



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

THAYANNE MACEDO PINHEIRO

PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO SORO DE PACIENTES
COM CÂNCER GÁSTRICO

BELÉM-PA
2017

THAYANNE MACEDO PINHEIRO

PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO SORO DE PACIENTES
COM CÂNCER GÁSTRICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Dra. Danielle Queiroz Calcagno

BELÉM-PA
2017

THAYANNE MACEDO PINHEIRO

PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO SORO DE PACIENTES
COM CÂNCER GÁSTRICO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina, aprovado o com
conceito _____.

Belém (PA), 08 de fevereiro de 2017.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno
ICB-UFPA
(Orientadora)

Profa. Dra. Dielly Catrina Favacho Lopes
ICB-UFPA
(Avaliadora)

Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha
ICB-UFPA
(Avaliadora)

Prof. Dr. Francisco Acácio Alves
ICB-UFPA
(Suplente)

*“Por vezes sentimos que aquilo
que fazemos não é se não uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor
se lhe faltasse uma gota.”*

Santa Teresa de Calcutá

Dedico essa monografia a minha família:

Maria dos Santos Macedo, Raimundo Nonato
Pinheiro, Thiago Rodrigo Macedo Pinheiro, Maria
Gorete Pinheiro Martins, Rita Queiroz, Keize
Lorennna M. dos Passos e Maria das Graças Pinheiro.

Agradecimentos

As plantas precisam de cultivo para florescer, cada espécie precisa de cuidados diferenciados para se adaptarem a lugares com clima e solo diferentes. Quanto maior a dedicação no cultivo, melhor será o aroma e mais variadas serão as cores.

Assim como as plantas, são as pessoas, se alguém consegue crescer é porque teve a ajuda de outras pessoas, que investiram amor, dedicação e ensinamentos.

Agradeço a todos que regaram a minha vida de carinho, apoio nos momentos difíceis, que me fizeram ter fé e coragem para seguir o meu caminho. Em especial, gostaria de agradecer a:

Deus, pelo dom da vida.

Minha família, em particular meus pais, minha avó e tios, pelo amor, incentivo e compreensão.

Minha orientadora, Profa. Dra. Danielle Calcagno, pela confiança, dedicação e paciência.

Minhas amigas Luana Paula, Maria de Lourdes, Mayara Gisele e Raymara Pimenta, que sempre estiveram do meu lado, apesar da distância.

Turma de Biomedicina, em especial, aos meus amigos, Vivianne Araújo, Ritiane Caetano, João Marcos, Dayse Minelle, Ana Paula Tromps e Carla de Lima, que me fizeram acreditar no meu sonho e seguir em frente.

Companheiras de laboratório, Fernanda Jardim, Kelly Cristina e Nina Nayara que acreditaram em mim.

Todos os professores, desde o primário ao ensino superior, que contribuíram com seus conhecimentos, ensinando não apenas o conteúdo, mas a ser cidadão.

Todas as pessoas que não foram citadas aqui, mas que foram importantes em diferentes fases da minha vida, minha eterna gratidão.

Lista de Figuras

Figura 1 - Regiões anatômicas do estômago	1
Figura 2 - Aspecto microscópico dos tipos histológicos de Lauren	3
Figura 3 - Mecanismo de reconhecimento do antígeno e função efetora do linfócito T-auxiliar na resposta imunológica adaptativa	9
Gráfico 1- Distribuição dos pacientes com câncer gástrico de acordo com suas características clinicopatológicas	20
Figura 4 - Famílias de quimiocinas	12
Figura 5 - Etapas do ensaio de expressão de proteínas pelo sistema MAGPIX	18

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1 - Classificação do pTNM patológico para o câncer gástrico	4
Tabela 2 - Agrupamento segundo o estadiamento do câncer gástrico	5
Quadro 1 - Principais características e funções das células imunológicas diferenciando células do sistema imune inato e adaptativo	10
Quadro 2 - Características de interleucinas, quimiocinas e fatores de crescimento	14
Quadro 3 - Classificação dos pacientes de acordo com suas características clinicopatológicas	20
Tabela 3 - Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico (Paciente) e voluntários saudáveis (Controle)	21
Tabela 4 - Quantificação de citocinas no soro de pacientes com CG e características clinicopatológicas	23

Lista de Abreviaturas

AFP	Alfa-fetoproteína
AJCC	American Joint Committee on Cancer
CA	Antígeno de carboidrato
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CG	Câncer gástrico
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GCSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HUJBB	Hospital Universitário João de Barros Barreto
IFNG	Interferon gama
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP-10	Proteína-10 induzida por interferon
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MPC1	Transportadora de piruvato mitocondrial 1
NK	Natural killer
PAMP	Padrão molecular associado à patógeno
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
TNF	Fator de necrose tumoral
UICC	Union of International Cancer Control
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Resumo

O câncer gástrico é o quinto tipo de câncer mais frequente e a terceira principal causa de morte por câncer no mundo. As altas taxas de morbidade e mortalidade do câncer gástrico resultam principalmente do diagnóstico tardio que ocorre devido à ausência de sintomas ou à presença de sintomas não específicos nos estágios iniciais da doença. O estudo contínuo de novas estratégias para o diagnóstico precoce e identificação de biomarcadores é de grande interesse nesse tipo neoplásico. Os biomarcadores tumorais em sua maioria são proteínas ou peptídeos produzidas diretamente pelo tumor ou pelo organismo e, funcionam como indicadores da presença de câncer. No presente estudo, foram analisadas a expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento 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, GCSF, GM-CSF, IFNG, IP-10, MPC1, MIP1 α , PDGFbb, MIP1 β , RANTES, TNF α e VEGF no soro de 16 pacientes com câncer gástrico em diferentes estádios clínicos e de 13 voluntários saudáveis. As análises foram realizadas pelo sistema MAGPIX, baseadas em ensaios magnéticos multiplex com leitura por sistema de fluorescência. A análise de proteínas revelou aumento da expressão estatisticamente significativa de IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF e MIP1 α no soro de pacientes com câncer gástrico comparada com os níveis de proteínas no soro de voluntários saudáveis. Já com relação às características clinicopatológicas, observamos aumento dos níveis séricos de IL-5, IL-7, IL-10 e IL-17A no câncer gástrico do tipo difuso em comparação o tipo intestinal. Assim, podemos concluir que as proteínas IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF e MIP1 α são potenciais biomarcadores de câncer gástrico e que tumores do tipo difuso podem estar relacionados a uma maior resposta inflamatória em relação ao tipo intestinal.

Palavras-chave: câncer gástrico, biomarcadores, interleucinas, quimiocinas e fatores de crescimento.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	CÂNCER GÁSTRICO	1
1.2	ESTADIAMENTO PATOLÓGICO DO CÂNCER GÁSTRICO	3
1.3	BIOMARCADORES DO CÂNCER GÁSTRICO	6
1.4	INFLAMAÇÃO	7
1.4.1	Citocinas	11
1.4.1.1	Interleucinas	12
1.4.1.2	Quimiocinas	12
1.4.1.3	Fatores de crescimento	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	AMOSTRAS DE SORO	17
3.2	ANÁLISE DE INTERLEUCINAS, QUIMIOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO	17
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
4	RESULTADOS	19
4.1	PERFIL DOS PACIENTES	19
4.2	NÍVEIS SÉRICOS DAS CITOCINAS	21
5	DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	34
7	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER GÁSTRICO

O estômago é um dos principais órgãos do trato gastrointestinal, está localizado na região abdominal, abaixo do diafragma. Ele é dividido em quatro regiões anatômicas principais: cárdia, fundo, corpo e antro (Figura 1). A cárdia e o antro são revestidos por células foveolares secretoras de mucina que formam as pequenas glândulas. As glândulas antrais além de conter as células secretoras de muco, possuem células endócrinas como a célula G, que libera gastrina para poder estimular a secreção luminal de ácido pelas células parietais dentro do fundo e do corpo gástrico. Nessas duas regiões, as glândulas bem desenvolvidas contêm células que produzem e secretam enzimas digestivas como a pepsina (KUMAR et al., 2010).

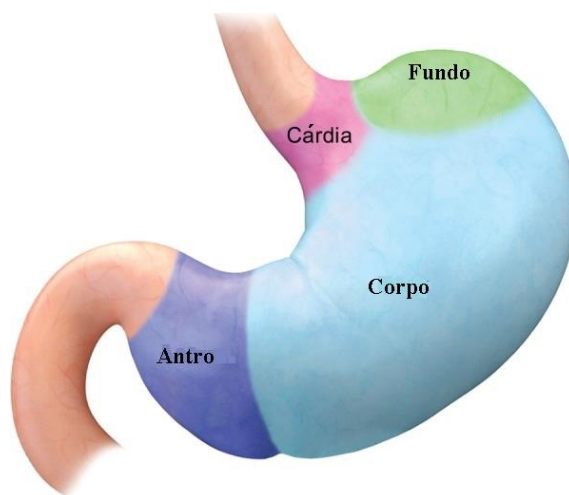


Figura 1– Regiões anatômicas do estômago. A imagem apresenta as quatro divisões do estômago: cárdia, fundo, corpo e antro. Adaptado de Kang et al (2013).

Entre os vários tipos de câncer que afetam os seres humanos, o câncer gástrico (CG) (CID-1º C16) ocupa a quinta posição quanto ao tipo tumoral mais frequente e constitui a terceira maior causa de morte por câncer no mundo (FERLAY et al., 2015). No Brasil, segundo as estimativas do INCA para 2016, o CG é o quarto mais incidente entre homens e o quinto entre as mulheres, excetuando-se o câncer de pele não melanoma.

O CG possui causa multivariada e os principais fatores de risco são: infecção por *Helicobacter pylori*, idade avançada, gênero masculino, dieta rica em alimentos salgados, defumados e em conserva, dieta pobre em frutas e vegetais, tabagismo, associação com outras doenças como metaplasia intestinal, gastrite crônica atrófica, anemia perniciosa, pólipos adenomatosos gástricos, gastrite hipertrófica gigante e histórico familiar de CG e polipose adenomatosa familiar (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2016).

O tumor gástrico pode estar presente entre a junção gastroesofágica e o piloro, acometendo diferentes camadas de tecido, como mucosa, submucosa, muscular, subserosa e serosa (KANG et al., 2013). Aproximadamente 95% dos tumores gástricos são adenocarcinomas, tendo origem na mucosa; cerca de 3% são linfomas, atingindo os linfonodos próximos, e poucos casos de leiomiossarcomas, que inicia em tecidos que dão origem aos músculos e aos ossos (INCA, 2016).

Os adenocarcinomas são classificados de acordo com estudos propostos por Lauren em 1965, em dois tipos principais: difuso e intestinal (Figura 2). O tipo difuso é pouco diferenciado, constituído de pequenas células não aderentes e difusamente dispersas, podendo apresentar células com núcleos periféricos em função da elevada produção de mucina. Já o tipo intestinal, é bem diferenciado e possui um padrão de crescimento expansivo, apresenta também coesão celular e células com núcleos irregulares e grandes. Há também em menor frequência o “padrão misto”, interposto entre os dois tipos histológicos (LAUREN, 1965).

O tipo intestinal é o mais frequente, depende de fatores ambientais e está associado à presença de lesões pré-cancerosas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia. Já o tipo difuso, apresenta pior prognóstico, o mesmo não está associado a lesões pré-cancerosas e apresenta um padrão de crescimento invasivo (HUNTSMAN et al., 2001).

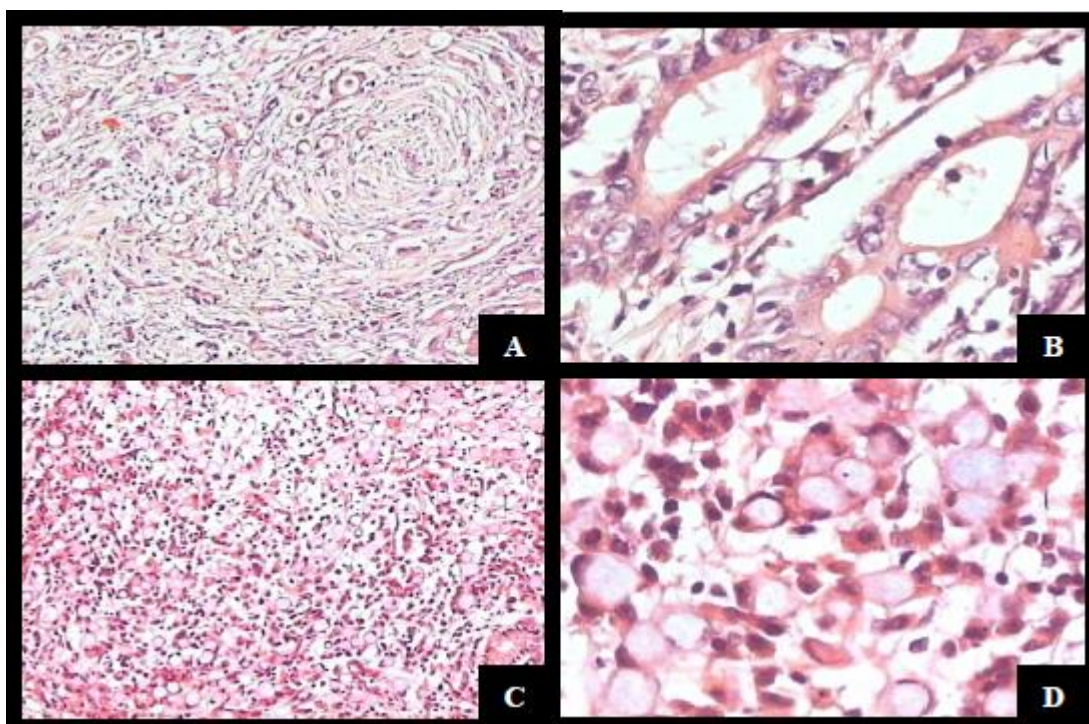


Figura 2- Aspecto microscópico dos tipos histológicos de Lauren marcados por hematoxilina e eosina (HE). No tipo intestinal, neoplasia forma glândulas desorganizadas, 200x (A); e as células neoplásicas formam cordões sólidos, 400x (B). No tipo difuso o tumor infiltra difusamente todas as camadas do estômago, e o melhor lugar para identificar a infiltração é a camada muscular, onde as células neoplásicas contrastam com as fibras musculares lisas, 200x (C); o excesso de muco produzido pelas células neoplásicas pode ser observado no citoplasma na forma de um grande vacúolo, que desloca o núcleo para a periferia, originando as células em anel de sinete, 400x (D) (LAURÈN, 1965).

Geralmente, os adenocarcinomas gástricos são diagnosticados em estágios avançados devido a falta sintomas da doença ou a presença de sintomas não específicos como vômitos, náuseas e desconforto abdominal persistente (BRENNER et al. 2009). Além disso, a sobrevida média cumulativa de cinco anos após o diagnóstico da doença é baixa, varia de 11-21% em países em desenvolvimento, como o Brasil (INCA, 2016). Assim, estudos que visem modificar esse panorama são necessários, contribuindo para um diagnóstico precoce e maior qualidade de vida dos pacientes.

1.2 ESTADIAMENTO PATOLÓGICO DO CÂNCER GÁSTRICO

O estadiamento dos tumores gástricos é determinado pela classificação pTNM, que é estabelecida pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e também pela *Union of*

International Cancer Control (UICC). É possível prever a sobrevivência dos pacientes com CG e definir tratamentos multidisciplinares de acordo com estadiamento da doença (KWON et al., 2016) (Tabela1).

Tabela 1 – Classificação do pTNM patológico para o câncer gástrico
(Adaptado da Classificação pTNM – UICC, 2013).

Tumor primário (pT)	
Tx	Tumor primário que não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria
T1	Tumor que invade a lâmina própria, mucosa muscular ou submucosa
T1a	Tumor que invade a lâmina própria ou mucosa muscular
T1b	Tumor que invade a submucosa
T2	Tumor que invade a muscular própria
T3	Tumor que penetra o tecido conectivo subseroso sem invasão do peritônio visceral ou de estruturas adjacentes. Tumores T3 também incluem aqueles que se estendem para o ligamento gastro-hepático ou no omento maior ou menor, sem perfuração do peritônio visceral cobrindo estas estruturas
T4	Tumor que invade a serosa (peritônio visceral) ou estruturas adjacentes
T4a	Tumor que invade a serosa (peritônio visceral)
T4b	Tumor que invade estruturas adjacentes, como baço, cólon transverso, fígado, diafragma, pâncreas, parede abdominal, glândula adrenal, rim, intestino delgado e retroperitônio
Linfonodos regionais (pN)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais
N2	Metástase em 3 a 6 linfonodos regionais
N3	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais
N3a	Metástase em 7-15 linfonodos regionais
N3b	Metástase em 16 ou mais linfonodos regionais
Metástase à distância (pM)	
MX	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

O estadiamento pode ser feito através da avaliação clínica ou patológica. Na avaliação clínica, é analisado a extensão do tumor através de exames radiográficos, endoscópicos e histológicos. Já o estadiamento patológico (pTNM) é feito através da análise macro e microscópica do tumor, observando a profundidade de invasão, comprometimento de linfonodos e metástase à distância. Na classificação pTNM são avaliados três parâmetros simultaneamente: extensão do tumor, se há envolvimento de outros órgãos pelo tumor primário (T); presença ou ausência de linfonodos comprometidos e a extensão das metástases em linfonodos regionais (N); presença ou ausência de metástase à distância (M) (GRAZIOSI et al., 2013) (Tabela 2).

Tabela 2 – Agrupamento segundo o estadiamento do câncer gástrico
(Adaptado da Classificação pTNM – UICC, 2013).

Estadiamento		Combinação pTNM	
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T1	N1	M0
	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
IIB	T1	N2	M0
	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
IIIA	T1	N3	M0
	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
IIIB	T4b	N0 ou N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
IIIC	T4b	N2 ou N3	M0
IV	T4a	N3	M0
	Qualquer	Qualquer	M1

1.3 BIOMARCADORES DO CÂNCER GÁTRICO

As proteínas séricas identificadas diferencialmente entre pacientes com CG e controles saudáveis podem ser adotadas como biomarcadores tumorais para o diagnóstico precoce ou prognóstico desses pacientes (LIU et al., 2014).

Atualmente, os testes não invasivos para o CG fornecem relativamente baixa sensibilidade e especificidade, incluindo antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno carboidrato (CA) 19-9 e 72-4, e alfa-fetoproteína (AFP) (LIU et al., 2014).

O CEA é um antígeno encontrado nas células normais e neoplásicas da mucosa gástrica dos pacientes com CG, sendo a maior síntese feita pelas células neoplásicas (BRUHN et al., 2008). Atualmente, o CEA é considerado como o mais importante biomarcador de proteína sérica para identificar precocemente pacientes com risco de desenvolver CG. No entanto, o CEA sérico não apresenta sensibilidade e especificidade para o CG, pois pode ser indicativo da gênese de vários tipos tumorais (JIN et al. 2015).

CA 19-9 é uma mucina de alto peso molecular com função na adesão celular, cujos níveis plasmáticos elevados foram encontrados principalmente em doentes com neoplasias malignas pancreáticas e biliares, e também com menor frequência em doentes com outras neoplasias gastrintestinais, como o CG (BRUHN et al., 2008).

No CG, CA 19-9 é importante para prever o estadiamento da doença. Interessantemente, níveis elevados no soro de pacientes com CG dois meses após 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 (CAINAP et al., 2015).

Na literatura, o CA 72-4 pareceu ser o marcador mais sensível e específico em pacientes com CG, 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 limitado nos aspectos de sensibilidade em torno de 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).

Elevados níveis séricos de AFP no soro é associado ao mau prognóstico no CG, e pode predizer metástases hepáticas após a ressecção total. Também foi associado à metástases em linfonodos e invasão vascular (LIU et al., 2010; ZUO e JU, 2015).

Esses biomarcadores possuem baixa especificidade e sensibilidade para o CG. Por isso, é necessário o desenvolvimento de um teste de baixo custo e não invasivo para identificar os indivíduos em risco de CG para encaminhamento para biópsia endoscópica, isso poderia contribuir significativamente para melhorar a sobrevivência e reduzir a carga de custos de saúde associados a essa doença.

As modernas técnicas de proteômica para identificar novos e confiáveis biomarcadores tumorais no soro são uma ferramenta importante na tentativa de um diagnóstico precoce, além da possibilidade de auxiliar no prognóstico do paciente com CG. O ensaio imunoenzimático (ELISA) é a principal ferramenta para a detecção de proteínas de interesse em amostras biológicas para pesquisa e no diagnóstico clínico (HUMPHRIES et al., 2014).

O sistema *Luminex xMAP Technology*, além de oferecer os benefícios do ELISA, também permite maior rendimento, aumento da flexibilidade, volume reduzido da amostra e baixo 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. As recentes melhorias no *Luminex* inclui o novo sistema MAGPIX, o qual é mais barato e mais fácil de ser utilizado. Por este sistema, pode-se executar até 50 testes com um único volume de reação, permitindo assim, uma grande redução de gastos de amostras e reagentes, aumentando ainda a produtividade da análise (BAKER et al., 2012).

1.4 INFLAMAÇÃO

O câncer é uma doença da expressão descontrolada de genes, que se deve em parte, a condições que ultrapassam ou subvertem a conservada capacidade de estabilidade gênômica. Alterações físicas do genoma podem ocorrer ao acaso ou ser estimulada por infecções de patógenos específicos, ou até mesmo condições inflamatórias persistentes (HOFF, 2013).

Naturalmente, os indivíduos já possuem características que dificultam a entrada de micro-organismos, seus locais de interação como pele, trato gastrointestinal e respiratório são revestidos por epitélios contínuos que funcionam como barreiras para os micro-organismos do ambiente externo (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2011). Essas barreiras físicas junto com ação de células dendríticas, fagócitos e células *natural killer* (NK), constituem o sistema imune inato. Outro nível de defesa dos indivíduos é o sistema imune adaptativo, que também identifica e destrói os agentes infecciosos (DELVES et al., 2013).

A captura dos agentes infecciosos pelo sistema imune inato começa imediatamente após a entrada de um micro-organismo no corpo, através do reconhecimento de componentes conservados dos agentes infecciosos, como os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos). Após o reconhecimento de qualquer agente que contenha essas moléculas, é realizado o englobamento desses componentes ou ocorre a ação direta de proteínas (proteases). As principais células que atuam na resposta imune inata são macrófagos e neutrófilos. Essa resposta imediata e específica, às vezes, não é suficiente para eliminar os agentes infecciosos (DELVES et al., 2013).

A persistência do patógeno e as mudanças que ocorrem no ambiente celular decorrente da imunidade inata, ativam a resposta imune adaptativa, que é iniciada nos órgãos linfoides periféricos, como linfonodos, baço e tecidos linfóides da mucosa (MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

O sistema imune adaptativo é mais específico, e por isso a resposta imunológica demora mais tempo para se desenvolver. As respostas imunes adaptativas aumentam a cada contato com o agente infeccioso, isso ocorre porque as células criam uma memória imunológica. Essa resposta adaptativa é mediada principalmente por linfócitos T e B, ambos possuem receptores específicos em suas membranas plasmáticas que fazem o reconhecimento de antígenos apresentados pelos micro-organismos. Em seguida, sintetizam e liberaram citocinas, que podem estimular alguns mecanismos de imunidade e inflamação (Figura 3). Após o reconhecimento dos agentes infecciosos, os linfócitos se diferenciam e se multiplicam para combater os mesmos, e caso haja uma nova infecção pelo mesmo micro-organismo, este será reconhecido pelas células de memória. (DELVES et al., 2013; HOFF, 2013).

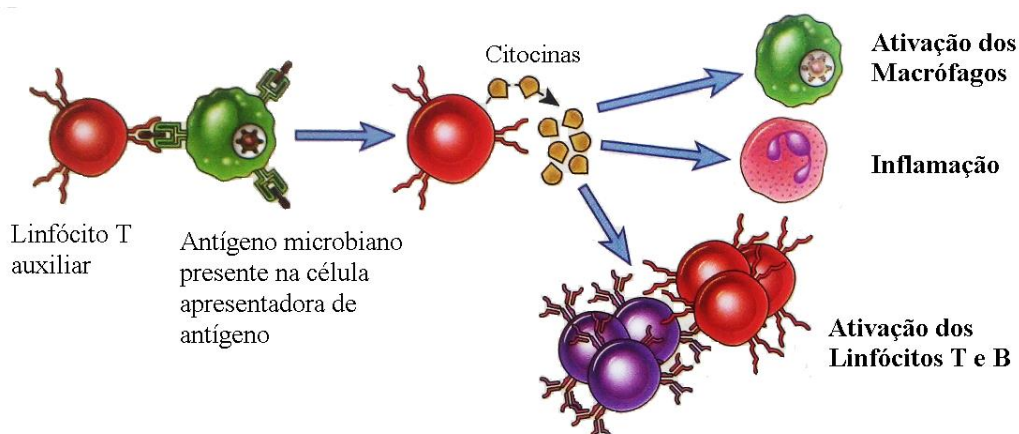


Figura 3 – Mecanismo de reconhecimento do antígeno e função efetora do linfócito T-auxiliar na resposta imunológica adaptativa. Adaptado de Abbas, Lichtman e Pillai (2011).

Os organismos vivos geralmente têm capacidade de restaurar seus danos teciduais, e quem é responsável por essa reparação é a inflamação. Quando o tecido é lesionado, desencadeia-se uma infecção e inflamação, promovendo a agregação de plaquetas no local da lesão, e estas vão liberar o PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), que por sua vez, vai alertar as células brancas do sistema imunológico a produzir os mediadores químicos, como citocinas, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano que vão orientar o processo de reparação tecidual (BARRETO, 2011).

Todas as células do sistema imune derivam de células tronco-hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea. Essas células pluripotentes se dividem e produzem dois tipos de células-tronco: progenitor linfóide e progenitor mielóide. O progenitor linfóide dá origem à células NK, linfócitos B e T, que participam da resposta imune. Já o progenitor mielóide dá origem à maioria das células dendríticas, aos granulócitos, eritrócitos e megacariócitos (MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010). O quadro 1 apresenta as funções das principais células que participam das respostas imunológicas.

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

A inflamação é um dos principais *hallmarks* do câncer. Esta favorece o crescimento tumoral, fornecendo fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que freiam a apoptose, fatores pró-angiogênicos, enzimas modificadoras de matriz extracelular que facilitam a angiogênese, assim como a invasão e metástase (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).

Quando o processo inflamatório persiste, o tecido acometido torna-se repleto de linfócitos e macrófagos, que sintetizam e liberam citocinas, espécies reativas de oxigênio

(EROs) e de nitrogênio (ERNs), que tornam o microambiente favorável para o surgimento de novos cânceres e para a progressão daqueles já estabelecidos (HOFF, 2013).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado uma forte ligação entre inflamação crônica e GC. Lukaszewicz-Zajac et al. (2016) demonstraram que a inflamação associada ao cancer é caracterizada pela infiltração de células imunológicas, incluindo leucócitos infiltrantes tumorais (TILs), citocinas e fatores de remodelação de tecidos. As células malignas também são capazes de liberar as quimiocinas e estimular células do sistema imunológico para constituir o microambiente inflamatório.

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, os quais são essenciais para a expressão de uma variedade de fatores pró-angiogênicos, fatores de crescimento, fatores anti-apoptóticos, quimiocinas e que juntos dão suporte à sobrevivência tumoral (MULTHOFF et al. 2012).

1.4.1 Citocinas

As citocinas são proteínas que atuam como mensageiros moleculares, permitindo que as células do sistema imunológico se comuniquem entre si para gerar uma resposta coordenada, robusta, mas auto-limitada a um antígeno alvo. Os efeitos de citocinas individuais na imunidade dependem de vários fatores, incluindo a concentração local de citocinas, o padrão da expressão de receptor de citocinas e a integração de múltiplas vias de sinalização nas respostas imunitárias de células (LEE et al., 2011).

As citocinas atuam, geralmente, próximo ao local onde foram produzidas, seja na mesma célula que secreta a citocina (ação autócrina) ou na célula adjacente (ação parácrina). Adicionalmente, quando produzidas em grande quantidade, as citocinas podem entrar na corrente sanguínea e atuar em locais distantes (ação endócrina) (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2011).

As citocinas 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 são divididas em grupos sendo os principais deles as interleucinas, quimiocinas e fatores de crescimento (HASEGAWA et al. 2016). No Quadro 2 podemos observar as características de algumas citocinas.

1.4.1.1 Interleucinas

O nome interleucina, seguido pelo número, foi criado para padronizar a nomenclatura das citocinas que atuam nos leucócitos, mas com a passar do tempo, foram descobertas muitas citocinas com características diferentes e isso tornou confuso a classificação (MURPHY, 2010).

Essa tipo de mediadores inflamatórios são sintetizados por células teciduais, macrófagos e principalmente por células T. Possuem várias funções, inclusive, muitas estão envolvidas na indução da divisão de outras células. Cada interleucina atua sobre um grupo limitado e específico de células que expressam receptores adequados para cada interleucina (NAOUM, 2001).

1.4.1.2 Quimiocinas

O termo quimiocina provém da contração de “citocina quimiotática”. São polipeptídios com cerca de 8 a 12kD. Existem aproximadamente 50 quimiocinas humanas que são classificadas em quatro famílias (CC, CXC, C e CX₃C), de acordo com o número e a localização dos resíduos de cisteína N-terminais (Figura 4) (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2011).

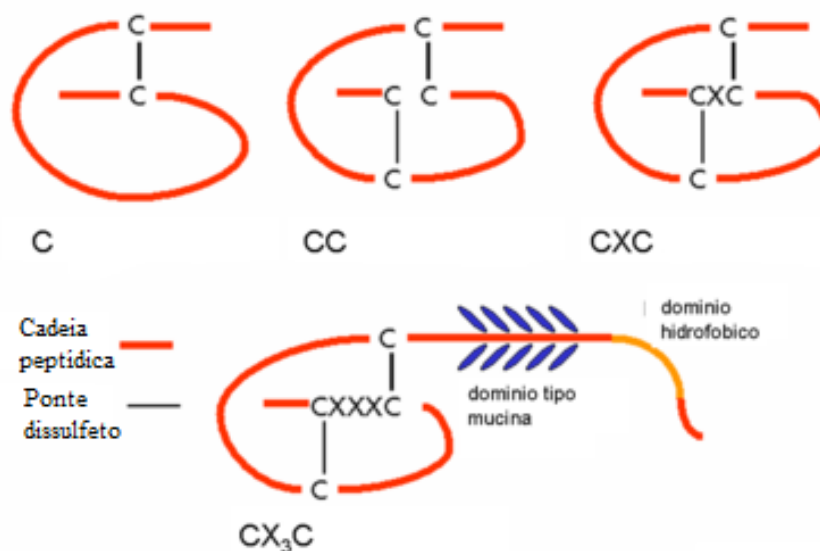


Figura 4- Famílias de quimiocinas. As quimiocinas são classificadas em quatro grupos, de acordo com número e a localização dos resíduos de cisteína N-terminais. Adaptado de: Kohidai, 2008.

As quimiocinas são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea para o local da infecção. As quimiocinas pró-inflamatórias são liberadas quando ocorre uma resposta imune em um sítio de infecção. As quimiocinas homeostáticas atuam no controle da migração celular durante o desenvolvimento ou manutenção dos tecidos (PALOMINO e MARTI, 2015).

É possível demonstrar em células tumorais, o papel das quimiocinas sobre os mecanismos que coordenam sua motilidade, sua direção de migração e sua capacidade de invasão e sobrevivência em sítios metastáticos (HOFF, 2013).

1.4.1.3 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são moléculas de sinalização capazes de instruir respostas celulares específicas em um ambiente biológico na tentativa de regenerar o tecido (LEE, SILVA e MOONEY, 2011). Essa resposta celular pode resultar em sobrevivência celular, controle de migração, diferenciação ou proliferação de um conjunto específico de células (CAO et al., 2009).

Assim que os fatores de crescimento são liberados, se inicia a transmissão de sinal. Esses fatores se ligam aos receptores de membrana específicos de células-alvo e instrui seu comportamento celular (LEE, SILVA e MOONEY, 2011). Uma série de eventos, como fosforilação de proteínas do citoesqueleto, fluxo de íons, expressão de genes e outros, traduz o sinal da ligação dos fatores de crescimento com a célula-alvo e leva a informação ao núcleo da mesma (COHEN, REN e BALTIMORE, 1995).

Todas as citocinas são produzidas por células do sistema imune em resposta à micro-organismos ou antígenos, agindo como mediadores inflamatórios. Enquanto muitas formas de comunicação do sistema imune ocorrem através de interação célula-célula, a secreção de citocinas permite a rápida propagação da sinalização imune de uma maneira eficiente e multivariada. Devido às suas funções e características biológicas, as citocinas possuem um papel fundamental no processo de inflamação (LEE et al., 2011).

Quadro 2- Características de interleucinas, quimiocinas e fatores de crescimento.

Citocinas		Síntese	Características	Referências
Interleucinas	IL-1 β	Produzida por macrófagos, monócitos, linfócitos e outros	Induz proteínas pró-inflamatórias e atua na hematopoiese	Razavi et al., 2015
	IL-1RA	Produzida por células epiteliais	Induz proteínas pró-inflamatórias	Perrier et al., 2006
	IL-2	Produzida por linfócitos T, células dendríticas e células NK	Atua na proliferação de linfócitos T ativados	Nelson, 2004; Waldmann, 2015
	IL-4	Sintetizada principalmente por 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	Sintetizada por células Th2	Atua na maturação, proliferação e ativação de eosinófilos	Flood-Page et al., 2007; Bentley et al., 1992
	IL-6	Produzida por Linfócitos B e T, eosinófilos e outros	Mediadora de eventos imunológicos e inflamatórios	Akdis et al., 2011; Trikha et al., 2013; Mumm e Oft, 2008
	IL-7	Produzida por 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	Sintetizada por linfócitos T	Tem efeito proliferativo sobre linfócitos T ativados e transformados	Donahue et al., 1990
	IL-10	Sintetizada por células T reguladoras	Atua como imunossupressor e regula a diferenciação e proliferação de células imunes	Saraiva e O'Garra, 2010; Asadullah et al., 2003
	IL-12	Produzida por células dendríticas e macrófagos	Estimula a produção de IFN α	Chan et al., 1992
	IL-13	Sintetizada por células T e NK	Participa da defesa contra helmintos e da resposta alérgica	Razavi et al., 2015; Abbas et al., 2009
	IL-15	Produzida por monócitos	Estimula a proliferação de células T	Razavi et al., 2015; Burton et al., 1994
	IL-17A	Sintetizada por células Th17	Faz o recrutamento de neutrófilos para as áreas infectadas	Infante-Duarte et al. 2000; Ye et al., 2001; Marti et al., 2009

Quadro 2- Características de interleucinas, quimiocinas e fatores de crescimento. (Cont.)

Citocinas		Síntese	Características	Referências
Quimiocinas	IL-8	Produzida por macrófagos, monócitos, neutrófilos e outros	Participa de respostas inflamatórias e doenças infecciosas	Chang et al., 2014; Ren et al., 2001
	MIP1 α	Sintetizada por macrófagos	Atividade quimiotática envolvendo monócitos, linfócitos e outros	Ding et al., 2014; Choi et al., 2000
	MIP1 β	Sintetizada por macrófagos	É um quimioatraente de monócitos e células NK	Nath et al., 2006
	Eotaxin	Produzida principalmente por eosinófilos	Participa de respostas alérgicas	Ponath et al., 1996
	IP-10	Secretada por monócitos e outros tipos celulares	Faz recrutamento de linfócitos sob condições inflamatórias	Bondar et al., 2014; Neville et al., 1997
	RANTES	Sintetizada principalmente por células T	Participa do recrutamento de leucócitos para o local da inflamação	Ignatov et al., 2006
	MPC1	Produzido por células endoteliais	Controla o metabolismo do piruvato mitocondrial	Li et al., 2016; Schell et al., 2014
Fatores de crescimento	GM-CSF	Produzido por células T e monócitos	Responsável pelo crescimento, diferenciação e aumento funcional de granulócitos e macrófagos	Lee e Margolin, 2011; Beales, 2002
	GCSF	Sintetizado por macrófagos e em pequena escala por monócitos e fibroblastos	Estimula a divisão e diferenciação de neutrófilos	Varella e Forte, 2001
	FGF basic	Produzido por adipócitos e outras células	Importante fator de divisão celular	Zhang et al., 2016
	PDGFbb	Sintetizado por plaquetas	Atua na angiogênese	Hannink et al., 2010
	VEGF	Produzido por células epiteliais	Atua na angiogênese e promove permeabilidade vascular	Cooper et al., 1999

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar proteínas relacionadas ao sistema imune candidatas a biomarcadores em pacientes com câncer gástrico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir um perfil clinicopatológico dos indivíduos participantes da pesquisa através de questionários e acompanhamento clínico;
- Quantificar e comparar as proteínas candidatas a biomarcadores (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, GCSF, GM-CSF, IFNG, IP-10, MPC1, MIP1 α , PDGFbb, MIP1 β , RANTES, TNF α e VEGF) no soro de pacientes com CG e de indivíduos saudáveis;
- Correlacionar os resultados obtidos com os dados clinicopatológico dos pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE SORO

Foram coletados 5mL de sangue em tubo com gel separador BD Vacutainer SST™ II Advance (Beckon Dickinson, Reino Unido) de cada paciente, totalizando 18 pacientes submetidos a gastrectomia no HUIBB, localizado em Belém, no Estado do Pará. No entanto, dois pacientes foram excluídos do trabalho por não terem sido diagnosticados com adenocarcinoma gástrico. Assim, o perfil da amostra foi realizado nos 16 pacientes com confirmação de adenocarcinoma gástrico e comparado com os dados clinicopatológicos.

Além disso, foram realizadas as coletas de 5mL sangue de 13 voluntários saudáveis, tais amostras serviram como controle negativo do estudo.

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 -80°C, para posterior determinação dos biomarcadores.

Foi realizado o seguimento clínico de todos os pacientes que fazem parte da pesquisa, utilizando o questionário de pesquisa (ANEXO I) preenchido de acordo com as informações fornecidas pelos pacientes e pelos prontuários médicos fornecidos pelo hospital.

Cabe ressaltar, que todos os indivíduos receberam informações quanto aos objetivos e protocolo da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre-esclarecido (TCLE) (ANEXO II), e que o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUIBB (095988/2015).

3.2 ANÁLISE DE INTERLEUCINAS, QUIMIOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO

O sistema MAGPIX foi utilizado para mensurar as proteínas candidatas a biomarcadores séricos em CG de acordo com a 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, FGF basic, GCSF, GM-CSF, IFNG, IP-10, MPC1, MIP1α, PDGFbb, MIP1β, RANTES, TNFα e VEGF), totalizando 27 proteínas.

O sistema MAGPIX é capaz de realizar análises qualitativas e quantitativas de proteínas e ácidos nucleicos. Os ensaios de detecção multiplex mensuram várias proteínas simultaneamente, cada proteína se liga a microesferas de cor específica, assim o dispositivo de leitura classifica cada conjunto de *beads* separadamente. Essas *beads* magnéticas são dispostas em monocamada e detectadas com um diodo emissor de luz (LED) (PERRAUT et al., 2014).

Os anticorpos de captura são acoplados às beads, que em seguida, vão reagir com as amostras que contém os biomarcadores de interesse. São realizadas várias lavagens para remover as proteínas que não foram ligadas, é adicionado um anticorpo de detecção biotintilado para criar um complexo sanduíche. O complexo de detecção final é formado com a adição do conjugado estreptavidina-ficoeritrina, que servirá como um indicador fluorescente (BIO-RAD, 2016) (Figura 5).

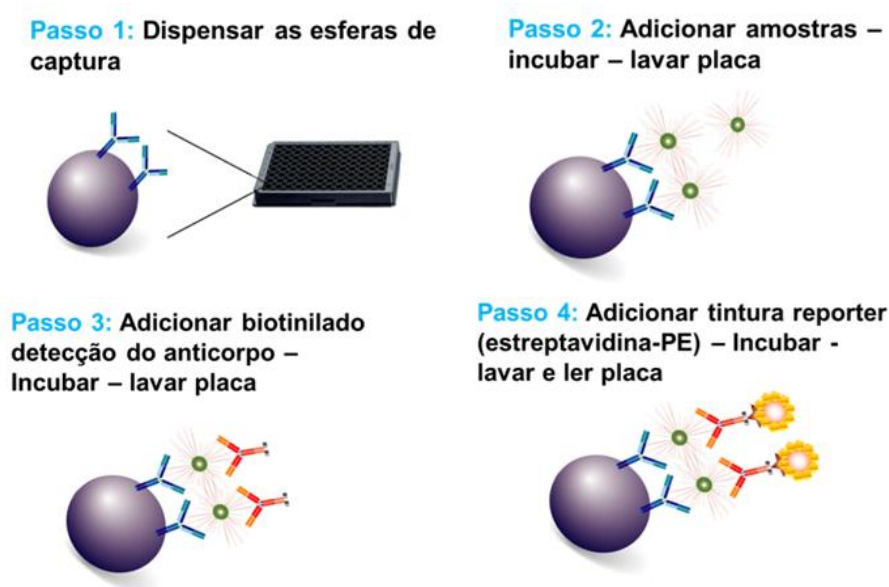


Figura 5- Etapas do ensaio de expressão de proteínas pelo sistema MAGPIX.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de comparação dos níveis séricos das citocinas no soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico foi realizada utilizando o teste não paramétrico Mann-Whitney para comparar com os níveis séricos de citocinas no soro de voluntários saudáveis e dos pacientes com adenocarcinoma gástrico, em seguida, associar com os dados clinicopatológicos. As diferenças estatísticas significantes foram consideradas quando $p < 0,05$ e os dados foram representados em mediana.

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL DOS PACIENTES

Foram incluídos no estudo, pacientes submetidos à ressecção cirúrgica no HUIBB e foram excluídos pacientes com tratamento prévio de quimioterapia e/ou radioterapia. Foram feitas as coletas de 18 pacientes, mas de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, somente as amostras de sangue de 16 pacientes com adenocarcinoma gástrico foram analisadas e comparadas com os dados clinicopatológicos fornecidos pelo hospital.

A média de idade foi de 55 anos (variando entre 34-74 anos), sendo a maioria com idade superior a 45 anos, e apenas 18,75% dos pacientes com idade menor ou igual a 45 anos (Quadro 3). Dos 16 pacientes, 81% pertencem ao gênero masculino e 19% ao feminino, em uma proporção de aproximadamente 4:1. (Gráfico 1A).

De acordo com a classificação de Lauren, 31,25% dos pacientes apresentaram adenocarcinoma do tipo difuso e 68,75% dos pacientes foram diagnosticados com tipo intestinal (Gráfico 1B). Quanto ao local, 12,5% dos pacientes apresentaram o tumor na região cárdia do estômago e 87,5% dos pacientes estavam com tumor no antro ou no piloro do estômago (Gráfico 1C).

Analisando os dados histopatológicos dos pacientes, obtivemos o pTNM, nenhum dos pacientes possuíam metástase. Quanto ao tumor primário, 12,5% dos pacientes eram T1, 12,5% dos pacientes apresentaram tumor tipo T2, 18,75% tinham tumor primário T3 e 56,25% dos pacientes apresentaram tumor primário do tipo T4 (Gráfico 1E). Já com relação ao número de linfonodos regionais, 37,5% pacientes não apresentaram metástase em linfonodos regionais (N0), 6,25% dos pacientes possuíam um ou dois linfonodos comprometidos (N1), 12,5% dos pacientes tinha de 3 a 6 linfonodos comprometidos (N2) e 43,75% pacientes apresentaram metástase em 7 ou mais linfonodos regionais (N3) (Gráfico 1F).

Após a análise do pTNM, foi realizado o estadiamento para o CG. Do total de 16 pacientes, 18,75% pertenciam ao estadiamento I da doença, 25% estavam no estadiamento II, 56,25% dos pacientes apresentaram estadiamento III e nenhum paciente se encontrava no estadiamento IV do CG (Gráfico 1D).

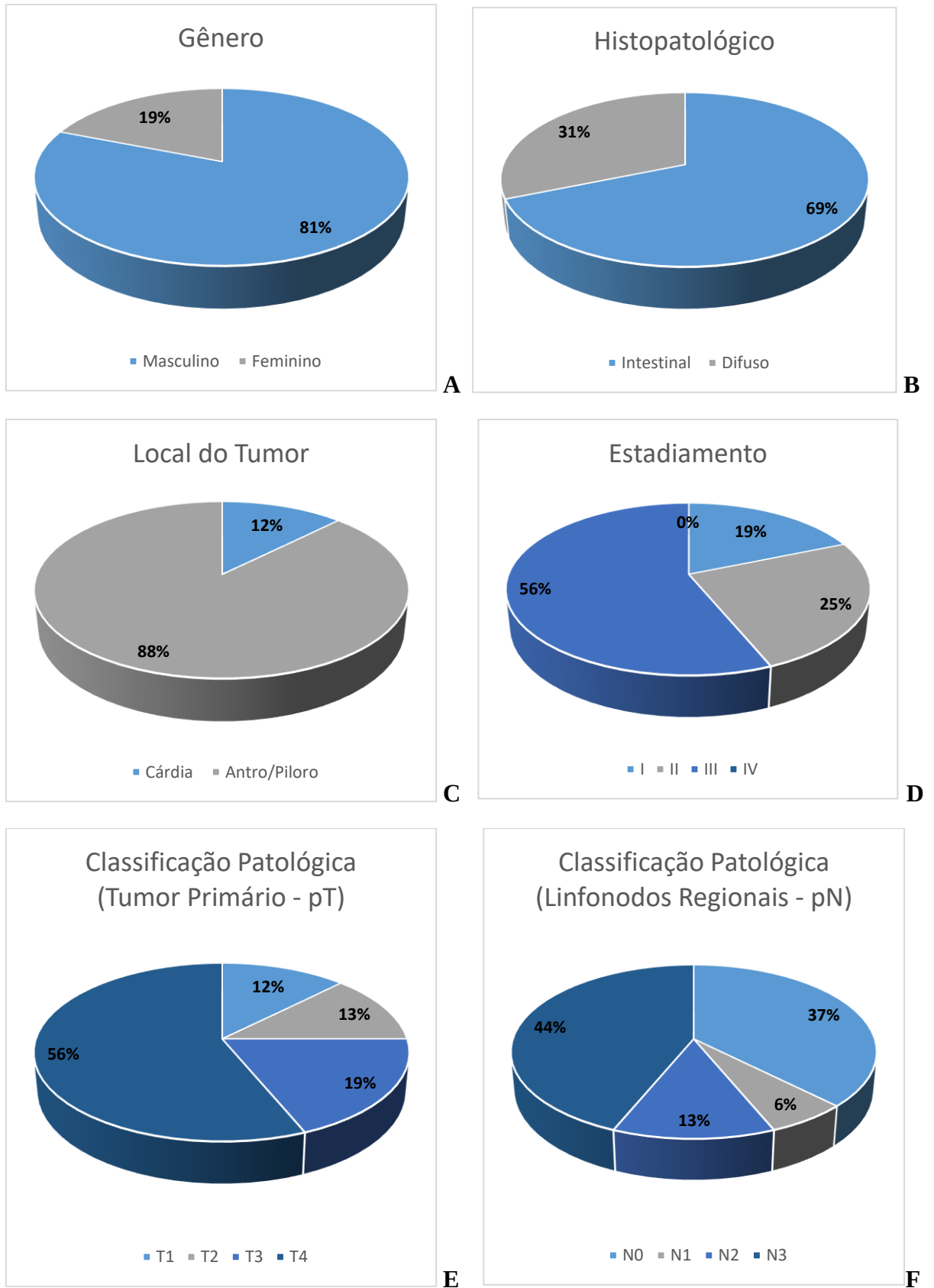


Gráfico 1–Distribuição dos pacientes com câncer gástrico de acordo com suas características clinicopatológicas. **A**, classificação por gênero. **B**, distribuição dos pacientes de acordo com a classificação de Lauren. **C**, classificação quanto ao local do tumor. **D**, distribuição de acordo com o estadiamento da doença. **E** e **F**, classificação patológica pT e pN, respectivamente.

Quadro 3- Classificação dos pacientes de acordo com suas características clinicopatológicas.

Características		Nº de Pacientes
Gênero	Homem	13
	Mulher	3
Idade	≤45	3
	>45	13
Local	Cárdia	2
	Antro/Piloro	14
Histopatológico	Difuso	5
	Intestinal	11
Estadiamento	I	3
	II	4
	III	9
	IV	0
T	T1	2
	T2	2
	T3	3
	T4	9
N	N0	6
	N1	1
	N2	2
	N3	7

4.2 NÍVEIS SÉRICOS DAS CITOCINAS

Comparando os níveis séricos de proteínas dos 16 pacientes com CG e 13 indivíduos saudáveis, houve um aumento das interleucinas IL-2 ($58,6 \pm 10,90$; mediana $\pm$ desvio interquartilico), IL-6 ($46,5 \pm 36,88$), IL-8 ($64,0 \pm 28,70$), IL-10 ($39,5 \pm 11,75$), fator de crescimento GM-CSF ($104,1 \pm 30,63$) e quimiocina MIP1 α ($39,5 \pm 12,00$) nas amostras de soro dos pacientes.

A análise de associação da quantificação de citocinas dos pacientes com CG e controles saudáveis pode ser observada na tabela 3.

Tabela 3- Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico (Paciente) e voluntários saudáveis (Controle).

Proteínas	Controle	Paciente	P
IL-17A	119,3±27,60	137,7±30,75	0,163
IL-1 β	45,5±6,85	50,5±8,50	0,111
IL-1RA	35,5±7,90	40,4±3,88	0,177
IL-2	49,0±11,25	58,6±10,90	0,027*
IL-4	63,5±16,15	78,0±28,20	0,308
IL-5	38,5±10,15	38,5±15,38	0,690
IL-6	36,3±6,90	46,5±36,88	0,002*
IL-7	18,3±4,00	20,2±4,63	0,268
IL-8	47,8±10,40	64,0±28,70	0,030*
IL-9	79,8±19,75	86,0±14,72	0,106
IL-10	33,5±4,75	39,5±11,75	0,037*
IL-12	50,0±12,90	59,5±16,25	0,132
IL-13	15,0±4,25	16,1±3,38	0,830
IL-15	54,8±12,25	61,5±33,68	0,088
Eotaxin	157,0±92,25	92,2±58,07	0,199
FGF basic	60,5±10,00	67,2±23,88	0,088
GCSF	48,0±7,15	53,5±7,00	0,059
GM-CSF	89,3±11,75	104,1±30,63	0,016*
IFNG	37,0±7,50	40,6±4,50	0,177
IP-10	416,0±489,75	542,7±265,50	0,595
MPC1	70,5±22,20	71,0±18,42	0,451
MIP1 α	33,8±6,25	39,5±12,00	0,044*
PDGFbb	2223,0±1320,60	2215,0±1303,95	1,000
MIP1 β	649,8±305,40	560,7±523,57	0,825
RANTES	21386,5±1054,85	20274,1±6352,38	0,069
TNF- α	49,0±7,85	54,7±10,63	0,298
VEGF	74,0±19,50	90,0±18,10	0,177

Em relação às características clinicopatológicas dos pacientes com CG, observamos diferença estatisticamente significativa da expressão das proteínas quanto ao tipo histológico de Laurén (Tabela 4). Observou-se aumento dos níveis séricos das proteínas 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, quando comparado ao tipo intestinal.

A análise de associação da quantificação de citocinas no soro de pacientes com CG comparando com suas características clinicopatológicas pode ser observada na tabela 4.

Tabela 4- Quantificação de citocinas no soro de pacientes com CG e características clinicopatológicas.

Características clinicopatológicas	IL-17A	p	IL-1β	P	IL-1RA	p	IL-2	p	IL-4	p	IL-5	p
Gênero												
Masculino	134±33	1	49,5±12,00	0,20	39,3±7,00	0,20	62±13,35	1	73,5±33,75	0,20	38±19,00	0,20
Feminino	150,5		51		41		58		82		41,5	
Idade												
≤45	123	0,20	48	0,20	38	1	52,3	1	77	1	38	0,20
>45	140±32,75		51±10,00		40,5±5,75		59,3±10,35		79±25,00		40,5±15,50	
Local												
Cárdia	162	0,70	63,25	0,70	54,4	0,70	67,75	0,81	76,4	0,93	49,75	0,150
Antro/Piloro	137,75±26,13		50,5±7,00		40,4±4,13		58,65±10,30		78±33,43		38±15,63	
Histopatológico												
Difuso	150,5±48,80	0,01*	51±19,00	0,10	42±18,65	0,69	62±19,25	0,23	81,3±11,25	0,14	49±12,75	0,02*
Intestinal	124±40,00		48±36,50		39,3±5,00		53,3±15,50		73,5±36,20		38±16,00	
Estadiamento												
I – II	141±41,30	1	51±10,50	1	41±7,50	1	62±23,00	1	79±18,00	1	48±19,50	0,31
III - IV	134±42,50		49,5±9,50		39,3±4,25		53±15,65		77±34,10		38±13,75	
T												
T1 - T2	143,25±85,60	1	51±30,38	0,56	41,5±31,60	0,56	67,5±29,88	1	80,15±37,70	0,56	44,75±37,25	0,56
T3 - T4	136,75±23,50		49,75±8,50		39,8±3,38		56,3±13,88		75,25±28,13		38±9,88	
N												
N0	145,75±43,30	0,60	51±14,50	0,60	41,5±12,60	0,60	60±15,30	1	80,15±11,50	0,60	48,5±16,63	0,11
N1 – N3	128,5±45,13		48,75±11,00		38,65±6,88		56,15±15,75		74,25±36,53		38±16,93	

Tabela 4- Quantificação de citocinas no soro de pacientes com CG e características clinicopatológicas.

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	1	20±5,00	0,20	73,3±63,75	0,20	88±14,50	1	39±13,00	1	65±16,85	0,20
Feminino	41,5		21		58		84		40		49,5	
Idade												
≤45	41,5	1	18,5	1	75,3	1	79	1	35,5	1	65	1
>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	1	26,25	1	117,25	0,46	108,65	1	81,5	1	65,75	1
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	0,82	22±32,25	0,03*	58,5±29,40	0,69	90±34,15	0,53	45,5±46,25	0,02*	66±19,50	0,39
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	1	21±15,50	1	56±27,30	0,31	84±11,50	1	44±12,50	0,31	61±18,20	1
III - IV	44±45,50		20±4,50		71,3±102,50		88±19,65		36,5±10,25		57±17,75	
T												
T1 - T2	52,5±71,25	1	27,75±45,75	0,56	53,75±27,88	0,56	82,5±47,48	0,56	42±69,63	0,56	55,65±20,30	0,56
T3 - T4	46,5±35,75		20±3,63		69,15±76,57		89±14,72		37,75±11,88		63±16,25	
N												
N0	54±39,50	0,60	21,5±23,88	0,60	57,25±27,35	0,60	87±24,20	1	44,75±29,50	0,11	63,5±16,50	0,60
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 4- Quantificação de citocinas no soro de pacientes com CG e características clinicopatológicas.

Características clinicopatológicas	IL-13	P	IL-15	P	Eotaxin	p	FGF basic	p	GCSF	p	GM-CSF	p
Gênero												
Masculino	16,3±5,00	1	61±44,65	1	86±73,25	1	62±27,65	1	53,5±12,75	1	103,8±47,50	1
Feminino	16		62		107		68		53		104,5	
Idade												
≤45	16	1	50,5	1	70	1	61,5	0,20	53	0,21	99	1
>45	16,3±4,50		62±24,55		98,5±65,65		69,5±25,65		55±7,25		104,5±23,00	
Local												
Cárdia	24,15	0,46	76	1	144,75	0,46	82,75	0,46	58,65	1	105,4	1
Antro/Piloro	16±2,38		61,5±21,80		85,65±59,23		64,25±15,08		53,5±7,00		104,15±19,63	
Histopatológico												
Difuso	16±10,40	0,53	63±24,90	0,25	107±116,00	0,86	70±22,40	0,39	57±9,40	0,09	106±20,25	0,39
Intestinal	16,3±3,00		58±41,30		86±59,50		62±25,00		53±13,30		99,8±57,50	
Estadiamento												
I – II	16±5,50	0,31	63±39,00	0,31	98,5±52,50	1	69,5±20,50	0,31	55±6,50	0,61	106±37,00	0,31
III - IV	16,5±3,00		57,5±29,90		85,3±76,25		62±29,90		53±10,65		99,8±43,85	
T												
T1 - T2	15,5±13,23	0,56	81±58,47	0,56	102,75±47,50	0,56	69,75±9,50	0,07	54±19,45	1	121,25±64,63	0,56
T3 - T4	16,4±2,88		59,5±20,85		85,65±82,63		61,75±28,97		53,5±7,00		101,8±11,63	
N												
N0	16±7,82	0,60	62,5±19,35	0,60	96,5±84,25	1	69±23,45	0,60	56±8,08	0,30	105,5±15,50	0,60
N1 – N3	16,4±3,50		59,25±47,22		91,9±67,88		64,25±27,45		53±13,97		101,8±68,18	

Tabela 4- Quantificação de citocinas no soro de pacientes com CG e características clinicopatológicas.

Características clinicopatológicas	IFNG	p	IP-10	p	MPC1	p	MIP1 α	p	PDGFbb	p
Gênero										
Masculino	40,5 $\pm$ 7,40	1	563 $\pm$ 316,40	0,20	71 $\pm$ 23,40	1	39 $\pm$ 18,00	1	2210 $\pm$ 1029,05	0,20
Feminino	41		397		71		40		2974	
Idade										
$\leq$ 45	40,5	1	528	1	68	1	39	1	2110	1
>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	0,46	76,75	0,93	155,75	0,26	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	0,25	580 $\pm$ 346,15	0,77	71 $\pm$ 27,40	0,42	40 $\pm$ 127,75	0,46	2517 $\pm$ 1948,15	0,61
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	1	563 $\pm$ 347,00	1	71 $\pm$ 27,50	1	40 $\pm$ 235,50	1	2216 $\pm$ 1508,00	1
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 - T2	40,5 $\pm$ 29,50	1	327,25 $\pm$ 471,22	0,56	71,5 $\pm$ 19,38	1	155,75 $\pm$ 403,10	0,56	2179,5 $\pm$ 2104,15	1
T3 - T4	40,65 $\pm$ 4,50		560,25 $\pm$ 226,63		69,5 $\pm$ 19,42		38,75 $\pm$ 8,13		2215 $\pm$ 1268,57	
N										
N0	40,5 $\pm$ 14,38	1	571,5 $\pm$ 276,83	0,60	68,5 $\pm$ 27,95	0,63	38,5 $\pm$ 75,00	1	2366,75 $\pm$ 1540,32	0,60
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 4- Quantificação de citocinas no soro de pacientes com CG e características clinicopatológicas.

Características clinicopatológicas	MIP1 β	P	Rantes	p	TNF- α	p	VEGF	p
Gênero								
Masculino	481 $\pm$ 500,75	0,20	20237 $\pm$ 4887,90	1	55,5 $\pm$ 12,75	1	90 $\pm$ 24,05	1
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	0,26	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	0,07	19111,3 $\pm$ 6419,25	0,86	56 $\pm$ 21,25	0,39	90,5 $\pm$ 23,80	0,23
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	0,31	19111,3 $\pm$ 9045,50	1	55,5 $\pm$ 14,50	1	90,5 $\pm$ 9,80	0,12
III - IV	481 $\pm$ 369,85		20311,3 $\pm$ 4644,40		54 $\pm$ 11,00		82,5 $\pm$ 29,15	
T								
T1 - T2	869,8 $\pm$ 2931,25	0,07	14947,2 $\pm$ 11661,90	0,56	51,5 $\pm$ 35,63	1	90,5 $\pm$ 7,35	0,26
T3 - T4	467,25 $\pm$ 426,55		20506,4 $\pm$ 1884,90		54,75 $\pm$ 7,38		85,75 $\pm$ 29,67	
N								
N0	865,9 $\pm$ 1685,50	0,60	19950,3 $\pm$ 4594,63	1	55,75 $\pm$ 15,88	0,60	90,9 $\pm$ 16,80	0,30
N1 – N3	509,25 $\pm$ 497,10		20274,1 $\pm$ 8445,45		53,5 $\pm$ 17,38		84,65 $\pm$ 26,45	

5 DISCUSSÃO

Muitos estudos já revelaram potenciais biomarcadores de soro para o CG, como antígeno carcinoembrionário (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carboidrato (CA) 19-9 e 72-4 e outros. Entretanto, esses não são biomarcadores séricos específicos para o CG e possuem baixa sensibilidade. A taxa de especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de adenocarcinoma gástrico é aproximadamente de 20% a 30%, respectivamente (SHIMADA et al., 2014; PECTASIDES et al., 1997; FAN e XIONG, 2011). Assim, é necessário a busca por biomarcadores mais específicos e sensíveis para o CG.

A interação entre as citocinas e as células neoplásicas é fundamental para a progressão bem sucedida de neoplasias gástricas. Vários estudos já demonstraram o papel significativo das interleucinas no desenvolvimento do CG (CHANG et al., 2014; TAHARA, 2008).

No presente estudo, observamos aumento sérico significativo de IL-2 ($58,6 \pm 10,90$; mediana $\pm$ desvio interquartil), IL-6 ($46,5 \pm 36,88$), IL-8 ($64,0 \pm 28,70$), IL-10 ($39,5 \pm 11,75$), GM-CSF ($104,1 \pm 30,63$) e MIP1 α ($39,5 \pm 12,00$) no soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico em relação aos indivíduos saudáveis.

A IL-2 (Interleucina-2) é uma citocina produzida por células T, predominantemente por T CD4⁺ e em menor grau por T CD8⁺, a síntese ocorre após a interação das células T com complexos mitogênicos ou antígeno-MHC, também pode ser produzida por células dendríticas e células NK. Tal síntese pode ser controlada por vários mecanismos, inclusive pelo silenciamento do gene *IL-2* (localizado em 4q26-27) pelos linfócitos B, induzido pela maturação da proteína 1 (BLIMP 1) (NELSON, 2004; WALDMANN, 2015).

A IL-2 é importante para a proliferação de linfócitos T ativados, com isso ativa fagócitos e aumenta o risco de morte celular. Ela também atua na terminação da resposta linfocitária induzindo a produção de células T supressoras (WANG et al, 1997; MALEK, 2003). Segundo Abbas et al. (2005), essa interleucina pode estimular a proliferação e diferenciação de células NK e promover a produção de citocinas derivadas de células NK, como TNF α , IFN γ e GM-CSF.

Corroborando nossos achados, Baik et al. (2012) observaram um aumento da IL-2 no soro dos pacientes com CG em comparação com indivíduos saudáveis. Além disso, os autores relataram que o nível elevado de IL-2 é um fator de mau prognóstico para os pacientes.

A IL-6 (interleucina-6) é uma citocina multifuncional produzida por células do sistema imune (células T e B) e células que não participam do sistema imune (células do músculo liso, condrócitos, osteoblastos, células glia e queratinócitos). Essa interleucina é conhecida como mediadora de eventos imunológicos e inflamatórios, e já demonstrou-se que pode ter um papel no desenvolvimento e na progressão de vários tipos de tumores (AKDIS et al., 2011; TRIKHA et al., 2013; MUMM e OFT, 2008).

A IL-6 é uma citocina inflamatória, promotora do crescimento e anti-apoptótica, é também um dos sinais efetores na promoção da carcinogênese (QI et al., 2014; NAUGLER et al., 2007; KINOSHITA et al., 2013). Walter et al. (2009) relataram o papel da IL-6 na promoção da migração e da invasão em células de tumor de mama.

O gene da *IL-6* está localizado no cromossomo 7p21 e existem três polimorfismos bem descritos neste gene (G ou C em -174 e em -572, G ou A em -597) que podem comprometer a função da proteína codificada. A associação desses polimorfismos com o risco de CG têm sido explorada em vários estudos (JUNLI et al., 2012).

Semelhante aos nossos resultados, Madej-Michniewicz et al. (2015) observaram níveis mais elevados da IL-6 no soro de pacientes com CG em comparação com indivíduos saudáveis. Esses autores também observaram maiores níveis de IL-6 em pacientes CG 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 CG avançado em relação CG precoce.

A IL-8 (interleucina-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).

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).

Kitadai et al. (2000) observaram a regulação positiva de IL-8 no soro de pacientes com CG. Essa quimiocina desempenha um papel importante na adesão, migração e invasão celular, logo, a superexpressão de IL-8 está associada ao desenvolvimento e metástase do CG. 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-10 (interleucina-10) é uma citocina que possui propriedades anti-inflamatórias, e é produzida por vários tipos celulares, sendo as células T reguladoras as principais responsáveis pela síntese (SARAIVA e O’GARRA, 2010).

Estudos demonstraram que a IL-10 pode atuar como um potente supressor, prevenindo doenças auto-imunes. Essa interleucina regula a diferenciação e proliferação de células imunes, como linfócitos T e B, células NK, células apresentadoras de antígenos e neutrófilos. Há também estudos que sugerem que IL-10 possui um papel imunoestimulatório na erradicação de infecções (SARAIVA e O’GARRA, 2010; ASADULLAH et al., 2003).

Em relação ao câncer, foi observado que a regulação positiva da produção de IL-10 exerce um grande influência no crescimento do tumor, na migração e na vigilância imunológica (JUNG et al., 2012; MA et al., 2011).

Altos níveis de IL-10 no soro foi observado em grande proporção em pacientes com câncer digestivo com mau prognóstico, principalmente CG (IKEGUCHI et al., 2009). Fortis et al. (1996) relataram níveis elevados de IL-10 no soro de pacientes com tumores hematopoiéticos e tumores sólidos, como o gástrico. Portanto, esses achados corroboram os nossos resultados obtidos no soro de pacientes com CG.

O GM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos) é produzido por células T e células monocíticas (LEE e MARGOLIN, 2011). É responsável pelo crescimento, diferenciação e aumento funcional de granulócitos e macrófagos. Essa citocina é um potente estimulante da proliferação celular, inclusive, existem dados que sugerem que ele estimula a proliferação de células não-hematopoiéticas (BEALES, 2002).

Alguns fatores de crescimento 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). As células que compõe a 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, curou 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 (proteína inflamatória de macrófagos 1 α) é uma quimiocina 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, pode estimular a atividade dos fagócitos e induzir a formação de osteoclastos em culturas de medula de rato (COOK, 1996; KUKITA et al., 1997).

A MIP1 α está principalmente associada à adesão celular e migração, visto que suas funções quimiotáticas envolvem monócitos, linfócitos, células dendríticas, eosinófilos e células NK, além de participar do processo inflamatório. Estudos relatam que essa quimiocina tem importantes implicações no crescimento e sobrevivência de mieloma múltiplo (CHOI et al., 2000).

Até o momento não há estudos na literatura que investigaram a quantificação de MIP1 α no tumor nem no soro de pacientes com CG. Portanto, o presente estudo foi o primeiro a descrever o aumento dessa quimiocina no soro de pacientes com CG.

Em relação às características clinicopatológicas, observamos diferenças nos níveis séricos das proteínas IL-17A, IL-5, IL-7 e IL-10, sendo mais elevadas no tipo difuso de Laurén em relação ao tipo intestinal. Entretanto, não há nada na literatura associando níveis elevados desses mediadores inflamatórios com o tipo histológico.

A IL-17A (interleucina-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; MARTI et al., 2009). 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 CG, e a frequência de células Th17 está intimamente relacionada com concentrações no soro de IL-17A em pacientes com CG. Além disso, as células Th17 e citocinas associadas estão presentes em níveis significativamente diferentes durante a progressão e metástase de CG.

A IL-5 (interleucina-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. (FLOOD-PAGE et al., 2007; BENTLEY et al., 1992).

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).

Interessantemente, Bartuzi et al. (2000) encontraram níveis séricos de IL-5 elevados em indivíduos infectados com *H. pylori* com gastrite crônica, um precursor do CG.

A IL-7 (interleucina-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).

A IL-7 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). E 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.

Resumidamente, demonstramos o aumento do nível sérico de IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF e MIP1 α no soro dos pacientes com CG. Adicionalmente, na análise de associação da expressão de citocinas e características clinicopatológicas dos adenocarcinomas estudados, observamos aumento dos níveis séricos de IL-5, IL-7, IL-10 e IL-17A nos pacientes com tipo histológico difuso.

6 CONCLUSÃO

De acordo com o presente estudo, podemos concluir que:

- A concentração das proteínas IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF e MIP1 α está aumentada no soro de pacientes com câncer gástrico.
- Os tumores do tipo difuso de Lauren podem estar relacionados a uma maior resposta inflamatória em relação ao tipo intestinal.

7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Cap. 2, p. 28-30.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. Cap. 1, p. 5-10, 41.
- AI-RAWI, M.; MANSEL, R.; JIANG, W. Interleukin-7 is a putative lymphangiogenic factor in endothelial cells. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 76, S166, 2002.
- AKDIS M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. **Journal Allergy Clinic Immunology**. v. 127. p. 701-721, 2011.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da célula**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 23, 1314 p.
- 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.
- ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. **Pharmacology Reviews**. v. 55. p. 241-269, 2003.
- BAIK, Y. H. et al. Can serum interleukin-2 receptor alpha predict lymph node metastasis in early gastric cancer? **Journal Korean Surgical Society**, 2012. p. 143-148.
- BAKER H. N. et al. Conversion of a capture ELISA to a Luminex xMAP assay using a multiplex antibody screening method. **Journal of Visualized Experiments**, jul. 2012. p. 1-7.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**. v. 392. p. 245-252, 1998.
- BARRETO, R. C. et al. O duplo papel da inflamação no surgimento das lesões cancerígenas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 14, n. 4, p. 107-114, 2011.
- BARTUZI, Z. et al. Evaluating the profile of selected cytokines in patients with food allergy and chronic gastritis. **Medical Science Monitor**. v. 6. p. 1128– 1135, 2006.
- BEALES, I. L. P. Effect of Interlukin-1 β on proliferation of gastric epithelial cells in culture. **BMC Gastroenterology**. v. 2. p. 1-8, 2002.
- BEEHARRY, M. K. et al. New blood markers detection technology: a leap in the diagnosis of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, jan. 2016. 22 v. p 1202-1212.
- 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 Cytokine, Chemokine and Growth factors Assays. Instruction Manual. Disponível em: < <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10014905.pdf> > Acesso em: 15 dez. 2016.
- BONDAR, C. et al. Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease. **Plos One**. p.e89068, 2014.
- BRENNER, H.; ROTHENBACHER, D.; ARNDT, V. Epidemiology of stomach cancer. **Cancer Epidemiology: Modifiable Factors**. p. 467-477, 2009.

- BRUHN, R. F. et al. Níveis dos marcadores CEA e CA 19-9 no soro e no lavado peritoneal na avaliação do comprometimento linfonodal do carcinoma gástrico. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**. v. 33. n. 3. P. 155-161, 2008.
- BURTON, J. D. et al. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T- cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cell. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 91. p. 4935-4939, 1994.
- CAINAP, C. et al. Classic tumor markers in gastric cancer. Current standards and limitations. **Clujul Medical**. v. 88, n. 2, p. 111-115, 2015.
- CAO, L. et al. Promoting angiogenesis via manipulation of VEGF responsiveness with notch signaling. **Biomaterials**. v. 30. p. 4085-4093, 2009.
- CASTRO, M. C. M. et al. Efeito da mitomicina C em polipose nasossinusal eosinofílica, in vivo: dosagem de IL5 e GMCSF, RT-PCR. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v. 72. n. 1. p. 38-42, 2006.
- CHAMAS, R. Biologia do câncer: uma breve introdução. In: HOFF, P. M. G. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. Cap. 1, p. 5.
- 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, W. J. et al. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**. v. 20. p. 4586–4596, 2014.
- 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, jun. 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.
- COHEN, G. B.; REN, R.; BALTIMORE, D. Modular binding domains in signal transduction proteins. **Cell**. v. 80. p. 237-248, 1995.
- COOK, D. N. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 59. p. 61-66, 1996.
- DELVES, P. J. et al. **Fundamentos de Imunologia**. 12ªed. Editora Guanabara, 2013. Cap. 1, p. 4-34.
- DIGEL, W. et al. Human interleukin-7 induces proliferation of neoplastic cells from chronic lymphocytic leukemia and acute leukemias. **Blood**. v. 78. p. 753–759, 1991.
- 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.
- 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.
- FAN, B.; XIONG, B. Investigation of serum tumor markers in the diagnosis of gastric cancer. **Hepatogastroenterology**. v. 58. p. 239–245, 2011.

- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**. p. E359-E386, 2015.
- FLOOD-PAGE, P. et al. (2007) 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.
- FORTIS, C. et al. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. **Cancer Letters**. v. 104. p. 1-5, 1996.
- GRAZIOSI, L. et al. Prognostic value of the seventh AJCC/UICC TNM classification of non-cardia gastric cancer. **World Journal of Surgical Oncology**. v. 11. n. 1. p. 1-7, 2013.
- GRETEN, T. F.; JAFFEE, E. M. Cancer vaccines. **Journal Clinical Oncology**. v. 17. p. 1047-1060, 1999.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 2011. v. 144, n. 5, p. 646-674.
- 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.
- HUMPHRIES J. M. et al. Identification and validation of novel candidate protein biomarkers for the detection of human gastric cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2014. p. 1051-1058.
- HUNTSMAN, D. G. et al. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. Nova Iorque: **Z Gastroenterology**, 2001. p. 149-151
- 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.
- IKEGUCHI, M. et al. Serum interleukin-6 and -10 levels in patients with gastric cancer. **Gastric Cancer**. v.12. p.95–100, 2009.
- 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.
- 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.
- INSTITUTO Nacional do Câncer. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 14 nov. 2016.
- 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.
- JU, D. et al. Interleukin-8 is associated with adhesion, migration and invasion in human gastric cancer SCG-7901 cells. **Medical Oncology**. v. 29. p. 91-9, 2012.
- JUNG, M. et al. Interleukin-10-induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin production in macrophages with consequences for tumor growth. **Molecular and Cellular Biology**. v. 32. p. 3938–3948, 2012.
- JUNLI, W. et al. Association of IL-6 polymorphisms with gastric cancer risk: Evidences from a meta-analysis. **Cytokine**. v. 59. p. 176-183, 2012.
- KANG, H. C. et al. Beyond the GIST: Mesenchymal tumors of the stomach. **Radiographics**. v. 33. n. 6. p. 1673-160, 2013.
- 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. Y. et al. Secretion of Biologically Active Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor by Transduced Gastric Cancer Cells. **Yonsei Medical Journal**. v. 49. n. 2. p. 279-287, 2008.
- KINOSHITA, H. et al. Interleukin-6 mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric tumorigenesis. **Plos One**. v. 8. p. e60914, 2013.
- 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.
- KITADAI, Y. et al. Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8. **Clinical Cancer Research**. v. 6. p. 2735-2740, 2000.
- KUAI, W. X. Interleukin-8 associates with adhesion, migration, invasion and chemosensitivity of human gastric cancer cells. **World Journal of Gastroenterology**. v. 18. p. 979-985, 2012.
- KUKITA, T. et al. Macrophage inflammatory protein-1 α (LD78) expressed in human bone marrow: its role in regulation of hematopoiesis and osteoclast recruitment. **Laboratory Investigation**. v. 76. p. 399-406, 1997.
- KUMAR, V. et al. **Robbins e Cotran, bases patológicas das doenças**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 260 e 782.
- KWON, O. K. et al. Validation of the 7th AJCC/UICC staging system for gastric cancer and a proposal for a new TNM system based on a prognostic score: a retrospective multicenter study. **Annals of Surgical Treatment and Research**. p. 295-302, 2016.
- LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma, an attempt at a histoclinical classification. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**. v. 64, p. 31-49, 1965.
- LEE S.; MARGOLIN, K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. **Cancers**. v. 3. p. 3856-3893, 2011.
- LEE, S. et al. Cytokines in cancer immunotherapy. **Cancers**, 2011. v. 3, 4 ed.
- LI, X. et al. MPC1 and MPC2 expressions are associated with favorable clinical outcomes in prostate cancer. **BMC Cancer**. v. 16. p. 894, 2016.
- LINDELL, D. M. et al. CXCL10/CXCR3 mediated responses promote immunity to respiratory syncytial virus infection by augmenting dendritic cell and CD8(+) T cell efficacy. **European Journal of Immunology**. v.38. p.2168–2179, 2008.
- LIU, W. et al. Serum proteomics for gastric cancer. **Clinica Chimica Acta**, 2014. p.179-184.
- 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.
- LUKASZEWICZ-ZAJAC, M. et al. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in comparison to other inflammatory proteins in gastric cancer (CG). **Journal Cancer Investigation**, 2016. v. 34. p. 305-312.
- 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. **Journal of Immunology**. v. 169. p. 3574- 3580, 2002.
- MA, Y. Y. et al. Interaction of coagulation factors and tumor-associated macrophages mediates migration and invasion of gastric cancer. **Cancer Science**. v.102. p. 336–342,2011.
- MADEJ-MICHNIEWICZ, A. et al. Evaluation of selected interleukins in patients with different gastric neoplasms: a preliminary report. **Scientific Reports**. p. 1-9, 2015.
- MALEK, T. R. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 74. p. 961–965, 2003.

- MARTI, L. et al. Alterations in cytokine profile and dendritic cells subsets in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients before and after biologic therapy. **Annals of New York Academy of Sciences**. v. 1173. p. 334-342, 2009.
- MULTHOFF, G.; MOLLS, M.; RADONS, J. Chronic Inflammation in Cancer Development. **Frontiers in Immunology**. V. 2, n. 98, fev. 2012.
- MUMM, J. B.; OFT, M. Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. **Oncogene**. v. 27. p. 5913–5919, 2008.
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 2 e 6, p. 83 e 321.
- NAOUM, P. C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 23, p. 15-23, 2001.
- 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.
- NATIONAL Cancer Institute. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/stomach/hp/stomach-treatment-pdq>>. Acesso em: 08 nov. 2016.
- 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.
- NCBI. IL7 interleukin 7 [*Homo sapiens* (human)]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3574>>. Acesso em: 11 jan. 2017.
- NELSON, B. H. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. **The Journal of Immunology**. v. 172. p. 3983–3988, 2004.
- PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Quimiocinas e imunidade. São Paulo: Einstein. v. 13. n. 3. 2015.
- PECTASIDES, D. et al. CEA, CA 19-9, and CA-50 in monitoring gastric carcinoma. **American Journal of Clinical Oncology**. v. 20. p. 348–353, 1997.
- PERRAUT, R. et al. Comparative analysis of IgG responses to Plasmodium falciparum MSP1p19 and PF13-DBL1 α 1 using ELISA and a magnetic bead-based duplex assay (MAGPIX®-Luminex) in a Senegalese meso-endemic community. **Malaria Journal**. v. 13. p. 410-421, 2014.
- 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.
- 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 c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. **Blood**. v. 98. p. 2778–2783, 2001.
- REN, Z. et al. Shift of the gastric T-cell response in gastric carcinoma. **Journal Gastroenterology and Hepatology**. v. 16. p. 142-148, 2001.
- SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**. v. 10. p. 170-181, 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.

- SHIMADA, H. et al. Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: a systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association. **Gastric Cancer**. p. 17:26–33, 2014.
- 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.
- 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.
- SOUSA, R. B.; CUNHA, F. Q. Inflamação e câncer. In: HOFF, P. M. G. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. Cap. 32, p. 434-439.
- SOUSA, R. B.; CUNHA, F. Q. Inflamação e câncer. In: HOFF, P. M. G. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. Cap. 32, p. 434-439.
- SUN, Z.; ZHANG, N. Clinical evaluation of CEA, CA19-9, CA72-4 and CA125 in gastric cancer patients with neoadjuvant chemotherapy. **World Journal of Surgical Oncology**. v. 12. p. 1-12, 2015.
- TAHARA, E. Abnormal growth factor/cytokine network in gastric cancer. **Cancer Microenvironment**. v. 1. p. 85–91, 2008.
- 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.
- VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. v. 24. p. 146-154, 2001.
- 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.
- WALTER, M. et al. Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. **Oncogene**. v. 30. p. 2745–2755, 2009.
- WANG, R.; CIARDELLI, T. L.; RUSSEL, J. H. Partial signaling by cytokines: Cytokine regulation of cell cycle and Fas-dependent, activation-induced death in CD4⁺ subsets. **Cell Immunology**. v. 182. p. 152–160, 1997.
- WAUGH, D. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**. v. 14. p. 6735-6741, 2008.
- 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.
- YUAN, A. et al. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. **Frontiers Bioscience**. v. 10. p. 853-865, 2005.
- ZHANG, Q. H. et al. Acidic and basic fibroblast growth factor expression levels in cervical cancer and their effects on tumor cell proliferation. **Genetics and Molecular Research**. v. 15. p. 1-9, 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. An analysis on clinical characteristics and prognosis of patients with serum alpha-fetoprotein-positive gastric cancer. **Minerva Medica**. 2015.

ANEXO I

Registro do NPO: _____



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Pesquisa em Oncologia

Painel de biomarcadores no soro de pacientes com câncer gástrico**PRONTUÁRIO**

Nome do Paciente: _____

Telefone para Contato: _____

Registro Hospitalar do Paciente: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Gênero: ☐ Masculino ☐ FemininoTipo Sanguíneo: TipoA ☐ Negativo ☐TipoB ☐ Positivo ☐TipoAB ☐TipoO ☐Anemia: ☐ Positivo ☐ Negativo

Valor de Hb: _____

Terapia antes da cirurgia: ☐ Sim ☐ Não

Qual? _____

Lesão Precursora: ☐ Gastrite ☐ *H. pylori*☐ Úlcera☐ Metaplasia☐ Pólipos

Local do adenocarcinoma:

PACIENTEEstado 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: ____/____/____

ANEXO II



**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 e 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”.

Eu discuti 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: _____