico, estimulando a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais. O aumento da expressão de VEGF está altamente associado com a progressão, metástase e pior prognóstico em diversos tumores malignos. Isso se deve à regulação do mesmo, que ocorre por meio de processos transcricionais e pós-transcricionais, incluindo o splicing alternativo, hipóxia, hormônios, outros fatores angiogênicos e microRNAs (GOEL e MERCÚRIO, 2013).

A família do VEGF é composta pelo VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D, sendo o VEGF-A o fator de crescimento mais importante para a angiogênese, pois ele se liga a receptores (em especial ao VEGFR2) que promovem a proliferação, o brotamento e a permeabilidade de vasos sanguíneos (MOENS et al., 2014).

Baseado no conhecimento das vias moleculares que envolvem a angiogênese, foram desenvolvidos vários anticorpos e inibidores de quinases que suprimem a sinalização de VEGF e de seus receptores, o que levou ao desenvolvimento de terapias anti-angiogênicas utilizadas no tratamento contra o câncer (SHIBUYA, 2014).

Em relação a estudos terapêuticos voltados para o câncer gástrico, tem sido aplicado o silenciamento de genes mediado por RNAi na expressão do gene *VEGF* em células deste tipo tumoral. Além disso, outra abordagem bastante utilizada é o bloqueio de VEGF simultaneamente à quimioterapia (ABDEL-RAHMAN, 2014).

Em 2002, KARAYIANNAKIS et al. mensuraram as concentrações séricas de VEGF em 61 controles saudáveis e em 58 pacientes com câncer gástrico antes da cirurgia e, novamente, aos 7 e 30 dias após a cirurgia. Os níveis séricos de VEGF em pacientes com câncer gástrico foram significativamente maiores que os controles, demonstrando que este fator de crescimento pode ser um possível biomarcador de diagnóstico. Além disso, no mesmo estudo, houve associação significativa entre os níveis séricos de VEGF e o estágio da doença, a profundidade de invasão do tumor e a presença de metástases à distância.

Entre as citocinas que encontramos com níveis estatisticamente significante na comparação entre grupos, a expressão de IL-10, GM-CSF, G-CSF e VEGF no tumor foi associado com a menor OS dos pacientes com câncer gástrico, a maior expressão dessas citocinas confere 59%, 36%, 35%, 30% e 53% menor OS (HR: 1,59; CI: 1,32–1,9; *Log-rank P*: 5,2e–07), (HR: 1,36; CI: 1,14–1,64; *Log-rank P*: 0,00085), (HR: 1,35; CI: 1,13–1,62; *Log-rank P*: 8e–04), (HR: 1,3; CI: 1,09–1,56; *Log-rank P*: 0,0035) e (HR: 1,53; CI: 1,27– 1,8; 5; *Log-rank P*: 5,7e–06), respectivamente. Entretanto, a baixa expressão de IL-8, IL-15 e MIP-1 α nos tumores confere 35%, 41% e 38% menor OS (HR: 0,65; CI: 0,53 – 0,79; *Log rank P*: 1,4e–05), (HR: 0,59; CI: 0,49–0,71; *Log-rank P*: 28,3e–09) e (HR: 0,62; CI: 0,5– 0,76; *Log-rank P*: 4,3e–06), respectivamente. Por outro lado, o aumento da expressão de IL- 6 nos tumores gástricos não foi associada com OS (HR: 1,1; CI: 0,91–1,32; *Log-rank P*: 0,33).

A associação da expressão das citocinas no tumor com a PFS demonstrou que a superexpressão de GM-CSF, G-CSF e VEGF (HR: 1,3; CI: 1,06 – 1,59; *Log-rank P*: 0,012) (HR: 1,27; CI: 1,03 – 1,57; *Log-rank P*: 0,023), (HR: 1,75; CI: 1,41 – 2,17; *Log-rank P*: 2,9e–07) confere menor PFS. Adicionalmente, a redução da expressão de IL-8, IL-15 e MIP-1 α foi associada a uma menor sobrevida livre de doença (HR: 0,74; CI: 0,59 – 0,92; *Log-rank P*:

0,0073), (HR: 0,6; CI: 0,49 – 0,73; *Log-rank P*: 6,6e-07), respectivamente. Apesar do aumento da expressão de IL-10 nos tumores gástricos está associado a OS, não observamos associação significativa com PFS.

Em relação às características clinicopatológicas, observamos diferenças na expressão das proteínas, IL-5 (49±12,75, p=0,02; mediana±desvio interquartilico), IL-7 (22±32,25, p=0,03) e IL-10 (45,5±46,25, p=0,02), IL-17A (150,5±48,80, p=0,01) mais elevadas no tipo difuso de Laurén em relação ao tipo intestinal. A IL-17A (128,5±45,13 e 145,75±43,30; 0,042) e IL-5 (38±16,93 e 48,5±16,63; 0,007) também obtiveram diferenças estatisticamente significantes no estadiamento N1-N3 em relação ao N0. A IL-10 está mais elevada em pacientes com câncer gástrico localizado na cárdia em relação àqueles localizados no antro e piloro. Entretanto, não há nada na literatura associando níveis elevados desses mediadores inflamatórios com o tipo histológico, com o estadiamento tumoral e a localização do tumor.

A IL-5 é uma citocina sintetizada principalmente por células Th2, apresenta um papel importante na maturação, proliferação e ativação de eosinófilos e a maior parte dos danos nos tecidos causados por asma, assim como outros distúrbios relacionados com a eosinofilia, acredita-se ser resultado da alteração dos níveis de expressão de IL-5 (FLOOD- PAGE et al., 2007; BENTLEY et al., 1992).

Interessantemente, BARTUZI et al. (2000) encontraram níveis séricos de IL-5 elevados em indivíduos infectados com *H. pylori* com gastrite crônica, um precursor do câncer gástrico. Em 2011, GABITASS et al. observaram que os níveis de IL-5, IL-6 e IL-10 estavam elevados no plasma dos pacientes com câncer gástrico, câncer esofágico e de pâncreas.

Vários estudos já demonstraram a participação da IL-5 na manutenção da atividade inflamatória. Portanto, o bloqueio dessa interleucina poderia ser uma forma terapêutica para alterar a patologia do organismo (CASTRO et al., 2006).

A IL-7 é produzida principalmente por células epiteliais do intestino e queratinócitos. Ela pode servir como um fator de regulação para os linfócitos da mucosa intestinal (RAZAVI et al., 2015; NCBI,2017).

Essa citocina induz o desenvolvimento, crescimento e diferenciação de algumas neoplasias malignas hematológicas, incluindo alguns tipos de leucemias e linfomas (DIGEL et

al., 1991; QIN et al., 2001). Essa citocina também pode atuar na linfangiogênese (formação de novos vasos linfáticos) durante a progressão e disseminação de tumores sólidos (AL-RAWI et al., 2002).

AL-RAWI et al. (2003) identificaram a IL-7 como um fator de crescimento potente para células endoteliais e células de câncer de mama. Isso propôs a influência dessa interleucina na biologia do câncer de mama, em termos de desenvolvimento e progressão.

A IL-17A é um dos membros da família IL-17, a célula que sintetizava essa citocina ficou desconhecida até o ano 2000, quando Infante-Duarte et al. propuseram que tal proteína não era derivada de Th1 ou de Th2, mas que era produzida por uma nova linhagem de células, que se denominou Th17.

Vários estudos demonstraram que a IL-17A atua na proteção contra bactérias e fungos extracelulares, devido a capacidade de recrutar neutrófilos para as áreas infectadas (YE et al., 2001). Inclusive, há estudo sugerindo que a associação da IL-17A às respostas antimicrobianas é fundamental para atuação no controle da proliferação de *H. pylori* (ALGOOD et al., 2009).

Segundo os achados de ZHONG et al. (2015), os níveis de IL-17A no soro estão aumentados em pacientes com câncer gástrico, e a frequência de células Th17 está intimamente relacionada com concentrações no soro de IL-17A em pacientes com câncer gástrico. Além disso, as células Th17 e citocinas associadas estão presentes em níveis significativamente diferentes durante a progressão e metástase de câncer gástrico.

A IP-10 é uma quimiocina pleiotrópica que tem como função principal a indução a apoptose, regulando, desta forma, o crescimento e proliferação celular. A função quimiotática da IP-10 recruta macrófagos, células dendríticas, células NK e T ativadas, o que a caracteriza como importante reguladora de imunidade inata e adaptativa (LIU et al., 2011).

A ação sobre o crescimento celular depende do tipo de células, logo, a IP-10 pode ter função anti ou proliferativa. Algumas células malignas apresentam uma isoforma do receptor de IP-10, o CXCR3-A, a qual pode ativar as vias ERK1 / 2, p38 / MAPK, JNK e PI3-K/ Akt, induzindo assim, a proliferação celular (LIU, GUO, STILES, 2011).

Não foram encontrados na literatura estudos que relatassem aumento dos níveis séricos de IP-10 em pacientes com câncer gástrico. No entanto, ZHOU et al.(2016) revelaram

que o receptor CXCR3 é superexpresso em células e tecidos de câncer gástrico, correlacionando-se com estágio avançado do tumor, invasão vascular, metástase linfonodal e baixa sobrevida. Os elevados níveis de IP-10 (493,25 e \pm 233,75; 0,033) nos pacientes com câncer gástrico localizado na cárdia reforçam que a IP-10 pode ativar vias de sinalização importantes na carcinogênese gástrica. Esta citocina, portanto, pode ser um importante alvo para prognóstico da doença

O aumento da expressão de IL-5 e IL-17A no tumor foi associado com menor OS e PFS em pacientes com câncer gástrico; a maior expressão de IL-5 confere 82% e 52% menor OS e PFS (HR: 1,82; CI: 1,41–2,35; *Log-rank P*: $3e-06$) (HR: 1,52; CI: 1,23–1,89; *Log-rank P*: $9,6e-05$), respectivamente; a maior expressão a IL-17A confere 60% e 42% de menor OS e PFS (HR: 1,6; CI: 1,33-1,92, *Log-rank P*: $5e-07$) e (HR: 1,42; CI: 1,14 – 1,78; *Log-rank P*: 0,0017), respectivamente. Entretanto, a baixa expressão de IL-7 no tumor que esta associada a uma menor OS e PFS; a baixa expressão de IL-7 confere 35% e 44% menor OS e PFS (HR: 0,65; CI: 0,53 – 0,79; *Log-rank P*: $1,4e-05$) e (HR: 0,56 CI: 0,46 – 0,69; *Log-rank P*: $1,8e-08$), respectivamente. Este resultado, nos leva a sugerir que os níveis elevados de IL-5, IL-7 e IL-10 no soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo difuso possam ser um indicativo de pior prognóstico nesse tipo tumoral.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi observado que os níveis elevados de IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α e VEGF no soro são potenciais biomarcadores tumorais no câncer gástrico. Além disso, a superexpressão de G-CSF, GM-CSF e VEGF nos tumores gástricos foi associado com um menor OS e PFS dos pacientes. Quando comparado os níveis de citocinas no soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico e grupo controle, observamos IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP1 α , RANTES e VEGF estatisticamente elevadas no grupo de pacientes com adenocarcinoma gástrico.

Como os mediadores inflamatórios produzidos localmente na mucosa gástrica podem atingir a circulação sanguínea e serem detectados em amostras de soro, inferimos com base nesses resultados que a quantificação dos níveis de IL-10, G-CSF, GM-CSF e VEGF no soro de pacientes com câncer gástrico pode ser um indicativo do prognóstico do paciente.

Em relação às características clinicopatológicas dos pacientes com adenocarcinoma gástrico, observou-se um maior nível de IP-10 em tumores localizados na cárdia. A IL-5 e IL-17A foram estatisticamente significantes para o estadiamento N-1-N3 em relação ao N0, sugerindo que estas interleucinas podem ser importantes para o estadiamento do câncer gástrico.

Foram observados também níveis elevados de IL-5, IL-7, IL-10 e IL-17A no soro de pacientes com adenocarcinoma do tipo difuso quando comparado com o nível de citocinas no adenocarcinoma do tipo intestinal. Esses resultados podem estar relacionados com uma maior resposta inflamatória desse tipo tumoral. Por sua vez, a análise de associação da expressão dessas citocinas no tumor gástrico sugere que IL-5, IL-10 e IL-17A mensurados no soro são potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico do paciente com adenocarcinoma tipo difuso de Lauren.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: **SaundersElsevier**, p. 1-14, 2012.

ABDEL-RAHMAN, O. Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway in gastric cancer: preclinical and clinical aspects. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 93, n. 1, p. 18-27

AKDIS, M. et al Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 4, p. 984-1010,2016.

AKDIS, M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, p. 701-721,2011.

ALGOOD, H. M. et al. Regulation of gastric B cell recruitment is dependent on IL-17 receptor A signaling in a model of chronic bacterial infection. **The Journal of Immunology**. v. 183. n. 9. p. 5837–5846, 2009.

AI-RAWI, M.; MANSEL, R.; JIANG, W. Interleukin-7 induces the growth of breast cancer cells. **British Journal of Surgery**. v. 90(Suppl.), 106, 2003.

ANDERSON, H., LOIVUKENE, K. et al. Association of cagA and vacA genotypes of *Helicobacter pylori* with gastric diseases in Estonia. **J clin microbial**, 40(1); 298-300, 2002.

ANUJA, K. et al. Prolonged inflammatory microenvironment is crucial for pro-neoplastic growth and genome instability: a detailed review. **Inflammation Research**, p. 1-10, 2016.

APTE, R. N. et al. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387-408, 2006.

ARAKI, S. et al. Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer. **Cancer Res**, p. 6854–6862, 2007.

AREND, W. P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 323-340, 2002.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. **Pharmacology Reviews**. v. 55. p. 241-269, 2003

BÄCKDAHL, L.; BUSHELL, A.; BECK, S. Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 1, p. 176-184, 2009.

BALDWIN, G. C. et al. Nonhematopoietic tumor cells express functional GM-CSF receptors. **Blood**, v. 73, n. 4, p. 1033-1037, 1989.

BARTUZI, Z. et al. Evaluating the profile of selected cytokines in patients with food allergy and chronic gastritis. **Medical Science Monitor**, v. 6, n. 6, p. 1128-1135, 2000.

BEALES, I. LP. Effect of Interlukin-1 β on proliferation of gastric epithelial cells in culture. **BMC gastroenterology**, v. 2, n. 1, p. 7,2002.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**. v. 392. p. 245-252, 1998.

BHATT, A. N. et al. Cancer biomarkers-Current perspectives. **Indian Journal research**, p. 129-149, 2010.

BENTLEY, A. M. et al. (1992) Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. **American Review of Respiratory Disease**. 146: 500-506.

Bio-Rad. Bio-plex™ Pro Cytikine, Chemokine and Growth factors Assays. Instruction Manual. Disponível em: <<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10014905.pdf>>. Acesso em: 15 de jan. de2017.

BONDAR C. et al. Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into

- the small intestine in celiac disease. **PLoS One**; 9:e89068, 2014.
- BONECCHI, R.; GRAHAM, G. J. Atypical chemokine receptors and their roles in the resolution of the inflammatory response. **Frontiers in immunology**, v. 7, 2016.
- BONINI, C.; MONDINO, A. Adoptive T-cell therapy for cancer: The era of engineered T cells. **European journal of immunology**, v. 45, n. 9, p. 2457-2469, 2015.
- BOYMAN, O.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 3, p. 180, 2012.
- BRENNER, H.; ROTHENBACHER, D.; ARNDT, V. Epidemiology of stomach cancer. **Cancer Epidemiology: Modifiable Factors**, p. 467-477, 2009.
- BROCKER, C. et al. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. **Human genomics**, v. 5, n. 1, p. 1, 2010.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.
- CALCAGNO, D. Q. et al. DNA and histone methylation in gastric carcinogenesis. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 8, p. 1182, 2013.
- CALCAGNO, D. Q.; DE ARRUDA C. SMITH, M.; BURBANO, R. R. Cancer type-specific epigenetic changes: gastric cancer. **Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis**, p. 79-101, 2015.
- CAPONE, F. et al. Serum Cytokine Profile Evaluation: A Tool to Define New Diagnostic and Prognostic Markers of Cancer Using Multiplexed Bead-Based Immunoassays. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.
- CĂINAP, C. et al. Classic tumor markers in gastric cancer. Current standards and limitations. **Clujul Medical** v. 88, n. 2, p. 111, 2015.
- CARSON, R. T.; VIGNALI, D. AA. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using

a multiplexed flow cytometric assay. **Journal of immunological methods**, v. 227, n. 1, p. 41-52, 1999.

CASTRO, M. C. M. et al. Efeito da mitomicina C em polipose nasossinusal eosinofílica, in vivo: dosagem de IL5 e GM-CSF, RT-PCR. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v. 72. n. 1. p. 38-42, 2006.

CHAN, S. H. et al. Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. **Journal of Immunology**. v. 148. p. 92-98, 1992.

CHANG, W. et al. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**. v. 20. p. 4586-4596, 2014.

CHANG, Y-W et al. Interleukin-1B (IL-1B) polymorphisms and gastric mucosal levels of IL-1 β cytokine in Korean patients with gastric cancer. **International journal of cancer**, v. 114, n. 3, p. 465-471, 2005.

CHEN, X. Z. et al. Correlation between serum CA724 and gastric cancer: multiple analyses based on Chinese population. **Molecular Biology Reports**. v. 39. p. 9031-9039, 2012.

CHOI, S. J. et al. Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. **Blood**, v. 96, n. 2, p. 671-675, 2000.

CHUNG, H. W. et al. Combined targeting of high-mobility group box-1 and interleukin-8 to control micrometastasis potential in gastric cancer. **International journal of cancer**, v. 137, n. 7, p. 1598-1609, 2015.

CLARK, R.; KUPPER, T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. **Journal of investigative dermatology**, v. 125, n. 4, p. 629-637, 2005.

COSTANTINI, S.; CAPONE, F.; GUERRIERO, E.; G. CASTELLO. An approach for understanding the inflammation and cancer relationship. **Immunology Letters**, vl. 126, no. 1-2, pp. 91-92, 2009.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-

867, 2002.

COOPER, J. S. et al. Chemoradiotherapy of locally advanced esophageal cancer: long-term follow-up of a prospective randomized trial (RTOG 85-01). **Jama**, v. 281, n. 17, p. 1623-1627, 1999.

COVER, T. L. Helicobacter pylori diversity and gastric cancer risk. **MBio**, v. 7, n. 1, p. e01869-15, 2016.

CRABTREE, J. E.; LINDLEY, I. J. Mucosal interleukin-8 and Helicobacter pylori-associated gastroduodenal disease. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 6, p. S33-8, 1994.

CREW, K. D.; NEUGUT, A. I. Epidemiology of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 3, p. 354, 2006.

CHRISTIANSSON, L. et al. The use of multiplex platforms for absolute and relative protein quantification of clinical material. **EuPA Open Proteomics**, v. 3, p. 37-47, 2014.

CROSS, M.; DEXTER, T. M. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 271-280, 1991.

DE SOUZA C. R. et al. Occurrence of Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus infection in endoscopic and gastric cancer patients from Northern Brazil. **BMC Gastroenterol**, Oct 15;14:179. doi: 10.1186/1471-230X-14-179, 2014.

DENG, G. et al. Elevated serum granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels during radiotherapy predict favorable outcomes in lung and esophageal cancer. **Oncotarget**, Dec 20;7(51):85142-85150. doi: 10.18632/oncotarget.13202, 2016.

DIGEL, W. et al. Human interleukin-7 induces proliferation of neoplastic cells from chronic lymphocytic leukemia and acute leukemias. **Blood**, v. 78, n. 3, p. 753-759, 1991.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 519-550, 2009.

DING, L. et al. Serum CCL2 and CCL3 as potential biomarkers for the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **Tumor Biology**. v. 35. p. 10539-10546, 2014.

DMITRIEVA, O. S. et al. Interleukins 1 and 6 as main mediators of inflammation and cancer. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 2, p. 80-90, 2016.

DONAHUE, R. E.; YANG, Y. C.; CLARK, S. C. Human P40 T-cell growth factor (interleukin-9) supports erythroid colony formation. **Blood**. v. 75. p. 2271-2275, 1990.

DRANOFF, G. et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 90. p. 3539-3543, 1993.

EL-OMAR, E. M. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 398, 2000.

EL-OMAR, E. M. The importance of interleukin 1 β in *Helicobacter pylori* associated disease. **Gut**, v. 48, n. 6, p. 743-747, 2001.

FAN, Y.; MAO, R.; YANG, J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. **Protein & cell**, v. 4, n. 3, p. 176-185, 2013.

FERGUSON, L. R. Chronic inflammation and mutagenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 690, n. 1, p. 3- 11, 2010.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359- E386, 2015.

FIGUEIREDO, C. et al. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 22, p. 1680-1687, 2002.

FLOOD-PAGE, P. et al. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in

patients with moderate persistent asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 176: 1062-1071,2007.

FORAN, E. et al. Upregulation of DNA methyltransferase-mediated gene silencing, anchorage-independent growth, and migration of colon cancer cells by interleukin-6. **Molecular Cancer Research**, v. 8, n. 4, p. 471-481, 2010.

FORTIS, C. et al. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. **Cancer Letters**. v. 104. p. 1-5, 1996.

FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 69, n. Suppl 1, p. s4-s9, 2014.

MEROGI, A. J. et al. Tumor-host interaction: analysis of cytokines, growth factors, and tumorinfiltrating lymphocytes in ovarian carcinomas. **Human pathology**, v. 28, n. 3, p. 321-331, 1997.

FULTON, R. J. et al. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix™ system. **Clinical chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1749-1756,1997.

GABAY, C. et al. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 232, 2010.

GABITASS, R. F. et al. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. **Cancer immunology**, 2011.

GERMANO, G.; ALLAVENA, P. MANTOVANI, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. **Elsevier**, vol. 43, no. 3, pp. 374–379, 2008.

GHIMIRE, P.; WU, GY e ZHU, L. Primary gastrointestinal lymphoma. **World J Gastroenterol**, 17:697–707,2011.

GIGEK, C. O. et al. Genetic variants in gastric cancer: Risks and clinical implications. **Experimental and Molecular Pathology**, 2017.

GO, M. F. Natural history and epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 16, n. s1, p. 3-15, 2002.

GOEL, H. L., MERCURIO, A. M. VEGF targets the tumour cell. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 12, p. 871,2013.

GRAHAM, G.; BONECCHI, R. Atypical chemokine receptors and their roles in the resolution of the inflammatory response. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 224, 2016.

GRETEN, T. F.; JAFFEE, E. M. Cancer vaccines. *Journal Clinical Oncology*. v. 17. p. 1047-1060, 1999.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. **Current opinion in genetics & development**, v. 20, n. 1, p. 65-71,2010.

HANNINK, M.; DONOGHUE, D. J. Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 989, n. 1, p. 1-10, 1989.

HAMLET, A.; Thoreson, A.C.et al. Duodenal Helicobacter pylori infection differs in cagA genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. **Gastroenterology**, 116 (2); 259-68, 1999.

HASEGAWA, H; et al.Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric Cytokine Family. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016.

HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. **Nature immunology**, v. 14, n. 10, p. 978-985, 2013.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular cancer**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

HUANG, Y.; CHEN, Z. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. **American journal of translational research**, v. 8, n. 6, p. 2490, 2016.

HUMPHRIES, J. M. et al. Identification and validation of novel candidate protein biomarkers for the detection of human gastric cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 5, p. 1051-1058, 2014.

IKEGUCHI, M. et al. Serum interleukin-6 and -10 levels in patients with gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 12, n. 2, p. 95-100, 2009.

INFANTE-DUARTE, C. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. **The Journal of Immunology**. v. 165. n. 11. p. 6107-6115, 2000.

IGNATOV, A. et al. RANTES stimulates Ca⁺ mobilization and inositol trisphosphate(IP₃) formation in cells transfected with G protein-coupled receptor 75. **British Journal of pharmacology**. v. 149. n. 5. p. 490-497, 2006.

INABA, K. et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colonystimulating factor. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 176. p. 1693-702, 1992.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativa 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v04/pdf/revisao2.pdf >. Acesso em: 09 de jan. de 2017.

International Agency for Research on Cancer – IARC. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in, v. 2012, 2012.

JANEWAY JUNIOR, C. A. et al.. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5^o edição. **Nova York: Garland Science**; 2001. The components of the immune system. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27092/> >. Acesso em: 13 de jan. de 2017.

- JIN, Z.; JIANG, W.; WANG, L. Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (Review). **Oncology letters**, v. 9, n. 4, p. 1502-1508, 2015.
- JUDD, L. M. et al. Inhibition of the JAK2/STAT3 pathway reduces gastric cancer growth in vitro and in vivo. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e95993, 2014.
- JU, D. et al. Interleukin-8 is associated with adhesion, migration and invasion in human gastric cancer SCG-7901 cells. **Medical Oncology**, v. 29, n. 1, p. 91-99, 2012.
- KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.
- KALNIŃA, Z. et al.. Emerging blood-based biomarkers for detection of gastric cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 41, p. 11636,2015.
- KAMINSKA, J. et al. CRP, TNF α , IL-1ra, IL-6, IL-8 and IL-10 in blood serum of colorectal cancer patients. **Pathology oncology research**, v. 6, n. 1, p. 38-41, 2000.
- KEATES, S. et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in ACG gastric epithelial cells by cag+ and cag- Helicobacter pylori. **J Immunol**, 163 (10): 5552-9, 1999.
- KARAYIANNAKIS, A. J.; et al. Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients: correlation with pathological variables, patient survival, and tumor surgery. **Annals of surgery**, v. 236, n. 1, p. 37, 2002.
- KEELEY, B. R. Prediagnostic serum levels of inflammatory biomarkers are correlated with future development of lung and esophageal cancer. **Cancer Sci.** Sep;105(9):1205-11. doi: 10.1111/cas.12485. Epub 2014 Sep 3,2014.
- KIDO, S. et al. Interleukin 8 and vascular endothelial growth factor - prognostic factors in human gastric carcinomas? **Eur J Cancer**, p. 1482–1487, 2001.
- KINOSHITA, H. et al. Interleukin-6 mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric tumorigenesis. **Plos One**. v. 8. p. e60914, 2013.

KIM, H. Y. et al. Secretion of Biologically Active Recombinant Human GranulocyteMacrophage Colony-Stimulating Factor by Transduced Gastric Cancer Cells. **Yonsei Medical Journal**. v. 49. n. 2. p. 279-287, 2008

KIM, H. K. et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. **European Journal of Cancer**. v. 39. p. 184-191, 2003.

KIM, H. J. et al. Loss of the Promyelocytic Leukemia Protein in Gastric Cancer: Implications for IP-10 Expression and TumorInfiltrating Lymphocytes. **Plos One**, v. 6. p. e26264, 2011.

KIM, Y. W. et al. Association of serum and intratumoral cytokine profiles with tumor stage and neutrophil lymphocyte ratio in colorectal cancer. **Anticancer Res**, Jul;34(7):3481-7,2014.

KITADAI, Y. et al. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. **American Journal of Pathology**. v. 152. p. 93-100,1998.

KOVALEVA, O. V. et al. Tumor Associated Macrophages in Kidney Cancer. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2016, 2016.

KUAI, WX. et al. Interleukin-8 associates with adhesion, migration, invasion and chemosensitivity of human gastric cancer cells. **World J Gastroenterol**, p. 979–985, 2012.

KURASHY, A.; KARIN, M.; GRIVENNIKOV, S. I. Tumor promotion via injury-and death-induced inflammation. **Immunity**, v. 35, n. 4, p. 467-477, 2011.

LANDSKRON, G. et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **Journal of immunology research**, v. 2014, 2014.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma, an attempt at a histoclinical classification. **ActaPathol. Microbiol. Scand.**, v. 64, p. 31-49, 1965.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. a001651, 2009.

LEE, S.; MARGOLIN, K. Cytokines in cancer immunotherapy. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 3856-3893, 2011.

LEE EY, Lee ZH, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. **Autoimmun**, Rev 8: 379–383, 2009.

LEE, K.; SILVA, E. A.; MOONEY, D. J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 8, n. 55, p. 153-170, 2011.

LEVY, D. E.; LEE, C-K. What does Stat3 do?. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 9, p. 1143-1148, 2002.

LEWIS, A. M. et al. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. **Journal of translational medicine**, v. 4, n. 1, p. 48, 2006.

LIAO, W. et al. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. **Current opinion in immunology**, v. 23, n. 5, p. 598-604, 2011.

LI, X. et al. Establishment of mitochondrial pyruvate carrier 1 (MPC1) gene knockout mice with preliminary gene function analyses. **Oncotarget**, v. 7, n. 48, p. 79981, 2016.

LINDELLDM,LANETE,LUKACSNW.CXCL10/CXCR3 mediated responses promote immunity to respiratory syncytial virus infection by augmenting dendritic cell and CD8(+) T cell efficacy. **Eur J Immunol**, 38:2168–79, 2008.

LIPPITZ, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. **The lancet oncology**, v. 14, n. 6, p. e218-e228, 2013.

LIU, W.; YANG, Q.; LIU, B.; ZHU, Z. Serum proteomics for gastric cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 431, p. 179-184, 2014.

LIU, X. et al. Clinicopathologic features and prognostic factors in alpha-fetoprotein-

producing gastric cancers: analysis of 104 cases. **Journal of Surgical Oncology**, v.102, p. 249-255, 2010.

LIU, Y.; CAO, X. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Cellular & molecular immunology**, v. 12, n. 1, p. 1-4, 2015.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a key event in cancer development. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 4, p. 221-233, 2006.

LUTZ, M. B. et al. Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 7, p. 3574-3580, 2002.

MADEJ-MICHNIEWICZ, A. et al. Evaluation of selected interleukins in patients with different gastric neoplasms: a preliminary report. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

MANNINO, M. H. et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Lett**, v. 367, n. 2, p. 103-7, 2015.

MARKIEWSKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **The American journal of pathology**, v. 171, n. 3, p. 715-727, 2007.

MAZZUCHELLI, R. I. et al. Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice. **PLoS ONE**, 2009.

MIKI, H. Ito, C. Profile of circulating levels of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 in colorectal cancer patients. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 34, n. 11, p. 1139-1143, 1999.

MIZUGUCHI, S. et al. The case of a lung adenocarcinoma producing granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) accompanied by arthritis. **The Japanese Association for Chest Surgery**, v. 19, p. 117-122, 2005.

NIMSE, S. B. et al. Biomarker detection technologies and future directions. **Analyst**, v. 141, n. 3, p. 740-755, 2016.

MOENS, S.; et al. The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis–Implications for therapy responses. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 4, p. 473-482, 2014.

MULTHOFF, G.; MOLLS, M.; RADONS, J. Chronic Inflammation in Cancer Development. **Frontiers in Immunology**. v. 2, n. 98, 2011.

NAGASHIMA, H. et al. Differences in interleukin 8 expression in Helicobacter pylori– infected gastric mucosa tissues from patients in Bhutan and the Dominican Republic. **Human pathology**, v. 46, n. 1, p. 129-136, 2015.

NAMEKATA, T.; MIKI, K. et al. Chronic atrophic gastritis and Helicobacter pylori infection among Japanese Americans in Seattle. **Am J Epidemiol**, v. 151, n. 8, p. 820-30, 2000.

NAUGLER, W. E. et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88- dependent IL-6 production. **Science**. v. 317, p. 121-124, 2007.

NATH, A. et al. Macrophage inflammatory protein (MIP)1 α and MIP1 β differentially regulate release of inflammatory cytokines and generation of tumoricidal monocytes in malignancy. **Cancer Immunology Immunotherapy**. v. 55, p. 1534-1541, 2006.

NELSON, B.H. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. **J Immunol**, v. 172, p. 3983-3988, 2004.

NEVILLE LF, MATHIAK G, BAGASRA O. The immunobiology of interferongamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the CX-C chemokine superfamily. **Cytokine Growth Factor Rev**, 8: 207–219, 1997.

NGUYEN, T. T. et al. An agent-based model of cellular dynamics and circadian variability in human endotoxemia. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 1, Article ID e55550, 2013.

NIMSE, S. B.; SONAWANE, M. D.; SONG, K. S.; KIM, T. Biomarker detection technologies and future directions. **Analyst**, v. 141, n. 3, p. 740-755, 2016.

NODA, N.; WAKASUGI, H. Cancer and oxidative stress. **Japan Medical**

Association Journal, v. 44, n. 12, p. 535-539, 2001.

NOMURA, H. et al. Purification and characterization of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). **The EMBO journal**, v. 5, n. 5, p. 871, 1986.

OHYAUCHI, M. et al. The polymorphism interleukin 8- 251 A/T influences the susceptibility of Helicobacter pylori related gastric diseases in the Japanese population. **Gut**, v. 54, n. 3, p. 330-335, 2005.

ONO, M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. **Cancer science**, v. 99, n. 8, p. 1501-1506, 2008.

PATEL DD., ZACHARIAH JP, WHICHARD LP. CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. **Clin Immunol**, v. 98, p. 39, 2001.

PERRIER, S; DARAKHSHAN, F.; HAJDUCH, E. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? **FEBS Letters**, v. 580. n. 27. p. 6289-6294, nov. 2006.

PODZORSKI, R. P.; PODZORSKI, D.S. et al. Analysis of the vacA, cagA, cagE, iceA, and babA2 genes in Helicobacter pylori from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. **Diagn Microbiol Infect**, 46(2): 83-8, 2003.

PONATH, P. D. et al. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 97. p. 604- 612, 1996

QI, Y. et al. Autophagy inhibition by sustained over-production of IL-6 contributes to arsenic-induced carcinogenesis. **Cancer Research**. v. 74. p. 3740-3752, 2014.

QIN, J. Z. et al. Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression. of the bcl-2 and cmyb genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. **Blood**. v. 98. p. 2778-2783, 2001.

QUEIROZ, D. M.; MENDES, E. N. et al. cagA-positive Helicobacter pylori and risk

- for developing gastric carcinoma in Brazil. **Int J Cancer**, 78(2):135-9,1998.
- RAKOFF-NAHOUM, S. Why cancer and inflammation?. **Yale J Biol Med**, v. 79, n. 3-4, p. 123-30,2006.
- RAZA, Y. et al. Combination of Interleukin 1 Polymorphism and Helicobacter pylori Infection: an Increased Risk of Gastric Cancer in Pakistani Population. **Pathology & Oncology Research**, v. 23, n. 4, p. 873-880, 2017.
- RAZAVI, G. S. E. et al. Emerging role of interleukins in cancer treatment. **Immunome Reserch**, 2015.
- REICHRATH, S. et al. Targeting the non-neuronal cholinergic system in macrophages for the management of infectious diseases and cancer: challenge and promise. **Cell death discovery**, v. 2, p. 16063, 2016.
- REN, Z. et al. Shift of the gastric T-cell response in gastric carcinoma. **Journal Gastroenterology and Hepatology**. v. 16. p. 142-148, 2001.
- REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.
- RICOTE, M. et al. Interleukin-1 (IL-1 α and IL-1 β) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma. **Cancer**, v. 100, n. 7, p. 1388-1396, 2004.
- ROKAVEC, M.; ÖNER, M. G.; HERMEKING, H. Inflammation-induced epigenetic switches in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 23-39, 2016.
- RUDI, J.; KUCK, D. et al. Helicobacter pylori vacA genotypes and cagA gene in a series of 383 H.pylori-positive patients. **Z Gastroenterol**, 38(7):559-64,2000.
- RUSLING, J. et al. Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. **Analyst**, v. 135, n. 10, p. 2496-2511,2010.
- SÁNCHEZ-ZAUCO, N. et al. Circulating blood levels of IL-6, IFN- γ , and IL-10 as potential diagnostic biomarkers in gastric cancer: a controlled study.**BMC Cancer**,

17:384, 2017.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*. v. 10. p. 170-181, 2010.

SANTOS, J. C. et al. Relationship of IL-1 and TNF- α polymorphisms with *Helicobacter pylori* in gastric diseases in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 9, p. 811-817, 2012.

SZKARADKIEWICZ, Andrzej et al. Natural Killer Cell Cytotoxicity and Immunosuppressive Cytokines (IL-10, TGF- β 1) in Patients with Gastric Cancer. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.

SCHELL, J. C. et al. A role for the mitochondrial pyruvate carrier as a repressor of the warburg effect and colon cancer cell growth. **Molecular Cell**. v. 56. p. 400-413, 2014.

SIDDIQUE, I. et al. Association between *Helicobacter pylori* genotypes and severity of chronic gastritis, peptic ulcer disease and gastric mucosal interleukin-8 levels: Evidence from a study in the Middle East. **Gut pathogens**, v. 6, n. 1, p. 41,2014.

SHIBUYA, M. VEGF-VEGFR signals in health and disease. **Biomolecules & therapeutics**, v. 22, n. 1, p. 1, 2014.

SHI, J.; WEI, P-K. Interleukin-8 does not influence proliferation of the SGC7901 gastric cancer cell line. **Oncology letters**, v. 8, n. 6, p. 2475-2480, 2014.

SHI, Y.; ZHOU, Y. E. The role of surgery in the treatment of gastric cancer. **Journal of surgical oncology**, v. 101, n. 8, p. 687-692, 2010.

SHIMAMURA, K. et al. Establishment of specific monoclonal antibodies against recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) and their application for immunoperoxidase staining of paraffin-embedded sections. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 38, n. 2, p. 283-286, 1990.

SIMONS, J. W. et al. Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered

to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. **Cancer Research**. v. 59. p. 5160-5168,1999.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 89, 2010.

SIONOV, R. V.; FRIDLENDER, Z. G.; GRANOT, Z. The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment. **Cancer Microenvironment**, v. 8, n. 3, p. 125-158, 2015.

SMITH, Malcolm G. et al. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 12, n. 19, p. 2979, 2006.

SMITH, H. A.; KANG, Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. **Journal of molecular medicine**, v. 91, n. 4, p. 411-429, 2013.

SOIFFER, R. et al. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 95. p. 13141-13146, 1998.

STOCKWIN, L. *et al.*. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. **Immunology and cell biology**, v. 78, n. 2, p. 91-102,2000.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers?. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463,2010.

SUN, Z.; ZHANG, N. Clinical evaluation of CEA, CA 19-9, CA 72-4 and CA 125 in gastric cancer patients with neoadjuvant chemotherapy. **Word Journal of Surgical Oncology**. v. 12. P. 1-12, 2005.

TACHIBANA, M.i et al. Autocrine growth of transitional cell carcinoma of the bladder induced by granulocyte-colony stimulating factor. **Cancer research**, v. 55, n. 15, p. 3438- 3443, 1995.

TAGUCHI, A. et al. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of

atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 14, n. 11, p. 2487-2493, 2005.

TRIKHA, M. et al. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. **Clinical Cancer Research**. v. 9. p. 4653– 4665, 2003.

TSAI-TURTON, M. et al. p53 autoantibodies, cytokine levels and ovarian carcinogenesis.

Gynecol Oncol. v. 114, n. 1, p. 12-7, 2009.

TSOU, P. et al. The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity. **Cancer Research**, v. 76, n. 19, p. 5597-5601, 2016.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275-292, 2011.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. v. 24. p. 146-154, 2001

VARN, F. S. et al Adaptive immunity programs in breast cancer. **Immunology**, v. 150, n. 1, p. 25-34, 2016.

VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nature immunology**, v. 9, n. 5, p. 503- 510, 2008.

VOLAREVIC, V. et al. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. **Autoimmunity**, v. 43, n. 4, p. 255-263, 2010.

VORONOV, E. et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2645-2650, 2003.

WAHL, S. M.; WONG, H.; MCCARTNEY-FRANCIS, N. Role of growth factors in inflammation and repair. **Journal of cellular biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 193-199, 1989.

- WALDMANN, T. A. The shared and contrasting roles of interleukin-2 (IL-2) and IL-15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy. **Cancer Immunology Research**. v. 3. p. 219-227, 2015.
- WAUGH, D. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**. v. 14. p. 6735-6741, 2008.
- WANG, Z. et al. Activation of STAT3 in human gastric cancer cells via interleukin (IL)-6- type cytokine signaling correlates with clinical implications. **PLoS One**, 2013.
- WU, Y.; ZHOU, B. P. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. **Cell cycle**, v. 8, n. 20, p. 3267-3273, 2009.
- XIE, K. Interleukin-8 and human cancer biology. **Cytokine Growth Factor Rev** p. 375– 391, 2001.
- YAMANO, T. et al. Granulocyte colony-stimulating factor production and rapid progression of gastric cancer after histological change in the tumor. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 37, n. 10, p. 793-796, 2007.
- YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. **Current opinion in cell biology**, v. 17, n. 5, p. 559-564, 2005.
- YAMAOKA, Y. et al. "Relation between cytokines and Helicobacter pylori in gastric cancer," *Helicobacter*, vol. 6, no. 2, pp. 116–124, 2001
- YANG, C. et al. CXCR3A contributes to the invasion and metastasis of gastric cancer cells. **Oncology Reports**, v. 36. p. 1686-1692, 2016.
- YE, P. et al. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 25. n. 3. p. 335-40, 2001
- YIN, Y. et al. The nuclear factor- κ B correlates with increased expression of interleukin-6 and promotes progression of gastric carcinoma. **Oncol. Rep.**, p. 34–38, 2013.

YOSHINAGA, Y. et al. Granulocyte-colony-stimulating factor-producing gastric metastasis from large cell type lung cancer. **Clinical journal of gastroenterology**, v. 4, n. 1, p. 10-14, 2011.

YU, H.; PARDOLL, D.; JOVE, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 11, p. 798-809, 2009.

YU, J. et al. Dysfunctional activation of neurotensin/IL-8 pathway In hepatocellular carcinoma is associated with increased inflammatory. **Plos One**,v. 8, 2013.

YUAN, A. et al. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Frontiers Bioscience*. v. 10. p. 853-865,2005.

ZAJAC, E. et al.. Angiogenic capacity of M1-and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9. **Blood**, v. 122, n. 25, p. 4054-4067,2013.

ZHANG, Z.et al. Potential Biomarkers in Diagnosis of Human Gastric Cancer. **Cancer investigation**, v. 34, n. 3, p. 115-122, 2016.

ZHONG, F. et al. IL-17A-producing T cells and associated cytokines are involved in the progression of gastric cancer. **Oncology Reports**, p. 2365-2374, 2015.

ZUO, C.; JU, Q. Na analysis on clinical characteristics and prognosis of patients with serum alpha-fetoprotein-positive gastric câncer. **Minerva Medica**. 2015.

ANEXO I



**Termo de consentimento livre e esclarecido
PAINEL DE BIOMARCADORES NO SORO DE PACIENTES COM
CÂNCER GÁSTRICO
As seguintes informações estão sendo fornecidas para sua participação
voluntária neste projeto.**

O Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará está desenvolvendo uma pesquisa, por meio da quantificação de proteínas no soro associadas ao quadro clínico do paciente, que permitirá auxiliar no diagnóstico precoce, na avaliação de resposta terapêutica, na detecção de recidivas e no prognóstico, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento.

Serão coletadas 5 ml de sangue periférico de pacientes submetidos a gastrectomia antes e após (7 dias, 30 dias e 90 dias) a cirurgia utilizando material estéril e descartável. A obtenção de sangue periférico para pesquisa não implicará riscos adicionais no tratamento ou na cirurgia. As amostras coletadas serão utilizadas para a quantificação de proteínas e esgotadas com o seu uso.

Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que a expressão diferente de proteínas pode auxiliar no diagnóstico e prognóstico do câncer gástrico. Somente no final do estudo poderemos identificar a presença de algum benefício.

Em qualquer etapa do estudo, os participantes do estudo ou seus responsáveis terão acesso aos profissionais relacionados com a pesquisa para o esclarecimento de dúvidas. Os principais investigadores são Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno, Prof. Dr. Paulo Assumpção e Prof. Dr. Rommel Burbano, que podem ser encontrados no Núcleo de Pesquisas em Oncologia, 2º Piso da UNACON. Av. Mundurucus, 4487, Guamá, Belém-PA, CEP: 66073-000, telefone (91) 3201-6776, e-mail: danicalcagno@gmail.com, assumpcaopp@gmail.com rommel@ufpa.br.

É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. O material biológico será identificado no laboratório por um código numérico preservando sua privacidade. O material será utilizado somente para este estudo, e os resultados obtidos estarão a disposição dos doadores. A

eventual inclusão dos resultados em uma publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do participante.

Não há despesas pessoais para cada participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consulta.

Na eventualidade de qualquer dano pessoal causado direta ou indiretamente após procedimentos propostos neste estudo (anexo causal comprovado), o participante terá direito a tratamento médico na instituição, bem como indenizações estabelecidas.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo um estudo “PAINEL DE BIOMARCADORES NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO”.

Eudiscuticom_____sobre a minha decisão de participar do estudo. Ficaram claros para mim claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o processo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa teradquirido.

Data:_____/_____/_____

Nome doparticipante:_____

Assinatura do participante ou responsávellegal:_____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo:_____



Termo de consentimento livre e esclarecido
PAINEL DE BIOMARCADORES NO SORO DE PACIENTES COM
CÂNCER GÁSTRICO
As seguintes informações estão sendo fornecidas para sua participação
voluntária neste projeto.

O Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará está desenvolvendo uma pesquisa, por meio da quantificação de proteínas no soro associadas ao quadro clínico do paciente, que permitirá auxiliar no diagnóstico precoce, na avaliação de resposta terapêutica, na detecção de recidivas e no prognóstico, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento.

Serão coletadas 5 ml de sangue periférico de voluntários saudáveis sem histórico de neoplasias utilizando material estéril e descartável. A obtenção de sangue periférico para pesquisa não implicará riscos à saúde desses voluntários. As amostras coletadas serão utilizadas para a quantificação de proteínas e esgotadas com o seu uso.

Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que a expressão diferente de proteínas pode auxiliar no diagnóstico e prognóstico do câncer gástrico. Somente no final do estudo poderemos identificar a presença de algum benefício.

Em qualquer etapa do estudo, os participantes do estudo ou seus responsáveis terão acesso aos profissionais relacionados com a pesquisa para o esclarecimento de dúvidas. Os principais investigadores são Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno, Prof. Dr. Paulo Assumpção e Prof. Dr. Rommel Burbano, que podem ser encontrados no Núcleo de Pesquisas em Oncologia, 2º Piso da UNACON. Av. Mundurucus, 4487, Guamá, Belém-PA, CEP: 66073-000, telefone (91) 3201-6776, e-mail: danicalcagno@gmail.com, assumpcaopp@gmail.com rommel@ufpa.br.

É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na instituição. As informações obtidas serão analisadas, não sendo divulgada a identificação de nenhum voluntário participante da pesquisa. O material biológico será identificado no laboratório por um código numérico preservando sua privacidade. O material será utilizado somente para este estudo, e os resultados obtidos estarão a disposição dos doadores. A eventual inclusão dos resultados em uma publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do participante.

Não há despesas pessoais para cada participante em qualquer fase do estudo, incluindo

exames e consulta.

Na eventualidade de qualquer dano pessoal causado direta ou indiretamente após procedimentos propostos neste estudo (anexo causal comprovado), o participante terá direito a tratamento médico na instituição, bem como indenizações estabelecidas.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo um estudo “PAINEL DE BIOMARCADORES NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO”.

Eudiscuto com _____ sobre a minha decisão de participar do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o processo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

Data: ____/____/____

Nome do participante: _____

Assinatura do participante ou responsável legal: _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo: _____

ANEXO II

Registro do NPO: _____



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Pesquisa em Oncologia

Painel de biomarcadores no soro de pacientes com câncer gástrico

PRONTUARIO

Nome do Paciente: _____

Telefone para Contato: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Gênero: Masculino Feminino

Tipo Sanguíneo: TipoA Negativo

TipoB Positivo

TipoAB

TipoO

Anemia: Positivo Negativo

Valor de Hb: _____

Lesão Precursora: Gastrite *H. pylori*

Úlcera

Metaplasia

Pólipos

Peso: _____ Altura: _____

PACIENTE

Estado Civil: Solteiro Casado Separado/Divorciado Viúvo

Ocupação: _____

Naturalidade: Cidade: _____ Estado: _____

Endereço atual: Cidade: _____ Estado: _____

Etnia: Amarelo Branco Pardo Negro

Tabagismo: Sim Parou Nunca fumou

Frequência (cigarros/dia): _____

Há quanto tempo parou de fumar? _____

Obesidade: Sim Não

Consumo de bebidas alcoólicas: Sim Não Raramente Nunca usou

Qual? _____

Frequência (doses/semana) _____

Consumo de alimentos/bebidas quentes: Sim Não

Frequência (vezes/semana): _____

Consumo de frutas e/ou suco de frutas: Sim Não

Frequência (unidades/semana): _____

Consumo de legumes e verduras: Sim Não

Frequência (porções/semana): _____

Consumo de carne e/ou ovo: Sim Não

Frequência (vezes/semana): _____

Consumo de frituras e gorduras: Sim Não

Frequência (vezes/semana): _____

Consumo de temperos industrializados e embutidos: Sim Não

Frequência (vezes/semana): _____

Consumo de refrigerantes e sucos industrializados: Sim Não

Frequência (vezes/semana): _____

Acréscimo de sal na refeição pronta: Sim Não Raramente

Medicamentos (uso regular): _____

Há quantos anos: _____

Presença de outros tipos de câncer: Positivo Negativo

Qual? _____

Quando? _____

Histórico de câncer na família: Positivo Negativo

Qual o câncer? _____

Grau de parentesco: _____

Heredograma:

Responsável: _____

Data: ____/____/____