



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO- UFPE  
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI- LIKA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE-PPGBAS

**IMPACTO DA INTERLEUCINA-33 COMO FATOR PROGNÓSTICO NO CÂNCER  
GÁSTRICO**

RECIFE, 2017

**ILAN ANDRADE PEDROSA**

**IMPACTO DA INTERLEUCINA-33 COMO FATOR PROGNÓSTICO NO  
CÂNCER GÁSTRICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

**Orientador:**

**Prof. Dr José Luiz de Lima Filho**

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA/UFPE  
Departamento de Bioquímica - UFPE

**Coorientador:**

**Prof. Dr Fabrício Oliveira Souto**

Núcleo de Ciências da Vida – NCV/CAA/UFPE  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Recife, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Pedrosa, Ilan Andrade**

**Impacto da interleucina-33 como fator prognóstico no câncer gástrico / Ilan Andrade Pedrosa- Recife: O Autor, 2017.**

**48 folhas: il., fig., tab.**

**Orientador: José Luiz de Lima Filho**

**Coorientador: Fabrício Oliveira Souto**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2017.**

**Inclui referências e anexos**

**1. Cancer 2. Interleucinas 3. Prognóstico I. Lima Filho, José Luiz de (orientador) II. Souto, Fabrício Oliveira (coorientador) III. Título**

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-259

**ILAN ANDRADE PEDROSA**

**IMPACTO DA INTERLEUCINA-33 COMO FATOR PROGNÓSTICO NO  
CÂNCER GÁSTRICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador:  
Prof. Dr José Luiz de Lima Filho

Coorientador:  
Prof. Dr Fabricio Oliveira Souto

Aprovada em: 10/03/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho/UFPE

---

Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins/UFPE

---

Prof. Dr. José Luiz Figueiredo/UFPE

*Às pessoas mais importantes  
da minha vida:  
meu pai, Wilson  
minha mãe, Fátima  
minhas irmãs, Iana e Ivna  
minha esposa, Rafaella  
e minha filha Bianca*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que me ensinaram os valores da humildade e perseverança para a realização de um sonho e que mesmo distantes, se fizeram presentes e vibraram em cada uma de minhas conquistas.

Às minhas irmãs, que me dão suporte incondicional em cada passo que dou em meu crescimento profissional.

À minha amada esposa que sempre me apoiou e me deu forças com palavras de incentivo e carinho, e muita compreensão, nos momentos mais difíceis dessa trajetória, mesmo estando em seu período mais sensível, a gestação!

À minha filha Bianca, que esperou a conclusão desse projeto para vir ao mundo e me encher de um amor indescritível.

À minha família pernambucana que torceu e acompanhou de perto essa conquista.

Ao meu orientador, o Professor José Luiz de Lima Filho por acreditar no meu projeto e ter conseguido tirar o melhor de mim na construção desse trabalho.

Ao meu coorientador, Fabricio Souto, que sempre esteve sereno e disponível para me ajudar e me tranquilizar. Por ter realizado todo o trabalho de processamento de amostras no laboratório e por ter participado intensamente no processo da escrita desse projeto.

Aos colegas mestrando do PPGBAS que dividiram angustias e felicidades nesses dois anos de luta.

Aos pacientes que permitiram que esse projeto fosse realizado com sucesso.

## Resumo

O câncer gástrico (CG) é a quinta neoplasia maligna mais comum e a segunda causa mais frequente de mortes relacionadas ao câncer. O desenvolvimento tumoral é relacionado a mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, e células do sistema imunológico. A interleucina-33 (IL-33), através do receptor ST2, vem sendo estudada no contexto tumoral e correlaciona com um pior prognóstico. No entanto, a presença e contribuição da IL-33, bem como de células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2), induzidas por esta citocina, no microambiente tumoral é ainda incerto. Além disso, a expressão desta interleucina em relação com desenvolvimento e progressão do CG não foi intensamente explorada. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença/contribuição da citocina IL-33 e sua relação com prognóstico do CG e aspectos clínicos. Avaliando a expressão relativa do RNA mensageiro (RNAm) da IL-33, tanto no sangue como no tecido tumoral de pacientes com CG, observamos um aumento da IL-33 de maneira dependente do estadiamento. Observando a expressão do RNAm para marcadores das ILC2 (ST2 e GATA-3) no tecido tumoral, encontramos os mesmos elevados no maior estadiamento do CG. Interessantemente, em uma avaliação retrospectiva, utilizando amostras parafinadas de pacientes com CG, deparamos com expressões aumentadas do RNAm da IL-33 e dos marcadores das ILC2, ROR- $\alpha$ , GATA-3 e IL-13, nos tecidos tumorais quando comparados aos tecidos adjacentes (controle). Em conclusão, os resultados do nosso trabalho sugerem que a presença da IL-33, assim como as células ILC2, podem participar do microambiente tumoral no CG. Ainda, o nível desta interleucina foi associada com o pior prognóstico nesta doença, o que aponta para um possível papel de predição de gravidade no CG. A continuação deste trabalho ou mais pesquisas com esta temática poderão demonstrar, de fato, a contribuição da IL-33 no desenvolvimento do CG.

**Palavras-chave:** Câncer gástrico, Imunidade Tumoral, IL-33, ILC2

## Abstract

Gastric cancer (GC) is the fifth most common malignant neoplasm and the second most frequent cause of cancer-related deaths. Tumor development is related to inflammatory mediators, including cytokines, and immune system cells. Interleukin-33 (IL-33), through the ST2 receptor, has been studied in the tumor context and correlates with a worse prognosis. However, the presence and contribution of IL-33 as well as type 2 innate lymphoid cells (ILC-2) induced by this cytokine in the tumor microenvironment is still uncertain. Furthermore, the expression of this interleukin in relation to development and progression of GC was not intensively explored. Therefore, our objective was to evaluate the presence / contribution of IL-33 and its relation with GC prognosis and clinical aspects. Evaluating the relative expression of IL-33 messenger RNA (mRNA) in blood and tumor tissue of GC patients, we observed an increase in IL-33 in stage-dependent manner. Observing the mRNA expression for ILC2 markers (ST2 and GATA-3) in the tumor tissue, we found elevation of these markers in stage II and III of GC. Interestingly, in a retrospective evaluation using paraffined samples from GC patients, we found increased expression of IL-33 mRNA and ILC2 markers, such as ROR- $\alpha$ , GATA-3 and IL-13, in tumor tissues when compared to Adjacent tissues (control). In conclusion, although the data did not reach statistical significance, the results of our work suggest that the presence of IL-33, as well as ILC2 cells, can participate in the tumor microenvironment in GC. Furthermore, the level of this interleukin was associated with the worst prognosis in this disease, which points to a possible role of gravity prediction in GC. The continuation of this work or more researches with this thematic will be able to demonstrate, in fact, the contribution of the IL-33 in the GC development.

**Keywords:** Gastric cancer, Tumoral immunity, IL-33, ILC2

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Progressão maligna do adenocarcinoma tipo intestinal e difuso com as alterações genéticas e epigenéticas associada. _____	17
<b>Figura 2:</b> Representação da resposta inflamatória no crescimento tumoral. _____	20
<b>Figura 3:</b> Fatores do microambiente tumoral levando a disfunção de células T. _____	22
<b>Figura 4:</b> Expressão relativa de mRNA da IL-33 no sangue de pacientes com câncer gástrico. _____	30
<b>Figura 5:</b> Expressão relativa do RNAm da IL-33 nos tecidos tumorais de pacientes com câncer gástrico. _____	31
<b>Figura 6:</b> Expressão relativa do RNAm do ST2 nos tecidos tumorais de pacientes com câncer gástrico. _____	32
<b>Figura 7:</b> Expressão relativa do RNAm do GATA-3 nos tecidos tumorais de pacientes com câncer gástrico. _____	33
<b>Figura 8:</b> Expressão relativa do RNAm da IL-33 em amostras parafinadas de pacientes com câncer gástrico. _____	34
<b>Figura 9:</b> Expressão relativa do fator de transcrição GATA-3 em amostras parafinadas de pacientes com câncer gástrico. _____	35
<b>Figura 10:</b> Expressão relativa do fator de transcrição ROR- $\alpha$ em amostras parafinadas de pacientes com câncer gástrico. _____	36
<b>Figura 11:</b> Expressão relativa do RNAm da IL-13 em pacientes com câncer gástrico. ____	37

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Sequência dos oligonucleotídeos primers utilizados nas reações de qPCR. \_\_\_\_28

## LISTA DE ABREVIACOES/SIGLAS

<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>APC</b>	<i>Antigen presenting cell</i> (célula apresentadora de antgeno)
<b>Arg-1</b>	Arginase – 1
<b>CG</b>	Cncer gástrico
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (cido desoxirribonucleico)
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal–regulated kinase</i>
<b>HC-UFPE</b>	Hospital das Clnicas da Universidade Federal de Pernambuco
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ILC</b>	<i>Innate lymphoid cell</i> (clula linfides inata)
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Cncer
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>kDa</b>	Quilo-Dalton
<b>LIKA</b>	Laboratrio de Imunopatologia Keizo Asami
<b>LTi</b>	Clula indutora do tecido linfide
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MDSC</b>	Clula supressora derivada-mielide
<b>MNU</b>	N-metil-nitrosourea
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>OMS</b>	Organizao Mundial de Sade
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reao em cadeia da polimerase)
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-derived growth factor</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> (cido ribonuclico)
<b>RNAm</b>	<i>Messenger Ribonucleic acid</i> (cido ribonuclico mensageiro)
<b>ROR-<math>\alpha</math></b>	<i>Related orphan receptor alpha</i>

<b>TAM</b>	<i>Tumor-associated macrophages</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i> (Fator transformador de crescimento)
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> (Fator de necrose tumoral)
<b>Treg</b>	Célula T regulatória
<b>TTP</b>	Tristetrapolin
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
2.1 CÂNCER GÁSTRICO: EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA .....	15
2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL E CARCINOGENESE GÁSTRICA.....	16
2.3 IMUNOLOGIA NO CÂNCER .....	19
2.4 INTERLEUCINA-33 (IL-33).....	23
2.5 CÉLULAS LINFÓIDES INATA DO TIPO 2 (ILC2) .....	26
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS .....	28
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	28
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	28
4.4 EXTRAÇÃO DE RNA DO SANGUE E AMOSTRAS FRESCAS.....	28
4.5 EXTRAÇÃO DE RNA DE BLOCOS DE PARAFINA .....	29
4.6 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (Q-PCR).....	29
4.7 ANÁLISE DOS DADOS E ESTATÍSTICA .....	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), já é responsável por mais mortes do que as doenças cardiovasculares. Apresentou aproximadamente 14 milhões de novos casos em 2012. Dentre os tumores, o câncer gástrico teve quase um milhão de novos casos no mesmo ano, tornando-o a quinta neoplasia mais frequente no mundo e o segundo em mortalidade (FERLAY et al., 2015). No Brasil, a estimativa do INCA para 2016 foram mais de 20.000 novos casos de câncer gástrico (INCA, 2016).

A carcinogênese gástrica é um processo multifatorial e com múltiplas etapas de desenvolvimento. O subtipo histológico intestinal está relacionado com fatores ambientais como infecção por *Helicobacter pylori* (*H.pylori*), dieta e estilo de vida; e o subtipo difuso relaciona-se com anormalidades genéticas (HU et al., 2012).

No modelo atual da oncogênese, o câncer surge a partir de células que sofrem uma sequência de mutações ou alterações genéticas. Tais alterações podem ser resultado de uma variedade de fatores intrínsecos, como mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA. Em 2011, Hanahan e Weinberg revisaram dez alterações fundamentais na fisiologia celular, propostas inicialmente em 2000, que permitiriam a transformação de uma célula normal em cancerígena: autossuficiência em sinais de proliferação, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, desregulação energética celular, evasão do sistema imune, instabilidade genômica e mutação, inflamação, invasão tecidual e metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2011; CHAMMAS, 2010). Em 2010, Chammas e colaboradores descreveram que os tumores são reconhecidos como órgãos cuja sua complexidade só pode ser entendida através do reconhecimento da relação entre células normais do tecido e do sistema imune com as cancerígenas. Tal relação celular cria o que se define como “microambiente tumoral” (CHAMMAS, 2010).

Muitas citocinas, como as pró-inflamatórias IL-6 e IL-18 estão super-expressas no sangue durante o câncer e no tecido tumoral. A elevação dessas citocinas, dentre outras, estão associadas a um pior prognóstico (SUN et al., 2011), já que estudos mostram a relação de processos inflamatórios crônicos favorecem o processo de carcinogênese (BITOUX & STAMENKOVIC, 2008). Determinadas citocinas ainda não apresentam, até o momento, um papel elucidado no controle do câncer ou no surgimento/manutenção tumoral. A interleucina-33 (IL-33) é uma citocina que dependendo do contexto patológico pode atuar de forma pró-inflamatória ou anti-inflamatória (MILLER, 2011). Pertence à família da IL-1 e sua atividade

biológica está relacionada a ligação com seu receptor ST2 presente na superfície celular de linfócitos T e de demais células do organismo e do sistema imunológico (YU et al., 2015). Embora a função da IL-33 no câncer não seja muito clara, dados da literatura demonstram que o nível sérico elevado desta interleucina tem sido evidenciado em muitos tipos de cânceres, incluindo câncer da mama, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer gástrico e a sua super-expressão está intimamente associada à progressão tumoral e à metástase (WASMER & KREBS, 2017).

Dados da literatura demonstraram que pacientes com câncer gástrico apresentam um fenótipo imunológico Th2 e, embora não totalmente explorado observaram que a presença de ILC2 está aumentada no sangue de pacientes com esta neoplasia (BIE et al., 2014; YANG et al., 2010). A atividade das ILC2 está relacionada com a ligação de IL-33 em seus receptores de superfície ST2, gerando liberação de IL-13 e consequente mobilização celular que favorece um ambiente pró-tumoral (BIE et al., 2014; VAN BEEK, MARTENS, BAKDASH, & DE VRIES, 2016).

Diante disto, o objetivo do trabalho foi avaliar a expressão da IL-33 e o perfil imune relacionado a essa citocina em pacientes ocidentais, no nordeste brasileiro, com câncer gástrico e buscar correlação com o estadiamento clínico desta doença.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 CÂNCER GÁSTRICO: EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA**

O câncer gástrico é a quinta neoplasia mais frequente no mundo, sendo a segunda em mortalidade por causas neoplásicas. No Brasil, corresponde ao quinto câncer mais frequente no sexo feminino, correspondendo a 3,7% dos casos e o quarto no sexo masculino, correspondendo a 6,0%. A frequência na população é baixa aos 40 anos e aumenta progressivamente com a idade, até atingir seu valor mais elevado após os 70 anos (FERLAY et al., 2015; CARVALHO, TEIXEIRA, NETO, & PAULISTA, 2007; INCA, 2016).

As estatísticas mundiais mostram distinta variação geográfica, sendo os países asiáticos, os com maior incidência, principalmente China e Japão. Nos países ocidentais há uma menor incidência com tendência a declínio dos casos nos países desenvolvidos. O prognóstico do câncer gástrico avançado é extremamente pobre, com taxas de sobrevivência de 5 anos entre 5% a 15% (CARVALHO et al., 2007). No Brasil, a Região Norte e Nordeste

correspondem as regiões com maior incidência, sendo a segunda neoplasia mais frequente e na Região Sul e Sudeste, a quarta (INCA, 2016).

Dentre os fatores de risco, pode-se distinguir os fatores ambientais como: infecção pelo *Helicobacter pylori*, dieta rica em sal, compostos N-nitrosos (embutidos) e malconservadas, consumo de álcool, tabagismo e obesidade; e os fatores genéticos como: polipose adenomatosa familiar, câncer gástrico difuso hereditário, síndrome de Lynch e síndrome de Li-Fraumeni (PATEL, ROY, & RAVI, 2017).

Histologicamente, o carcinoma gástrico demonstra grande heterogeneidade citológica. A classificação dos carcinomas tem sido baseada em critérios de Lauren, onde os subtipos intestinais (54%) e difusos (32%) de adenocarcinoma são os mais frequentes (HU et al., 2012).

## 2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL E CARCINOGENESE GÁSTRICA

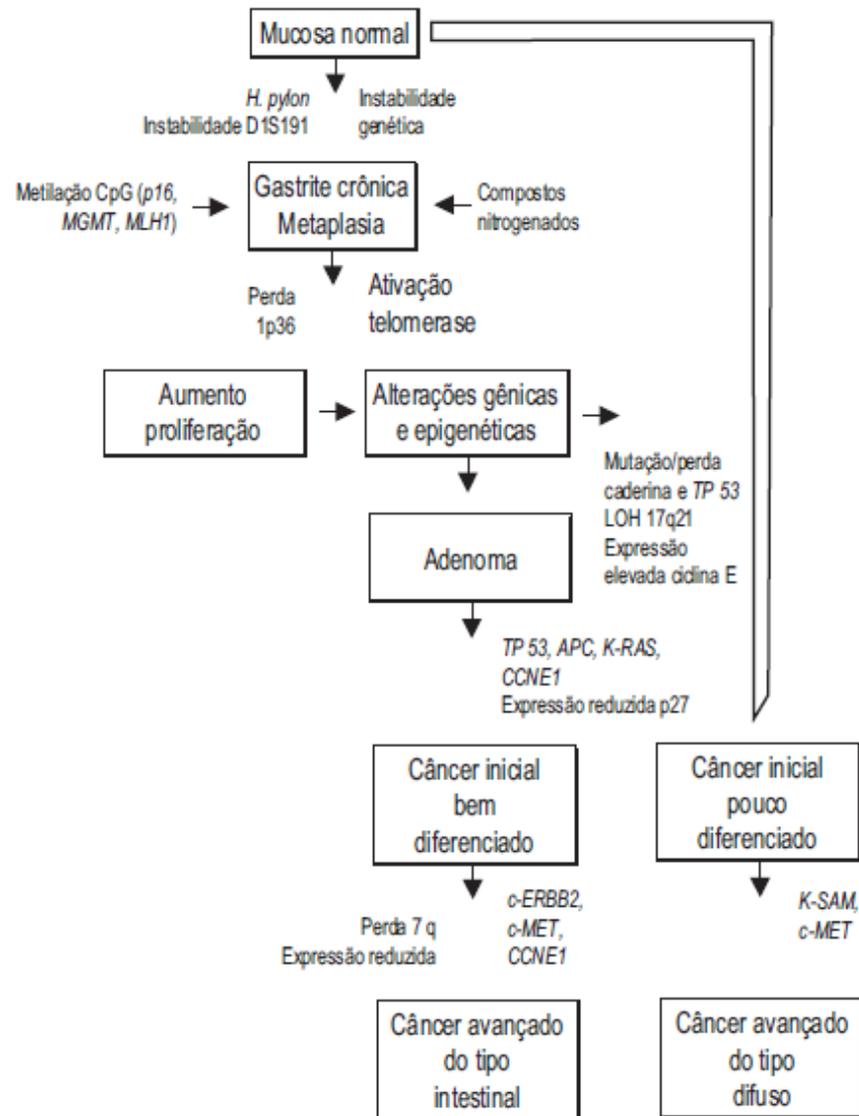
É cada vez mais evidente que o microambiente tumoral desempenha um papel determinante no desenvolvimento do câncer. As células do tecido hospedeiro, incluindo fibroblastos e outros componentes do estroma celular não são passivos no crescimento e invasão tumoral, mas são participantes ativos na promoção do desenvolvimento neoplásico. Na verdade, o crescimento tumoral depende, em grande parte, da relação entre células tumorais e estromais, incluindo, entre outros, macrófagos, mastócitos, adipócitos e fibroblastos (BITOUX & STAMENKOVIC, 2008). Este microambiente é composto também por células do sistema imunológico, células endoteliais, pericitos, fibroblastos e células musculares lisas. (WASMER & KREBS, 2017). As interações destas células podem gerar ações importantes para a manutenção do tumor. Por outro lado, alterações na anatomia vascular tumoral e dos componentes da matriz extracelular podem dificultar o acesso de células do sistema imune ao tumor (TURLEY, CREMASCO, & ASTARITA, 2015).

Na clássica revisão de Hanahan e Weinberg feita em 2000 e revisada em 2011, foram descritas alterações fundamentais das células neoplásicas para que fosse possível manter o crescimento neoplásico a despeito dos mecanismos de defesa do organismo hospedeiro (HANAHAN & WEINBERG, 2011; TURLEY et al., 2015). Em tal revisão foram descritas oito alterações fundamentais, como auto-suficiência em sinais de proliferação, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, evasão do apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, desregulação energética celular, evasão da destruição pelo sistema imune, invasão tecidual e metástase e duas alterações facilitadoras do processo, como

instabilidade genômica e mutação e inflamação tumoral (HANAHAN & WEINBERG, 2011; CHAMMAS, 2010).

Como todo processo de malignização celular, a carcinogênese gástrica ocorre através de processos com múltiplas etapas, podendo iniciar-se com o mais variado estímulo desencadeante (dieta, tabagismo, mutações e infecção pelo *H. pylori*). Estas etapas se manifestam clinicamente e sequencialmente, como gastrite, atrofia gástrica, ulcerações, metaplasia intestinal, displasia e neoplasia maligna. Esse processo é o mais frequente no desenvolvimento do câncer gástrico representado pelo subtipo histológico intestinal de Lauren. Já o subtipo difuso pode desenvolver-se sem que ocorra algumas etapas deste processo (CARVALHO et al., 2007).

**Figura 1:** Progressão maligna do adenocarcinoma tipo intestinal e difuso com as alterações genéticas e epigenéticas associada.



**Fonte:** (Tahara, 1998 e Yasui et al, 2001)

A infecção pelo *Helicobacter pylori* é reconhecida como uma das principais causas de câncer gástrico, mesmo sabendo que a simples infecção não resultará em um processo de carcinogênese, já que apenas 1-2% dos infectados desencadeará todo o processo. A produção de uréase, proteases e fosfolipases pelo *H. pylori*, promove degradação de glicoproteínas presentes na mucosa gástrica, danificando suas células e causando gastrite crônica e consequente instabilidade genética. O processo de instabilidade gênica acaba gerando alterações gênicas como a perda da heterozigose do gene de reparo DNA *hMSH2* e dos genes supressores de tumor *APC* e *TP53* assim como a amplificação de genes como o *cERBB2*, *c-*

*MET*, *ciclina E* e *K-SAM*; e perda da função da glicoproteína caderina. Tais genes citados codificam receptores de fatores de crescimento (*cERBB2*, *c-MET* e *K-SAM*), proteínas de regulação do ciclo celular (*TP53* e *APC*) e proteínas de adesão (caderinas) (CARVALHO et al., 2007). Dias Jácome e colaboradores demonstraram que a infecção pelo *H.pylori* isolada não é suficiente para desencadear todo o processo de carcinogênese, sendo apenas o primeiro passo. O ambiente de inflamação crônica e a acloridria (diminuição da produção de ácido clorídrico) favorece a ação de outras bactérias da microbiota gástrica que dá continuidade ao processo até o surgimento da neoplasia maligna (DIAS-JÁCOME, LIBÂNIO, BORGES-CANHA, GALAGHAR, & PIMENTEL-NUNES, 2016). Em 2016, um estudo japonês mostrou que mesmo após a erradicação do *H. pylori* em pacientes com atrofia gástrica, o risco de desenvolvimento de câncer gástrico é mantido, sugerindo outros fatores que possam perpetuar o processo de carcinogênese (TAHARA et al., 2016). Outro estudo, desta vez experimental com camundongos, evidenciou que uma outra espécie do gênero *Helicobacter*, o *Helicobacter felis*, quando exposto a nitrosamina N-metil-nitrosourea (MNU), é mais carcinogênico que o *H.pylori*, mostrando mais uma possibilidade de surgimento do câncer gástrico após erradicação do *H. pylori* (LEE, KIM, & LEE, 2016).

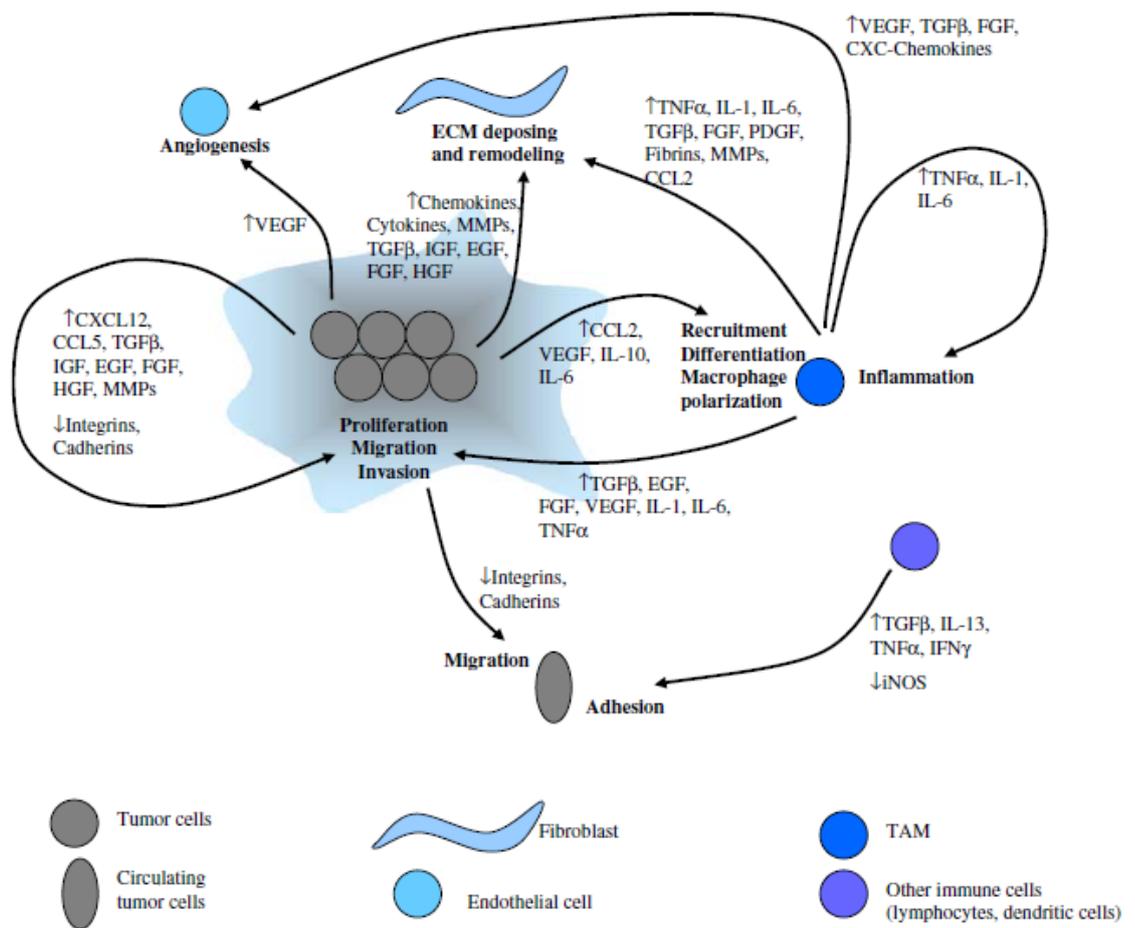
### 2.3 IMUNOLOGIA NO CÂNCER

Como descrito anteriormente, Hanahan e Weinberg descreveram oito características fundamentais e duas facilitadoras para a malignização de uma célula. Dentre elas estão, a capacidade de evasão do sistema imune e a promoção de inflamação (HANAHAN & WEINBERG, 2011). A imunidade inata é a responsável por iniciar a resposta antitumoral através das células imunes residentes, como os macrófagos, no tecido afetado. Os macrófagos são estimulados a produzir citocinas pró-inflamatórias que atrairão células *natural killer* (NK) e posteriormente, as células dendríticas que processarão antígenos tumorais para serem apresentadas às células T “naive” nos linfonodos, resultando na produção de citocinas, proliferação de linfócitos T citotóxicos e auxiliares que iniciarão uma resposta imune específica (VAN BEEK et al., 2016).

A inflamação é um processo fisiológico onde células do sistema imunológico, e as citocinas produzidas por elas, são direcionadas para combater e controlar um trauma tecidual causado por bactérias, fungos, vírus ou células neoplásicas. Quando o processo de agressão é controlado, as células imunes voltam ao seu estado normal, cessando o processo inflamatório e iniciando o de reparo tecidual, porém, em situação de doenças inflamatórias crônicas e

neoplasias, este processo é perpetuado. Os mastócitos e macrófagos são responsáveis pelo início da atividade inflamatória através da ação de interleucina-1(IL-1), TNF- $\alpha$  e IL-6 que atuarão nas células endoteliais e consequente mobilização e ativação de monócitos, neutrófilos e linfócitos que produzirão outras citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, INF- $\gamma$ , CCL2, CCL20 e outros) e fatores de crescimento (VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ ) (BITOUX & STAMENKOVIC, 2008). Nas neoplasias, esse contexto inflamatório gera um efeito paradoxal, onde a relação das células imune e suas citocinas com o estroma tecidual e a célula neoplásica favorece o crescimento tumoral (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Os sinais de proliferação celular sustentado, ação de fatores de crescimento celular, fatores pró-angiogênicos e produção de enzimas de matriz modificadas, produzidas no processo inflamatório, facilitarão angiogênese, invasão e metástases (BITOUX & STAMENKOVIC, 2008; HANAHAN & WEINBERG, 2011). A importância da inflamação dentro do processo de carcinogênese é claramente visto em infecções por *H.pylori*, vírus da hepatite B e C, papiloma vírus, citomegalovírus e Epstein-Barr, onde há uma associação com o desenvolvimento de câncer gástrico, hepatocarcinoma, câncer de colo de útero e neoplasias hematológicas respectivamente. Podemos citar também, a colite crônica ulcerativa e hepatite crônica como causas de câncer colorretal e hepatocarcinoma (CHAMMAS, 2010; TURLEY et al., 2015; WASMER & KREBS, 2017).

**Figura 2: Representação da resposta inflamatória no crescimento tumoral.** Após romper a membrana basal e invadir o estroma do hospedeiro, a célula cancerígena causa uma reação do estroma, gerando uma resposta celular de macrófagos, mastócitos e fibroblastos. Estas células produzem inúmeras citocinas, fatores de crescimento e enzimas que causarão alterações na matriz extra-celular (ECM), através do depósito de proteínas e proteoglicanos, e angiogênese.



**Fonte:** Adaptado de *Histochem Cell Biol* (2008) 130:1079–1090

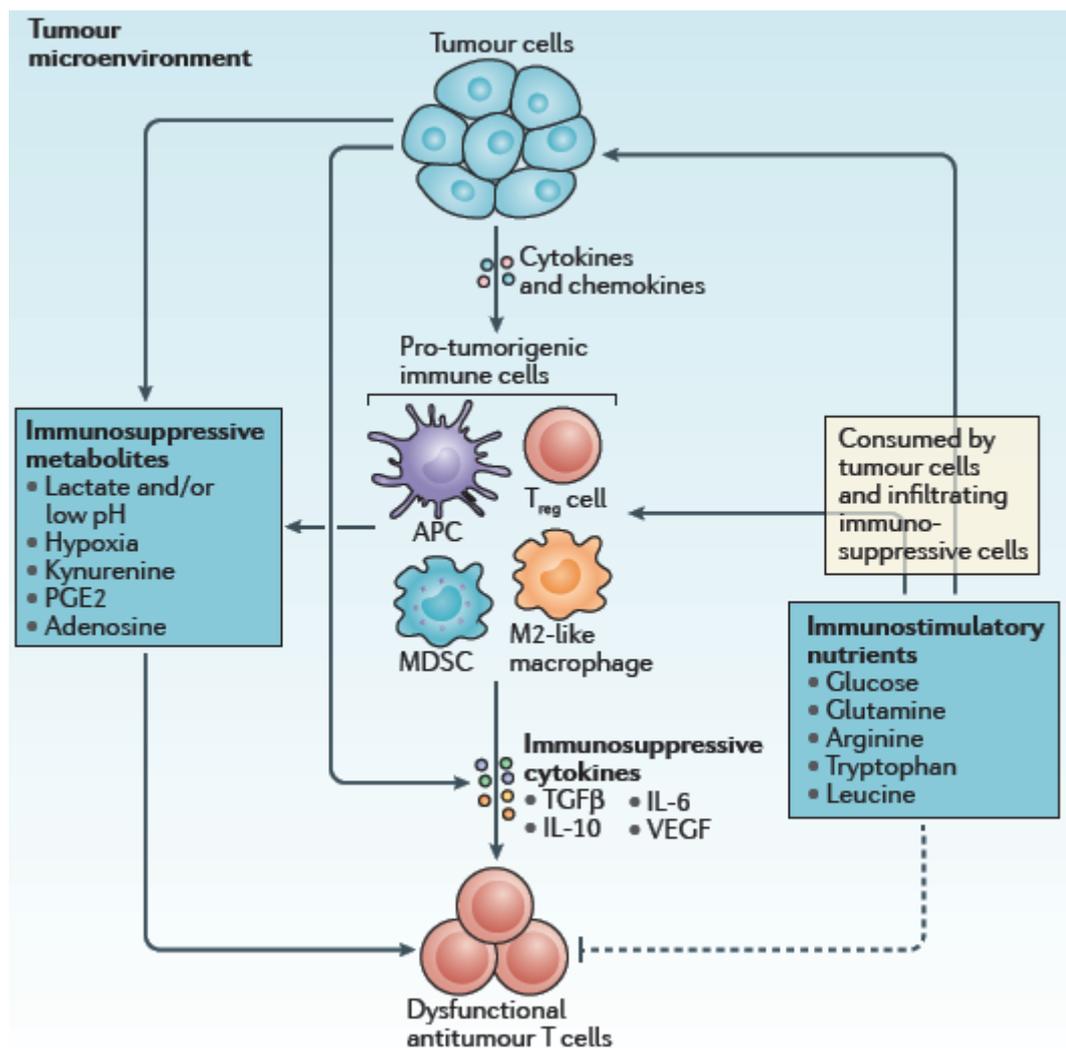
Em 1970, foi proposto que o sistema imune realiza uma vigilância imunológica permanente, impedindo que células neoplásicas se desenvolvam (MALE, BRASTOFF, ROTH, & ROITT, 2013). Essa teoria persistiu por décadas como uma das explicações para o surgimento de neoplasias, ou seja, o surgimento de cânceres relacionava-se com uma falha do sistema imune. Isso explicava os casos de câncer em organismos imunocomprometidos, porém não deixava claro o surgimento em organismos imunocompetentes. Estudos em camundongos mostram que o sistema imune é uma barreira importante, e não exclusiva, no

surgimento de neoplasias. Camundongos imunoincompetentes em determinadas linhagens de células imunológicas desenvolvem câncer mais frequentemente e com maior velocidade de crescimento celular que os imunocompetentes. Particularmente, a deficiência de desenvolvimento ou função de linfócitos T citotóxicos CD8+, linfócitos T helper Th1 CD4+ ou células NK tornam organismos mais suscetíveis ao surgimento de câncer (DUNN, OLD, & SCHREIBER, 2004; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Nos organismos imunocompetentes pode ocorrer um evento conhecido como imunoedição, como descrito por Dunn e Schreiber em 2004, das células cancerígenas. A imunoedição compreende três fases: eliminação, equilíbrio e escape. Nesse processo, o sistema imune seleciona linhagens menos imunogênicas ao destruir as células mais imunogênicas. Isso favorece o crescimento de células naturalmente “invisíveis” ao sistema imune. Essas células promovem uma interação como células do estroma, como descrito anteriormente, potencializando o efeito imunodepressor (DUNN, OLD, & SCHREIBER, 2004). São exemplos dessa interação a paralisação de infiltração de células T e NK através da secreção de TGF- $\beta$ , o recrutamento de células T regulatórias (Treg) ou células supressoras mielóide-derivadas (MDSC) (HANAHAN & WEINBERG, 2011; CHAMMAS, 2010).

As células T são as grandes responsáveis por combater tecidos tumorais. As células T citotóxica CD8+ e as células T *helper* CD4+ (Th1), juntamente com as células apresentadoras de antígenos (APC), correspondem as principais armas do sistema imune contra o câncer. O principal mecanismo de escape das células tumorais é a inativação dessas células. A anergia das células T é promovida pela mobilização de células Treg e consequente produção de TGF- $\beta$  e IL-10; marginalização das APCs no ambiente tumoral, evitando seu contato com antígenos tumorais e consequente apresentação aos linfócitos; através da produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio pelas MDSC; pela produção de TGF- $\beta$  e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) pelos fibroblastos associados ao câncer e pela ação das células endoteliais produzindo prostaglandina E2 (SPEISER, HO, & VERDEIL, 2016).

**Figura 3: Fatores do microambiente tumoral levando a disfunção de células T.** No microambiente tumoral, as funções das células T são reguladas pela disponibilidade de nutrientes, pelas células imuno-moduladoras e pelas citocinas produzidas por elas. Esses fatores interagem uns com os outros para desativar respostas de células T antitumorais. Os nutrientes imunoestimuladores que atuam na expansão e ativação das células T são consumidos pelas altas taxas de consumo de células tumorais e células imunossupressoras. Além disso, as células tumorais e imunossupressoras produzem metabólitos imunossupressores e citocinas, alterando a transcrição das células T que promovem sua disfunção. APC, célula apresentadora de antígeno; IL, interleucina; MDSC, célula supressora derivada mielóide; PGE2, prostaglandina E2; TGF $\beta$ , fator transformador de crescimento- $\beta$ ; célula Treg, célula T reguladora; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular.



Fonte: (Adaptado de Speiser et al., 2016)

#### 2.4 INTERLEUCINA-33 (IL-33)

Como descrito anteriormente, a liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas, fatores de crescimento, proteases e lipídeos irão interagir com o tumor e as células do estroma modulando o ambiente tumoral para facilitar o processo de adesão, invasão e

motilidade celular (BITOUX & STAMENKOVIC, 2008). A ativação de mastócitos e macrófagos após dano celular iniciam o processo de inflamação com a liberação local de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Essas citocinas facilitarão o acesso de outras células do sistema imune através da ativação de células endoteliais com expressão de moléculas de adesão que promoverão a diapedese leucocitária. Estes, por sua vez, produzirão IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 e INF- $\gamma$  assim como VEGF, PDGF e TGF- $\beta$ . A ação das células T citotóxica CD8+ e T helper CD4+ (Th1), que são as responsáveis pela destruição de células cancerígenas, logo é atenuada pela ação das células reguladoras do processo inflamatório agudo. Com a não resolução do trauma agudo, há uma mudança no perfil celular (retorno de macrófagos e ativação de Treg), tornando um processo crônico, o que permitirá o surgimento de um ambiente mais favorável ao crescimento tumoral (BITOUX & STAMENKOVIC, 2008; SPEISER et al., 2016).

A IL-33, também conhecida como IL-1F11 e membro da família da IL-1 é uma proteína de função dupla, podendo atuar tanto quanto uma citocina de sinalização ou como um fator nuclear intracelular e tem sua função biológica associada a ligação de seu receptor ST2 (IL-1RL1) que pertence a família dos receptores de IL-1. Apresenta duas formas de receptor ST2: uma forma transmembrana (ST2L) uma forma solúvel (sST2) (LOPETUSO, SCALDAFERRI, & PIZARRO, 2012; YU et al., 2015; MILOVANOVIC et al., 2012). A IL-33 é originalmente produzida como uma proteína precursora de 30 kDa e depois clivada em uma forma ativa e segregada de 18 kDa pela caspase-1 (YU et al., 2015).

Pesquisas sugerem que a IL-33 é amplamente distribuída pelas várias células de tecidos do corpo, principalmente nos fibroblastos, adipócitos, células musculares lisas, endoteliais, brônquicas e epiteliais intestinais, mas também está presente em células de origem hematopoiética, como macrófagos e células dendríticas (LOPETUSO, SCALDAFERRI, & PIZARRO, 2012; MARTIN, 2013).

Ao contrário de outras citocinas da família das IL-1, a IL-33 pode induzir resposta imune do tipo Th2. O receptor ST2 encontra-se seletivamente expresso nas células T do tipo Th2, Treg e células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2), mas não em células T do tipo Th1 (BIE et al., 2014; MILOVANOVIC et al., 2012). Ela pode ter sua produção celular induzidas por estímulos exógenos via receptores Toll-like (TLR) e endógenos, via citocinas (MARTIN, 2013). Presente constitucionalmente nas células endoteliais, a IL-33 age como alarmina quando lançada no meio extracelular após estresse ou dano celular (WASMER & KREBS, 2017).

Rank e colaboradores, mostraram que a IL-33 é capaz de ativar células dendríticas de murinos, polarizando as células T “naive” para o fenótipo Th2, aumentando a secreção de citocinas Th2 como IL-5 e IL-13 (RANK et al., 2009). Sua ação também se estende para eosinófilos, basófilos e neutrófilos (MILLER, 2011). Na presença desta interleucina, o ST2 ativa a sinalização celular e promove a interação entre mastócitos e linfócitos T auxiliares Th2 com o tecido durante os processos inflamatórios agudos e crônicos. (LOPETUSO et al., 2012). Inúmeros artigos evidenciam ações da IL-33 em respostas imunes em situações patológicas como doenças reumatológicas, doenças inflamatórias intestinais, asma, câncer e infecções (helmintos, vírus e fungos); e em situações fisiológicas (MILLER, 2011; MARTIN, 2013).

A relação entre câncer e IL-33 foi descrita em vários estudos e em diferentes tipos histológico de câncer. A ação pró-cancerígena parece clara em alguns tipos de câncer, porem controversa em outros, sendo inclusive um fator protetor. Neoplasias como os carcinomas escamosos de cabeça e pescoço, os de mama, carcinoma de pulmão não-pequenas células, hepatocarcinomas e gástricos têm uma relação direta entre agressividade e atividade da IL-33 (WASMER & KREBS, 2017).

Estudo realizado em 2011 pelo professor Sun e seus colaboradores mostrou que a IL-33 plasmática está aumentada em pacientes com câncer gástrico e diretamente relacionada com estadiamentos mais avançados. Também foi evidenciado que a via NF- $\kappa$ B, classicamente uma via de ativação carcinogênica, é ativada pela IL-33. A análise conjunta mostrou que o aumento da citocina associa-se a um pior prognóstico, com lesões mais profundas, mais extensas e com maior índice de metástases (SUN et al., 2011).

Um outro grupo de pesquisadores chineses mostrou que a IL-33 induz a ativação da via intracelular ERK 1/2 via receptor ST2 em células de câncer gástrico. Essa via pertence à família MAPK que tem um papel crucial no processo de invasão e metástase do câncer gástrico (YU et al., 2015).

Deng e colaboradores em 2016, mostraram que o uso de trsitetrapolin (TTP), uma proteína de ligação degradadora de RNAm, diminui a expressão de IL-33 e reduziu proliferação, migração e invasão de linhagens de células de câncer gástrico. Foi demonstrado também, através da avaliação de biópsias de pacientes com câncer gástrico, uma relação inversa entre TTP e estadiamentos mais avançados (DENG et al., 2016).

Um estudo alemão, realizado em 2016, avaliou a relação prognóstica de IL-33 e sST2 em pacientes com câncer gástrico e com gastrite. Os resultados mostraram que não houve

diferença estatística entre a IL-33 nos dois grupos, porém houve diferença em relação ao sST2, onde encontrava-se mais elevado em pacientes com câncer gástrico. O estudo sugeriu que a relação IL-33/sST2 seria mais fidedigna para identificar pacientes com câncer, onde quanto menor o valor da relação, maior a chance de neoplasia gástrica (BERGIS, KASSIS, & RADEKE, 2016).

Apesar de estudos relacionarem o aumento de IL-33 em paciente com câncer gástrico, principalmente na população asiática, o seu papel na fisiopatologia dessa neoplasia não é claro. Não há estudos relatando seu aumento na população brasileira com câncer gástrico, em especial da região nordeste.

## 2.5 CÉLULAS LINFÓIDES INATA DO TIPO 2 (ILC2)

Pesquisas têm identificado vários membros distintos da família de células linfóides inatas (ILC). Tais células são classificadas em três grupos com base nos marcadores específicos de cada tipo, nas citocinas que produzem e na transcrição de fatores que regulam o seu desenvolvimento e função (BIE et al., 2014). Esses grupos são divididos em grupo 1, grupo 2 e grupo 3 de ILC. As células do grupo 1 são caracterizadas pela secreção de  $\text{INF-}\gamma$  e  $\text{TNF-}\alpha$  e respondem as citocinas IL-12, IL-15 e IL-18. Neste grupo estão incluídas as células NK e as ILC1. O grupo 2 é formado pelas ILC2 que secretam principalmente IL-5 e IL-13 e respondem ao estímulo de IL-33, IL-25 que são alarminas secretadas por células epiteliais após dano tecidual. Finalmente o grupo 3 é formado pelas células indutoras de tecido linfóide (LTi) e as ILC3 que respondem ao estímulo de IL-1 $\beta$  e IL-23 e produzem IL-17 e IL-22 (VAN BEEK et al., 2016).

As ILC2 são dependentes da proteína de ligação GATA 3 (*GATA3*) e do ácido retinóico relacionado ao receptor- $\alpha$  órfão (*ROR $\alpha$* ) para o seu desenvolvimento e função (BIE et al., 2014), demonstradas pelos estudos dos professores Mjosberg e Wong, respectivamente (MJÖSBERG et al., 2012; WONG et al., 2012). O GATA-3 também é fator de transcrição das células Th2 (VAN BEEK et al., 2016).

A resposta imune do tipo 1 tem sido relacionada com a vigilância imunológica contra os tumores e a resposta tipo 2, ainda não muito bem clara, está associada a uma condição favorável ao crescimento tumoral (VAN BEEK et al., 2016). Muitos pesquisadores têm demonstrado que as ILC2 promovem e induzem o desenvolvimento de imunidade dependente de células Th2 CD4<sup>+</sup> (BIE et al., 2014). A presença de IL-33 no ambiente tumoral estimula as ILC2 a produzirem IL-13 que tem ação promotora nos MDSCs e na produção do fator anti-

inflamatório TGF- $\beta$ . As ILC2 produzem moléculas que suprimem a ação de células T. Uma dessas moléculas é a arginase-1(Arg1), que se relaciona com a presença de MDSCs e macrófagos M2 no leito tumoral. A Arg1 é uma enzima que metaboliza a L-arginina, uma molécula essencial para a produção correta de receptores de células T, portanto o seu aumento no microambiente tumoral está associado a uma diminuição da efetividade das células T e consequente evasão imune das células tumorais (VAN BEEK et al., 2016).

Xu e colaboradores demonstraram que o fenótipo Th2 é predominante em paciente com câncer gástrico e está relacionado com a polarização de MDSCs e macrófagos M2, o que indica que o ambiente imunossuprimido é mantido por estas células. O desvio da resposta imune para via Th2 favorece o desenvolvimento tumoral já que a via clássica antitumoral Th1, realizada por células Th1 CD4+ e linfócitos T citotóxico CD8+, torna-se preterida pelo sistema imune (XU et al., 2012). O estudo do professor Bie e colaboradores em 2014, demonstrou que em pacientes com câncer gástrico há um aumento da circulação de ILC2, o que provavelmente relaciona-se ao desequilíbrio da resposta Th1/Th2, favorecendo a via imunossupressora no microambiente tumoral (BIE et al., 2014).

Em outro estudo de 2014, conduzido por Li e colaboradores descreveu o poder mitogênico da IL-33 em colanginócitos ao atuar nas ILC2 e promovendo a liberação de IL-13. A relevância do circuito IL-33/ILC2/IL-13 em tecido com doenças biliares foi demonstrada com o surgimento de colangiocarcinoma em murinos geneticamente suscetíveis, ao receberem infusão de IL-33 (LI et al., 2014). No entanto, estes autores não observaram a presença destas células no ambiente tumoral.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expressão da IL-33 e sua relação com o prognóstico do câncer gástrico

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para IL-33 no sangue de pacientes com câncer gástrico;
- Avaliar a presença do RNAm da IL-33 e de ILC2 (através do GATA-3, ROR- $\alpha$ , IL-13) em tecidos parafinados de pacientes com CG;

- Analisar se a expressão do RNAm pode ser detectada tanto em tecido fresco como em amostras parafinadas;
- Correlacionar os dados obtidos com os dados clínicos dos pacientes.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS**

As amostras foram coletadas no Hospital de Câncer de Pernambuco e Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e analisadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Foram obtidos do Hospital de Câncer de Pernambuco: 12 amostras sanguíneas de pacientes com câncer gástrico e destes mesmos foram retiradas 12 biópsias de tecidos tumorais frescos durante excisão cirúrgica e, em seguida, as amostras foram mantidas em solução de preservação de RNA (RNAlater, Qiagen). Do HC-UFPE foram obtidas 27 amostras parafinadas de tecidos tumorais e 19 de tecidos adjacentes (controles) de áreas sem neoplasia. O presente trabalho foi desenvolvido segundo a aprovação no comitê de ética humano sob o número do comprovante 042181/2014. Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir de análise de prontuário dos pacientes.

### **4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Todo paciente portador de câncer gástrico atendido e submetido a intervenção cirúrgica, tendo ou não, realizado quimioterapia neoadjuvante.

### **4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Pacientes que não apresentarem confirmação histológica de câncer gástrico.

### **4.4 EXTRAÇÃO DE RNA DO SANGUE E AMOSTRAS FRESCAS**

RNA total do sangue foi obtido através do QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen). Os tecidos frescos, mantidos em RNAlater (Qiagen) foram homogeneizados com o auxílio do triturador (Homomix D-130, Biosystems, PR, Brasil) para posterior extração do RNA total usando o RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado pelo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e transcrito através do kit Reverse Transcription (Qiagen).

#### 4.5 EXTRAÇÃO DE RNA DE BLOCOS DE PARAFINA

O RNA total foi extraído de tecidos parafinizados usando o kit ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado pelo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e transcrito através do kit Reverse Transcription (Qiagen).

#### 4.6 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (Q-PCR)

Para a transcrição reversa, o RNA extraído foi sintetizado em DNA complementar (cDNA) utilizando o kit QuantiTect Reverse Transcription Kit® (Qiagen, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras de cDNA foram quantificadas usando o aparelho de espectrofotômetro NanoDrop® – 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE) antes de serem usadas para as análises da qPCR. A PCR em tempo real foi realizada seguindo condições de ciclagem: desnaturação inicial 95oC por 10 min, seguida por 40 ciclos de 95oC por 15 s, 60oC por 50 s e 72oC por 30 s. Para a reação utilizou-se o fluoróforo SyBr® Green Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) e o gene da  $\beta$ -actina, como controle endógeno da reação (gene de referência). As sequências dos oligonucleotídeos primers utilizados foram sintetizados pela Exxtend e encontram-se na Tabela 1. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, CA, USA) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados com o auxílio dos softwares ABI PRISM 7500 SDS (versão 2.0.6). Os resultados foram representados graficamente como expressão relativa.

**Tabela 1** - Sequência dos oligonucleotídeos primers utilizados nas reações de qPCR. (fw= forward, rev= reverse).

Gene ( <i>Homo sapiens</i> )	Sequência dos primers
IL-33_fw	ATCAGGTGACGGTGTGATG
IL-33_rev	CTGGCAGTGGTTTTTCACAC
ST2_fw	TTGCGTGGGATAGCACATAC
ST2_rev	TGTAAGTATGCTCGTTGG
GATA-3_fw	CTGGCCACAGTTGTTTGATG
GATA-3_rev	TGCCAGAACTGGTATTTCC
ROR-alpha_fw	GAGGTTGCGGCATTACTTTG

ROR-alpha_rev	GCTATGGACCCTTTTCATGC
IL-13_fw	ATTGCTCTCACTTGCCTTGG
IL-13_rev	TCTGGTTCTGGGTGATGTTG
$\beta$ -actina_fw	CCTGGCACCCAGCACAAT
$\beta$ -actina_rev	GCCGATCCACACGGAGTACT

#### 4.7 ANÁLISE DOS DADOS E ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados pelo software GraphPadPrism® versão 6.0. A estatística descritiva foi realizada através da média $\pm$ desvio padrão. O valor de p foi obtido através do teste t pareado para os dados paramétricos e teste de Wilcoxon para os dados não paramétricos na comparação entre dois grupos. Para a comparação entre os diferentes grupos, foi empregada a análise de variância (ANOVA) para os dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos. A significância estatística foi considerada, admitindo-se um nível crítico de 5%, em todos os casos.

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

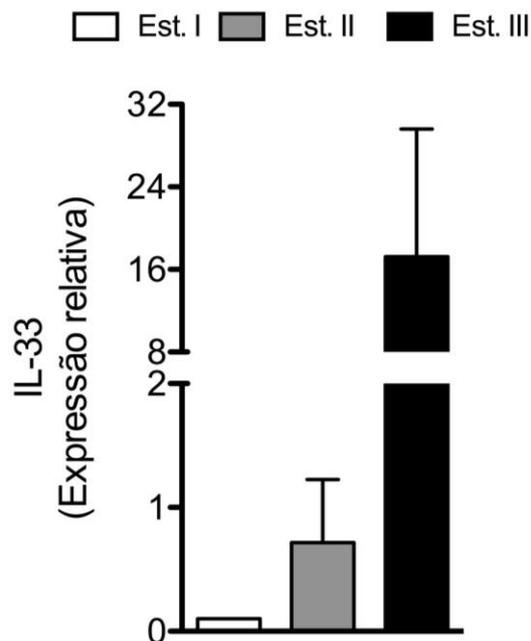
O presente trabalho observou que há um aumento de IL-33 em ambiente tumoral e no sangue de pacientes com câncer gástrico e que a intensidade da expressão dessa interleucina parece relacionar diretamente com estadiamentos mais avançados. Dados sugerem que esta citocina contribui para o desenvolvimento do câncer por induzir a presença das ILC2 no ambiente tumoral. (BIE et al., 2014; VAN BEEK et al., 2016)

O microambiente tumoral exerce um papel fundamental no processo de malignização celular. A interação das células do estroma com as células do sistema imune e suas citocinas produzidas são determinantes para a manutenção processo de carcinogênese, permitindo a sobrevivência da célula neoplásica. A medida que células malignas sobrevivem, adquirem novas mutações que permitem um aumento da capacidade de invasão e metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2011; SOAVE et al., 2016; CHAMMAS, 2010).

A IL- 33 é uma citocina da família das IL-1 e caracteriza-se por ter sua atividade associada a ligação com seu receptor transmembrana ST2. Esse receptor está presente em células do sistema imune como linfócitos, ILC2, mastócitos e macrófagos. A atividade da IL-33 desencadeia uma cascata de eventos que terminam por ativar preferencialmente a via Th2 da resposta imune, ativando células como linfócitos Treg, mastócitos e macrófagos que agirão

através de suas citocinas para uma supressão da resposta anti-tumoral do hospedeiro. Estudos já associaram a IL-33 com neoplasias como câncer de mama, câncer de pulmão não-pequenas células, carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e câncer gástrico, sendo esse último objeto de estudos em populações asiáticas.(BIE et al., 2014; MILLER, 2011; MILOVANOVIC et al., 2012; WASMER & KREBS, 2017)

Primeiramente, o presente estudo avaliou a expressão de RNAm de IL-33 no sangue de pacientes, do nordeste brasileiro, portadores de câncer gástrico. Foram avaliados um total de 12 pacientes separados em grupos de acordo com o estadiamento da *American Joint Committee on Cancer (AJCC-TNM)* como mostrado na figura 4. Os resultados sugerem que há um aumento, embora não significativamente estatístico, da IL-33 no sangue de pacientes com estadiamentos mais avançados (II e III). Assim como nesse estudo, um estudo asiático mostrou aumento de IL-33 (Sun et al., 2011). No entanto, sua análise foi através da dosagem de níveis proteicos de IL-33 no plasma e o presente estudo avaliou a expressão de RNAm para IL-33. Nosso resultado mostra que, assim como em população asiática, a população ocidental, em especial a brasileira parece apresentar a mesma relação entre aumento de IL-33 plasmático e estadiamento avançado.

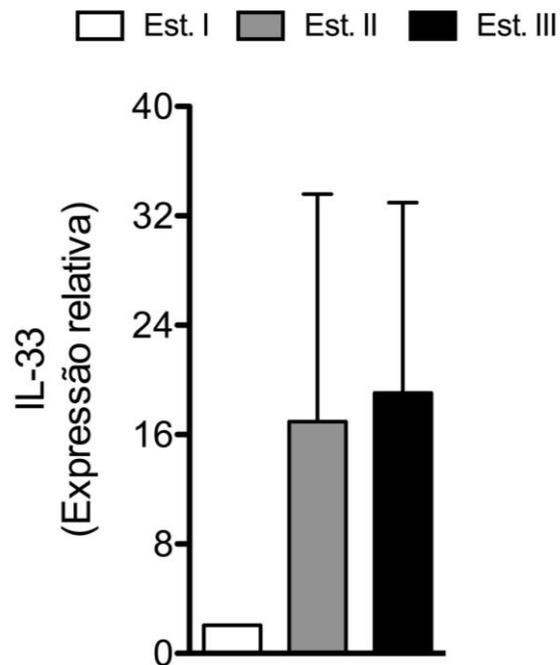


**Figura 4:** Expressão relativa de mRNA da IL-33 no sangue de pacientes com câncer gástrico. As expressões relativas do RNAm da IL-33 foram avaliadas no sangue total de 12 pacientes com CG, divididos pelo estadiamento (I, II e III) segundo o AJCC.

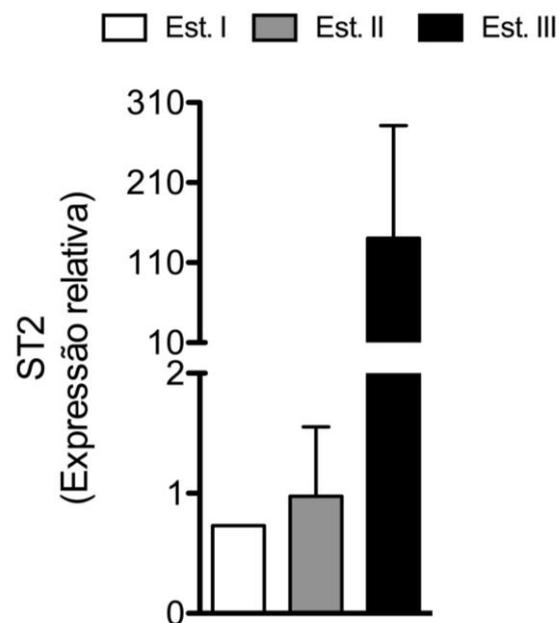
Uma vez que foi observado um aumento da IL-33 no sangue total de pacientes com CG, de maneira estadiamento dependente, objetivou-se analisar a expressão desta interleucina

e de seu receptor nos tecidos tumorais dos pacientes com CG. A expressão de RNAm de IL-33 e ST2 foi avaliada em amostras de tecidos a fresco das lesões tumorais dos pacientes com CG. Embora não tenha havido significância estatística foi observado um aumento expressivo de IL-33 e do ST2 nos tecidos. Essa elevação, assim como encontrada no sangue, foi também associada diretamente com o estadiamento, estando em altas concentrações no estádios mais avançados (II e III) como mostrado na figura 5 e figura 6. De fato, a presença do ST2 é descrita como fundamental para a atividade da IL-33. Tal receptor está presente em células como mastócitos, macrófagos, células T Th2 e Treg (LOPETUSO et al., 2012). O eixo IL-33/ST2 tem papel importante na ativação de macrófagos M2, que produzem IL-10 e consequente supressão da resposta anti-tumoral inata e adaptativa (MILOVANOVIC et al., 2012), assim como nas ILC2, onde haverá produção de IL-13 e IL-5, potencializando a via de reposta Th2 (BIE et al., 2014). Estes dados sugerem que a presença da IL-33 e de seu receptor ST2, no tecido tumoral podem apresentar um papel importante na manutenção do CG.

A relação da IL-33 com a imunossupressão do microambiente tumoral foi relatada positivamente na revisão do professor Miller, onde foi descrito que a ação desta interleucina em promover uma resposta imune Th2 e mobilização de células Treg. A produção de IL-5 e IL-13 produzida por essa resposta imune gera um processo inflamatório crônico que mantém o contexto imunossupressor do ambiente tumoral, juntamente com a atividade das células Treg (MILLER, 2011). Além disso, a pesquisa do professor Yu mostrou que através da exposição de cultura de células de câncer gástrico à IL-33 há uma promoção de invasão e migração celular através da ativação da via ST2-ERK1-2 (YU et al., 2015). Com isso, os resultados positivos para a presença de IL-33 e de ST2 no tecido tumoral, sugerem que a imunossupressão descrita por Miller e a invasibilidade relatada por Yu da IL-33 se encaixa no contexto de nossos resultados, já que uma maior concentração de IL-33 está mais intensa em estádios mais avançados.



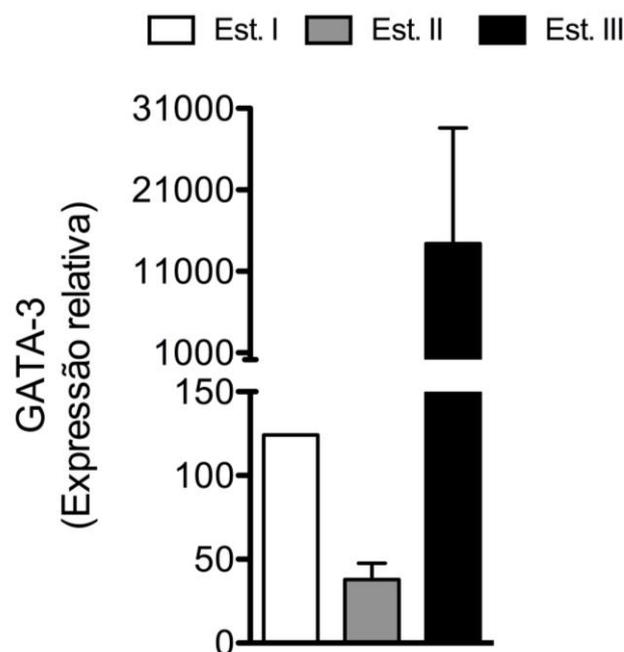
**Figura 5:** Expressão relativa do RNAm da IL-33 nos tecidos tumorais de pacientes com câncer gástrico. As expressões relativas do RNAm da IL-33 foram avaliadas nas amostras a fresco (coletadas em RNAlater) de 11 pacientes com CG, divididos pelo estadiamento (I,II e III) segundo o AJCC.



**Figura 6:** Expressão relativa do RNAm do ST2 nos tecidos tumorais de pacientes com câncer gástrico. As expressões relativas do RNAm do ST2 foram avaliadas nas amostras a fresco (coletadas em RNAlater) de 11 pacientes com CG, divididos pelo estadiamento (I, II e III) segundo AJCC.

Tendo em vista que a IL-33 e ST2 foram encontrados no tecido tumoral decidiu-se analisar a presença de ILC2. Essa célula expressa o receptor ST2 e já teve sua relação com

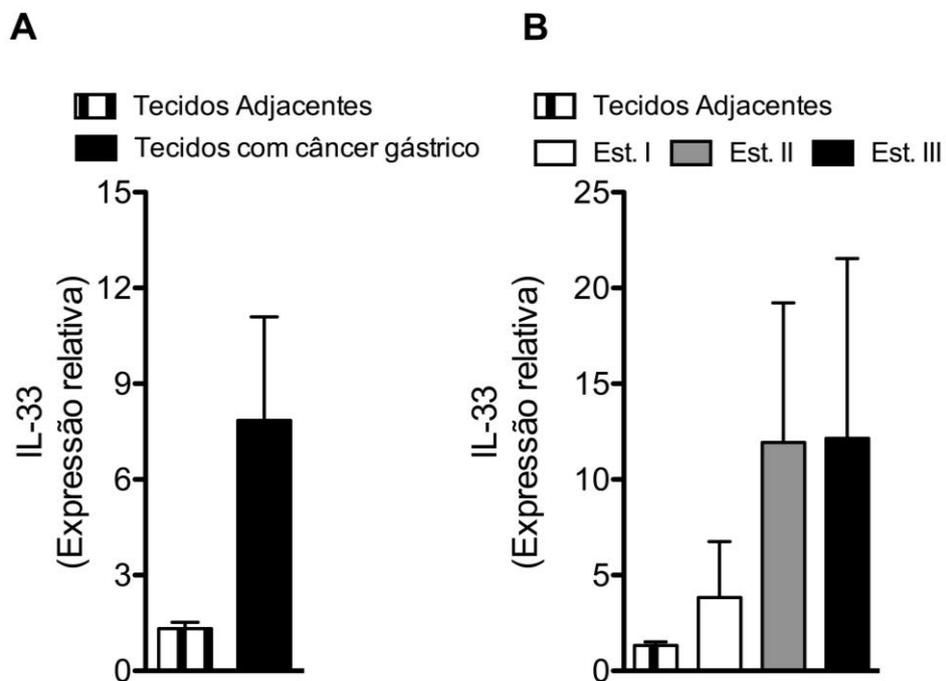
câncer gástrico relatada em outro estudo (BIE et al., 2014). A avaliação da expressão de ILC2 foi feita através da análise da expressão do fator transcricional, GATA-3. Mesmo não sendo um fator exclusivo das ILC2, ele está fortemente expresso nestas células (MJÖSBORG et al., 2012). De modo geral, a expressão relativa do GATA-3 nos tecidos tumorais foi elevada nos estadiamentos mais avançados (III) como mostra a figura 7, sugerindo a presença de ILC2 e sua provável participação na progressão da neoplasia. Mais uma vez, o número de amostras pequeno não permitiu um resultado estatisticamente significativo entre os estadios mais precoces e mais avançados.



**Figura 7:** Expressão relativa do RNAm do GATA-3 nos tecidos tumorais de pacientes com câncer gástrico. As expressões relativas do RNAm do GATA-3 foram avaliadas nas amostras a fresco (coletadas em RNAlater) de 11 pacientes com CG, divididos pelo estadiamento (I, II e III) segundo AJCC

O presente trabalho objetivou inicialmente buscar amostras frescas para as análises propostas, no entanto, tendo em vista a dificuldade de obtenção de amostras buscou uma análise retrospectiva com tecidos parafinados de pacientes com câncer gástrico. Foram utilizados 27 amostras parafinadas de paciente com CG e 19 amostras controle, sendo de tecidos gástricos adjacentes (região gástrica não acometida pela neoplasia). Em um primeiro momento foi comparado a expressão de RNAm de IL-33 em ambos os tecidos (controle e tumoral). De maneira semelhante aos dados prévios, os resultados mostraram que a expressão foi mais elevada na região acometida pelo câncer, como mostra a figura 8A. Depois foram separados os pacientes de acordo com o estadiamento e analisado em conjunto com a amostras controle como mostra a figura 8B. O aumento da expressão de IL-33 manteve o

padrão visto nas amostras com tecidos fresco, sendo mais intenso nos estádios mais avançados (II e III) e menos no estádio inicial (I). O grupo controle segue com expressão bem menos intensa do que o grupo do estádio I. Os resultados observados em amostras parafinadas demonstram que este tipo de análise é possível de ser realizada. Além disso, estes resultados foram semelhantes aos encontrados com amostras frescas. Os dados do grupo controle nos apontam que o processo de carcinogênese gástrica inicia-se em local pontual, avançando a medida que a interação entre as células do estroma e as do sistema imune relacionam-se para tornar aquele ambiente mais favorável ao crescimento neoplásico. A presença da IL-33 sugere que esta tem papel na carcinogênese gástrica e depende da interação com outros componentes do microambiente tumoral.

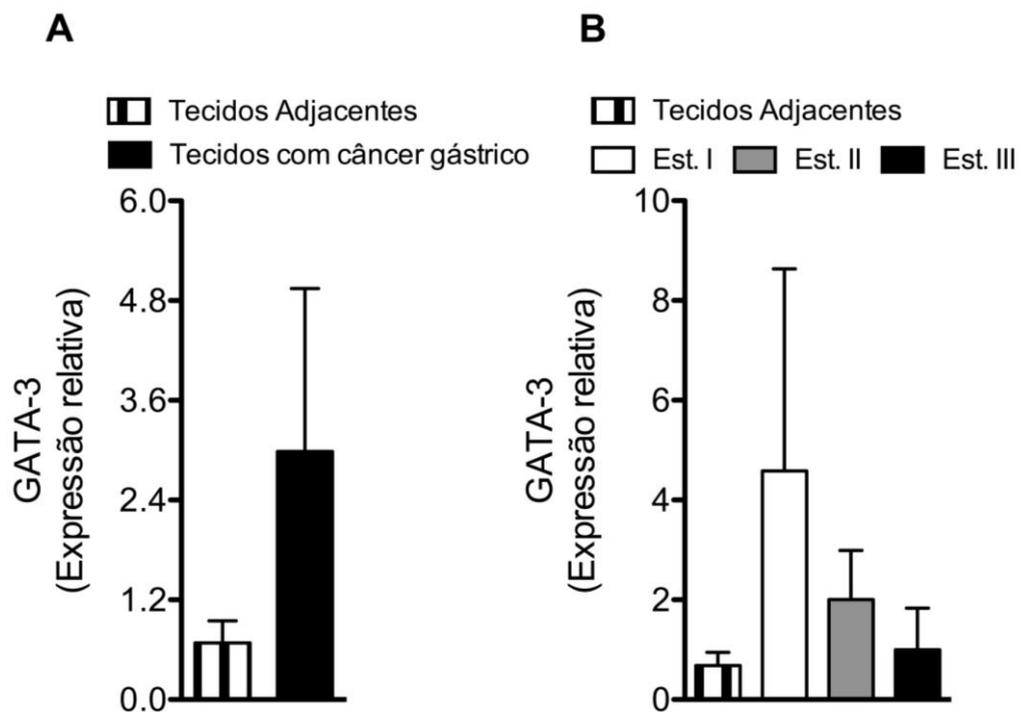


**Figura 8:** A. Expressão relativa do RNAm da IL-33 em pacientes com câncer gástrico. As expressões relativas da IL-33 foram obtidas de amostras parafinadas de 27 pacientes e comparada com 19 controles. B. Expressão relativa do RNAm da IL-33 avaliadas e divididas em grupo controle e por estadiamento (I, II e III) segundo AJCC.

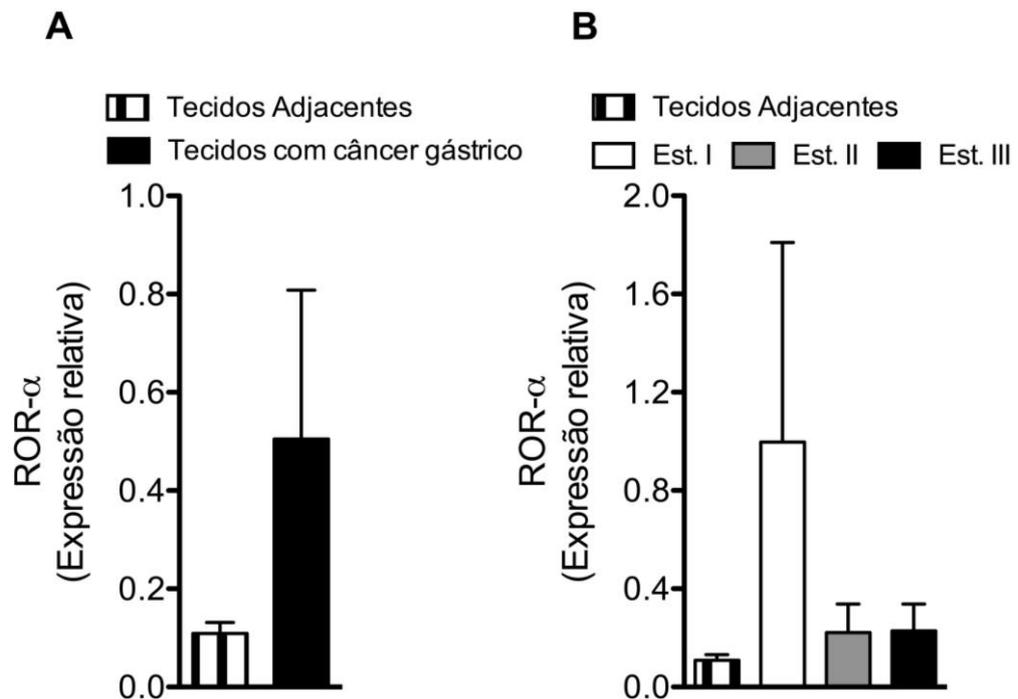
Como descrito anteriormente, foi avaliado a expressão de GATA-3 em tecidos frescos de CG, o que sugeriu a presença de ILC2 no microambiente tumoral e sua provável relação com progressão da neoplasia. A expressão de GATA-3 foi mais intensa em estágio mais avançado (III). Prosseguiu-se as avaliações tentando identificar a expressão de RNAm para os fatores de transcrição GATA-3 e ROR- $\alpha$  nos tecidos parafinados. Tendo em vista que o

GATA-3 não é um fator de transcrição exclusivo das ILC2, podendo estar presente também em células NK (MJÖSBERG et al., 2012), foi avaliada a expressão de ROR- $\alpha$  em amostras parafinadas. O fator de transcrição ROR- $\alpha$  é fundamental para o desenvolvimento e atividade das ILC2 e parece ser mais específico para essa linhagem celular (WONG et al., 2012).

A expressão de RNAm para o GATA-3 e ROR- $\alpha$  comparando as amostras controle e com câncer. Os resultados mostraram aumento a expressão de ambos os fatores de transcrição nas amostras com câncer em relação ao controle (figura 9A e 10A). Depois, foram separadas as amostras com câncer por estadiamento e comparadas entre si e com o grupo controle (figura 9B e 10B). Não houve relação direta entre estadiamento mais avançado e expressão de GATA-3 e ROR- $\alpha$ , porem manteve-se o aumento em relação ao grupo controle. Provavelmente o número pequeno de amostras não foi suficiente para tornar a relação direta entre estadiamento avançado e expressão dos fatores de transcrição mais clara.

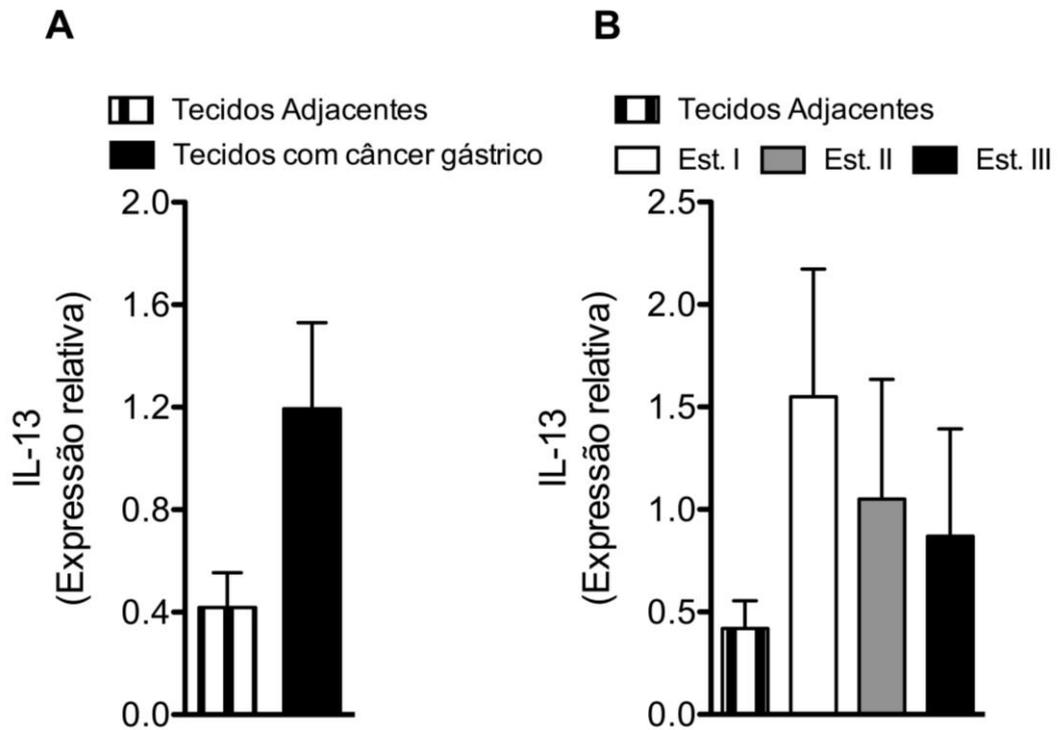


**Figura 9:** **A.** Expressão relativa do fator de transcrição GATA-3 em pacientes com câncer gástrico. Comparação entre amostras parafinadas de tecido saudável e com câncer. **B.** Expressão do fator de transcrição GATA-3 presentes nas ILC2. Separação das amostras com câncer por estadiamento e comparação entre elas e amostras com tecido saudável.



**Figura 10:** **A.** Expressão relativa do fator de transcrição ROR- $\alpha$  presente em pacientes com câncer gástrico. As amostras foram obtidas de 27 tecidos parafinados com câncer e 19 controles. **B.** Expressão relativa do fator de transcrição ROR- $\alpha$  presentes nas ILC2. Amostras avaliadas e divididas em grupo controle e por estadiamento (I, II e III) segundo AJCC.

Finalmente, para sugerir a presença das ILC2 no ambiente tumoral, foi determinado a presença de IL-13, uma citocina liberada por estas células, nas amostras parafinadas (JONES, 2015). A IL-13 é uma citocina que age nas MDSC e células Treg, promovendo o crescimento tumoral através da geração de um ambiente imunossupressor. A produção de TGF- $\beta$  pelas MDSC e a polarização de macrófagos para o fenótipo M2 são exemplos dessa atividade imunossupressora (TURLEY et al., 2015; VAN BEEK et al., 2016). Foi avaliado a expressão de RNAm da IL-13 nas amostras com câncer gástrico e comparamos com o grupo controle. Os resultados mostraram aumento de IL-13 no grupo com câncer (figura 11A). Seguiu-se as análises, separando o grupo com câncer gástrico em grupos por estadiamento e analisados com o grupo controle (figura 11B). Não houve relação direta entre o aumento da expressão de IL-13 e o estadiamento mais avançado nos pacientes com câncer. Aqui, mais uma vez, o número reduzido de amostras pode ter afetado a relação entre expressão da citocina com o estadiamento.



**Figura 11:** **A.** Expressão relativa do RNAm da IL-13 em pacientes com câncer gástrico. As amostras foram obtidas de 27 tecidos parafinados e comparados com 19 controles. **B.** Expressão relativa de RNAm da IL-13 em pacientes com câncer gástrico divididos em grupo controle e por estadiamento (I, II, III) de acordo com a AJCC.

## 6. CONCLUSÃO

Diante do exposto, concluímos que pacientes de origem ocidental com câncer gástrico, apresentam aumento do RNAm para IL-33 no sangue e no tecido tumoral. Sua expressão é crescente e associa-se diretamente com estadiamentos mais avançados do CG. É possível sugerir que há uma relação de eventos IL-33/ILC2/IL-13 presente no microambiente do câncer gástrico e conseqüentemente pró-tumoral. É importante destacar que o uso de amostras de tecidos parafinados foi capaz de gerar resultados semelhantes ao observado com amostras frescas. Isso sugere que o uso de tecidos parafinados podem auxiliar em investigações para estudos retrospectivos.

## REFERÊNCIAS

- Bergis, D., Kassis, V., & Radeke, H. H. (2016). High plasma sST2 levels in gastric cancer and their association with metastatic disease. *Cancer Biomarkers*, *16*(1), 117–125. <https://doi.org/10.3233/CBM-150547>
- Bie, Q., Zhang, P., Su, Z., Zheng, D., Ying, X., Wu, Y., ... Xu, H. (2014). Polarization of ILC2s in peripheral blood might contribute to immunosuppressive microenvironment in patients with gastric cancer. *Journal of Immunology Research*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/923135>
- Bitoux, M.-A., & Stamenkovic, I. (2008). Tumor-host interactions: the role of inflammation. *Histochemistry and Cell Biology*, *130*(6), 1079–1090. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0527-3>
- Carvalho, E. L. De, Teixeira, A., Neto, D. C., & Paulista, P. P. (2007). Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. *Arq Gastroenterol*, *39*(4), 1–4.
- Chammas, R. (2010). Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. *Revista Médica*, *89*(1), 21–31. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v89i1p21-31>
- Deng, K., Wang, H., Shan, T., Chen, Y., Zhou, H., Zhao, Q., & Xia, J. (2016). Tristetraprolin inhibits gastric cancer progression through suppression of IL-33. *Scientific Reports*, *6*(March), 24505. <https://doi.org/10.1038/srep24505>
- Dias-Jácome, E., Libânio, D., Borges-Canha, M., Galaghar, A., & Pimentel-Nunes, P. (2016). Gastric microbiota and carcinogenesis: The role of non-*Helicobacter pylori* bacteria - A systematic review. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, *108*(9), 530–540. <https://doi.org/10.17235/reed.2016.4261/2016>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, *22*(1), 329–360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hu, B., Hajj, N. El, Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., & Meloni-Ehrig, A. (2012). Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, *3*(3), 251–261. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021>
- Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. (2016). *INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva*. <https://doi.org/978-85-7318-283-5>
- Jones, C. L. (2015). HHS Public Access. *Nat Immunol.*, *33*(4), 395–401. <https://doi.org/10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus>
- Lee, H. S., Kim, J., & Lee, D. H. (2016). Effect of N-Methyl-N-Nitrosourea on *Helicobacter*-induced Gastric Carcinogenesis in. *Journal of Cancer Prevention*, *21*(3), 182–186. <https://doi.org/10.15430/JCP.2016.21.3.182>
- Li, J., Razumilava, N., Gores, G. J., Walters, S., Mizuochi, T., Mourya, R., ... Bezerra, J. A. (2014). Biliary repair and carcinogenesis are mediated by IL-33-dependent cholangiocyte proliferation. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(7), 3241–3251. <https://doi.org/10.1172/JCI73742>
- Lopetuso, L. R., Scaldaferrì, F., & Pizarro, T. T. (2012). Emerging role of the interleukin

- (IL)-33/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 5(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-18>
- Male, D., Brastoff, J., Roth, D. B., & Roitt, I. (2013). *Immunology*. (A. Vosburgh & M. Hyde, Eds.) (8th ed.). London. Retrieved from [www.elsevierhealth.com](http://www.elsevierhealth.com)
- Martin, M. U. (2013). Special aspects of interleukin-33 and the IL-33 receptor complex. *Seminars in Immunology*, 25(6), 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.006>
- Miller, A. M. (2011). Role of IL-33 in inflammation and disease. *Journal of Inflammation (London, England)*, 8(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-8-22>
- Milovanovic, M., Volarevic, V., Radosavljevic, G., Jovanovic, I., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., & Lukic, M. L. (2012). IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunologic Research*, 52(1–2), 89–99. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8283-9>
- Mjösberg, J., Bernink, J., Golebski, K., Karrich, J. J., Peters, C. P., Blom, B., ... Spits, H. (2012). The Transcription Factor GATA3 Is Essential for the Function of Human Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity*, 37(4), 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.015>
- Patel, T. N., Roy, S., & Ravi, R. (2017). Gastric cancer and related epigenetic alterations. *Ecancermedicalscience*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.714>
- Rank, M. A., Kobayashi, T., Kozaki, H., Bartemes, K. R., Squillace, D. L., & Kita, H. (2009). IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(5), 1047–1054. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.02.026>
- Soave, D. F., Miguel, M. P., Tomé, F. D., de Menezes, L. B., Nagib, P. R. A., & Celes, M. R. N. (2016). The Fate of the Tumor in the Hands of Microenvironment: Role of TAMs and mTOR Pathway. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/8910520>
- Speiser, D. E., Ho, P.-C., & Verdeil, G. (2016). Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nature Reviews. Immunology*, 16(10), 599–611. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.80>
- Sun, P., Ben, Q., Tu, S., Dong, W., Qi, X., & Wu, Y. (2011). Serum Interleukin-33 levels in patients with gastric cancer. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(12), 3596–3601. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1760-5>
- Tahara, T., Shibata, T., Horiguchi, N., Kawamura, T., Okubo, M., Ishizuka, T., ... Ohmiya, N. (2016). A possible link between gastric mucosal atrophy and gastric cancer after *Helicobacter pylori* eradication. *PLoS ONE*, 11(10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163700>
- Turley, S. J., Cremasco, V., & Astarita, J. L. (2015). Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nature Reviews. Immunology*, 15(11), 669–682. <https://doi.org/10.1038/nri3902>
- van Beek, J., Martens, A., Bakdash, G., & de Vries, I. (2016). Innate Lymphoid Cells in Tumor Immunity. *Biomedicines*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.3390/biomedicines4010007>
- Wasmer, M.-H., & Krebs, P. (2017). The Role of IL-33-Dependent Inflammation in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 7(January). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00682>
- Wong, S. H., Walker, J. A., Jolin, H. E., Drynan, L. F., Hams, E., Camelo, A., ... McKenzie, A. N. J. (2012). Transcription factor ROR $\alpha$  is critical for nuocyte development. *Nature Immunology*, 13(3), 229–36. <https://doi.org/10.1038/ni.2208>
- Xu, Y., Gao, J., Su, Z., Dai, X., Li, Y., Liu, Y., ... Xu, H. (2012). Downregulation of Hlx closely related to the decreased expressions of t-bet and Runx3 in patients with gastric cancer may be associated with a pathological event leading to the imbalance of Th1/Th2. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/949821>
- Yang, P., Qiu, G., Wang, S., Su, Z., Chen, J., Wang, S., ... Xu, H. (2010). The mutations of

- Th1 cell-specific T-box transcription factor may be associated with a predominant Th2 phenotype in gastric cancers. *International Journal of Immunogenetics*, 37(2), 111–115. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2010.00899.x>
- Yu, X. X., Hu, Z., Shen, X., Dong, L. Y., Zhou, W. Z., & Hu, W. H. (2015). IL-33 Promotes Gastric Cancer Cell Invasion and Migration Via ST2-ERK1/2 Pathway. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(5), 1265–1272. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3463-1>

## ANEXOS

### ANEXO I

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### IMPACTO DA INTERLEUCINA – 33 COMO FATOR PROGNÓSTICO NO CÂNCER GÁSTRICO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa porque foi atendido (a) ou está sendo atendido (a) nesta instituição e teve diagnóstico ou suspeita de um tipo de câncer chamado câncer gástrico. Para que você possa decidir se quer participar ou não, precisa conhecer os benefícios, os riscos e as consequências pela sua participação.

Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tem esse nome porque você só deve aceitar participar desta pesquisa depois de ter lido e entendido este documento. Leia as informações com atenção e converse com o pesquisador responsável e com a equipe da pesquisa sobre quaisquer dúvidas que você tenha. Caso haja alguma palavra ou frase que você não entenda, converse com a pessoa responsável por obter este consentimento, para maiores esclarecimentos. Converse com os seus familiares, amigos e com a equipe médica antes de tomar uma decisão. Se você tiver dúvidas depois de ler estas informações, entre em contato com o pesquisador responsável.

Após receber todas as informações, e todas as dúvidas forem esclarecidas, você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso queira participar.

##### PROPÓSITO DA PESQUISA

Esta pesquisa tem o propósito de analisar com mais detalhes um fator que possa indicar uma maior agressividade do tumor. Este fator é chamado de interleucina – 33 e pode ser detectado no sangue e no tumor de paciente com câncer gástrico. As pesquisas mais recentes indicam que vários tipos de tumores apresentam esse fator presente no sangue, porém ainda não existem dados sobre sua presença no câncer gástrico. Os estudos poderão levar a um futuro desenvolvimento de medicações.

##### PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Para realizar o diagnóstico de câncer é necessário que uma parte de seu tumor ou de seu sangue sejam coletados para exames laboratoriais. Estes procedimentos são necessários para um diagnóstico correto e para a escolha de um tratamento adequado. Os materiais não utilizados, ou aqueles que sobram dos exames, são descartados conforme a Legislação Sanitária. Na ocasião desses procedimentos, e só após a sua autorização, uma pequena

amostra excedente de seu tumor ou de seu sangue (aquela que está sobrando e que iria ser descartada), poderá ser utilizada para esta pesquisa. Este procedimento não comprometerá o diagnóstico uma vez que a parte principal destes materiais será encaminhada à Divisão de Patologia e a outros laboratorios da Universidade Federal de Pernambuco responsáveis pelos exames laboratoriais de rotina para o diagnóstico.

Todas as amostras biológicas coletadas durante esta pesquisa, conforme descrito acima, serão utilizadas apenas para os propósitos descritos neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Ao final da pesquisa, se você autorizar, suas amostras poderão ser armazenadas por até 10 anos para ser utilizado em pesquisas futuras. No futuro, qualquer pesquisa que contemple o uso das suas amostras armazenadas deverá ser aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco e você receberá um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorizar esses testes antecipadamente. É importante ressaltar que você poderá participar desta pesquisa mesmo que não autorize a armazenar o material que restou. Se você decidir mais tarde que não deseja ter este material armazenado para uso futuro, você poderá entrar em contato a qualquer momento com a equipe da pesquisa para que suas amostras sejam destruídas, sem ter que explicar as suas razões para fazê-lo.

## BENEFÍCIOS

Você não será remunerado por sua participação e esta pesquisa poderá não oferecer benefícios diretos a você. Se você concordar com o uso de suas informações e/ou do material do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes desta pesquisa.

O benefício principal da sua participação é possibilitar que no futuro, com os resultados alcançados com esta pesquisa, o diagnóstico e o tratamento para esse tipo de câncer beneficiem outros pacientes.

## RISCOS

Não existem riscos físicos adicionais a você pela sua participação nesta pesquisa. Os materiais utilizados nessa pesquisa serão somente aqueles considerados excedentes dos coletados para exames laboratoriais de rotina para o diagnóstico do seu tumor. Os riscos físicos e inconvenientes não serão diferentes daqueles previstos durante os procedimentos normais para a obtenção de amostras biológicas para o diagnóstico da sua doença.

O seu médico irá informá-la em detalhes sobre os riscos associados aos procedimentos adicionais de biópsia e da coleta de sangue, uma vez que o nível do risco dependerá de onde o(s) tumor(es) está(ão) localizado(s) no seu corpo. De maneira geral, fazer uma biópsia causa dor, inchaço, sangramento e/ou infecção no local onde a agulha da biópsia penetra na sua pele; se seu médico decidir usar anestesia, pode ocorrer reação alérgica.

Os prováveis riscos e efeitos adversos (efeitos danosos) de se realizar uma biópsia incluem: sangramento e dor no local onde a agulha foi inserida, um inchaço debaixo da pele que contém sangue (hematoma), sonolência, se você optar por receber um analgésico e/ou

medicamento que faça você relaxar. De maneira menos provável, porém de riscos sérios, os efeitos colaterais em se submeter a uma biópsia incluem: infecção, falta de ar, baixa frequência cardíaca e baixa pressão arterial, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. Os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha.

## CUSTOS

Se você concordar com o uso da parte de seu tumor e/ou sangue armazenados e/ou das informações do seu prontuário como descrito acima, você não terá quaisquer custos ou despesas (gastos) pela sua participação nessa pesquisa. Você não pagará por qualquer procedimento, medicação em estudo ou teste exigido como parte desta pesquisa.

## CONFIDENCIALIDADE

Se você optar por participar desta pesquisa, as informações sobre a sua saúde e seus dados pessoais serão mantidas de maneira confidencial e sigilosa. Seus dados somente serão utilizados depois de anonimizados (ou seja, sem sua identificação). Apenas os pesquisadores autorizados terão acesso aos dados individuais, resultados de exames e testes bem como às informações do seu registro médico. Mesmo que estes dados sejam utilizados para propósitos de divulgação e/ou publicação científica, sua identidade permanecerá em segredo.

## TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento desta pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação nesta pesquisa.

## BASES DA PARTICIPAÇÃO

A sua participação é voluntária e a recusa em autorizar a sua participação não acarretará quaisquer penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito, ou mudança no seu tratamento e acompanhamento médico nesta instituição. Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento sem qualquer prejuízo. Em caso de você decidir interromper sua participação na pesquisa, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta de amostras e o seu uso para os exames relativos à pesquisa será imediatamente interrompida.

## ACESSO AO RESULTADOS DE EXAMES

Você pode ter acesso a qualquer resultado relacionado à esta pesquisa. Estes resultados serão enviados ao seu médico e ele os discutirá com você. Se você tiver interesse, você poderá receber uma cópia dos mesmos.

## GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

A pessoa responsável pela obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido lhe explicou claramente o conteúdo destas informações e se colocou à disposição para responder às suas perguntas sempre que tiver novas dúvidas. Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e inclusive para tomar conhecimento dos resultados desta pesquisa. Neste caso, por favor, ligue para Ilan Andrade Pedrosa no telefone (081) 99615-5594 de 09:00 – 18:00 h. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências de Saúde, que está formado por profissionais de diferentes áreas, que revisam os projetos de pesquisa que envolvem seres humanos, para garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos as pessoas que se voluntariam à participar destes.

Este termo está sendo elaborado em duas vias, sendo que uma via ficará com você e outra será arquivada com os pesquisadores responsáveis.

## CONSENTIMENTO

Li as informações acima e entendi o propósito da solicitação de permissão para o uso das informações contidas no meu registro médico e de parte de meu tumor e/ou meu sangue obtidos durante o atendimento nesse hospital. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas

Ficaram claros para mim quais são procedimentos a serem realizados, riscos e a garantia de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos dados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo.

Entendo que meu nome não será publicado e toda tentativa será feita para assegurar o meu anonimato.

Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

(  ) Eu concordo em participar desta pesquisa e **CONCORDO** em ter minhas amostras armazenadas e utilizadas para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA e para isto deverei assinar no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, se eu concordar.

ou

(  ) Eu concordo em participar desta pesquisa, mas **NÃO CONCORDO** em ter minhas amostras armazenadas para uso em pesquisas futuras.

Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar nesta pesquisa.

Nome e Assinatura do participante

Data: / /

Nome e Assinatura do Responsável Legal/Testemunha Imparcial

Data: / /

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo mesmo. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação desta pesquisa.

Nome e Assinatura do Responsável pela obtenção do Termo

Data: / /

## ANEXO II

**FICHA DE DADOS DOS PACIENTES****I.) DADOS DO PACIENTE**

1. NOME:

PRONTUÁRIO:

2. DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_ anos

3. SEXO:  M  F4. ETNIA: BRANCO  PRETO  AMARELO  PARDO  INDIGENA 

5. ESCOLARIDADE:

 SEM ESCOLARIDADE OU CURSO FUNDAMENTAL INCOMPLETO ENSINO FUNDAMENTAL COMPLETO E MÉDIO INCOMPLETO ENSINO MÉDIO COMPLETO E SUPERIOR INCOMPLETO ENSINO SUPERIOR COMPLETO6. HISTORIA FAMILIAR DE CÂNCER? S  N 

SE SIM, QUAL? \_\_\_\_\_

**II.) COMORBIDADES**7. DM: S  N HAS: S  N 

OUTRAS: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

8. MEDICAMENTOS EM USO: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

9. TABAGISMO:  S  N

TEMPO DE USO:

CARGA

TABÁGICA:

QUAL? (PALHA, CACHIMBO, CIGARRO COMUM...):

---

10. ETILISMO: S  N  TEMPO DE USO: DRINKS/SEMANA:

### III.) DADOS DO EXAME FISICO AO DIAGNÓSTICO

11. PERFORMANCE STATUS (PS):

0  1  2  3  4

12. PESO:\_\_\_\_\_ ALTURA:\_\_\_\_\_ IMC:\_\_\_\_\_

### IV.) DADOS DO TRATAMENTO REALIZADO

13. DATA DO PROCEDIMENTO:\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (DD/MM/AA)

QUAL PROCEDIMENTO REALIZADO? \_\_\_\_\_

NÚMERO DO BLOCO:

14. QUIMIOTERAPIA:

INICIO:\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (DD/MM/AA)

TÉRMINO:\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (DD/MM/AA)

ESQUEMA/PROTOCOLO: \_\_\_\_\_

15. ESTADIAMENTO CLINICO:

ESTADIAMENTO CIRURGICO:

16. TIPO HISTOLÓGICO:

GRAU HISTOLÓGICO:

### V.) DADOS LABORATORIAIS AO DIAGNOSTICO

- HEMOGLOBINA:\_\_\_\_\_g/dL

- NEUTRÓFILOS: \_\_\_\_\_mm<sup>3</sup>

- PLAQUETAS: \_\_\_\_\_mm<sup>3</sup>

- CREATININA: \_\_\_\_\_mg/dL

- BILIRRUBINA TOTAL: \_\_\_\_\_mg/dl

- AST: \_\_\_\_\_UI/L

- ALT: \_\_\_\_\_UI/L

- ALBUMINA: \_\_\_\_\_g/dL

- COLESTEROL TOTAL: \_\_\_\_\_mg/dL

- LDL: \_\_\_\_\_mg/dL

- TRIGLICERIDEOS: \_\_\_\_\_mg/dL

- 25OH VITAMINA D: \_\_\_\_\_UI/L

- DHL: \_\_\_\_\_UI/L

- FOSFATASE ALCALINA: \_\_\_\_\_UI/L

- CEA: \_\_\_\_\_UI/mL

**VI.) EXAMES DE ESTADIAMENTO:**

---

---

---

---

---

---

---

---