

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs,
RECEPTORES OX40 E CD40L, E DO AGREGADO DE
PLAQUETAS - LEUCÓCITOS NO CÂNCER GÁSTRICO**

MÁRIO RINO MARTINS

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interinstitucional em Oncologia da Fundação
Antônio Prudente em parceria com o Hospital de
Câncer de Pernambuco, para obtenção do título de
Doutor em Ciências
Área de Concentração em Oncologia**

Orientador: Dra. Maria Dirlei Begnami

Co-orientadora: Dra. Leuridan Cavalcante Torres

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Martins, Mário Rino

Análise da expressão de microRNAs, receptores OX40 e CD40L, e do agregado de plaquetas-leucócitos no câncer gástrico / Mário Rino Martins. São Paulo, 2019

117p.

Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Maria Dirlei Begnami

Descritores: 1. Neoplasias Gástricas/genética/Stomach Neoplasms/genetics, 2. MicroRNAs/MicroRNAs. 3. Receptores OX40/Receptors, OX40. 4. Plaquetas/Blood Platelets. 5. Ligante de CD40/CD40 Ligand. 6. Leucócitos/Leukocytes. 7. Biología Computacional./Computational Biology

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá (1944).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Mário (in memorian) e Cláudia*, que sempre me ensinaram a agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo.

À minha esposa *Rackel*, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Às minhas filhas *Beatriz e Gabriela*, que deram um sentido especial à minha existência e me têm proporcionado grandes momentos de alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é meu guia e me dá coragem para enfrentar a vida;

À minha orientadora **Dra. Maria Dirlei Begnami**, pela oportunidade de tê-la como orientadora;

À minha coorientadora **Dra. Leuridan Cavalcanti Torres**, por toda sua imensurável ajuda na execução desse trabalho, pela orientação, dedicação, paciência e, principalmente, pela amizade durante todo o processo;

Aos membros do programa de **pós-graduação da Fundação Antônio Prudente**, que foram sempre muito atenciosos e me auxiliaram no que fosse necessário;

À **Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo**, pelo apoio na realização deste projeto;

À **direção-geral do Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)** pelo apoio à realização do projeto;

À **Diretoria de Pesquisa do HCP**, pela oportunidade de participar deste programa cooperativo de pós-graduação;

Ao coordenador do Serviço de Cirurgia Oncológica, **Dr. João Alberto**, e aos colegas cirurgiões do Departamento de Cirurgia Oncológica do HCP, pelo auxílio e apoio na realização das pesquisas;

Aos **residentes de Cirurgia Oncológica do HCP**, pela dedicação e empenho ao desenvolvimento deste projeto;

A coordenação e equipe do **Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP**, por todo o apoio na realização deste trabalho;

Aos **amigos Kleber e Marina**, do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP, pelo auxílio na execução do trabalho, pelo apoio científico, críticas e sugestões;

À **Dra. Norma Lucena e Dra. Renata Almeida, do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz**, pela atenção sempre que necessário, pela ajuda nas análises e ensinamentos fundamentais para a realização deste trabalho;

Aos **enfermeiros do Bloco Cirúrgico do HCP**, pelo excelente suporte à coleta de material biológico;

Aos **Anestesiologistas Dr. Aumério Chagas e Dr. Lucas Lima**, pelo empenho e dedicação ao desenvolvimento deste projeto;

À enfermeira **Valéria Lúcia de Melo Lobo e Italaney Silva**, pelo apoio na coleta de dados, e professor **José Figueroa Natal**, pelo seu apoio nas análises estatísticas;

Aos amigos **Rogério Santos e Thales Paulo Batista**, pelo incentivo e sugestões;

Aos **colegas da turma do programa de doutorado do HCP/AC Camargo**. Com certeza as disciplinas foram mais “suaves” com o convívio de todos vocês;

Aos meus **familiares**, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo constante estímulo;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

RESUMO

Martins MR. **Análise da expressão de microRNAs, receptores OX40 e CD40L, e do agregado de plaquetas-leucócitos no câncer gástrico.** São Paulo 2019. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Hospital de Câncer de Pernambuco].

O prognóstico dos portadores de câncer gástrico tem melhorado pouco nas últimas décadas e o melhor entendimento das vias moleculares e as interações imunes no microambiente tumoral podem revelar novas possibilidades de tratamento. O ambiente tumoral é composto por células do sistema imune, que refletem a tentativa desse sistema em promover uma resposta antitumoral. Complexas interações entre células e mediadores imunes no microambiente tecidual regulam o crescimento de tumores, progressão, metástase e angiogênese. O entendimento das alterações da imunidade na população com câncer gástrico (CG) permitirá a intervenção terapêutica para melhorar a resposta à cirurgia e à quimioterapia. **Objetivo:** comparar a expressão de miRNA em tecidos de pacientes com câncer gástrico e controles saudáveis para encontrar miRNAs desregulados no câncer gástrico e usar ferramentas de bioinformática para determinar a possível influência desses miRNAs no sistema imunológico. Avaliar a formação de agregados plaquetas-leucócitos circulantes, bem como os níveis de ativação plaquetária (CD62p+, CD40L) desses conjugados a leucócitos em pacientes com CG. Quantificar a expressão de moléculas costimulatórias da resposta imune (OX40) em linfócitos T de pacientes com CG. **Métodos:** é um estudo do tipo corte transversal, exploratório e translacional realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco, Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira e Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do AC Camargo entre 2015 a 2018. Foram avaliados 83 pacientes com câncer gástrico e 69 controles. Foram determinados os níveis de expressão de microRNAs no tecido tumoral gástrico em comparação aos da mucosa gástrica normal por técnica de reação em cadeia da polimerase (qPCR - TaqMan). Foram realizadas as análises dos níveis linfócitos T e B, OX40, CD40L e

de agregado de plaquetas no sangue periférico por citometria de fluxo. **Resultados:** As análises revelaram um miRNA mais expresso (miR-196a-5p) e dois significativamente menos expressos (miR-374a-5p e miR-375) em comparação ao grupo controle. Pacientes com estágio IV (metástático) apresentaram uma diminuição significativa na expressão do miR-374-5p quando comparados aos pacientes não metastáticos ($p=0.03$). Com uso de plataformas de bioinformática, foram observadas várias vias que sofrem influência dos microRNAs desregulados e que interagem com genes envolvidos com a resposta imune celular, moléculas de adesão celular e migração celular. Foram encontrados níveis elevados de expressão de OX40 em linfócitos T, monócitos e neutrófilos de pacientes com neoplasia gástrica ($p<0.0001$), entretanto, os níveis de OX40 foram reduzidos nos grupos com neoplasia estágio III/IV quando comparados ao estágio I/II. Observamos níveis elevados de agregados de plaquetas-linfócitos T e plaquetas-linfócitos B no sangue de pacientes GC com estágio IV quando comparados com os estágios I, II e III, e grupo controle ($p <0,05$). Níveis reduzidos de agregados plaquetas-linfócitos totais com expressão de CD40L foram observados no estágio IV da doença ($p<0,05$). Níveis elevados de plaquetas ativadas e agregados de plaquetas-monócitos ativados (CD62p+) foram observados em pacientes GC quando comparados ao grupo controle ($p<0,05$). **Conclusão:** Os resultados deste estudo permitem concluir que existem alterações de mecanismos moleculares (miRNA) e celulares envolvidos na regulação e ativação da resposta imune, sendo associadas à progressão e metástase no GC.

Descritores: Neoplasias gástricas, MicroRNAs, Receptores OX40, Plaquetas, Ligante de CD40, Leucócitos, Biología Computacional.

SUMMARY

Martins MR. [**Analysis of the expression of microRNAs, OX40 and CD40L receptors, and platelets-leukocytes aggregation in gastric cancer**]. São Paulo 2019. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Hospital de Câncer de Pernambuco].

The prognosis of gastric cancer patients has not been improved in the last decades and the the understanding of the molecular immune pathways and how immune interactions happens on tumoral microenvironment, open new possibilities of treatment. The tumor environment is infiltrated by cells of the immune system, which reflect an antitumor response. Complex interactions between microenvironmental cells and mediators regulate tumor growth, progression, metastasis and angiogenesis. The knowledge of the immunity in the population with gastric cancer will allow therapeutic intervention to improve the response to surgery and the chemotherapy. Objective: our primary goal was to compare the miRNA expression in tissues from primary gastric cancer patients and healthy controls to find miRNAs dysregulated in gastric cancer and used bioinformatics tools to determine potential roles of these miRNAs in the immune system. We conducted a secondary analysis to evaluate the formation of circulating platelet-leucocyte conjugates as well as the CD40L levels conjugate to leucocytes in GC and finally, samples were analysed for levels of costimulatory molecules related to the immune response (OX40) in GC. Methods: A cross-sectional, translational and exploratory study carried out at the Hospital de Cancer de Pernambuco, Translational Research Laboratory of the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira and AC Camargo International Research Center (CIPE) from 2015 to 2018, involving 83 patients with gastric cancer and 69 controls. Expression levels of microRNAs in gastric tumor tissue and normal gastric mucosa were determined by polymerase chain reaction technique (qPCR - TaqMan). Analyzes of T and B lymphocytes, OX40, CD40L and platelet aggregate levels were performed in peripheral blood by flow cytometry. Results: The results revealed a more express miRNA (miR-196a-5p)

and two significantly less expressed (miR-374a-5p and miR-375) compared to the control group. Patients with stage IV (metastasis) showed a significant decrease in miR-374-5p expression when compared to non-metastatic patients ($p = 0.03$). Bioinformatics analysis suggested that the pathways regulated by these differentially expressed miRNAs were related to the immune response, cell adhesion, and cell migration. High levels of OX40 expression were found in T lymphocytes, monocytes and neutrophils of patients with gastric neoplasia ($p < 0.0001$); however, OX40 levels were reduced in groups with stage III / IV neoplasia when compared to stage I / II. We observed higher levels of platelet-T lymphocyte aggregate (P-T lymph) and platelet-B lymphocyte aggregate (P-B lymph) in the peripheral blood (PB) of GC patients with stage IV when compare with stages I-II-III, and control group ($p < 0,05$). Reduced levels of CD40L+ Platelet-total lymphocyte (P-lymph) were observed at stage IV of the disease ($p < 0.05$). High levels of CD62p+ platelets and CD62p+ platelets-monocyte aggregate were observed GC patients when compare to control group ($p < 0.05$). Conclusion: The results of this study allow us to conclude that there are alterations of molecular mechanisms (miRNA) and cellular mechanisms involved in the regulation and activation of the immune response and associated to the progression and metastasis in GC

Keywords: Stomach Neoplasm, MicroRNA, OX40 receptors, Platelets, Leucocytes, Computational Biology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência de câncer gástrico por região geográfica e sexo em 2018 ..	3
Figura 2	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, exceto pele não melanoma, estimados para 2018, por sexo, na região Nordeste do Brasil.....	4
Figura 3	Caracterização molecular do câncer gástrico	9
Figura 4	A biogênese do miRNA	11
Figura 5	Papel dos microRNAs na regulação do sistema imune	13
Figura 6	MicroRNAs que regulam o desenvolvimento e a função da resposta imune adaptativa	17
Figura 7	MicroRNAs participam na biogênese e progressão do câncer.....	19
Figura 8	Funções de vários membros da superfamília do TNF na inflamação, proliferação celular, apoptose e morfogênese	22
Figura 9	Visão geral da ação plaquetária.....	25

Figura 10	As plaquetas e sua relação com o sistema imune.....	27
Figura 11	Fluxograma de recrutamento dos pacientes com câncer gástrico e controles	38
Figura 12	Algoritmo de execução do programa miRwalk.....	46
Figura 13	Visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	48
Figura 14	Figura esquemática da estratégia de análise.....	50
Figura 15	Avaliando e interpretando os agregados plaquetas- leucócitos.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Aspectos epidemiológicos e clínicos dos tumores gástricos segundo classificação de Lauren	6
Quadro 2	Classificação histológica de acordo com a Organização Mundial da Saúde	7
Quadro 3	Exemplos de microRNAs envolvidos nos processos neoplásicos	18

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
APC	Células apresentadoras de antígenos
APRIL	do inglês, <i>Proliferation-inducing ligand</i>
BAFF	do inglês, <i>B-Cell activating factor</i>
CD	do inglês <i>Cluster of differentiation</i>
CD62p	P-selectina
cDNA	DNA complementar
CG	Câncer gástrico
CIN	Instabilidade cromossômica
DAMPs	do inglês, <i>Damage-associated molecular patterns</i>
DC	Células dendríticas
EBV	do inglês, <i>Epstein-Barr Virus</i>
EDA	do inglês, <i>Ectodysplasin A</i>
EGF	do inglês, <i>Epidermal growth factor</i>
GS	Genotipicamente estáveis
HCP	Hospital de Câncer de Pernambuco
IFN	Interferon
IGF-1	do inglês, <i>Insulin-like growth factor 1</i>
IMIP	Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KEGG	do inglês <i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LPA	Ácido lisofosfatídico
MÊS	<i>Matriz extracelular subendotelial</i>
MHC	Molécula de histocompatibilidade principal
miRNAs	microRNAs
mRNAs	RNA mensageiro
MSI	Instabilidade microssatélite
ncRNAs	RNAs não codificantes
Nf-KB	do inglês, <i>Nuclear fator kappa-B</i>

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PDGF	do inglês, <i>Platelet-derived growth factor</i>
RANKL	do inglês, <i>Receptor activator of Nf-KB ligand</i>
STAT3	<i>Signal transducers and activators of transcription 3</i>
TAM	do inglês, <i>Tumor-associated macrophage</i>
TCGA	do inglês, <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células T
TGF	do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>
TGF	do inglês, <i>Growth transformation factor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Factor necrosis tumor</i>)
TRAIL	do inglês, <i>TNF- Related apoptosis inducing ligand</i>
TWEAK	do inglês, <i>TNF-elated weak inducer of apoptosis</i>
TxA2	Tromboxano A2
VEGF	do inglês, <i>Vascular endotelial growth factor</i>
VEGI	do inglês, <i>Vascular endotelial cell-growth inhibitor</i>

APRESENTAÇÃO

Conforme requerido pelo Programa de Pós-Graduação em Oncologia do A.C.Camargo, na parte textual, esta tese foi dividida em: resumo, summary, introdução, objetivos, materiais e métodos, resultados, considerações finais, conclusões e referências bibliográficas. Os resultados foram apresentados na forma de artigo publicado e de manuscritos submetidos à revistas internacionais. Este trabalho foi desenvolvido no Hospital de Câncer de Pernambuco (Recife-PE), A.C.Camargo Cancer Center (São Paulo-SP) e no Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (Recife-PE). do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), sob os números CAAE 39976214.9.000.5205 e CAAE 28932814.2.0000.520, seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	Câncer gástrico.....	2
1.1.1	Epidemiologia.....	2
1.1.2	Fatores de risco.....	4
1.1.3	Características anatomopatológicas.....	5
1.1.4	Classificação molecular.....	8
1.2	MicroRNAs (miRNAs).....	9
1.2.1	MicroRNAs e sistema imune.....	10
1.2.1.1	MicroRNAs na imunidade inata.....	13
1.2.1.2	MicroRNAs na imunidade adaptativa.....	14
1.3	MicroRNAs, sistema imune e câncer.....	18
1.4	Participação das plaquetas nos mecanismos de regulação do sistema imune.....	23
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivo Geral.....	31
2.2	Objetivos Específicos.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	Detalhamento do estudo.....	34
3.2	Crterios de elegibilidade.....	34
3.3	População do estudo.....	35
3.3.1	Artigo 1 (miRNAs).....	35
3.3.2	Artigo 2 (Análise OX 40).....	35
3.3.3	Artigo 3 (Expressão de CD40L e agregados plaquetários).....	36
3.4	Procedimentos para seleção dos sujeitos e coleta de dados.....	36
3.5	Testes laboratoriais.....	39
3.5.1	Classificação histológica.....	39
3.5.2	Microdissecção manual.....	39
3.5.3	Extração de RNA.....	39

3.5.4	Determinação da expressão dos microRNAs por TaqMan	42
3.5.5	Análise por ferramentas de bioinformática	45
3.5.6	Técnica de citometria de fluxo	47
3.6	Análises estatísticas	52
3.7	Aspectos éticos	54
4	RESULTADOS	52
4.1	Artigo 1	56
4.2	Artigo 2	80
4.3	Artigo 3	86
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
6	CONCLUSÕES	106
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Apêndice 2 Questionário de pesquisa / formulário clínico

Apêndice 3 Outro artigo publicado

ANEXOS

Anexo 1 Pareceres substanciados - CEP HCP

Anexo 2 Declaração de revisão de Língua Portuguesa

Anexo 3 Declaração de revisão de Língua Inglesa (artigo 1)

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

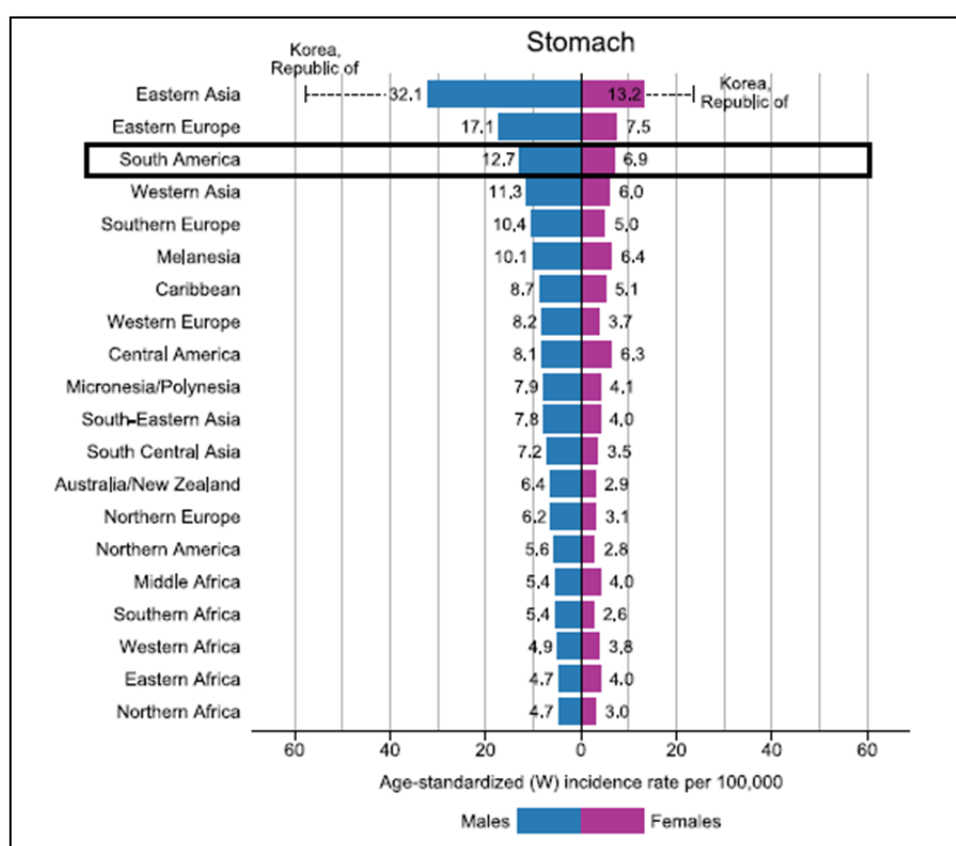
1.1 CÂNCER GÁSTRICO

1.1.1 Epidemiologia

O câncer gástrico (CG) é a quinta neoplasia mais comum no mundo segundo estimativas de 2018 (com uma incidência estimada de 1.033.701 casos, 5,7% do total (BRAY et al. 2018), perdendo em incidência apenas para as neoplasias de pulmão, mama, colorretais e próstata. Mais de 70% dos casos (677.000 casos) ocorrem em países em desenvolvimento. O câncer de estômago é a terceira causa de mortalidade por neoplasia no mundo (FERLAY et al. 2015).


As maiores taxas de incidência do CG são observadas no Leste da Ásia (32,1/100.000 homens e 13,2/100.000 mulheres), principalmente em países como a Mongólia, o Japão e a Coréia do Norte. Em seguida, destacam-se o Leste Europeu (17,1/homens e 7,5/mulheres), a América do Sul (12,7/homens e 6,9/mulheres), o Oeste Asiático (11,3/homens e 6,0/mulheres) e o Sudoeste Europeu (10,4/homens e 5,0/mulheres). Por outro lado, outras regiões mostram uma incidência muito menor, como a América do Norte (5,6/homens e 2,8/mulheres), a Oceania (6,4/homens e 2,9/mulheres) e o norte da África, que apresenta a menor incidência global (4,7/homens e 3,0/mulheres) (BRAY et al. 2018). Destaca-se, ainda, que a terceira maior incidência de câncer gástrico é no continente sul-americano, e o Brasil tem aproximadamente metade da população desse continente (Figura 1).

No Brasil são estimados 21.290 novos casos e 14.182 mortes para o ano de 2018, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer-INCA (Ministério da Saúde 2018). Na região Nordeste, a incidência de CG foi estimada para o biênio 2018-2019 de 3.140 novos casos em homens (5,3%) e de 2.110 novos casos em mulheres (3,6%). Apresentando-se como o segundo lugar em incidência no sexo masculino e o sexto no sexo feminino (Figura 2) (Ministério da Saúde 2018).



Fonte: BRAY et al. (2018).

Figura 1 - Incidência de câncer gástrico por região geográfica e sexo em 2018.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	15.820	26,9%	Homens 	Mulheres	Mama feminina	11.860	20,3%
Estômago	3.140	5,3%			Colo do útero	6.030	10,3%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.920	5,0%			Cólon e Reto	2.800	4,8%
Cólon e Reto	2.260	3,8%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.310	3,9%
Cavidade Oral	1.890	3,2%			Glândula Tireoide	2.220	3,8%
Laringe	1.550	2,6%			Estômago	2.110	3,6%
Esôfago	1.460	2,5%			Ovário	1.480	2,5%
Leucemias	1.380	2,3%			Corpo do útero	1.470	2,5%
Sistema Nervoso Central	1.290	2,2%			Sistema Nervoso Central	1.100	1,9%
Linfoma não Hodgkin	1.000	1,7%			Leucemias	1.090	1,9%

*Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: Ministério da Saúde (2018).

Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, exceto pele não melanoma, estimados para 2018, por sexo, na região Nordeste do Brasil.

No estado de Pernambuco, a estimativa para o período de 2018 e 2019, excluindo câncer de pele não melanoma, foi de 9.690 casos novos de câncer nos homens, sendo 590 (6%) casos novos de neoplasias de estômago. Nas mulheres, a incidência estimada será de 11.020 casos, sendo 420 casos de CG (4%). A estimativa proposta para a taxa bruta de CG, no estado de Pernambuco, é de 11,88/100.000 entre os homens e de 7,68/100.000 entre as mulheres (Ministério da Saúde 2018).

1.1.2 Fatores de risco

Vários fatores estão associados a incidência em CG, tais como o sexo masculino, a geografia - pois o CG é mais comum em países orientais-, os hábitos alimentares, a etnia, cirurgias gástricas prévias, a anemia perniciosa, bem como a presença de microorganismos como *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e o vírus *Epstein-Barr* (American Cancer Society-ACS 2019).

Além do fator ambiental e comportamental, alguns fatores genéticos podem levar ao desenvolvimento das síndromes de câncer gástrico hereditário, como exemplo, a síndrome de câncer gástrico hereditário difuso, síndrome de Lynch, a

polipose adenomatosa familiar e a síndrome de Li-Fraumeni. A maioria dos pacientes com câncer gástrico apresenta a forma esporádica, e em cerca de 10% dos casos é observada história familiar de câncer, sendo de 1 a 3% claramente associada à síndrome hereditária de câncer gástrico. Os carcinomas gástricos têm etiologia multifatorial e diversos mecanismos biológicos distintos (GARATTINI et al. 2017).

1.1.3 Características anatomopatológicas

Por volta de 95% dos tumores gástricos são de origem epitelial e denominados adenocarcinomas. LAUREN em 1965, descreveu dois tipos histológicos de CGs, com características clínicas e histológicas distintas: o tipo intestinal e o difuso. O tipo intestinal é mais comum, apresenta melhor prognóstico e é influenciado por fatores ambientais como infecção por *H. pylori*, obesidade e fatores relacionados à dieta. O tipo difuso é mais frequente em jovens, indicando uma possível susceptibilidade genética (Quadro 1). Existem também os casos de carcinomas gástricos mistos que possuem componentes do tipo intestinal e do difuso (MARQUÉS-LESPIER et al. 2016).

Quadro 1 - Aspectos epidemiológicos e clínicos dos tumores gástricos segundo classificação de Lauren.

	CLASSIFICAÇÃO DE LAUREN	
	INTESTINAL	DIFUSO
IDADE	Idosos	Jovens
SEXO	Masculino	Masculino
ÁREAS GEOGRÁFICAS	Áreas com alta incidência	Não tem associação com áreas geográficas
FATORES AMBIENTAIS	Alimentares (ingesta de sal e nitratos)	Fatores de risco pouco definidos
	Modo de preparação dos alimentos	
	Tabagismo	
H. PYLORI	Forte associação etiológica	-
CLÍNICA	Menos agressivo	Mais agressivo
PROGNÓSTICO	Melhor	Pior prognóstico e elevada mortalidade
BASE MOLECULAR	Mutação nos genes supressores de tumor <i>TP53</i> e <i>APC</i> - 50%	Perda de expressão do gene <i>CDHI</i> . Mutações somáticas: 40% até 83% Gene <i>PSCA Prostate Stem Cell Antigen</i>

Fonte: Adaptado de LAUREN (1965); Anonymous 1993; ESLICK et al. (1999); YASUI et al. (2006); TSUGANE e SASAZUKI (2017).

A Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) define os vários tipos de tumores gástricos como demonstrado no Quadro 2. Estão assim distribuídos, a saber: adenocarcinomas papilífero, tubular, mucinoso, carcinoma com células em “anel de sinete”, carcinoma com células pouco coesivas (células soltas), carcinoma misto, carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma hepatoide, carcinoma com estroma linfoide, coriocarcinoma, carcinossarcoma, carcinoma de células parietais, tumor rabdoide maligno, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma de células de *Paneth*, carcinoma indiferenciado, carcinoma adenoneuroendócrino misto, tumor do seio endodérmico, carcinoma embrionário, tumor do saco vitelino puro gástrico e adenocarcinoma oncocítico (BOSMAN et al. 2010).

Quadro 2 - Classificação histológica de acordo com a Organização Mundial da Saúde-OMS

I - TUMORES EPITELIAIS	II -TUMORES NÃO EPITELIAIS
<ul style="list-style-type: none"> • Neoplasia • Adenoma • Carcinomas <ul style="list-style-type: none"> • Adenocarcinoma tipo intestinal e tipo difuso • Adenocarcinoma papilífero • Adenocarcinoma tubular • Adenocarcinoma mucinoso • Carcinoma com células em “anel de sinete” • Carcinoma adenoescamoso • Carcinoma de célula escamosa (epidermoide) • Carcinoma de células pequenas • Carcinoma indiferenciado • Neoplasia neuroendócrina bem diferenciada (tumor carcinoide) 	<ul style="list-style-type: none"> • Leiomioma • Schwanoma • Tumor de células granulares • Tumor glômico • Leiomiossarcoma • Tumor de estroma gastrointestinal - GIST • Sarcoma de Kaposi • Outros • Linfomas (linfoma de célula B de zona marginal tipo MALT, linfoma do Manto, Linfoma de grandes células B difuso, outros) • Tumores secundários

Fonte: BOSMAN et al. (2010).

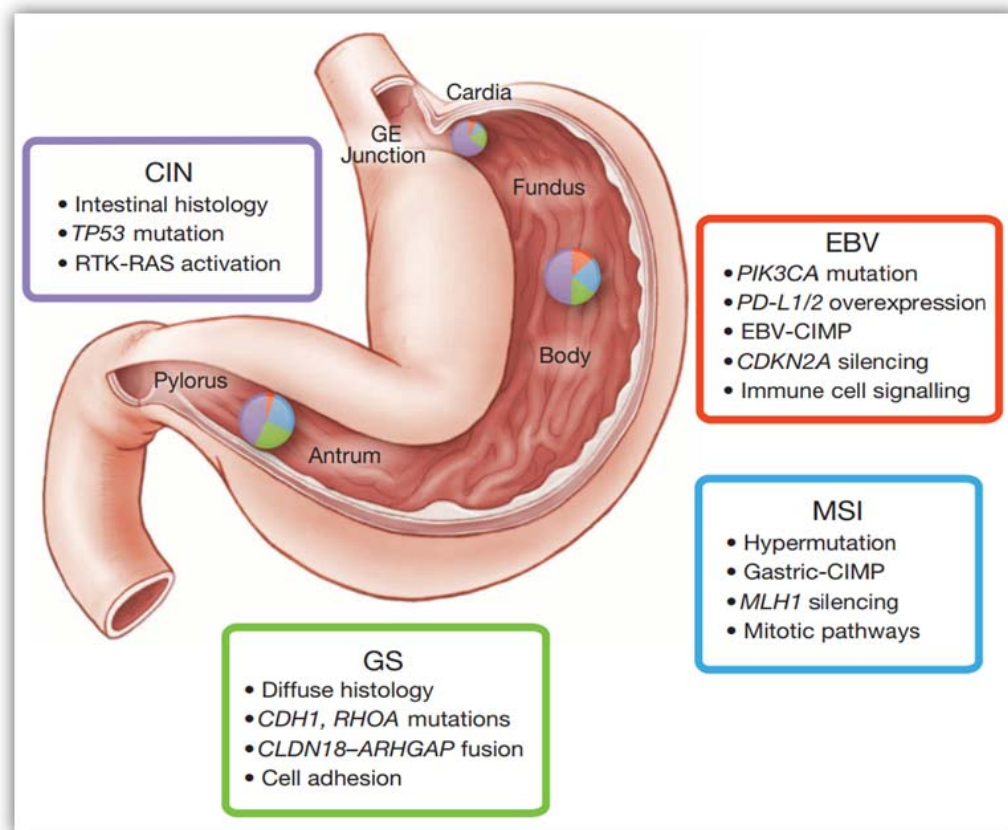
Os tumores gástricos podem ser classificados em tumores proximais (cárdia, fundo) e distais (antro e piloro). A classificação de Borrmann divide os CGs em dois tipos macroscópicos: avançados e superficiais (precoces). Os CGs avançados são divididos em: tipo I - polipoide; tipo II ulcerado com bordas bem delimitadas; tipo III - ulcerado e infiltrativo; tipo IV - infiltrativo difuso. Os CGs superficiais são divididos em 3 subtipos: tipo I -poloide; tipo IIa - superficial elevado; tipo IIb - superficial plano; tipo IIc - superficial deprimido; e tipo III - ulcerado (PAN et al. 2013).

Para estadiamento do tumor é utilizado o sistema TNM (*tumor, node, metastasis*), que classifica o tumor com base na profundidade microscópica de invasão tumoral (T) na parede gástrica, na quantidade de linfonodos regionais com presença de tumor (N) e na presença de metástases a distância (M) (EDGE e COMPTON 2010).

1.1.4 Classificação molecular

A carcinogênese gástrica consiste em um processo de várias etapas, iniciando-se na mucosa gástrica com gastrite e desenvolvendo-se até resultar no câncer gástrico. Por meio de análises das alterações moleculares, *The Cancer Genome Atlas-TCGA* (2014) caracterizou os subtipos de câncer gástrico baseado nas alterações moleculares encontradas em vias de sinalização celular conhecidas.

Existem quatro subtipos moleculares de CG: i) tumores positivos para *Epstein-Barr* (EBV), que apresentam mutações recorrentes de *PIK3CA*, hipermetilação de DNA e amplificação de *JAK2*, *PDL1* e *PDL2*; ii) tumores com instabilidade de microssatélites (MSI), que apresentam taxas de mutação elevadas, incluindo mutações de genes que codificam proteínas de sinalização oncogênicas direcionáveis, silenciamento de *MLH1*; iii) tumores genomicamente estáveis (GS), que são enriquecidos pela variante histológica difusa e mutações de *RHOA* ou fusões envolvendo proteínas ativadoras de GTPase da família RHO; e iv) tumores com instabilidade cromossômica (CIN), que mostram uma marcante aneuploidia e amplificação focal dos receptores tirosina-quinase. A identificação desses subtipos fornece um roteiro para a estratificação do paciente e ensaios clínicos de terapias-alvo (BASS et al. 2014; ZHOU et al. 2014).



Fonte: Cancer Genome Atlas Research Network (2014).

Figura 3 - Caracterização molecular do câncer gástrico

As análises de expressão gênica em diversas etapas da carcinogênese gástrica podem elucidar os mecanismos de escape tumoral e permitir a identificação de alvos terapêuticos (KIM e SVENDSEN 2011). O perfil de expressão gênica no CG foi associado aos mecanismos de regulação da resposta imune, sendo relacionado a agressividade clínica e resistência ao tratamento quimioterápico (UEDA et al. 2010).

1.2 MICRORNAS (miRNAS)

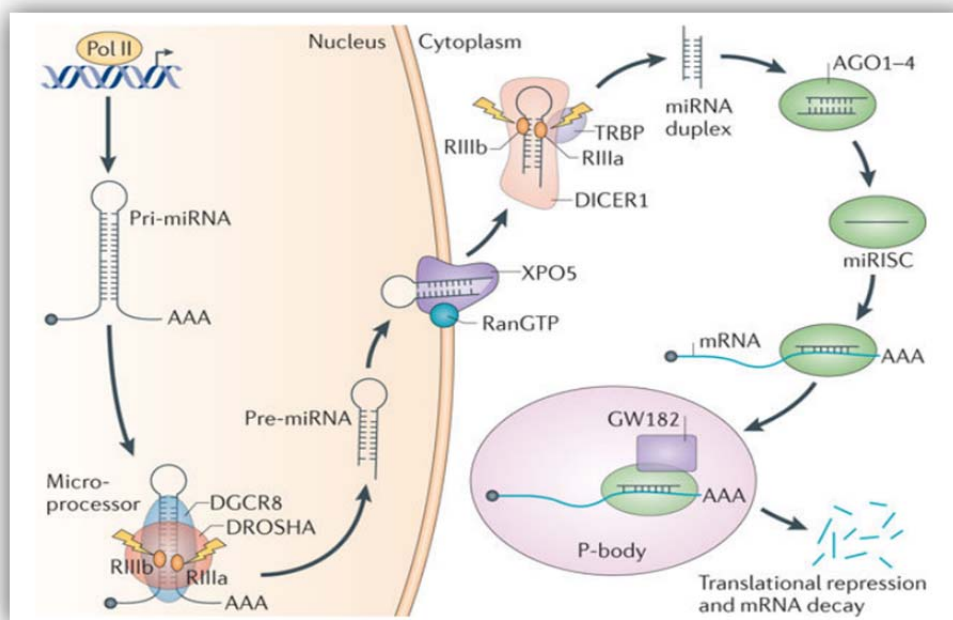
A descoberta de que pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs) são capazes de controlar a expressão gênica de uma maneira específica teve um enorme impacto na biologia. Entre esses, os miRNAs aparecem como importantes reguladores citoplasmáticos da expressão gênica. Os miRNAs atuam como reguladores pós-transcricionais de seus alvos de RNA mensageiro (mRNA) via degradação e/ou repressão traducional (CATALANOTTO et al. 2016).

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas pequenas de RNA não codificador, compostas por aproximadamente 18-25 nucleotídeos, cuja principal função é a regulação pós-transcricional da expressão gênica (SHAH et al. 2016). Estas moléculas estão envolvidas na maioria dos processos biológicos como: regulação do ciclo celular, crescimento celular, apoptose, diferenciação celular e resposta ao estresse (IORIO e CROCE 2012).

Os miRNAs regulam os genes através de ligação à região 3'UTR (Untranslated Region) dos RNAs mensageiros (mRNAs), levando à repressão da tradução ou degradação destes miRNAs (SHAH et al. 2016). Apesar de moléculas de miRNAs terem sido descritas no início da década de 1990, os estudos das funções dos miRNAs somente se intensificaram na década passada. Até o momento, mais de 17000 sequências de miRNAs em mais de 140 espécies diferentes foram catalogadas no miRBase (<http://www.mirbase.org/>), número este que tem aumentado exponencialmente, e nos últimos três anos quase triplicou.

Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II no núcleo onde são formados os pri-miRNAs. Os pri-miRNAs são processados pela Drosha e seu cofator

Pasha para liberação dos pre-miRNA precursors. A RAN-GTP e exportina transportam o pre-miRNA para o citoplasma. Subsequentemente, a RNA polimerase III Dicer processa o pre-miRNA formando um miRNA transitório de fita dupla (miRNA:miRNA duplex). Esse miRNA de fita dupla é carregado até o miRISC, onde a fita simples de miRNA maduro é retida no complexo. O miRNA maduro se liga às regiões complementares dos seus RNAm alvos para regular negativamente a expressão gênica em um dos dois caminhos que dependem do grau de complementariedade entre o miRNA e seu alvo. Os microRNAs que se ligam imperfeitamente aos seus RNAm alvos bloqueiam a expressão gênica à nível de tradução proteica. miRNAs que se ligam aos seus alvos com perfeita complementariedade induzem a clivagem do RNAm (Figura 4) (LIN e GREGORY 2015).



Fonte: Adaptado de LIN e GREGORY (2015).

Figura 4 - A biogênese do miRNA

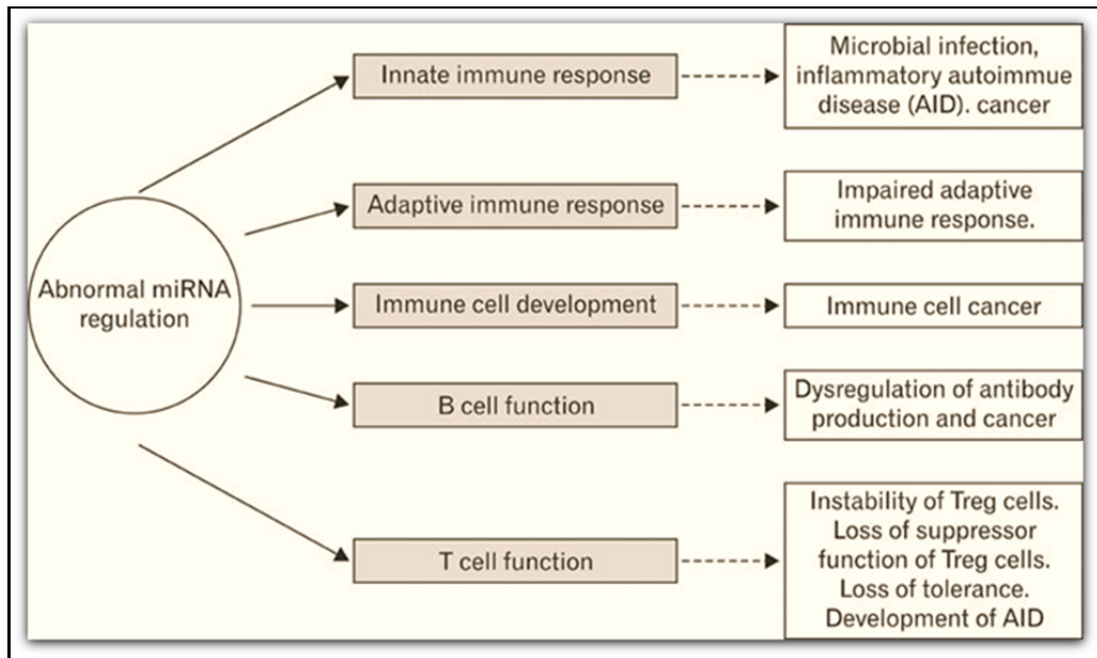
1.2.1 MicroRNAs e sistema imune

Os microRNAs desempenham papéis importantes na regulação negativa das respostas imunes em muitos tipos de câncer (XU et al. 2017). O reconhecimento atenuado das células cancerosas pelas células imunes pode ser causado por alterações nos padrões antigênicos devido à instabilidade genética das células cancerosas. Uma série de microRNAs contribui para essas alterações antigênicas, tanto nas células tumorais quanto nas células do sistema imune (VESELY et al. 2011).

Não é surpreendente que vários processos fisiológicos relevantes, como a produção de citocinas pró-inflamatórias, a morte celular e a apresentação de antígenos, possam ser afetadas pelos microRNAs. Muitos dos microRNAs que foram encontrados mostraram padrão de expressão diferente entre pacientes com lúpus e controles saudáveis em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e podem estar envolvidos, por exemplo, na regulação da via do interferon (IFN) tipo I (HONARPISHEH et al. 2018). O microambiente tumoral é altamente heterogêneo e consiste em fibroblastos, células imunes, progenitores de células endoteliais, componentes da matriz extracelular, vasos sanguíneos e linfáticos. Ao todo, esses diferentes tipos de células contribuem para iniciação e progressão do tumor, regulando um equilíbrio entre os sinais anti- e pró-crescimento. Parte desse processo é uma consequência de alterações de expressão gênica, que são dependentes de mecanismos regulatórios pós-transcrição (DUNN et al. 2002).

Os miRNAs desempenham um papel fundamental em diversos processos biológicos, como embriogênese, diferenciação, inflamação, infecções virais e carcinogênese. A importância dos miRNAs no desenvolvimento e regulação do

sistema imune, incluye a diferenciação de células, produção de anticorpos e liberação de mediadores inflamatórios (LINDSAY 2008).



Fonte: Adaptado de HA (2011).

Figura 5 - Papel dos microRNAs na regulação do sistema imune.

1.2.1.1 MicroRNAs na imunidade inata

Um progresso significativo foi feito ao longo da última década na caracterização de miRNAs que controlam a função dos componentes celulares da imunidade inata. Dentre os componentes da imunidade inata, destacam-se os neutrófilos e monócitos. Os neutrófilos são fundamentais na fase inicial do processo inflamatório, sendo uma das primeiras células a ser recrutada em grandes números para o local de infecção e lesão tecidual, atraídos por quimiocinas, como a IL-8 (GUGLIETTA et al. 2016).

O macrófago é uma célula derivada de um tipo de leucócito, o monócito, que é formado na medula hematopoiética. Os monócitos circulantes saem do sangue atravessando a parede dos vasos sanguíneos e se estabelecem no tecido conjuntivo. No tecido conjuntivo se transformam em macrófagos. Os macrófagos fagocitam partículas, sejam elas restos celulares, partículas inertes ou microorganismos. Além da capacidade de fagocitar, o macrófago tem uma enorme importância no desenvolvimento da resposta imune, pois produz vários mediadores da resposta inflamatória, como as citocinas e quimiocinas (SQUADRITO et al. 2013).

Alguns estudos já caracterizaram a regulação da função dos neutrófilos e macrófagos mediada por miRNAs. Demonstrou-se que o miR-146a regula negativamente a resposta inflamatória mediada pelos genes *TRAF6*, *IRAK1* e *IRAK2* expressos por macrófagos, interferindo na produção de IFN tipo I por essas células (HOU et al. 2009). Também foi observada a participação dos microRNAs (miR-155, miR-125a / b, miR-146a, miR-21 e let-7e) na ativação e diferenciação de macrófagos. Observou-se que a regulação desses miRNAs pode promover ou suprimir a ativação dos macrófagos associados ao tumor (TMA; do inglês *tumor associated macrophage*) (SQUADRITO et al. 2013). Os miRNAs também podem restringir a função de outras células do sistema imune inato, tais como as células dendríticas (DC), suprimindo diretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (BRAIN et al. 2013).

1.2.1.2 MicroRNAs na imunidade adaptativa

A resposta imune adaptativa é caracterizada pela ativação e subsequente expansão clonal de linfócitos T e B específicos para o antígeno, levando a respostas

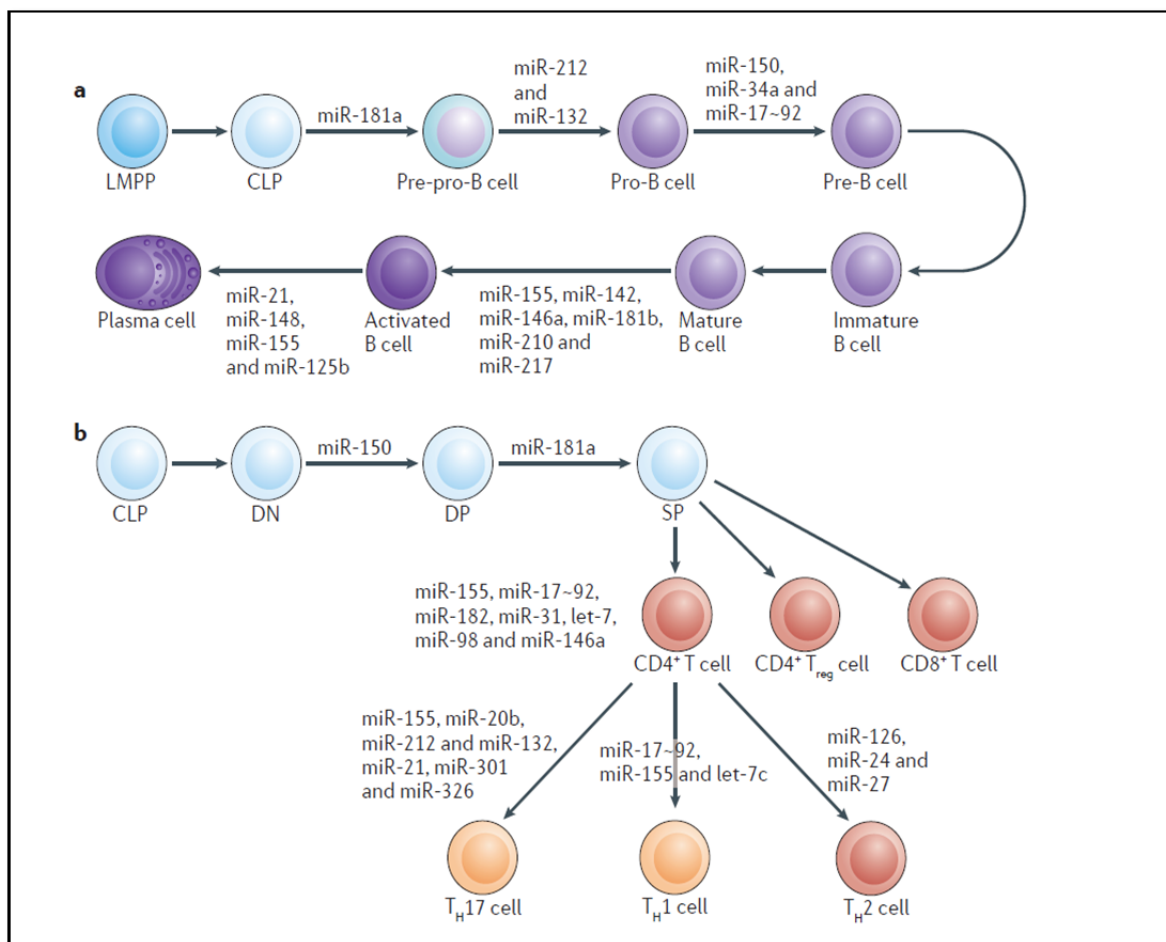
efetoras citotóxicas e produção de citocinas e anticorpos em resposta aos estímulos. O ambiente tumoral é composto por células do sistema imune, como linfócitos TCD8⁺ citotóxico, Th1/Th17, células NK, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) (ZITVOGEL et al. 2011), que refletem a tentativa do sistema imune de promover uma resposta antitumoral. A ativação dos linfócitos T é crítica para a eliminação do tumor através de imunovigilância. Os sinais necessários para ativação da resposta imune de células T são gerados pelo receptor das células T (TCR), que se liga a antígenos apresentados no contexto de molécula de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I ou II expresso na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs). Outra forma de ativação é proporcionada por interação de uma molécula coestimuladora expressa nas células T com as moléculas presentes na superfície da APCs (CHEN e FLIES 2013).

Além de regular as respostas na imunidade inata, os miRNAs também desempenham um papel importante no controle das respostas imunes adaptativas. Vários miRNAs são críticos para o desenvolvimento, ativação, sobrevivência e proliferação de células B e T. Por exemplo, miR-150, um miRNA que é predominantemente expresso em células B maduras, demonstrou controlar populações múltiplas de células B através da regulação do nível de expressão do fator de transcrição c-Myb; e que isso afeta dramaticamente o desenvolvimento e a resposta dos linfócitos (XIAO et al. 2007).

Em modelo animal, foram demonstrados aumento de expressão de miR-155 em células T ativadas, e camundongos deficientes de miR-155 apresentaram deficiência de células TCD4⁺ (RODRIGUEZ et al. 2007). Além disso, a expressão de miR-23, miRNA-27 E miRNA-24 nas células T estão envolvidos na regulação

dos mecanismos efetores dessas células, evitando respostas imunes exacerbadas (CHO et al. 2016) (Figura 7).

Os miRNAs são importantes reguladores da imunidade inata e adaptativa, controlando a manutenção e o desenvolvimento de progenitores imunes, bem como a diferenciação e as funções das células imunes maduras (DAVIDSON-MONCADA et al. 2010), e, por isso, não é de surpreender que as aberrações na expressão de miRNAs sejam relacionadas ao sistema imunológico e possam levar a uma resposta imune antitumoral alterada e contribuir para o desenvolvimento do câncer (TILI et al. 2013).



Fonte: Adaptado de MEHTA e BALTIMORE (2016).

Figura 6 - microRNAs que regulam o desenvolvimento e a função da resposta imune adaptativa. a) Esquema que descreve os miRNAs que participam da ontogenia dos linfócitos B; b) Esquema que descreve os miRNAs que participam da ontogenia dos linfócitos T. DN: *double negative*; DP: *double positive*; LMPP: *lymphoid-primed multipotent progenitor*; pre-B cell: *precursor B cell*; pre-pro-B cell: *precursor-progenitor B cell*; pro-B cell: *progenitor-B cell*; SP: *single positive*; TH: *Thelper*; T_{reg} cell: *regulatory T cell*. TCR: *T cells receptor*.

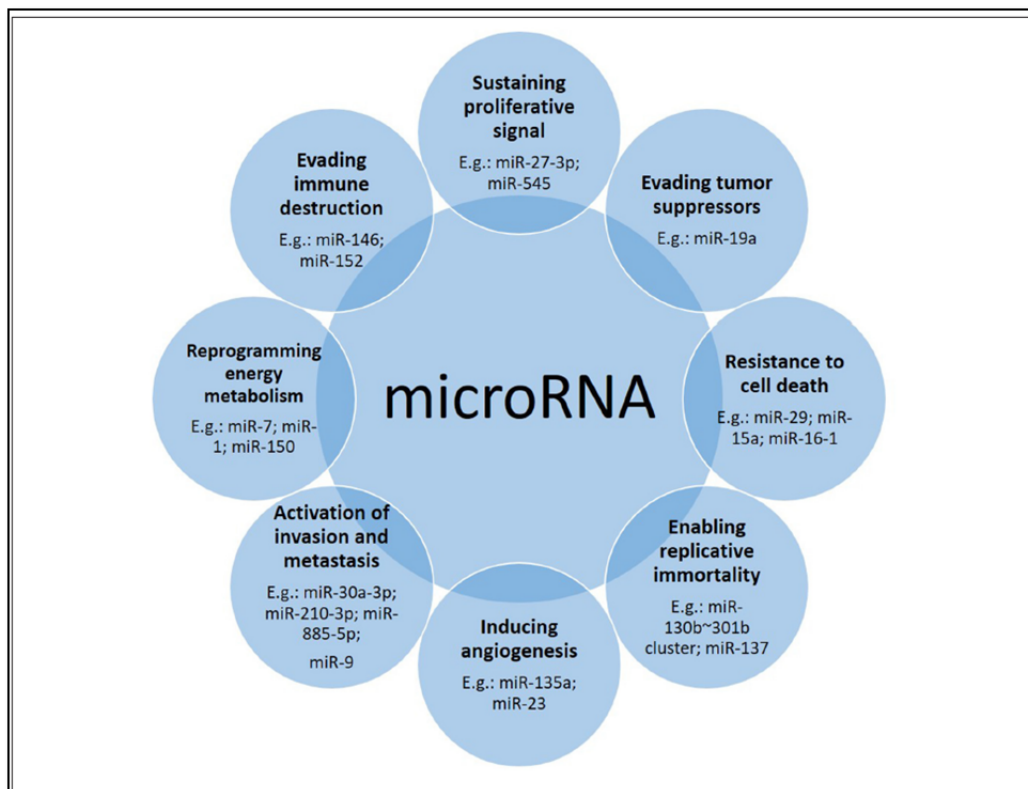
1.3 MICRORNAS, SISTEMA IMUNE E CANCER

Estudos têm demonstrado que existe conexão entre a função do miRNA e várias doenças, incluindo o câncer (PIOVAN et al. 2012; PIZZINI et al. 2013). Acredita-se que essas moléculas têm o papel essencial em muitos tipos de câncer, atuando na oncogênese ou como supressores tumorais (O'DAY e LAL 2010). Dessa maneira, a regulação gênica promovida pelos miRNAs é importante no estabelecimento e progressão de diversos tipos de neoplasias em humanos (VALASTYAN et al. 2009). Os microRNAs estão envolvidos em muitos aspectos relacionados ao câncer. Existem muitos artigos nos quais os microRNAs desempenham um papel-chave na biogênese e progressão do câncer, como pode ser visto no Quadro 3.

Quadro 3 - Exemplos de microRNAs envolvidos nos processos neoplásicos

PONTO	miRNA	CÂNCER	ALVO	FUNÇÃO	REFERÊNCIA
Induzindo angiogênese	miR-135a	↓ câncer gástrico	FAK	Proteína-tirosina quinase não receptora	(CHENG et al. 2017)
Ativação de invasão e metástase	miR-9	↑ câncer de ovário	E-CADHERIN	Adesão celular	(ZHOU et al. 2017)
Evasão imune	miR-152	↓ câncer gástrico	B7-H1	Sinal Co-estimulatório	(WANG et al. 2017)
Resistência à morte celular	miR-15a	↓ em leucemia	BCL-2	Suprime a apoptose	(CIMMINO et al. 2005)
Reprogramação do metabolismo energético	miR-7	↓ câncer pancreático	LKB1	Metabolismo celular	(GU et al. 2017)

Siglas: FAK- Focal adhesion kinase; B7-H1- B7-homolog 1; BCL-2- B-cell lymphoma 2; LKB1- serine/threonine kinase 11



Fonte: Adaptado de DETASSIS et al. (2017)

Figura 7 - MicroRNAs participam na biogênese e progressão do câncer

A progressão do câncer para uma doença avançada ou metastática geralmente sugere uma falha da resposta imune. Uma resposta imune efetiva decorre da colaboração harmoniosa entre o sistema imune inato e adaptativo, com o *feedback* negativo dos checkpoints imunológicos e dos mecanismos imunossupressores. Por outro lado, a resposta imune pode exercer efeitos pró ou anti-tumorigênicos sobre o microambiente tumoral. Alguns autores mostraram que a imunidade inata e adaptativa estão envolvidas na imunovigilância e eliminação do tumor (DUNN et al. 2002).

Em tumores estabelecidos, o escape da imunovigilância ocorre através de diferentes mecanismos, quer pelo tumor (por exemplo, perda de antígeno, tolerância imunogênica) ou ao nível das células imunitárias (por exemplo, inibição da ativação

das células T (WILLIMSKY e BLANKENSTEIN 2005). Os tumores não só escapam do reconhecimento imunológico, mas também inibem ativamente a atividade antitumoral mediada por células T, através da modulação dos pontos de checagem imunológicos (*checkpoints*), tais como o PD-L1 (DONG et al. 2018). Nesse contexto, demonstrou-se que os microRNAs regulam tanto o recrutamento quanto a ativação de células do sistema imune no microambiente tumoral (CURTALE 2018). Centenas de miRNAs foram relatados como diferencialmente expressos em células imunes. Padrões de assinaturas distintas de miRNA não só foram encontrados em linhagens de células imunes, mas também podem ser detectados nos mesmos subconjuntos de células que estão em diferentes estágios de desenvolvimento (KUCHEN et al. 2010).

As células tumorais e do sistema imune produzem vários fatores de crescimento, angiogênicos, proteinases, quimiocinas e citocinas, que contribuem para a remoção de células tumorais ou para a formação de um microambiente imunossupressor (WHITESIDE 2008). A ativação de fatores de transcrição específicos e a presença de citocinas inflamatórias representam o elemento-chave da conexão entre as células imunes e as tumorais (BALKWILL 2009). Dentre os fatores de transcrição, o *nuclear factor kappa-B* (NF- κ B), *signal transducers and activators of transcription 3* (STAT3), fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *Factor necrosis tumor*) e *Transforming growth factor beta* (TGF- β) demonstraram mediar a ativação de várias vias oncogênicas.

O NF- κ B é um importante regulador da inflamação e da imunidade inata e sua expressão aberrante tem sido descrita em muitos tumores (KARIN 2006). Os efeitos do NF- κ B são dependentes do tipo celular, consistindo na indução da

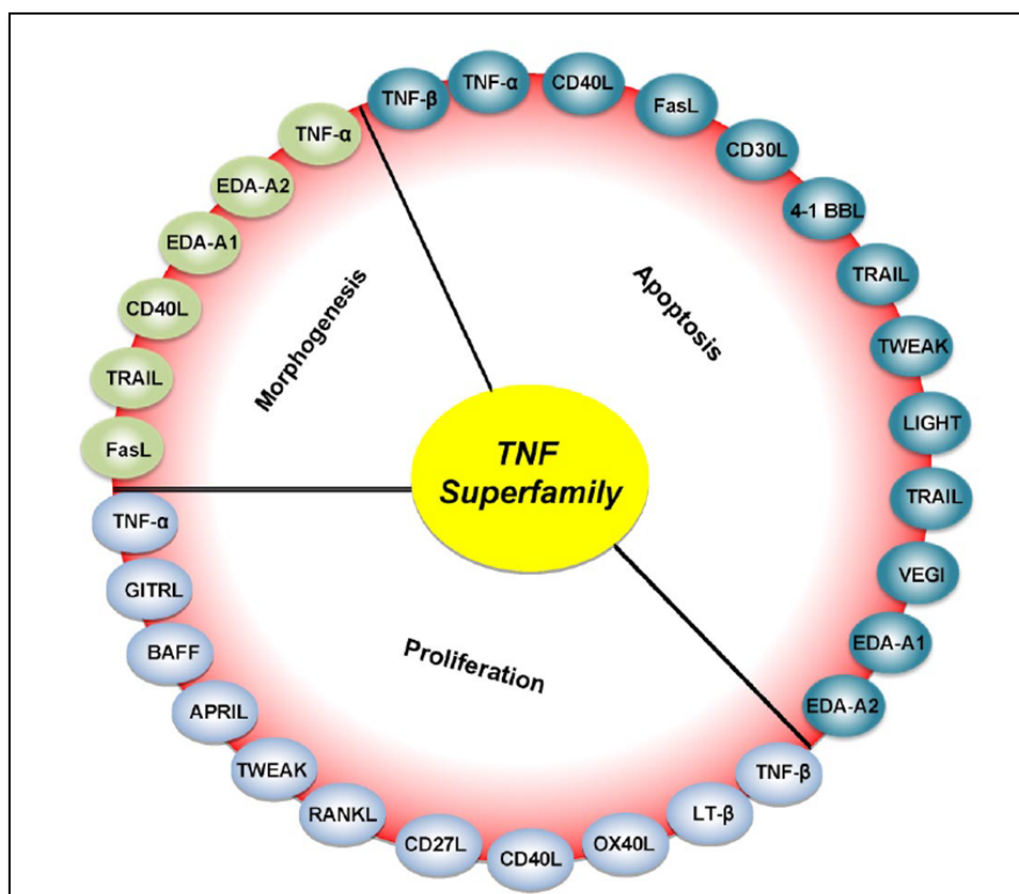
expressão de genes relacionada a sinais pró-inflamatórios e de genes antiapoptóticos em células tumorais, favorecendo o desenvolvimento do tumor (PIKARSKY et al. 2004). Um dos mais importantes ativadores da sinalização de NF- κ B é o TNF- α , que se liga ao seu receptor específico expresso por células do sistema imune ou por células tumorais (BEZBRADICA e MEDZHITOV 2009).

A superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) são proteínas expressas predominantemente por células imunes e regulam diversas funções celulares, incluindo regulação da resposta imune e inflamação, mas também proliferação, diferenciação, apoptose e embriogênese (AGGARWAL et al. 2012). Os membros da superfamília são TNF α , TNF β , lymphotoxin- β , CD40L, FasL, CD30L, 4-1BBL, CD27L, OX40L, *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), LIGHT, *receptor activator of NF- κ B ligand* (RANKL), *TNF-related weak inducer of apoptosis* (TWEAK), *A proliferation-inducing ligand* (APRIL), *B-cell activating factor* (BAFF), *vascular endothelial cell-growth inhibitor* (VEGI), *ectodysplasin A* (EDA)-A1, EDA-A2, e GITRL (AGGARWAL et al. 2012).

A sinalização celular para a maioria das citocinas e fatores de crescimento é normalmente mediada pela interação entre um ligante solúvel e um receptor na transmembrana. Na superfamília TNF foram identificados vários ligantes incluindo FasL, CD27L, CD30L, CD40L, OX40L e 4-1BBL. Todos estes ligantes são principalmente expressos como proteínas na superfície celular e interagem com células que expressam os receptores correspondentes (Figura 8).

As atividades carcinogênicas do TNF α são mediadas por sua capacidade de ativar o fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B, que regula positivamente a expressão de genes ligados à sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e

metástase de células tumorais (BALKWILL 2009). Em contraste com o TNF- α , outros membros da superfamília do TNF exibem mais ação antitumoral em contraste ao potencial oncogênico (AGGARWAL et al. 2012).



Fonte: Adaptado de AGGARWAL et al. (2012).

Figura 8 - Funções de vários membros da superfamília do TNF na inflamação, proliferação celular, apoptose e morfogênese

O nível de expressão dos receptores pode variar, dependendo da linhagem de células imunes e seu estado de ativação. Por exemplo, o receptor OX40 e seu ligante (OX40L), que pertencem à família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), é um receptor localizado na superfície de células TCD4+ ativadas e sua

ativação pode promover sinais coestimuladores para as células que intensificam a sua proliferação e produção de citocinas, e prolongam a sobrevivência de células T de memória efetora (LASRY et al. 2016).

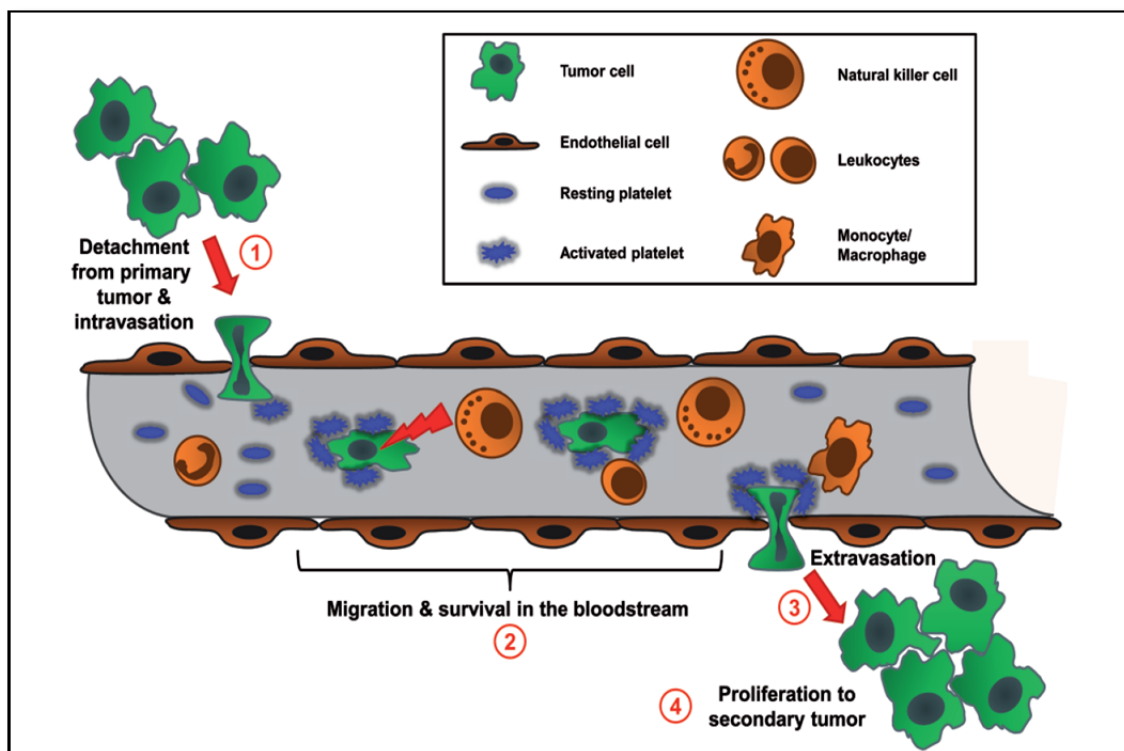
Outro exemplo, o CD40 também é um receptor da superfície celular da superfamília do TNF que está expresso constitutivamente na superfície de células apresentadoras de antígenos. A sua ativação através do ligante específico promove a maturação funcional, levando a um aumento na apresentação de antígenos e na produção de citocinas, além de um subsequente aumento na ativação de células T (MORAN et al. 2013). THOMAS e STOREY (2015) evidenciaram que plaquetas ativadas expressam o ligante do CD40 (CD40L), que tem uma estrutura semelhante e efeito semelhante ao TNF- α . A expressão de CD40L derivado da plaqueta induz a cascata de coagulação extrínseca, afeta células dendríticas, os linfócitos B e linfócitos T. Tal capacidade sugere que o CD40L derivado da plaqueta proporciona uma ligação de comunicação entre a imunidade inata e adaptativa.

1.4 PARTICIPAÇÃO DAS PLAQUETAS NOS MECANISMOS DE REGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE

As plaquetas humanas são fragmentos subcelulares de megacariócitos que se localizam na medula óssea. Apesar dessa definição clássica, GARRAUD e COGNASSE (2015) enfatizam que as plaquetas compartilham propriedades muito semelhantes às de células. A demanda fisiológica, presença de doença como o câncer ou efeitos de drogas podem regular a produção e envio de plaquetas para circulação (THOMAS e STOREY 2015).

A fisiologia plaquetária é essencial para a hemostasia, a integridade vascular, angiogênese, inflamação e cicatrização de feridas. Esta é certamente a função mais conhecida das plaquetas. No entanto, a natureza ou a extensão das respostas dos mediadores secretados por plaquetas ativadas têm recebido atenção em diversas condições mórbidas, tais como doenças cardiovasculares, infecções graves, desordens autoimunes, doenças autoinflamatórias e câncer (THOMAS e STOREY 2015).

A metástase é a principal causa de mortalidade associada aos cânceres e os mecanismos subjacentes da disseminação tumoral ainda permanecem pouco compreendidos. Durante a disseminação metastática, as células tumorais invadem a corrente sanguínea e/ou os vasos linfáticos. Os mecanismos para formação das metástases podem ser divididos em quatro fases: 1) destacamento das células tumorais e entrada no sistema angiolinfático; 2) migração pela corrente sanguínea; 3) captura em um órgão distante e extravasamento das células tumorais; 4) colonização destes tecidos e formação de tumores secundários (STEGNER et al. 2014) (Figura 9).



Fonte: STEGNER et al. (2014)

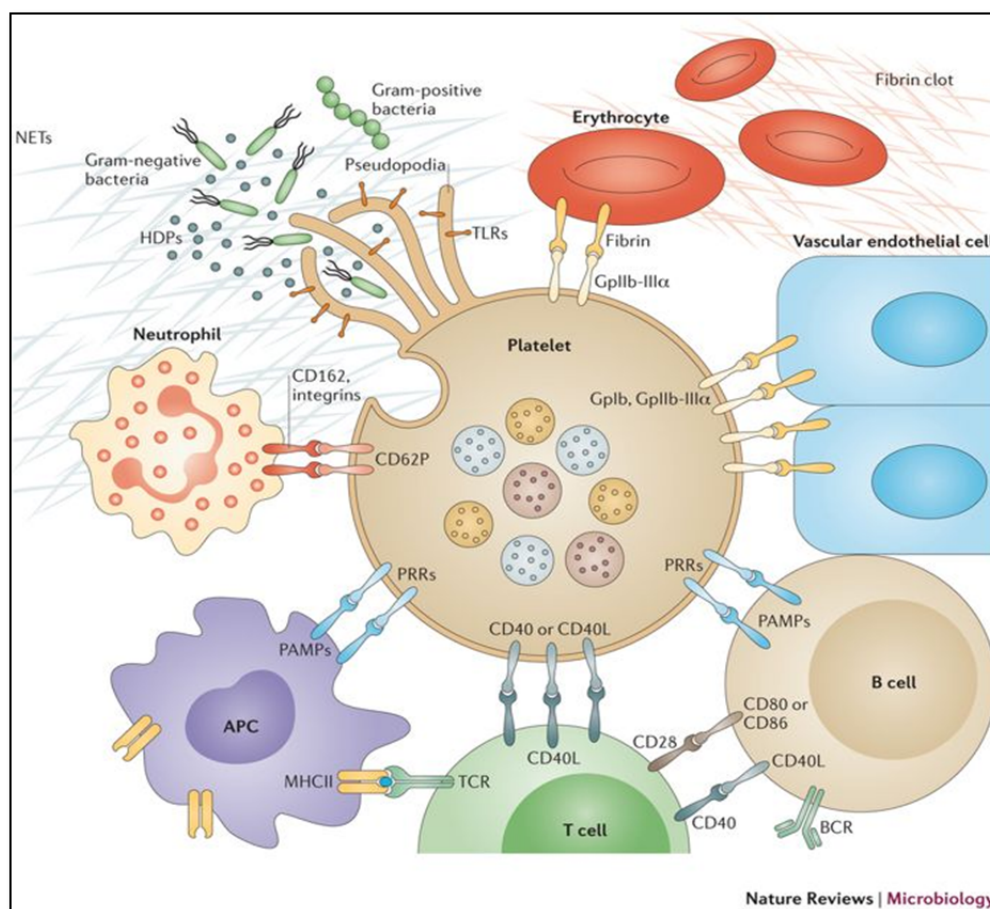
Figura 9 - Visão geral da ação plaquetária nos mecanismos de metástases

Trousseau (1873) descreveu a associação entre trombose venosa profunda e neoplasias. Pouco mais de um século após as observações de GASIC et al. (1968) descreveram a associação entre o número total de plaquetas e o potencial metastático das neoplasias em modelo experimental. Além disso, a trombocitose é observada numa população considerável de pacientes com neoplasias. Alguns autores também demonstraram uma correlação inversa entre a contagem do número de plaquetas e sobrevida, sugerindo a trombocitose como um marcador de mau prognóstico. Isso sugere que as plaquetas possam promover a manutenção de células tumorais viáveis circulantes, facilitando seu extravasamento e a colonização de novos microambientes (HONN et al. 1992; IKEDA et al. 2002).

As plaquetas circulam na corrente sanguínea por cerca de 10 dias e sua principal função descrita é promover a hemostasia. O contato entre receptores plaquetários e seus ligantes, que são apresentados por exposição da matriz extracelular subendotelial (MES) ou presentes em algumas células tumorais, conduz à ativação plaquetária. Esta ativação causa uma remodelação do citoesqueleto e alteração morfológica das células de discóide para esférica e desencadeia a exocitose de densos grânulos, pequenas vesículas intracelulares as quais são encontradas somente nas plaquetas e em seus progenitores (STEGNER e NIESWANDT 2011). As plaquetas ativadas podem liberar CD40L solúvel e são responsáveis por aproximadamente 95% da sCD40L em circulação. O CD40L é uma citocina essencial que leva à ativação de um amplo espectro de células imunes (SETIANTO et al. 2010)

Na circulação sanguínea, os clones tumorais também podem ativar as plaquetas por contato direto ou através da liberação de mediadores agonistas, tais como adenosina difosfato (ADP), a trombina, tromboxano A₂ (TxA₂) ou proteinase associada ao tumor como descrito por ZUCHELLA em 1989. O agregado plaquetário tumoral tem a capacidade de disseminar e embolizar para tecidos pulmonares, conforme descrito em modelos murinos (MALIK 1983). Vários estudos demonstram a ativação plaquetária aumentada em pacientes com neoplasia ABBASCIANO et al. (1995) e que essa ativação pode estar associada ao risco de metástases (HONN et al. 1992). A proteína de membrana P-selectina (CD62P) é um marcador utilizado para mensuração da ativação plaquetária. No entanto, alguns autores têm demonstrado uma perda da expressão de CD62P na superfície das plaquetas após o início da ativação, traduzindo-se em aumento dos níveis séricos de

CD62P (MICHELSON et al. 2001). Porém, estudos demonstram que os agregados de plaquetas-monócitos e plaquetas-neutrófilos, cuja formação é mediada pela interação entre as moléculas de adesão na superfície das plaquetas, como CD62P, podem ser uma alternativa sensível e confiável para mensurar a ativação plaquetária (MICHELSON et al. 2001; YIP et al. 2013).



Fonte: Adaptado de YEAMAN (2014).

Figura 10 - As plaquetas e sua relação com o sistema imune. BCR, B cell receptor; MHCII, major histocompatibility complex class II; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PRR, pattern recognition receptor; TCR, T cell receptor; TLRs, Toll-like receptors.

Além dos agregados de plaquetas e leucócitos, diferentes tipos de células tumorais também podem induzir a agregação plaquetária e, assim, conferir vantagem de sobrevivência na circulação. A agregação tumor-plaquetas pode proteger a neoplasia da defesa do sistema imune promovida pelas células NK (PALUMBO et al. 2005), sendo um mecanismo de escape tumoral. Os agregados plaquetários são cruciais para disseminação de células tumorais, pois menos de 0,1% das células tumorais vão conseguir sobreviver na corrente sanguínea de forma livre (FIDLER 1970). Após escapar do sistema imune, as células aderem aos órgãos distantes e começam a extravasar e colonizar nos tecidos-alvo. Para ocorrer o extravasamento, os clones tumorais precisam aderir ao endotélio para posterior migração transendotelial (MILES et al. 2008). Estes processos são mediados por diferentes receptores de adesão entre o tumor e as células endoteliais, mas são facilitados pela ação das plaquetas.

As plaquetas são reguladoras da permeabilidade vascular. Elas liberam *platelet-derived growth factor* (PDGF), *growth transformation factor* (TGF), *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e *ácido lisofosfatídico* (LPA) a partir de seus alfa-granulos e esta plêiade de substâncias influencia a integridade vascular no microambiente do agregado ligado ao endotélio (SMYTH et al. 2009). O crescimento de focos metastáticos é altamente dependente da neoangiogênese. Além de induzir a formação de novos vasos, as plaquetas são cruciais para a estabilização dos vasos recém-formados (RHEE et al. 2004).

Considerando a elevada incidência e a altíssima mortalidade do CG, como também os dados da OMS que alertam que 70% dos casos ocorreram em países em

desenvolvimento, desenhamos um estudo que objetiva avaliar alguns mecanismos biológicos que permita influenciar na melhoria dos critérios prognósticos e até servir de base para estudos futuros que tornem a decisão terapêutica menos empírica e mais personalizada. Os miRNA participam dos mecanismos biológicos da carcinogênese de várias neoplasias malignas e regulação da resposta imune. Além disso, a análise da expressão de receptores da superfamília do TNF (OX40 e CD40L), e da agregação de plaquetas e leucócitos no sangue de pacientes com CG pode contribuir para ampliar o conhecimento científico sobre os mecanismos da resposta imune nessa neoplasia.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de microRNAs, dos receptores OX40 e CD40L, e do agregado de plaquetas e leucócitos no câncer gástrico

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigo 1

- Identificar miRNAs diferencialmente expressos no tumor gástrico;
- Associar os miRNAs diferentemente expressos com as variáveis clínicas;
- Identificar genes-alvo associados aos microRNAs desregulados e o potencial desses genes na regulação da resposta imune.

Artigo 2

- Avaliar os níveis de expressão de OX40 em leucócitos no sangue de pacientes CG e controles;
- Associar os níveis de expressão de OX40 encontrados nos pacientes com o estágio clínico da doença.

Artigo 3

- Avaliar os níveis de agregados de plaquetas e leucócitos no sangue de pacientes CG e controles;
- Avaliar os níveis de ativação plaquetária (CD40L e CD62p) no sangue de pacientes CG e controles;
- Associar os níveis de agregados plaquetas-leucócitos e da ativação plaquetária (CD40L e CD62p) com o estágio clínico da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DETALHAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP e no A.C.Camargo *Cancer Center*. O período da coleta dos dados clínicos e das amostras biológicas foi de setembro de 2015 a agosto de 2018.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) sob nº. CAAE 28932814.2.0000.5205 (Anexo 1), seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Todos os participantes foram incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento livre esclarecido (TCLE - Apêndice 1).

3.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Os critérios de inclusão foram:

- pacientes com neoplasia gástrica (adenocarcinomas);
- pacientes que concordarem em participar do estudo;
- idade acima de 18 anos.

Os critérios de exclusão foram:

- pacientes com diagnóstico prévio de outras doenças oncológicas;

- pacientes com segundo tumor primário sincrônico;
- pacientes submetidos previamente a tratamentos oncológicos com quimioterapia ou radioterapia.

3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

O grupo de estudo foi pacientes com diagnóstico histológico de adenocarcinoma do estômago, atendido no HCP com idade acima de 18 anos, de ambos os sexos. Os pacientes apresentavam-se em diferentes estágios clínicos da doença e tiveram seu diagnóstico histopatológico determinado por cirurgia ou endoscopia digestiva alta.

3.3.1 Artigo 1 (miRNAs)

Para as análises comparativas de expressão dos miRNAs foram selecionadas 25 amostras de tecido tumoral fixado em formol e embocado em parafina e tecnicamente adequado para análises moleculares. Como controles, foram selecionadas 5 amostras de mucosas gástricas histologicamente normais colhidas por via endoscópica, fixadas em formol tamponado a 10% e embocadas em parafina proveniente de pacientes sem qualquer tipo de tumor.

3.3.2 Artigo 2 (Análise de OX40)

- **Pacientes:** foram realizadas análises em 24 pacientes, homens e mulheres (idade acima de 18 anos), com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico (CG),

admitidos para tratamento no serviço de cirurgia oncológica do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP).

Controles: Foram realizadas análises em 34 indivíduos saudáveis (ambos os sexos) que não possuíam história pregressa ou familiar de câncer, e assintomáticos, sendo acompanhantes dos pacientes, e/ou funcionários do HCP.

3.3.3 Artigo 3 (Análise de CD40L e agregado plaquetário)

- **Pacientes:** foram realizadas análises em 34 pacientes, homens e mulheres (idade acima de 18 anos), com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico (CG), admitidos para tratamento no serviço de cirurgia oncológica do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP).
- **Controles:** foram realizadas análises em 30 indivíduos saudáveis (ambos os sexos), idade acima de 18 anos, que não possuíam história pregressa ou familiar de câncer, e assintomáticos, sendo acompanhantes dos pacientes, e/ou funcionários do HCP.

3.4 PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO DOS SUJEITOS E COLETA DOS DADOS

Todos os pacientes que fizeram parte deste trabalho assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido no momento do atendimento e responderam a um questionário padronizado (Apêndice 2). Os dados clínicos foram coletados a partir do prontuário e transcritos neste questionário padrão previamente definido.

O diagnóstico histológico foi realizado no laboratório de histologia e patologia cirúrgica do HCP e, posteriormente, revisado por um segundo patologista. O diagnóstico seguiu a classificação preconizada pela OMS para tumores de estômago, assim como a classificação histológica de Lauren.

Os pacientes foram submetidos à tomografia computadorizada para confirmação do estadiamento do tumor, conforme rotina de estadiamento normalmente preconizada no HCP. O fluxograma da captação e exames realizados nesta pesquisa estão demonstrados na Figura 11.

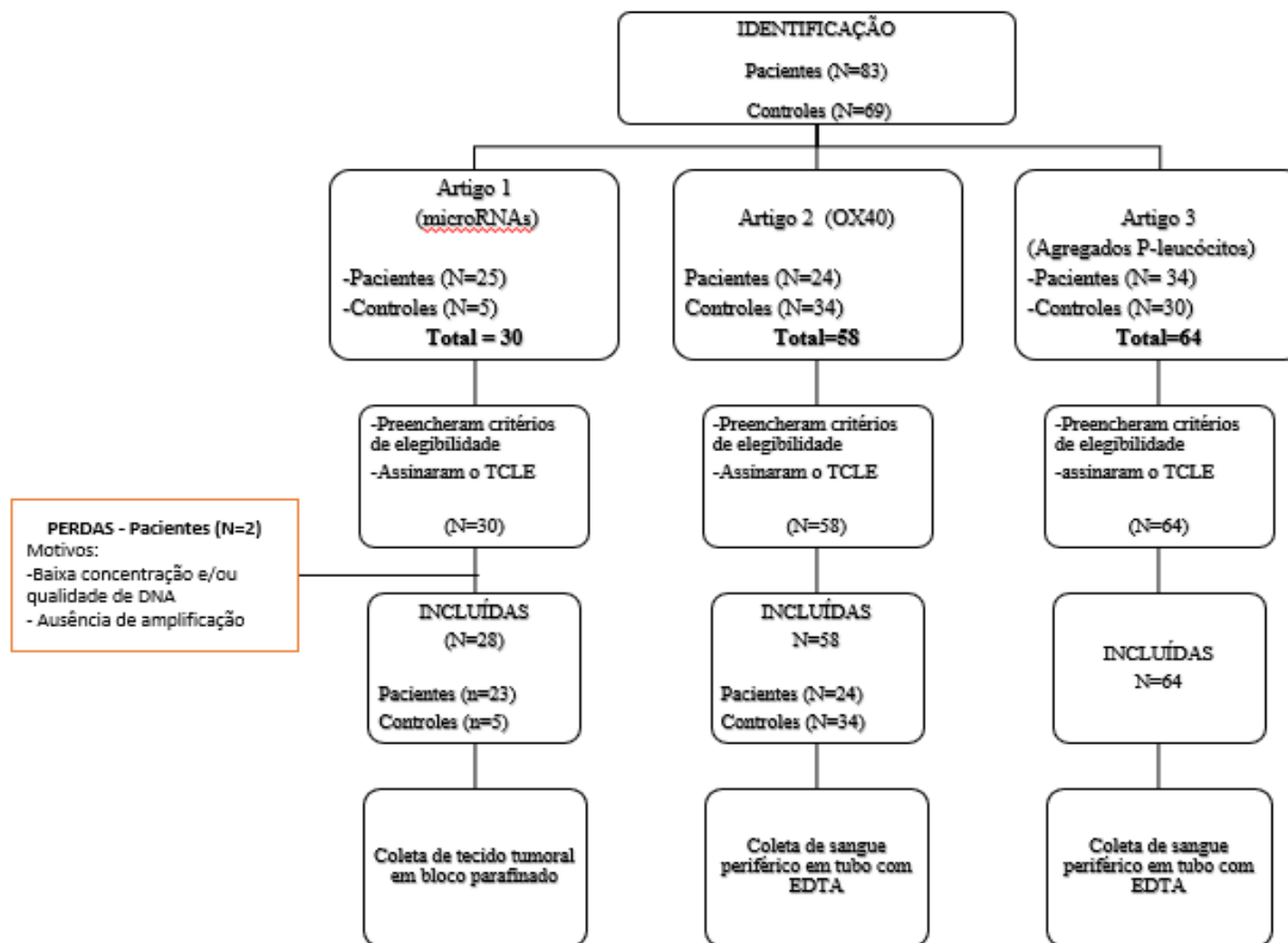


Figura 11 - Fluxograma de recrutamento dos pacientes com câncer gástrico e controles saudáveis.

3.5 TESTES LABORATORIAIS

3.5.1 Classificação histológica e estadiamento

Todos os casos de CG selecionados foram classificados e o estadiamento foi realizado de acordo com o sistema TNM preconizado pelo *American Joint Committee on Cancer-AJCC* (EDGE e COMPTON 2010), e foram utilizadas as classificações histológicas de câncer gástrico de Lauren e do grau histológico tumoral da OMS (EDGE e COMPTON 2010).

3.5.2 Microdissecção manual

Das primeiras 30 amostras selecionadas (mucosa gástrica normal ou tumoral) foram coletados 20 cortes histológicos de 5 µm de espessura da área de interesse a partir dos blocos de parafina correspondentes. Após as análises microscópicas das lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para identificação e marcação da área tumoral foi possível a realização da microdissecção manual (técnica conhecida como *scrape*) das lâminas previamente cortadas, garantindo a extração do material genético apenas das células de interesse. As áreas tumorais, ou de mucosa gástrica normal dos cortes histológicos, foram microdissecadas com bisturi cirúrgico descartável, e o material armazenado em microtubo no freezer à temperatura de menos 80°C.

3.5.3 Extração de RNA

A extração de RNA de tecido parafinado foi realizada com o uso do kit *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation for FFPE Samples* (Ambion - Applied

Biosystems, Austin, TX), que possibilita a extração de material genético de amostras parafinadas e previamente fixadas com formaldeído.

Para remover completamente a parafina do tecido tumoral após a microdissecção manual, foi adicionado 1 ml de xilol 100% (Allkimia, Brasil) e incubado por 3 min em termobloco a 50°C. Para a formação do pellet contendo o material genético no fundo do tubo, a fim de possibilitar o descarte do xilol sobrenadante, foi feita a centrifugação por 3 min a 14.000 rpm. Com o objetivo de remover o xilol das amostras e acelerar a secagem do pellet foram realizadas duas lavagens adicionando 1 ml de álcool 100% (Merck, Brasil) e centrifugando por 3 minutos a 14.000 rpm. Ao final das centrifugações o sobrenadante foi descartado. Para remover o etanol residual foi realizada uma centrifugação a vácuo por 10 min a 37°C.

Com o pellet livre de resíduos foi adicionado 200 µl de Digestion Buffer, 4 µl de Protease e incubado em termobloco por 15 min a 50°C e 15 min a 80°C. Para iniciar o processo de isolamento do RNA foi feita uma mistura com 240 µl de Isolation Aditive e 550 µl de etanol 100%. Os 790 µl dessa mistura foram adicionados no tubo contendo a amostra de tecido. Todo o volume contendo a mistura de reagentes e a amostra foi colocado em um tubo com uma coluna de filtro e centrifugado a 10.000 rpm por 30 segundos. Todo o volume que passou pelo filtro foi descartado e o filtro reinsertado no tubo vazio. A seguir foram realizadas duas lavagens com 700 µl da solução Wash 1 e 500 µl da Wash 2/3, ambas seguidas de centrifugação por 30 segundos a 10.000 rpm e descartando o conteúdo do tubo e mantendo a coluna de filtro.

Para encerrar a etapa de lavagens, foi realizada uma última centrifugação, desta vez sem reagentes, para remoção do fluido residual presente no filtro e novamente descartando o líquido e mantendo o filtro. Para o tratamento da amostra com DNase foi adicionado bem no centro do filtro 60 μ l de uma mistura de: 6 μ l de DNase buffer e 4 μ l de DNase e 50 μ l de água livre de nuclease (Sigma-Aldrich, EUA), incubando 30 minutos à temperatura ambiente.

Dando prosseguimento ao protocolo, foi adicionado novamente 700 μ l de Wash 1 na coluna de filtro. Após um minuto, o tubo foi centrifugado por 30 seg. a 10.000 rpm e descartado o líquido. Foram realizadas mais duas lavagens com 500 μ l de Wash 2/3, novamente centrifugando por 30 seg. a 10.000 rpm. Foi realizada uma última centrifugação sem reagente a 10.000 rpm por 1 min. para remover o fluido residual do filtro. A última etapa foi a eluição do RNA. Para essa etapa, o filtro foi transferido para um tubo novo e foi adicionado 20 μ l de água livre de nucleasse. Após um minuto o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por mais 1 min. Por fim, o filtro foi descartado e o tubo contendo o RNA eluído foi armazenado a - 80°C.

A concentração da solução de RNA foi mensurada através do espectrofotômetro NanoDrop ND3.0 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE) utilizando 1,5 μ l de amostra e verificando a absorbância em 260 nm (Figura 6). A taxa de absorbância do RNA A260/A280 funciona como seu indicador de pureza, sendo que taxas de RNA de boa qualidade ficam entre 1,8-2,1. A taxa de absorbância do RNA A260/A280 menor que 1,8 significa que há contaminação da amostra com fenol, proteína ou outros contaminantes com absorbância em 280 nm.

3.5.4 Determinação da expressão dos microRNAs por TaqMan

➤ Síntese de cDNA total

A síntese de DNA complementar (cDNA) total foi realizada de acordo com o protocolo *Megaplex™ Pools for microRNA Expression Analysis* (Applied Biosystems), que possibilita a detecção e quantificação de 380 miRNAs por amostra. Seguindo esse protocolo, usamos o Megaplex RT Primers (Pool A), que consiste em um conjunto predefinido composto por 380 oligonucleotídeos *stem-looped reverse-transcription* que são específicos para a síntese de cDNA a partir de miRNAs maduros.

➤ Pré-amplificação do cDNA total

Nessa etapa foi realizada a pré-amplificação específica do cDNA total a fim de aprimorar as análises das expressões de miRNAs realizadas posteriormente.

➤ Validação da expressão dos miRNAs - síntese do cDNA específico

A reação de síntese do cDNA específico para cada miRNA na etapa de validação foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados no manual TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems). Foi realizada a pipetagem da quantidade necessária para 10 ng de RNA para todas as amostras e adicionada água q.s.p. 9,16µL. Para o mix de RT os reagentes foram descongelados e submetidos à centrifugação rápida antes de serem adicionados, utilizando-se de capela de fluxo

laminar. Em seguida, foi adicionado em cada tubo, contendo 9,16 µl das amostras e água, 5,84µL de mix para reação RT, incubado por 5 min. No gelo e colocado no termociclador. As amostras de cDNA obtidas foram armazenadas em freezer -20°C.

Para as reações de qRT-PCR, os cDNA foram descongelados, homogeneizados e colocados no gelo. Para a constituição do mix de PCR, os reagentes também foram descongelados e submetidos à centrifugação rápida. Em seguida, a placa contendo 96 poços foi montada com a adição de 18,67 µl de máster mix e 1,33µL de cDNA, totalizando 20µl em cada poço. Após a selagem e centrifugação da placa, ela foi inserida no aparelho 7900HT fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Os resultados das expressões dos miRNAs foram analisados utilizando-se o *software RQ Manager 1.2* (Applied Biosystems).

➤ **TaqMan® Low Density Array (TLDA)**

A reação para determinação dos perfis de expressão dos miRNAs foi realizada com a metodologia TaqMan® Human MicroRNA Array. Nessa etapa ocorreu a amplificação do pool de cDNA pré-amplificado através de oligonucleotídeos sequência-específicos e das sondas presentes na placa TLDA. As sondas hibridizam-se especificamente à sua sequência complementar, sendo que essa hibridização fica entre o local de ligação dos oligonucleotídeos senso e antisenso. Cada sonda contém dois marcadores: o *reporter* (marcador fluorescente FAMTM), ligado na extremidade 5', e o *quencher*, ligado na extremidade 3'. Como a sonda está intacta, a proximidade com o *quencher* faz com que o marcador reporter fique

silenciado. Quando a DNA polimerase estende o oligonucleotídeo ligado à amostra de cDNA, ocorre a quebra da sonda hibridizada, separando o quencher do reporter, aumentando a fluorescência do reporter. O conjunto desses sinais fluorescentes gerados indica o nível de expressão dos miRNAs nas reações de PCR, detectando a presença do alvo em tempo real. Cada array (placa TLDA, Pool A) contém 377 miRNAs (funcionalmente definidos e amplamente expressos) e 7 controles. Os miRNAs avaliados estão indexados no Sanger miRBase v14 (disponível em: <http://www.mirbase.org/>).

Os resultados foram analisados pelo software RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems). O nível de expressão dos miRNAs foi quantificado relativamente à expressão de um miRNA controle e também foi normalizado de acordo com um snRNA (small nuclear RNA) calibrador. O resultado final (RQ ou fold) foi expresso como um aumento ou diminuição da expressão de um miRNA em n-vezes quando comparado ao controle e ao calibrador, da seguinte forma $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct$ é a diferença entre valor ΔCt do CG e do tecido gástrico normal - calibrador ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{miRNA \text{ Carcinoma gástrico}} - \Delta Ct_{snRNA \text{ calibrador}}$), e o ΔCt é a diferença entre o valor de Ct do CG e do controle ($\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{miRNA \text{ controle}}$). Foi utilizado como calibrador endógeno o snRNU6.

3.5.5 Análise por ferramentas de bioinformática

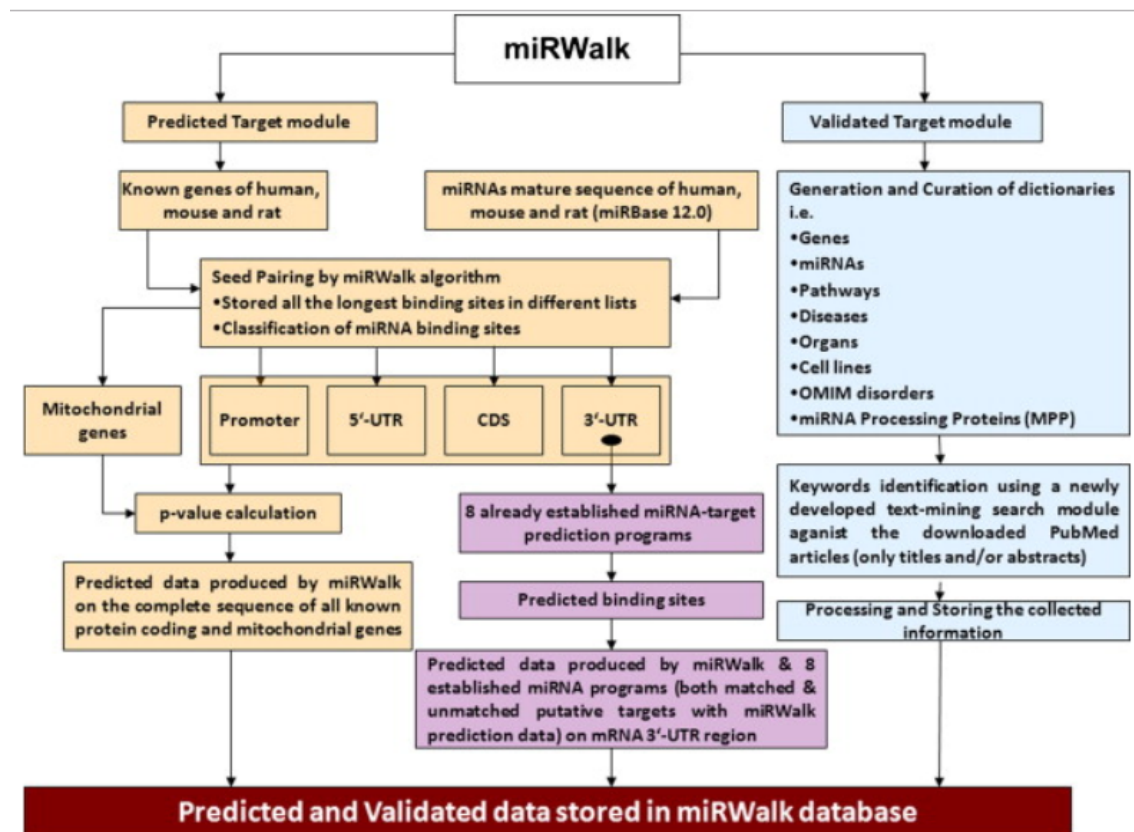
➤ Banco de dados MirWalk

O miRWalk é um banco de dados abrangente de microRNAs de humanos, camundongos e ratos (miRNAs), e seus alvos previstos e validados associados a genes, vias, doenças, órgãos, linhagens de células e fatores de transcrição.

O miRWalk é composto por dois módulos: o módulo predição de alvos hospeda informações de interações de alvos de miRNA com a sequência completa de todos os genes conhecidos de humanos, camundongos e ratos. Os resultados da análise também são apresentados juntamente com os resultados de 8 programas de predição de alvos miRNA estabelecidos para a comparação e com diferentes algoritmos. O programa fornece também os locais de ligação do miRNA associados a 449 vias biológicas humanas. Os módulos-alvo validados hospedam recursos novos e exclusivos em informações de interação de miRNA, validadas experimentalmente e associadas a genes, vias, doenças, órgãos e linhagem de células. O miRWalk é o único banco de dados que fornece os possíveis locais de ligação de miRNAs na sequência completa (promotor, 5' UTR e 3' UTR) de genes conhecidos e 3 genomas mitocondriais completos.

O algoritmo miRWalk é baseado em uma abordagem computacional que identifica a mais longa complementariedade consecutiva entre miRNA e sequências de genes. Com base no complemento de Watson-Crick, ele começa a andar na sequência genética completa e identifica possíveis sítios de ligação de miRNA na sequência completa de todos os genes conhecidos. Então, o miRWalk compara seus locais de ligação de miRNA identificados com os resultados de 8 programas de predição de miRNA-alvo estabelecidos, ou seja, DIANA-microT, miRanda, miRDB,

PicTar, PITA, RNA22, RNAhybrid e TargetScan / TargetScanS. Finalmente, miRWalk incorpora todos os locais de ligação de miRNA previstos produzidos pelo algoritmo miRWalk e os 8 programas estabelecidos em um banco de dados relacional (miRWalk). Depois disso, faz uma extensa pesquisa no banco de dados PubMed para recuperar todas as informações disponíveis sobre miRNAs humanos, de ratos e ligados a genes, vias, doenças, órgãos, linhas celulares e proteínas conhecidas por estarem envolvidas no processamento de miRNA.



Fonte: miRWalk - A database on Predicted and Published MicroRNAs (2015).

Figura 12 -Algoritmo de execução do programa miRwalk

➤ **DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis**

DAVID (um programa acessível pela internet) fornece um conjunto abrangente de ferramentas de anotação funcional para os pesquisadores entenderem o significado biológico por trás da grande lista de genes. Para qualquer lista de genes, as ferramentas do DAVID são capazes de: identificar vias biológicas enriquecidas, descobrir grupos genéticos relacionados à via enriquecida, visualizar genes nos mapas genéticos BioCarta e KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - banco de dados online), listar proteínas de interação, entre outras funcionalidades.

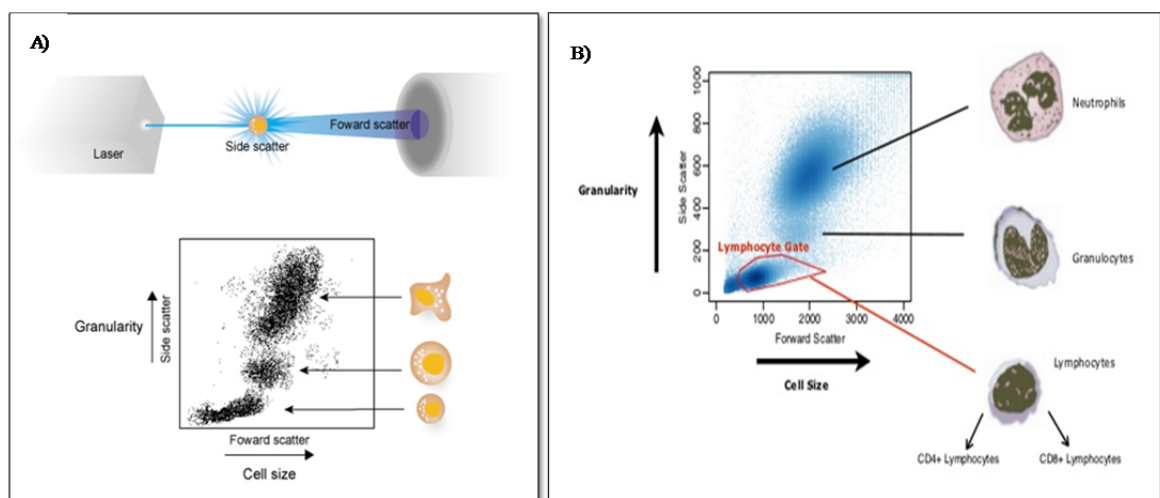
3.5.6 Técnica de citometria de fluxo

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma tecnologia avançada e rápida que permite contar, examinar e classificar células individuais e medir simultaneamente múltiplos parâmetros. Antes da análise, as células individuais em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos, como PE, FITC, PerCP e PE-CY-7, que diferem um do outro em relação à cor que emitem. Os anticorpos monoclonais têm especificidade para moléculas expressas na membrana e no interior das células, o que possibilita caracterizar leucócitos humanos e outras células humanas, bem como analisar suas funções. Essas moléculas são identificadas como “clusters of differentiation” (CD).

No citômetro de fluxo, o sistema de fluidos canaliza uma amostra de células em um único fluxo para que as células passem uma a uma através de um feixe focalizado de um laser. À medida que cada célula passa através do feixe, as propriedades de dispersão da luz e a fluorescência são coletadas pelo sistema óptico e direcionadas para vários detectores. Os sinais recebidos pelos detectores são então

convertidos em valores numéricos pelo sistema eletrônico e analisados em software específico.

Conforme uma célula passa por um feixe de laser, a luz é espalhada em direções diferentes e dois parâmetros são definidos: tamanho de célula, representado pela dispersão direta da luz do laser (Forward Scatter - FSC); e complexidade celular (granularidade), representada por dispersão lateral da luz do laser (Side Scatter - SSC). Esta informação é exibida visualmente em um gráfico de pontos (dot plot), no qual cada ponto representa uma única célula, diferenciadas pela forma como dispersam a luz e pela fluorescência, que é proporcionalmente direta à quantidade de moléculas expressas na célula. A Figura 13 apresenta uma visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo.



Fonte: BD Biosciences, CA.

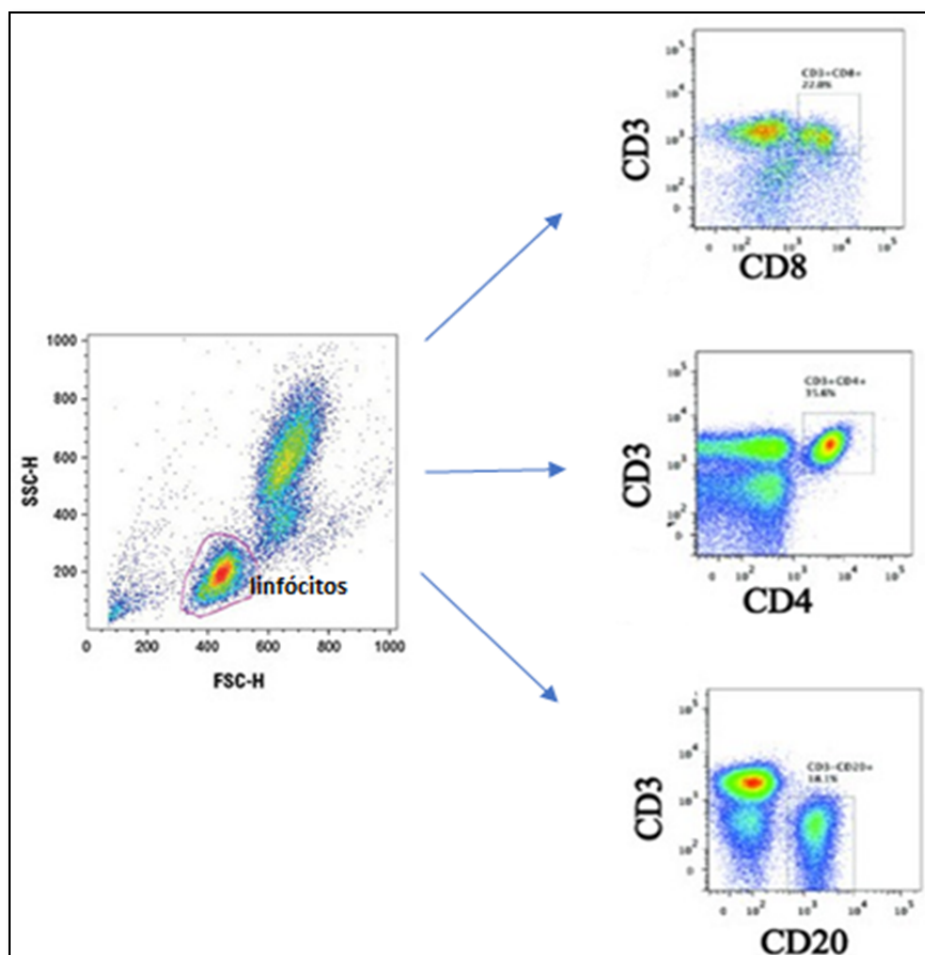
Figura 13 - Visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo

➤ **Procedimento de coleta de sangue e imunofenotipagem de células T totais TCD4+, TCD8+ e linfócitos B.**

O volume de 4 mL de amostra de sangue venoso foi coletado em tubos com EDTA e mantidas a temperatura ambiente (24 °C). O tempo entre a coleta e o processamento foi de até 60 minutos. Antes do processamento, o tubo com amostra de sangue foi colocado no equipamento homogenizador (BD Bioscience) e em seguida, foram analisadas por citometria de fluxo.

A alíquota de 50 µL de sangue periférico foi adicionada em tubo de poliestireno de citometria com 2 µL de soro humano AB+, e 2 mL de tampão de lise de hemácias (FACS[®] Lysing Buffer, Becton Dickinson, Mountain View, CA) e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 2 lavagens consecutivas, adicionando 2 mL de phosphate buffered saline (PBS) 1x concentrado (pH 7,4) e centrifugando a 300 x g por 5 min a 22°C. Após a segunda lavagem, foi descartado o sobrenadante e as células foram marcadas com 5 µL de anticorpos monoclonais (BD Biosciences, CA) anti-CD45, anti-CD3 (células T), anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD20 (células B) conjugados a fluorocromos diferentes. Para marcação de OX40 em linfócitos, foram adicionados anti-CD134 (OX40) conjugado ao fluorocromo. Após a incubação, foi realizada uma última etapa de lavagem, em seguida foi realizada a aquisição no citômetro de fluxo FACSVersé (BD Biosciences, CA) (Figura 14). Foram adquiridos 20.000 eventos celulares na região dos linfócitos. Os dados obtidos analisados com o programa BD FACSuite[™] (BD Biosciences, CA) e os resultados percentuais foram comparados entre os pacientes e controles saudáveis. Linfócitos T totais, TCD4, TCD8 e linfócitos B

foram expressos em valores percentuais e os resultados apresentados pelos pacientes foram comparados aos dos controles saudáveis.



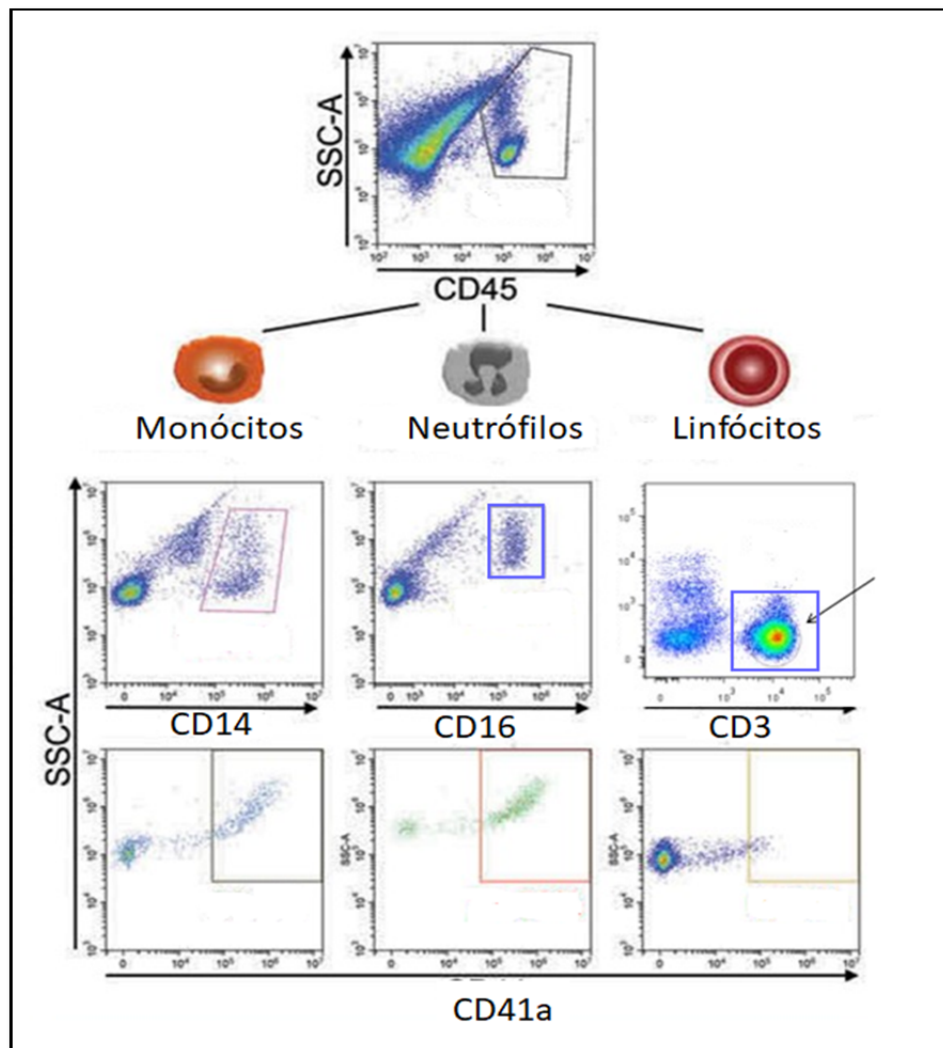
Fonte: BD Biosciences, CA.

Figura 14 - Figura esquemática da estratégia de análise

➤ **Análise de agregado de plaquetas por citometria de fluxo**

Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos com EDTA e mantidas a 4 °C por um tempo máximo de 1h. Para a preparação da amostra, foram realizados os protocolos descritos por MACEY et al. (2002), HARDING et al. (2007) e BOURNAZOS et al. (2008).

Foram adicionados 5 uL de anticorpos monoclonais anti-CD45, anti-CD3 para células T, anti-CD20 para células B, anti-CD41a (GpIIb / IIIa) para plaquetas, anti-CD62p (GMP 140) e anti-CD40L para avaliar ativação plaquetária, anti-CD16 para neutrófilos e anti-CD14 para monócitos (BD, Pharmigen, San Diego, CA, EUA) e incubados a 20 °C por 20 minutos no escuro, conforme descrito por GRANJA et al. (2015). A lavagem das células foi realizada com 2 mL de Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) [1x] e as células foram então centrifugadas a 300 x g durante 5 min a 20 °C. O procedimento de lavagem foi repetido duas vezes. Após a lavagem, os sobrenadantes foram descartados, e as células foram analisadas com 250 µL de solução salina no citômetro de fluxo (FACSVERSE; Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, EUA). Para a citometria de fluxo, 20.000 eventos celulares foram adquiridos, e os resultados foram analisados pelo programa FACSuite (Becton Dickinson) (Figura 15).



Fonte: Adaptado de FINSTERBUSCH et al. (2018).

Figura 15 - Avaliando e interpretando os agregados de plaquetas-leucócitos.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

➤ Análise descritiva e de associação

A estatística descritiva das variáveis categóricas foi representada em tabelas com distribuição das frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas como medidas de tendência central (mediana, mínimo e máximo)

Para as variáveis quantitativas, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. As variáveis quantitativas com distribuição não normal foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25%-75%). Teste não paramétrico de Mann-Whitney foram utilizados para comparação entre dois grupos. Teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* foram utilizados para comparação entre três grupos. Para evitar erro estatístico tipo I, as análises pelo teste *Kruskal-Wallis* foram seguidas pela correção de Dunn para testagem múltipla. Foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada através do programa *graphpad prism v8.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

➤ **Análise do miRNAs**

Para análise dos microRNAs, considerando como ponto de corte o FDR (teste T) inferior a 0,05, foi realizada uma análise de clusterização (agrupamento) hierárquica não supervisionada de amostras e microRNAs pelo método de Pearson. Para análise de predição de alvos, os miRNAs foram selecionados de acordo com a modulação (positiva ou negativa) para a busca no banco miRWalk versão 2.0. As listas de genes identificados foram submetidas separadamente ao programa DAVID Bioinformatics Resources 6.8 para identificação de vias biológicas relacionadas aos genes-alvo. Nesta análise, foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0.05$.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), sob n°. CAAE 39976214.9.000.5205 e CAAE 28932814.2.0000.520, seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Todos os participantes foram incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE - Apêndice 1).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados desta tese foram apresentados na forma de três artigos. A formatação do texto dos artigos foi realizada conforme orientações das revistas

4.1 ARTIGO 1

Tipo: original paper

Título: *MicroRNA expression profiling reveals novel insights into immune-related pathways involved with gastric cancer.*

Autores: Mário Rino Martins, Renata Santos Almeida, Norma Lucena-Silva, Cláudia Malheiros Coutinho-Camilo, Israel Torjal, Rogério Luiz dos Santos, José Iran Costa Júnior, Leuridan Cavalcante Torres e Maria Dirlei F. S. Begnami.

Revista: *Medical Oncology* (ISSN 1357-0560)

Data de publicação: Submetido em maio de 2019

Fator de impacto (JCR 2018): 2,92

Qualis (Medicina I): A2

Situação: em análise pelos revisores do periódico

Medical Oncology
**MicroRNA expression profiling provides novel insights into immune-related pathways
involved in gastric cancer**
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	MicroRNA expression profiling provides novel insights into immune-related pathways involved in gastric cancer
Article Type:	Original Research
Keywords:	Gastric cancer; MicroRNA; Microarray analysis; Immune system; Bioinformatics
Corresponding Author:	Mario Rino Martins, M.D. Hospital de Cancer de Pernambuco Recife, Pernambuco BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Hospital de Cancer de Pernambuco
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Mario Rino Martins, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Mario Rino Martins, M.D. Renata Santos Almeida, Ph.D Norma Lucena-Silva, Ph.D Cláudia Malheiros Coutinho-Camilo, Ph.D Israel Torjal, Ph.D Rogério Luiz dos Santos, M.D Cristiana Libardi Miranda-Furtado, Ph.D Álvaro Fabrício Lopes Rios, Ph.D Leuridan Cavalcante Torres, Ph.D Maria Dirlei F.S. Begnami, Ph.D
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	FAPESP - from Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (12/12551-9) Dra Maria Dirlei F.S. Begnami
Abstract:	Gastric cancer is one of the most common cancers, and an increasing number of studies have found that microRNAs (miRNAs) play important roles in gastric cancer progression; however, the roles of specific miRNAs involved in the immune response to this disease remain unclear. We compared the miRNA expression in tissues from primary gastric cancer patients and healthy controls to find miRNAs dysregulated in gastric cancer and used bioinformatics tools to determine potential roles of these miRNAs in the immune system. We evaluated 25 primary gastric cancer tissues and five healthy gastric tissues. Quantitative real-time polymerase chain reaction was performed for a set of miRNAs, followed by the prediction of their target genes and functional enrichment analysis of these targets. Analysis of a microarray dataset showed that the miRNA miR-196a-5p was significantly upregulated, while miR-374a-5p and miR-375 were downregulated in gastric cancer patients. In addition, miR-374-5p was significantly downregulated in patients with metastasis compared with its expression levels in non-metastatic patients ($p = 0.03$). Bioinformatics analysis suggested that the pathways regulated by these differentially expressed miRNAs were

	related to the immune response, cell adhesion, and cell migration. Most importantly, this study provides a new insight into the potential use of multiple miRNAs to find distinct pathways of immune regulation in gastric cancer.
Suggested Reviewers:	<p>Fernando Augusto Soares, Ph.D Sao Paulo University fasoares@icloud.com He has expertise in gastric cancer, cancer biology, biomarkers and molecular biology.</p> <p>https://publons.com/researcher/2742579/fernando-a-soares/</p>
	<p>Estela Maria Novak, Ph.D Sao Paulo University enovak@usp.br She has expertise in molecular biology and cancer</p> <p>https://publons.com/researcher/2748907/estela-m-novak/</p>
	<p>Patricia Palmeira Daenekas Jorge, Ph.D Sao Paulo University patpalm@usp.br She has expertise in immunology, cancer and molecular biology.</p> <p>https://publons.com/researcher/2618747/patricia-palmeira/</p>
	<p>Neeti Sharma, Ph.D Deemed University neetimohan27@gmail.com She has expertise in microRNA and cancer</p>
	<p>Sachin Gopalkrishna Pai, Ph.D University of South Alabama, AL, USA spai@health.southalabama.edu He has expertise in cancer immune regulation, immunotherapy and immune pathway.</p>

MicroRNA expression profiling provides novel insights into immune-related pathways involved in gastric cancer

Mário Rino Martins^{1,*}, Renata Santos Almeida², Norma Lucena-Silva², Cláudia Malheiros Coutinho-Camilo³, Israel Torjal³, Rogério Luiz dos Santos¹, Cristiana Libardi Miranda-Furtado⁴, Álvaro Fabricio Lopes Rios⁵, Leuridan Cavalcante Torres⁶, Maria Dirlei F.S. Begnami⁷

¹ Oncology Surgical Department, Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer - Hospital do Câncer de Pernambuco, Recife, Brazil

² Aggeu Magalhães Institute/Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil

³ International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

⁴ Drug Research and Development Center, Postgraduate Program in Medical and Surgical Science, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

⁵ Center of Bioscience and Biotechnology, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁶ Translational Research Laboratory Prof. C.A. Hart, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil

⁷ Anatomic Pathology Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

* Correspondence: Mário Rino Martins

Tel: +55 81 3217 8000; Mobile: +55 81 99607 7665

Fax +55 81 2122 4703

E-mail: mario_rino@hotmail.com

Acknowledgments We thank Valéria Lúcia de Melo Lobo Tavares and Italaney Silva for their support in data collection. We also thank the A.C. Camargo Cancer Center and Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer for institutional support. This study was partially

supported by a grant from Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (number 12/12551-9 to M.D.F.S.B.).

Abstract

Gastric cancer is one of the most common cancers, and an increasing number of studies have found that microRNAs (miRNAs) play important roles in gastric cancer progression; however, the roles of specific miRNAs involved in the immune response to this disease remain unclear. We compared the miRNA expression in tissues from primary gastric cancer patients and healthy controls to find miRNAs dysregulated in gastric cancer and used bioinformatics tools to determine potential roles of these miRNAs in the immune system. We evaluated 25 primary gastric cancer tissues and five healthy gastric tissues. Quantitative real-time polymerase chain reaction was performed for a set of miRNAs, followed by the prediction of their target genes and functional enrichment analysis of these targets. Analysis of a microarray dataset showed that the miRNA miR-196a-5p was significantly upregulated, while miR-374a-5p and miR-375 were downregulated in gastric cancer patients. In addition, miR-374-5p was significantly downregulated in patients with metastasis compared with its expression levels in non-metastatic patients ($p = 0.03$). Bioinformatics analysis suggested that the pathways regulated by these differentially expressed miRNAs were related to the immune response, cell adhesion, and cell migration. Most importantly, this study provides a new insight into the potential use of multiple miRNAs to find distinct pathways of immune regulation in gastric cancer.

Keywords Gastric cancer; MicroRNA; Microarray analysis; Immune system; Bioinformatics

Introduction

Stomach cancer is a public health problem worldwide, with an estimated 1,000,000 new cases and 783,000 deaths per year, thus accounting for 8.8% of the cancer deaths globally, with 70% of the new cases and deaths occurring in developing countries [1]. Brazil and, specifically, its Northeast region are high-incidence areas for this disease [1]. Thus, it is important to better understand the mechanism of gastric cancer (GC) progression, including proliferation, growth, migration, invasion,

and apoptosis [2]. Numerous studies have demonstrated that non-coding RNAs play important roles in the GC initiation and progression [3, 4].

MicroRNAs (miRNAs, miRs) are small non-coding RNAs of 20–22 nucleotides in length, which are involved in crucial biological processes [5]. miRNAs regulate gene expression through binding to the 3' untranslated region (UTR) of target mRNAs, thus leading to mRNA cleavage or suppression of its translation [6]. Abnormal expression levels of miRNAs are a well-known and important issue in cancer development [7] and have been shown to be involved in multiple steps in GC tumorigenesis [8, 9].

Recent evidence has indicated a promising role for miRNAs in the risk assessment, prevention, early diagnosis, and prognosis of GC [10, 11]. miRNA expression profiling is becoming an important tool to reveal different tumor types and gene activity in cancer [12, 13]. Owing to their involvement in the regulation of expression of many mRNAs, miRNAs can modulate various physiological and pathological responses [14], thus providing important insights into disease severity and prognosis. Studies of miRNAs have revealed a new layer of the regulation of gene expression that affects many biological systems, including the immune system [15]. More than 100 different miRNAs are expressed by cells of the immune system and have the potential to influence molecular pathways that control innate and adaptive immune responses [15, 16].

The aims of the present study were to identify differentially expressed miRNAs in GC, determine their associations with clinical variables, identify their putative target genes, and to assess their potential to influence the outcomes of immune responses, using a series of bioinformatics methods.

Materials and methods

Patients

The study included patients diagnosed with potentially curable GC at the Hospital do Cancer de Pernambuco from 2014 to 2017. The inclusion criteria of the study were histologically confirmed diffuse or intestinal-type gastric carcinoma, and all patients were newly diagnosed. None of the patients had received chemotherapy, radiotherapy, or immunotherapy before sampling. The

exclusion criteria were past treatments of neoplasia or autoimmune disease. We prospectively collected information on clinical characteristics of the patients. Cancer staging was performed according to the 7th edition of the American Joint Committee on Cancer tumor–node–metastasis (TNM) criteria [17].

All samples were obtained from surgical specimens of patients with GC, and all patients provided written informed consent for the use of these tissues for research purposes. We obtained 25 GC tissues and also collected five normal gastric biopsy samples from the antral part of the stomach of control subjects who were referred for upper gastrointestinal endoscopy due to symptoms of dyspepsia and had no previous history of malignancy. The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Research Committees of Hospital do Câncer de Pernambuco (approval number. CAAE 28932814.2.0000.5205).

miRNA expression analysis by TaqMan® low-density array

For this analysis, we used 23 gastric tumor tissues and five gastric normal tissues as controls. Two patients were excluded because of inadequate samples. miRNA expression profiles were determined using a TaqMan low-density array (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's protocol. Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using a 7900 HT Fast real-time PCR system (Applied Biosystems), and relative miRNA quantification was performed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [18]. Data analyses were performed by comparing the tumor and control groups. A pool of the normal samples was used for calibration, and hsa-miR-10b, which showed the most stable expression in the sample set, was used as a reference. Calculations were performed using the R software (<https://cran.r-project.org/>), and only differentially expressed miRNAs, with a false discovery rate (FDR) ≤ 0.01 , were considered for further analysis.

Differences in miRNA expression according to clinical variables

The most differentially expressed miRNAs between tumor and normal tissues were selected based on fold changes (FCs; the ratio of median relative expression in the tumor group to that in the control group >10.0) and further investigated for their association with clinical variables. A power

analysis for the study design was conducted using G*Power 3 [19] based on the means and standard deviations of relative miRNA levels, as reported by Baggish et al. [20]. Power calculations were also performed on a number of physiological measures from the current study to ensure that the sample sizes were adequate for detecting between-group differences in these variables. A sample size of $N = 30$ was required to detect between-group differences in the mean miRNA levels by the Mann–Whitney test (power of 80%; $\alpha = 0.05$). miRNA expression was considered to be significantly different between the two groups if the FDR-adjusted p -value was less than 0.05 and FC of expression was greater than 10 in either direction. In the patient group, the relative expression of each miRNA was analyzed according to the histological grade (G1/G2 versus G3), lymph node involvement (negative versus positive), tumor location (proximal versus distal), metastasis (positive versus negative), and Lauren classification (diffuse versus intestinal). Considering that variables did not show a normal distribution (using the Kolmogorov–Smirnov test), the Mann–Whitney U -test was performed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). For all statistical tests, p -values were two-tailed, and p was set to 0.05.

Target prediction and functional annotation

Potential mRNA targets of the miRNAs selected for analysis according to clinical variables were predicted using miRWalk v2 [21, 22], with its own algorithm and three other tools (RNA22, miRanda, and TargetScan) integrated into the system. We only used 3'-UTRs of mRNAs for target prediction and considered interactions with the miRNA seed region (nucleotides 2–8). Only targets predicted with at least three tools were considered for further analysis. Functional annotation was conducted separately for targets of each selected miRNA differentially regulated in GC. The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) v. 6.8 [23] was used for pathway enrichment assessment (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways).

Results

The clinical and pathological characteristics of GC patients are summarized in Table 1.

miRNA expression in gastric cancer and normal gastric tissues

miRNA expression patterns significantly differed between GC and normal gastric tissues (Fig. 1 and Table 2). FC filters included the requirements that the miRNA expression was greater than or equal to two-fold of the control level for upregulated miRNAs and less than two-fold of the control level for downregulated miRNAs.

Using an arbitrary FC cutoff of >10 and a p -value cutoff of <0.01 , among the differentially expressed miRNAs, one (miR-196b-5p) was found to be significantly upregulated and two (miR-374-5p and miR-375) were found to be significantly downregulated in GC tissues versus normal gastric tissues (Table 2).

Analysis of miR-196b-5p, miR-374-5p, and miR-375 according to clinical parameters

miRNA expression analysis according to clinical parameters revealed that miR-374-5p was significantly downregulated in GC patients with metastasis compared with its expression in no-metastasis group ($p = 0.03$). miR-375 was significantly upregulated in the histological G3 group compared with its expression in G1 and G2 tissues ($p = 0.05$). No statistical differences were found in the expression of miR-196b-5p, miR-374-5p, and miR-375 depending on the lymph node involvement, tumor location, and Lauren classification. In addition, miR-196b-5p was not associated with metastasis or histological grade parameters (Table 3).

Analysis of miR-196b-5p, miR-374-5p, and miR-375 associations with biological pathways by functional enrichment

The pathways for miR-375 (Fig. 2a), miR-196b-5p (Fig. 2b), and miR-374-5p (Fig. 2c), identified by microarray analysis, included the gap junction, mRNA surveillance pathway, gonadotropin-releasing hormone signaling pathway, proteoglycans in cancer, Ras signaling pathway, pathways in cancer, pancreatic and colorectal cancer, and tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway. Further details of the pathways associated with miR-196b-5p, miR-374-5p, and miR-375 are shown in Fig. 2.

Relation of miRNAs differentially expressed in gastric cancer to cancer hallmarks and mediators of tumor immune escape

Overall, we found miRNA target genes (*TNFRSF1B*, *TRAF1*, and *TRAF2*) in the pathways linked to the immune system, including hsa04668:TNF signaling pathway, related to aberrant miRNA expression. The gene *PDCD1* (*PD-1*) was identified in several immune-related biological pathways, linked to the immune system and major cancer hallmarks, including hsa04660:T-cell receptor signaling pathway and hsa04514:cell adhesion molecules (CAMs). The gene *CD274* (*PDL-1*) was identified in a pathway linked to cancer hallmarks, hsa04514:CAMs. The *CD40LG* (*CD40L*) gene was identified in several biological pathways related to tumor-regulated miRNAs (with increased expression in the tumor relative to the control group). The *CD40L*-involving biological pathways were found to be linked to the immune system, as well as the hsa04660:T-cell receptor signaling pathway, hsa04514:CAMs, and hsa04060:Cytokine–cytokine receptor interaction.

Discussion

In the present study, we established a carefully designed procedure to identify a miRNA profile of GC patients. Aberrant miRNA expression was reported in various solid tumors, including breast, lung, pancreas, and colon cancer [24, 25]. miRNAs can act as tumor suppressors and as oncogenes [26]. The relationships between miRNAs and tumors have thus become the focus of cancer studies [27].

Our study revealed that the miR-196b-5p expression was higher in GC tissues than in normal tissues. To date, there have been a few studies on miR-196b-5p in GC. miRNAs are abnormally expressed in tumor tissues and body fluids of GC patients. Because detection of miRNAs in the plasma, serum, urine, and gastric juice can be used in the diagnosis, several studies have evaluated the diagnostic performance of miRNAs in body fluids in GC patients, and the results showed that many miRNAs had certain value for GC diagnosis, recurrence monitoring, and/or clinical staging. Tsai et al. [28] have reported that the lack of promoter methylation in miR-196b may explain its overexpression in the majority of GCs, which can be used as a tumor biomarker. Lee et al. [29] have reported that miR-196b-5p is upregulated in a Korean GC population. However,

Liu et al. [30] have reported that miR-196b-5p is downregulated in a GC cell line. This result contradicts to our data and those of Lee et al. [29]; however, the study [30] was conducted on a GC cell line rather than on primary tumor tissues, which suggests that the tumor microenvironment and lifestyles may affect the regulation of miR-196b-5p and indicates that in vitro studies, using a tumoral lineage rather than a primary tumor for miRNA analysis, may not be adequate.

miR-375 is frequently downregulated in various tumor types, being a tumor suppressor and inhibiting malignant characteristics of cancer cells, and it is associated with the proliferation, apoptosis, invasion, and metastasis [31]. Our results showed differences in the expression of miR-375 between histological types of GC.

In this study, the expression of miR-374a-5p was significantly lower in gastric adenocarcinoma tissues than in normal tissues. Xie et al. [32] have demonstrated that miR-374a-5p is involved in tumor metastasis and invasion. Our results suggest that miR-374a-5p could be a good biomarker for the risk of GC metastasis. Wu et al. [33] have found that miR-374a inhibited the cell proliferation and invasion of lung adenocarcinoma, at least partially, through the repression of transforming growth factor alpha (*TGFA*) gene expression. This newly identified miR-374a-mediated *TGFA* gene silencing may lead to better understanding of the molecular mechanisms of GC progression.

Recently, emerging bioinformatics methods have accelerated the identification of the mechanisms involved in GC development at the molecular level. miRNAs have been reported to regulate the activity of ~30% of all protein-coding genes in the human genome [34]. We predicted, using bioinformatics resources, possible genetic pathways involving the three above-mentioned miRNAs, among which both miR-196b-5p and miR-374a-5p were associated with the regulation of cancer pathways. The interactions between dysregulated miRNAs and their potential target genes are complex and can be influenced by various factors, such as pathology, hypoxia, and infection [35].

It has also become clear that miRNAs play multiple roles in the negative regulation of numerous immune checkpoints. A network of miRNAs directly and indirectly controls the expression of immune checkpoint receptors, and several miRNAs can target multiple checkpoint

molecules, mimicking the therapeutic effect of a combined immune checkpoint blockade [36]. Standard treatment options for patients with advanced GC show limited efficacy and are associated with some toxicity, which necessitates the development of more effective therapies for improving treatment outcomes. Immunotherapy involving immune checkpoint inhibitors has emerged as a new treatment option, and in the near future, miRNAs may become important components of immune checkpoint therapy [37].

We found several target genes, such as *TNFRSF1B*, *TRAF1*, *TRAF2*, *PDCD1* (*PD-1*), *CD274* (*PDL-1*), and *CD40L*, which are involved in immunological pathways and are significantly affected by the miRNA in GC. TNF- α and its receptors, TNFRSF1A and TNFRSF1B, belong to the TNF/TNFR superfamily (TNFRSF), and interactions of these genes regulate the inflammation and increase the invasive capacity and metastatic potential of tumor cells. TNF- α induces a cascade of other inflammatory cytokines and chemokines and has been considered one of the key mediators of the immune system. TNF- α plays a therapeutic role in destroying tumor blood vessels and inducing the apoptosis and necrosis of tumor cells [38]. However, when chronically produced, with persistent inflammation in the tumor microenvironment, TNF- α can act as a tumor promoter by promoting DNA damage, enhancing proangiogenic functions, and increasing the expression of matrix metalloproteinases and endothelial adhesion molecules [39]. Hamano et al. [40] showed that TNF, in concert with interleukin (IL)-2, preferentially upregulated the mRNA and surface expression of TNFR2, 4-1BB, and OX40 on regulatory T cells (Tregs) [40]. Thus, TNF amplifies its stimulatory effect on Tregs by inducing TNFRSF members [40]. Our previous study has demonstrated a higher expression of OX40 in T cells of GC patients [41]. These findings indicate that miRNAs may be important regulatory molecules in T cells in GC.

The interaction between PD-1 and PD-L1 has been demonstrated to negatively regulate T-cell activation and function, leading to the inhibition of the immune response in cancer patients [42]. However, little is known about the operation of the PD-1/PD-L1 pathway in gastric adenocarcinoma patients. Chiu et al. [43] characterized the PD-1 expression profile in gastric adenocarcinoma patients and found a significant increase in PD-1 expression in peripheral blood and gastric tissue,

which could promote the apoptosis of CD3⁺ T cells. Our findings corroborated the results of this previous study and provided new insights into possible immune targets in GC.

We identified miRNAs with significantly up- or downregulated expression in GC, potentially influencing *CD40L* gene expression. These findings indicate that these miRNAs may downregulate *CD40L* mRNA and repress its protein translation. CD40L is a pivotal molecule in adaptive immune function. In its absence, T-dependent humoral immunity is debilitated, and several important T-cell functions are compromised, including the activation of antigen-presenting cells (APCs) [44]. In vitro stimulation with CD40L has been demonstrated to enhance the efficiency of dendritic cells (DCs) as APCs for the antitumoral response [45], and CD40 stimulation can be significantly enhanced by an additional stimulus.

There are a few limitations to this study, including a relatively small number of patients. Thus, further large-scale research is required to elucidate the exact roles of miRNAs in GC. However, our study provides basic data on miRNAs in GC, which should facilitate further research on GC and elucidate the functional roles and clinical significance of miRNAs.

Collectively, our results can drive new research on the mechanism of immune evasion by tumors and their ability to attenuate immune responses. Furthermore, our data demonstrated that miRNAs could make two distinct impacts, on gastric adenocarcinoma cells and on cells of the immune system, seemingly affecting a crucial part of the antitumor response. The screened genes and pathways provided new insights into molecular mechanisms underlying GC occurrence and progression, holding promise to serve as potential therapeutic targets.

Conclusions

Our study revealed, via analysis of a microarray dataset, that three miRNAs (miR-196a-5p, miR-374a-5p, and miR-375) were significantly up- or downregulated in GC patients. Further studies, involving larger cohorts, are needed to validate the clinical application of these miRNAs. Most significantly, this study provides a new insight into the potential use of multiple miRNAs to find distinct pathways of immune regulation in GC. Further understanding of the immunopathogenesis of gastric adenocarcinoma will be critically important for the development of effective therapeutic

strategies against the disease. Our future research will focus on exploring immune checkpoint receptors in various populations of cells of the immune system and their relation to GC.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest (including financial and non-financial interests).

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394–424.
2. Hao NB, He YF, Li XQ, Wang K, Wang RL. The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer. *Oncotarget*. 2017;8:81572–82.
3. Liz J, Esteller M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859:169–76.
4. Deng K, Wang H, Guo X, Xia J. The cross talk between long, non-coding RNAs and microRNAs in gastric cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016;48:111–6.

5. Bjaanaes MM, Halvorsen AR, Solberg S, Jørgensen L, Dragani TA, Galvan A, Colombo F, Anderlini M, Pastorino U, Kure E, Børresen-Dale AL, Brustugun OT, Helland A. Unique microRNA-profiles in *EGFR*-mutated lung adenocarcinomas. *Int J Cancer*. 2014;135:1812–21.
6. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:351–79.
7. Xu J, Zhao J, Zhang R. Four microRNAs signature for survival prognosis in colon cancer using TCGA data. *Sci Rep*. 2016;6:38306.
8. Yan Y, Wang R, Guan W, Qiao M, Wang L. Roles of microRNAs in cancer associated fibroblasts of gastric cancer. *Pathol Res Pract*. 2017;213:730–6.
9. Lu M, Kong X, Wang H, Huang G, Ye C, He Z. A novel microRNAs expression signature for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis. *Oncotarget*. 2017;8:8775–84.
10. Sandoval-Bórquez A, Polakovicova I, Carrasco-Véliz N, Lobos-González L, Riquelme I, Carrasco-Avino G, Bizama C, Norero E, Owen GI, Roa JC, Corvalán AH. MicroRNA-335-5p is a potential suppressor of metastasis and invasion in gastric cancer. *Clin Epigenetics*. 2017;9:114.
11. Liu S, Suo J, Wang C, Sun X, Wang D, He L, Zhang Y, Li W. Downregulation of tissue miR-338-3p predicts unfavorable prognosis of gastric cancer. *Cancer Biomarkers*. 2017;21:117–122.
12. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435:834–8.
13. Zhang Y, Sui J, Shen X, Li C, Yao W, Hong W, Peng H, Pu Y, Yin L, Liang G. Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of lung cancer. *Oncol Rep*. 2017;37:3543–53.
14. Friedman JM, Jones PA. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. *Swiss Med Wkly*. 2009;139:466–72.
15. O’Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles

- for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:111–22.
16. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:12481–6.
 17. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17:1471–4.
 18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. *Methods.* 2001;25:402–8.
 19. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007;39:175–91.
 20. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, Wang TJ, Chan SY. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol.* 2011;589:3983–94.
 21. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods.* 2015;12:697.
 22. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk–database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inform.* 2011;44:839–47.
 23. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2008;4:44–57.
 24. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2257–61.
 25. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006;9:189–98.
 26. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev*

- Cancer. 2006;6:259–69.
27. Wang F, Sun GP, Zou YF, Hao JQ, Zhong F, Ren WJ. MicroRNAs as promising biomarkers for gastric cancer. *Cancer Biomarkers*. 2012;11:259–67.
 28. Tsai KW, Hu LY, Wu CW, Li SC, Lai CH, Kao HW, Fang WL, Lin WC. Epigenetic regulation of miR-196b expression in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49:969–80.
 29. Lee SW, Park KC, Kim JG, Moon SJ, Kang SB, Lee DS, Sul HJ, Ji JS, Jeong HY. Dysregulation of microRNA-196b-5p and microRNA-375 in gastric cancer. *J Gastric Cancer*. 2016;16:221–9.
 30. Liu J, Ma L, Wang Z, Wang L, Liu C, Chen R, Zhang J. MicroRNA expression profile of gastric cancer stem cells in the MKN-45 cancer cell line. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014;46:92–9.
 31. Yan JW, Lin JS, He XX. The emerging role of miR-375 in cancer. *Int J Cancer*. 2014;135:1011–8.
 32. Xie J, Tan ZH, Tang X, Mo MS, Liu YP, Gan RL, Li Y, Zhang L, Li GQ. MiR-374b-5p suppresses RECK expression and promotes gastric cancer cell invasion and metastasis. *World J Gastroenterol*. 2014;20:17439–47.
 33. Wu H, Liu Y, Shu XO, Cai Q. MiR-374a suppresses lung adenocarcinoma cell proliferation and invasion by targeting TGFA gene expression. *Carcinogenesis*. 2016;37:567–75.
 34. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9:102–14.
 35. Wang J, Wang Q, Liu H, Hu B, Zhou W, Cheng Y. MicroRNA expression and its implication for the diagnosis and therapeutic strategies of gastric cancer. *Cancer Lett*. 2010;297:137–43.
 36. Dragomir M, Chen B, Fu X, Calin GA. Key questions about the checkpoint blockade—are microRNAs an answer? *Cancer Biol Med*. 2018;15:103–15.
 37. Togasaki K, Sukawa Y, Kanai T, Takaishi H. Clinical efficacy of immune checkpoint inhibitors in the treatment of unresectable advanced or recurrent gastric cancer: an evidence-based review of therapies. *Onco Targets Ther*. 2018;11:8239–50.

38. Xu F, Zhou G, Han S, Yuan W, Chen S, Fu Z, Li D, Zhang H, Li D, Pang D. Association of TNF- α , TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in northeast Chinese Han women. *PLoS One*. 2014;9:e101138.
39. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol*. 2006;72:1605–21.
40. Hamano R, Huang J, Yoshimura T, Oppenheim JJ, Chen X. TNF by inducing co-stimulatory TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40 augments the number and function of mouse CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2011;41:2010-20.
41. Martins MR, Santos RLD, Jatahy KDN, Matta MCD, Batista TP, Júnior JIC, Begnami MDFS, Torres LC. Could OX40 agonist antibody promote activation of the anti-tumor immune response in gastric cancer? *J Surg Oncol*. 2018;117:840–4.
42. Gentzler R, Hall R, Kunk PR, Gaughan E, Dillon P, Slingluff CL, Rahma OE. Beyond melanoma: inhibiting the PD-1/PD-L1 pathway in solid tumors. *Immunotherapy*. 2016;8:583–600.
43. Chiu YM, Tsai CL, Kao JT, Hsieh CT, Shieh DC, Lee YJ, Tsay GJ, Cheng KS, Wu YY. PD-1 and PD-L1 up-regulation promotes T-cell apoptosis in gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res*. 2018;38:2069–78.
44. Wolniak KL, Shinall SM, Waldschmidt TJ. The germinal center response. *Crit Rev Immunol*. 2004;24:39–65.
45. Terheyden P, Straten P, Bröcker EB, Kämpgen E, Becker JC. CD40-ligated dendritic cells effectively expand melanoma-specific CD8⁺ CTLs and CD4⁺ IFN- γ -producing T cells from tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*. 2000;164:6633–9.

Table 1 Clinical and pathological characteristics of gastric cancer patients

Variables	<i>N</i> = 25
Age (years), median (IQR 25 th –75 th)	64 (34–85)
Sex	
Male	15 (60%)
Female	10 (40%)
Lymph node involvement	
Negative	7 (35%)
Positive	13 (65%)
Distant metastasis	
Negative	20 (80%)
Positive	5 (20%)
TNM ^a	
I/II	8 (32%)
III/IV	17 (68%)
Grade	
Differentiated (G1/G2)	7 (28%)
Undifferentiated (G3)	18 (72%)
Lauren`s criteria	
Intestinal	7 (28%)
Diffuse	14 (56%)
Indeterminate	4 (16%)

Values are presented as absolute numbers and percentages or median (IQR)

^aClassification according to the American Joint Committee on Cancer, 7th edition [17]

IQR, interquartile range; TNM, tumor–node–metastasis

Table 2 MicroRNAs with altered expression in gastric cancer tissues (FDR \leq 0.01)

miRNA kit	Expression fold change (tumor/control)	FDR.t.test	miRNA name
hsa-miR-374-000563	-16.83	0.010592087	hsa-miR-374a-5p
hsa-miR-375-000564	-14.39	0.010179736	hsa-miR-375
hsa-miR-203-000507	-7.05	0.004724326	hsa-miR-203a-3p
hsa-miR-30b-000602	-5.74	0.012233919	hsa-miR-30b-5p
hsa-miR-31-002279	-4.45	0.004128206	hsa-miR-31-5p
hsa-miR-642-001592	-4.23	0.004724326	hsa-miR-642a-5p
hsa-miR-25-000403	-3.86	0.004128206	hsa-miR-25-3p
hsa-miR-130a-000454	-3.14	0.014106465	hsa-miR-130a-5p, hsa-miR-130a-3p
hsa-miR-532-3p-002355	-2.97	0.010665846	hsa-miR-532-3p
hsa-miR-199a-3p-002304	2.42	0.004724326	hsa-miR-199a-3p
hsa-miR-539-001286	2.72	0.012233919	hsa-miR-539-5p
hsa-miR-345-002186	2.74	0.004128206	hsa-miR-345-5p
hsa-miR-29a-002112	3.03	0.004128206	hsa-miR-29a-3p
hsa-miR-143-002249	3.23	0.004897369	hsa-miR-143-3p
hsa-miR-155-002623	3.39	0.004128206	hsa-miR-155-5p
mmu-miR-134-001186	3.67	0.004897369	hsa-miR-134-5p
hsa-miR-146b-001097	4.12	0.004897369	hsa-miR-146b-5p
hsa-miR-185-002271	4.28	0.004128206	hsa-miR-185-5p
hsa-miR-886-5p-002193	4.69	0.01164442	Vault RNA
hsa-miR-146b-3p-002361	6.60	0.004128206	hsa-miR-146b-3p
hsa-miR-517b-001152	7.23	0.004128206	hsa-miR-517b-3p
hsa-miR-196b-002215	184.65	0.014802397	hsa-miR-196b-5p

Table 3. Correlation between microRNA expression and clinical characteristics of gastric cancer patients

Variables	miR-196b-5p		miR-374-5p		miR-375	
	Mean fold change	<i>p</i> -Value	Mean fold change	<i>p</i> -Value	Mean fold change	<i>p</i> -Value
Histological grade						
Differentiated (G1/G2)	555.5	0.40	0.10	0.73	0.39	0.05*
Undifferentiated (G3)	184.2		0.16		0.66	
Lymph node involvement						
Negative	256.6	0.23	0.14	0.64	0.07	0.13
Positive	54.1		0.15		0.41	
Metastasis						
Negative	156.4	0.70	0.16	0.03*	0.25	0.72
Positive	36.6		0.03		0.09	
Lauren's criteria						
Intestinal	493.2	0.64	0.09	0.38	0.46	0.09
Diffuse	313.1		0.17		0.12	

* $p \leq 0.05$

Figure legends

Fig. 1. Heatmap summarizing the expression patterns of 21 miRNA loci that were differentially expressed in gastric cancer

Fig. 2 Analysis of genes related to miRNAs identified through microarray analysis: **(a)** miR-375 **(b)** miR-196-5p, and **(c)** miR-374a-5p.

Fig 1

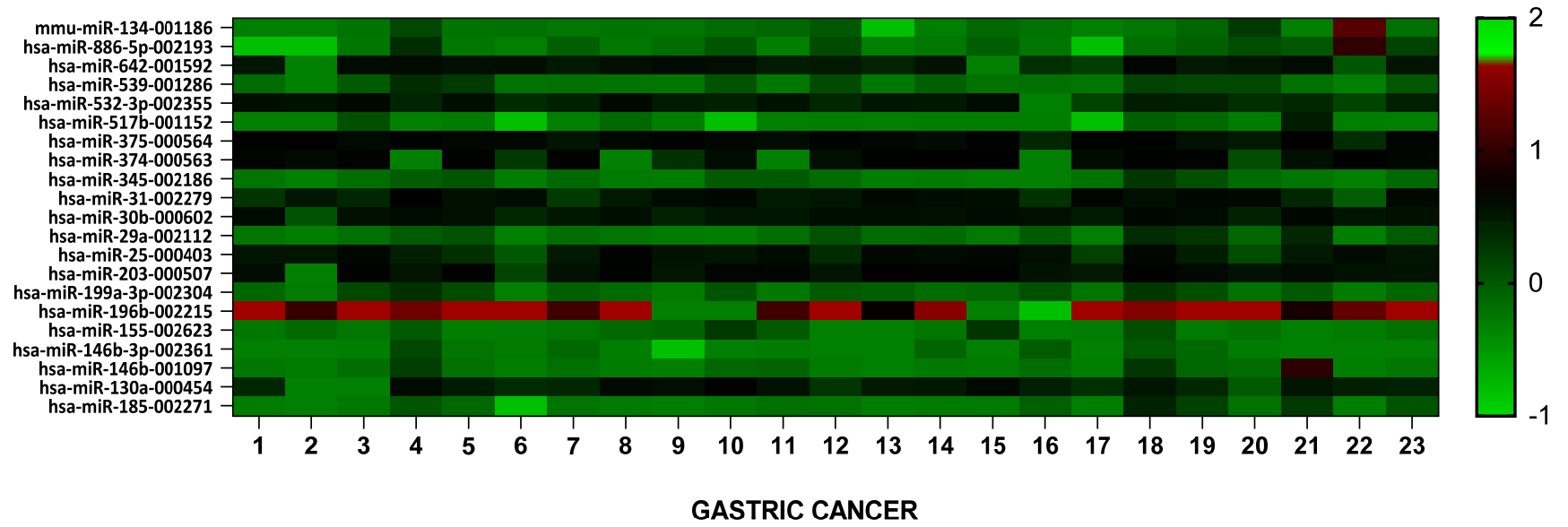
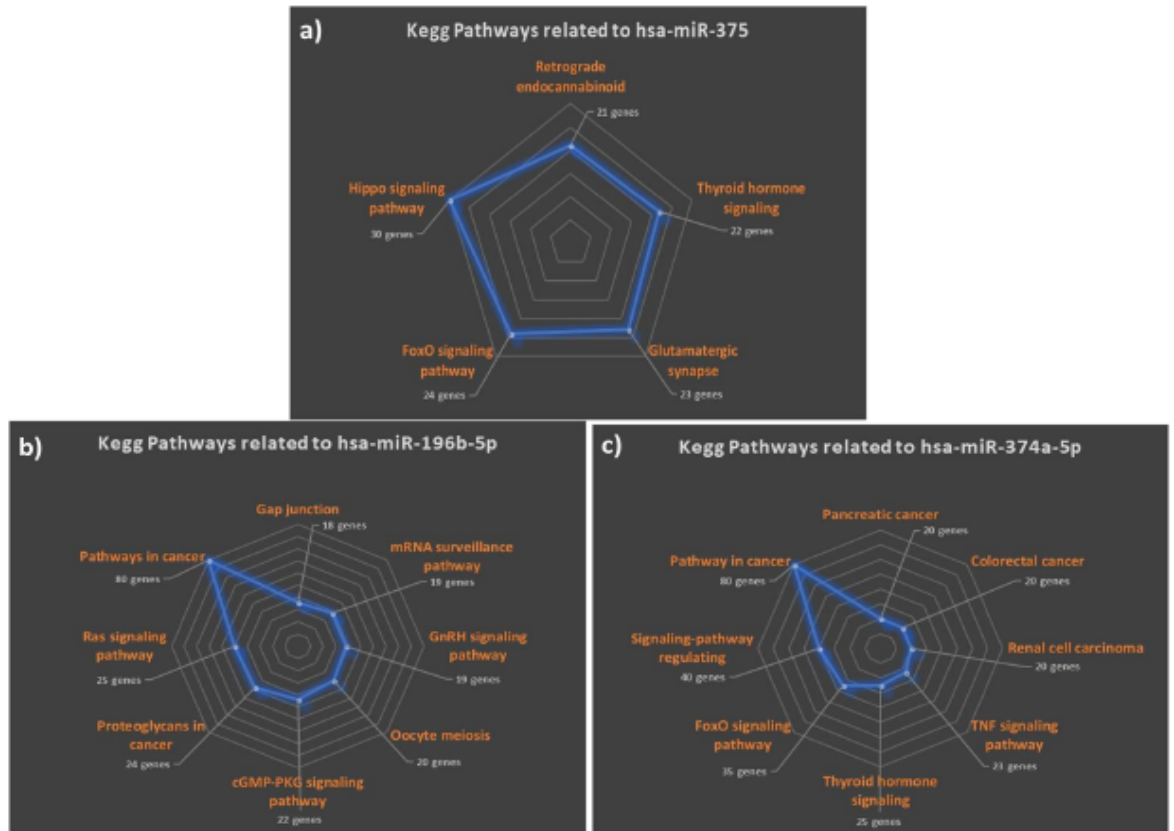


Fig. 2



4.2 ARTIGO 2

Tipo: original research

Título: *Could OX40 agonist antibody promote activation of the anti-tumor immune response in gastric cancer?*

Autores: Mário Rino Martins; Rogério Luiz dos Santos; Kleber das Neves Jatahy; Marina Cadena da Matta; Thales Paulo Batista; José Iran Costa Júnior; Maria Dirlei F. S. Begnami, Leuridan Cavalcante Torres.

Revista: *Journal of Surgical Oncology* (ISSN: 1096-9098)

Data de publicação: abril de 2018

Fator de impacto (JCR 2018): 2,88

Qualis (Medicina I): A2

Situação: publicado. doi: 10.1002/jso.25001

Could OX40 agonist antibody promote activation of the anti-tumor immune response in gastric cancer?

Mário R. Martins MD¹  | Rogério L. d. Santos MD¹ | Kleber d. N. Jatahy² |
 Marina C. d. Matta² | Thales P. Batista MD, MSc⁴ | José Iran C. Júnior MD^{1,2} |
 Maria D. F. S. Begnami MD, PhD³ | Leuridan C. Torres PhD^{1,2}

¹Oncology Surgical Department, Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer—Hospital do Câncer de Pernambuco (SPCC—HCP), Recife, Brazil

²Translational Research Laboratory Prof. C. A. Hart, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil

³Anatomic Pathology Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

⁴Surgical Department, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil

Correspondence

Mário R. Martins, MD, MSc, Oncology Surgical Department, Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer—Hospital do Câncer de Pernambuco (SPCC—HCP), Av. Cruz Cabugá, 1597, Recife, PE 50040-000, Brazil.
 Email: mario_rino@hotmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco APQ (FACEPE), Grant number: 0688-4.01/15

Background and Objectives: OX40, a membrane-bound molecule of the tumor-necrosis-factor-receptor superfamily, is a critical costimulatory receptor during the immune response, especially to T cells, but studies described their presence of OX40 on neutrophils and monocytes, suggesting a potential role in the activation of immune response. Our aim was to characterize costimulatory receptors OX40 expression on circulating leukocytes in gastric cancer to identify novel targets for immunotherapy.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells were isolated from 24 gastric cancer patients and 34 healthy controls and the expression of costimulatory (OX40) receptors were analyzed on T cells, neutrophil and monocyte using monoclonal antibodies by flow cytometry.

Results: We found that the higher levels of OX40+ T cells, monocytes/OX40+ and neutrophils/OX40+ from gastric cancer patients when compared to controls ($P < 0.0001$), and also higher levels of OX40+ T cells when compared to stages III and IV ($P = 0.02$). Percentage levels of total T cells were similar between patients and controls.

Conclusions: OX40 as a therapeutic agent has been investigated in many preclinical tumor models. Our findings suggest that of levels of costimulatory in T cells in GC will direct future studies on the role that costimulatory receptors play in the failure of T cell-mediated immunity.

KEYWORDS

immunotherapy, neoplasm, receptor OX40 (CD134), stomach

1 | INTRODUCTION

The incidence of gastric cancer (GC) has decreased over the past three decades, although it was still the third leading cancer-related cause of death worldwide in 2012.¹ Nowadays, surgical resection is considered the best procedure in the treatment of GC patients with early-stage disease. However, the control of GC at advanced-stage disease remains difficult.² Many studies focusing on the role of host immune

response, especially T lymphocytes, play an important role in controlling the development of tumors.³

Neoplasm may elicit antitumor immune responses because of tumor specific antigens, which interact with the immune system of the patient. Indeed, tumor antigen specific T cells are frequently identified in patients with cancer, however, they often fail to control tumor progression.⁴ Understanding the reasons underlying this failure can open new possibilities of T cell immunotherapy in gastric cancer.

The survival and activation of T cells following antigen encounter depends on the balance between costimulatory and coinhibitory receptors.⁵ OX40 is a potent costimulatory receptor that can potentiate T-cell receptor signaling on the surface of T lymphocytes, leading to their activation by a specifically recognized antigen.⁶ Early studies of OX40 expression on T cells demonstrated that T-cell activation was required for its expression.⁷ Neither naïve T cells nor resting memory T cells express OX40. Initial work suggested that OX40 expression was limited to CD4+ T cells, but subsequent studies demonstrated that OX40 was also expressed on activated CD8+ T cells.⁸ OX40 engagement by ligands present on dendritic cells dramatically increases the proliferation, effectors function, and survival of T cells. Other cells types example, neutrophils and natural killer cells also express OX40.

Our aim was to characterize the expression of costimulatory (OX40) receptors on T cell, neutrophils and monocytes of the peripheral blood in GC. Our findings could validate OX40 as a potent immune-stimulating target for treatment in patients with GC.

2 | MATERIALS AND METHODS

Samples fresh of peripheral blood were obtained from patients with gastric cancer who were evaluated at the Hospital de Cancer de Pernambuco (HCP) and Instituto de Medicina Integral Fernando Figueira (IMIP). Peripheral blood from 24 gastric cancer patients was enrolled (Table 1). None of the patients performed radiotherapy or chemotherapy before peripheral blood collection. Individuals with autoimmune disease, infectious diseases and multiprimary cancer were excluded. Peripheral blood from 34 healthy donors was used as controls. The clinical stages of tumors were determined according to the TNM classification system of International Union Against Cancer (Edition 7th). The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Cancer Pernambuco. Written informed consent was obtained from each subject. Table 1.

2.1 | Flow cytometric analysis

Blood samples were in EDTA tubes at study inclusion and were kept on ice until being processed within 60 min of collection. Immunophenotyping of peripheral blood was performed by flow cytometry on a BD FACSVerse™ (BD Biosciences, San Jose, CA). The following monoclonal antibodies were used: anti-CD3 PE and anti-CD134 FITC (BD Biosciences). The cells were analyzed with the most appropriate lymphocytes gate, granulocytes (neutrophils) gate, and monocytes gate using the combination of forward and side scatters and the obtained data were analyzed using BD FACSuite™ software (BD Biosciences). The analyzes were presented in percentage values (%).

2.2 | Statistical analysis

Categorical data are expressed as numbers, percentages and mean (\pm SD). Continuous variables are shown as median values and

TABLE 1 Clinical and pathological characteristics in gastric cancer

Clinical and pathological parameters	N (%)
Sex	N = 24
Male	18 (75,0)
Female	6 (25,0)
Age	
Mean (\pm SD)	53 (\pm 16,3)
Distant metastasis	
Negative	13 (54,1)
Positive	8 (33,3)
Unknown	3 (12,5)
TNM stage ^a	
I/II	7 (29,2)
III/IV	16 (66,6)
Unknown	2 (8,3)
Histologic grade	
Differentiated	8 (33,3)
Undifferentiated	15 (62,5)
Unknown	1 (4,2)

TNM, tumor node metastasis.

Values are presented as absolute numbers and percentage (%) or mean (\pm SD).

^aClassification according to the American Joint Committee on Cancer 7th edition.

interquartile range (IQR 25–75th). Therefore, a non parametric test was used to compare the two groups (Mann-Whitney U-test). Statistical significance was defined as $P < 0.05$. Data analysis was performed using GraphPadPrism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3 | RESULTS

3.1 | High levels of the costimulatory receptors OX40 in circulating leucocytes in gastric cancer

OX40 is not constitutively expressed on naïve T cells, but is expressed after its activation. In this study we have explored the expression of alternative costimulatory receptors on T cells in patients with gastric cancer. Most patients have gastric cancer in advanced stage (66.6%). GC patients had higher percentages of OX40+T cells (median: 1.5%) and monocytes/OX40+ (median: 1.3%) and neutrophils/OX40+ cells (median: 0.3%) when compared to controls (median: 0.3% and 0.1% and 0.1%; $P < 0.0001$). Percentage levels of total T cells were similar between patients and controls (median: 62.6% and 68.7%, respectively), as shown the Figure 1A–D.

GC patients in stage I and II had higher percentages of OX40+ T (median: 3.0%) when compared to stages III and IV (median: 1.4%; $P = 0.02$) and no statistic difference in neutrophils/OX40+ and monocytes/OX40+ between patients and controls (Figure 2A–C).

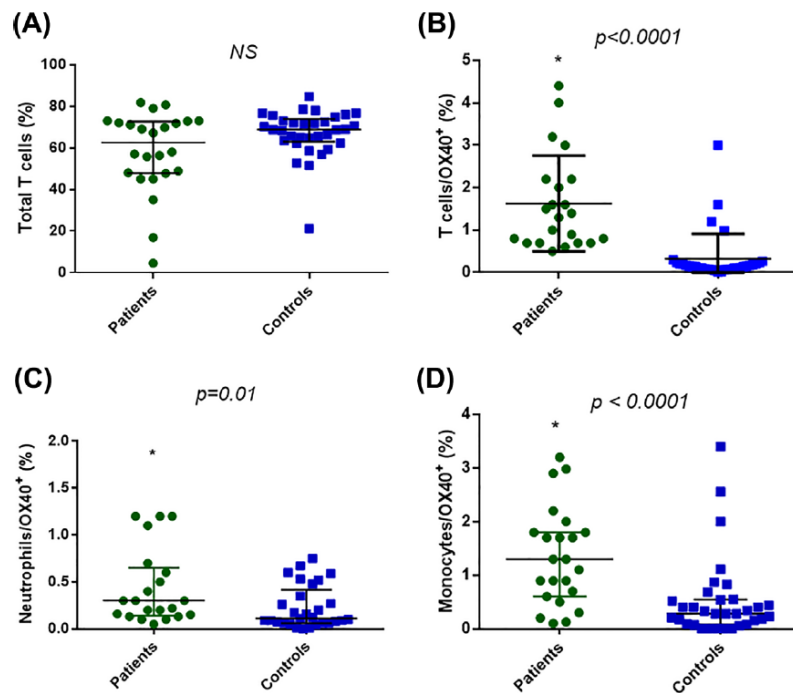


FIGURE 1 Percent values of (A) total T cells, (B) T cells/OX40+, (C) neutrophils/OX40+, and (D) monocytes/OX40+ in the peripheral blood of gastric cancer patients ($n = 24$) and healthy donors ($n = 34$). The graphs are represented in medians and interquartile range (IQR 25–75th). Mann Whitney test was performed for median analysis between groups. * $P < 0.05$. NS, No significant

4 | DISCUSSION

The relationship between immunity, inflammation, and cancer has been extensively studied in preclinical and clinical animal models. In general, quantitative reductions of leukocytes in the blood represent defects in the immune response, as well as, neutrophil represents a systemic response to infection or neoplasm. The proven association between the lymphocyte and neutrophil ratio and the prognosis of cancer clearly confirms the relationship between immunity and cancer; and has been the object of researcher's interest in order to allow modulation of this response for the purpose of control and even cure for neoplasm.

Immunity is not established simply with the quantity of cells of the immune system, but mostly cellular activation and expression of costimulators on the cell surface. Thus, to understand the immune response in GC, it is necessary to evaluate costimulators associated with T lymphocytes, as well as other cellular elements of immunity. It is crucial to know the role of costimulators, given the growth of treatment with action on the immune response, such as immunotherapy for the treatment of GC.

In this sense, OX-40 signaling was considered especially important for the survival, expansion, and effector differentiation, function and memory generation, especially for $CD4^+$ T cells.⁹ OX40 and its ligand (OX40L) can be expressed in several cell types as well as on effector regulatory $CD4^+$ T cells Natural Killer T (NKT), Natural Killer (NK), and neutrophils, and monocytes.¹⁰ In liver, in particular, invariant NKT cells

constitutively express the receptor OX40 and that OX40 stimulation results in massive pyroptotic death of iNKT cells, characterized by the release of potent proinflammatory cytokines that induce liver injury.¹¹

The OX40 ligand is expressed on antigen-expressing cells, as B cells, dendritic cells (DCs), and macrophages as well as airway smooth muscle cells.^{12–15} OX40L expressing DCs can enhance Th2 cell differentiation from naive T-cells and promote Th2 responses and OX40/OX40 ligand interactions is crucial in T-cell regulation and asthma.^{16–18} Tregs recruit mast cells to different sites through secretion of IL-9, while the OX40L (expressed on mast cell) and OX40 on T cell interaction inhibits the extent of the mast cell degranulation in asthma. In cancer, increase the expression of OX40 by T lymphocytes in the colorectal tumor infiltrate after treatment with radiotherapy, promoting a better activation of the anti-tumor immune response.^{19–21}

In this study, we show that T cells in gastric cancer present important alterations in the expression of some costimulatory receptors that are essential for optimal function of T cells. As expected, there is a higher level of T cell activated in patients with gastric cancer. However, we show that T cells in gastric cancer have decreased levels of the costimulatory receptors OX40 that become more pronounced with stages III and IV.

In 2000, Weinberg et al²² reported that injection of agonist antibody anti-OX40 into tumor in mice cured 20–80% of the animals. The mice that were cured following anti-OX40 were resistant to re-

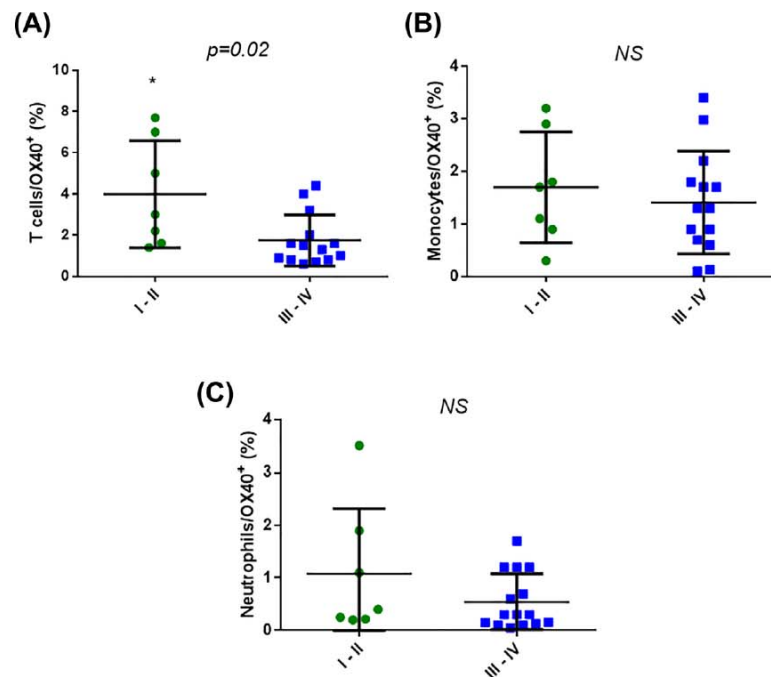


FIGURE 2 Percent values of (A) T cells/OX40+, (B) monocytes/OX40+, and (C) neutrophils/OX40+ in the peripheral blood of gastric cancer patients with stages I–II and III–IV. T cells from GC patients with stages I and II have increased levels of OX40 costimulatory receptors when compared with stages III and IV. The graphs are represented in medians and interquartile range (IQR 25–75th). Mann Whitney test was performed for median analysis between groups. * $P < 0.05$. NS, No significant

challenge with the same tumor. These authors performed analyze on OX40+ cells within resected tumors from patients with primary breast cancer.²³ OX40+ T cells were found in other tumor types such as melanoma and head and neck cancers,²⁴ which increased the possibility of using anti-OX40 therapy.

Addition of OX40 expression on T cells, it's also present in platelets, neutrophils and monocytes, among others. Its ligand (OX40L) is found in antigen presenting cells such as B cells, dendritic cells, and macrophages.²⁵ In 2014, Baumann et al²⁶ showed that activation of neutrophils/OX40+ by soluble OX40L resulted in delayed caspase-3 activation with in delayed neutrophil apoptosis in vitro, regulating neutrophil survival. However, this study showed for the first time OX40 expression on monocytes of peripheral blood of patients with gastric cancer. Possibly, the OX40 expressed on monocytes is responsible for maintaining the survival of these cells, in the same way as for neutrophils. Elevated levels of monocytes/OX40+ and neutrophils/OX40+ in gastric cancer may be associated with increase in the activation and migration of these cells for the tumor microenvironment.

Surgery, chemotherapy, and radiation therapy remain the hallmark of primary treatment for patients with gastric cancer, but little is known about the effect of these therapies on antigen presentation and immunity.²⁷ During cancer surgery, particular care is to avoid disruption of the tumor and minimize release of cancer cells; therefore, tumor antigen release during surgery may be minimal.²⁷ Most likely, surgery creates a valuable temporal window

where antigen is present in the draining lymph node and the suppressive effects of the tumor have been removed.

Gough et al²⁸ to understand the effect of surgical resection on anti-immunity, developed a surgical model (sarcomas) that resulted in a local recurrence rate of 50% following complete resection. Mice that remained tumor-free following surgery were immune to inoculation with tumor. They also demonstrated that if CD8 T-cells were depleted just prior to surgery then the recurrence rate increased to 100%, showing immune-mediated tumor control. If the mice were injected with anti-OX40 on the same day as surgical resection, then all the mice remained tumor-free after surgery.²⁸ The data resulting from those experimental studies suggest that microscopic tumor deposits present after surgical resection may be controlled via tumor specific T cell responses and this immune response was greatly enhanced by anti-OX 40 administrations.²⁸

Although the results are promising, however, our study has limitations, including no evaluation of OX40 expression on T cells and phagocytes in tumor microenvironment and in blood peripheral before and after surgery. Another limitation is that the number of patients enrolled was relatively small.

5 | CONCLUSIONS

Despite some limitations such as small number of patients, our original findings suggest that of levels of costimulatory in T cells in patients with GC will direct future studies on the role that costimulatory

receptors play in the failure of T cell-mediated immunity. This is a very preliminary report and that further confirmation of results with larger patient cohorts is essential before definite conclusions can be drawn.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Valéria Lúcia de Melo Lobo Tavares and Italaney Silva for their support in data collection and Prof. José Figueiroa for their support statistical analyses. The authors thank the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) and Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer for institutional support. This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE; Grants Number: APQ 0688–4.01/15).

CONFLICTS OF INTEREST

None of the authors has any potential financial conflicts of interest related to this manuscript.

ORCID

Mário R. Martins  <http://orcid.org/0000-0001-8705-8210>

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359–E386.
2. Hsu JT, Liao JA, Chuang HC, et al. Palliative gastrectomy is beneficial in selected cases of metastatic gastric cancer. *BMC Palliat Care*. 2017;16:19.
3. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2008;99:1704–1711.
4. Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:684–693.
5. Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:939–951.
6. Curti BD, Kovacsics-Bankowski M, Morris N, et al. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Res*. 2013;73:7189–7198.
7. Soroosh P, Ine S, Sugamura K, et al. Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4+ T cells. *J Immunol*. 2007;179:5014–5023.
8. Bansal-Pakala P, Halteman BS, Cheng MH, et al. Costimulation of CD8 t cell responses by OX40. *J Immunol*. 2004;172:4821–4825.
9. Li XC, Rothstein DM, Sayegh MH. Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments. *Immunol Rev*. 2009;229:271–293.
10. So T, Lee SW, Croft M. Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19:253–262.
11. Lan P, Fan Y, Zhao Y, et al. TNF superfamily receptor OX40 triggers invariant NKT cell pyroptosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2017;127:2222–2234.
12. Siddiqui S, Mistry V, Doe C, Stinson S, Foster M, Brightling C. Airway wall expression of OX40/OX40L and interleukin-4 in asthma. *Chest*. 2010;137:797–804.
13. Ohshima Y, Tanaka Y, Tozawa H, Takahashi Y, Maliszewski C, Delespesse G. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol*. 1997;159:3838–3848.
14. Weinberg AD, Wegmann KW, Funatake C, Whitham RH. Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*. 1999;162:1818–1826.
15. Burgess JK, Carlin S, Pack RA, et al. Detection and characterization of OX40 ligand expression in human airway smooth muscle cells: a possible role in asthma? *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:683–689.
16. Kaur D, Brightling C. OX40/OX40 ligand interactions in T-cell regulation and asthma. *Chest*. 2012;141:494–499.
17. Maddur MS. Human B cells induce dendritic cell maturation and favour T2 polarization by inducing OX-40 ligand. *Nat Commun*. 2014;5:4092.
18. Ishii N, Takahashi T, Soroosh P, Sugamura K. OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. *Advances in Immunology*. 2010;105:63–98.
19. Kumari A, Garnett-Benson C. Effector function of CTLs is increased by irradiated colorectal tumor cells that modulate OX-40L and 4-1BBL and is reversed following dual blockade. *BMC Res Notes*. 2016;9:92.
20. Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol*. 2010;28:57–78.
21. Croft M, Duan W, Choi H, et al. TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. *Trends Immunol*. 2012;33:144–152.
22. Weinberg AD, Rivera MM, Prell R, et al. Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J Immunol*. 2000;164:2160–2169.
23. Ramstad T, Lawnicki L, Vetto J, et al. Immunohistochemical analysis of primary breast tumors and tumor-draining lymph nodes by means of the T-cell costimulatory molecule OX-40. *Am J Surg*. 2000;179: 400–406.
24. Vetto JT, Lum S, Morris A, et al. Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma and head and neck cancers. *Am J Surg*. 1997;174:258–265.
25. Weinberg AD, Evans DE, Thalhofer C, et al. The generation of T cell memory: a review describing the molecular and cellular events following OX40 (CD134) engagement. *J Leukoc Biol*. 2004;75: 962–972.
26. Baumann R, Yousefi S, Simon D, et al. Functional expression of CD134 by neutrophils. *Eur J Immunol*. 2004;34:2268–2275.
27. Bell RB, Leidner RS, Crittenden MR, et al. OX40 signaling in head and neck squamous cell carcinoma: overcoming immunosuppression in the tumor microenvironment. *Oral Oncol*. 2016;52:1–10.
28. Gough MJ, Crittenden MR, Sarff M, et al. Adjuvant therapy with agonistic antibodies to CD134 (OX40) increases local control after surgical or radiation therapy of cancer in mice. *J Immunother*. 2010;33:798–809.

How to cite this article: Martins MR, Santos RLd, Jatayh KdN, et al. Could OX40 agonist antibody promote activation of the anti-tumor immune response in gastric cancer? *J Surg Oncol*. 2018;117:840–844. <https://doi.org/10.1002/jso.25001>

4.3 ARTIGO 3

Tipo: original research

Título: Platelet/Lymphocyte aggregates and CD40L receptors have a critical role in progression and metastasis of gastric cancer.

Autores: Mário Rino Martins, Rogério Luis dos Santos, José Iran Costa Júnior, Kleber das Neves Jatahy, Marina C da Matta, Maria Dirlei Begnami, Leuridan Cavalcanti Torres.

Revista: *Cancers* (ISSN 2072-6694)

Data de publicação: Submetido em maio de 2019

Fator de impacto (JCR 2018): 5.32

Qualis (Medicina I): A1

Situação: em análise pelos revisores do periódico

Original article

Platelet/Lymphocyte aggregates and CD40L receptors have a critical role in progression and metastasis of gastric cancer

Mário Rino Martins, MD^{1,4}; Rogério Luis dos Santos, MD^{1,4}; José Iran Costa Júnior, MD, PhD⁴; Kleber das Neves Jatahy, MSc³; Marina C da Matta, PhD³; Maria Dirlei Begnami, MD, PhD²; Leuridan Cavalcanti Torres, PhD^{3,4}.

¹ Oncology Surgical Department/ Hospital do Câncer de Pernambuco [SPCC – HCP], Recife, Brazil; mario_rino@hotmail.com; rogeriosantos1@icloud.com

² Anatomic Pathology Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil; mariadirlei@gmail.com

³ Translational Research Laboratory Prof. C. A. Hart. Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira [IMIP], Recife, Brazil; kleberjatahy@gmail.com; damattamc@hotmail.com; leuridan.torres@gmail.com

⁴ Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer, Hospital de Câncer de Pernambuco Recife, Brazil; iran_costa@terra.com.br

* Correspondence: mario_rino@hotmail.com; Tel.: +55-81-34629583

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract:

Background and objectives: By modulating the immune system, platelets regulate several aspects of cancer-associated pathology and activated platelets could influence the mechanisms linking the CD40/CD40L system with neoplasia. Thus, the present study evaluated the activation level of circulating platelets in gastric cancer (GC), the formation of circulating platelet-leucocyte conjugates as well as the CD40L levels conjugate to leucocytes in GC patients. **Methods:** Peripheral blood was taken before surgical treatment from 34 patients with gastric cancer and 30 healthy controls. Measurement of circulating platelet-leukocyte aggregates (PLAs) were performance by flow cytometry using monoclonal anti-CD41a for label platelet and CD62p and CD40L to measure of platelet activation. **Results:** We observed higher levels of platelet- T lymphocyte aggregate (P-T lymph) and platelet-B lymphocyte aggregate (P-B lymph) in the peripheral blood (PB) of GC patients with stage IV (metastatic) when compare with stages I-III, and control group ($p < 0,05$). Reduced levels of CD40L+ Platelet-total lymphocyte (P-lymph) were observed at stage IV of the disease ($p < 0,05$). High levels of CD62p+ platelets and CD62p+ platelets-monocyte aggregate were observed GC patients (Stages I-IV) when compare to control group ($p < 0,05$). **Conclusion:** The results of this study allow us to conclude that quantitative alterations of platelet-lymphocytes aggregates (PLYS) and CD40L+ on PLYS were associated to progression and metastasis in GC.

Keywords: platelet, CD40L, platelets-leucocyte aggregate; gastric cancer; flow cytometry.

1. Introduction

Gastric cancer (GC) is responsible for 9% of cancer deaths worldwide. Over 950,000 new cases are diagnosed each year, and about 90% of them are in advanced stage, requiring some systemic treatment [1][2]. Thus, it was valuable to explore the mechanism of gastric cancer progression such as proliferation, migration and immune escape [3]. It is now becoming clear that the tumors microenvironment, which is largely coordinate by inflammatory cells, is an indispensable participant in the oncologic process [4]

There is growing evidence demonstrating an intimate relationship between platelets and cancer, and the abundance of activated platelets in the microenvironment of a range of tumors[5][6] The interaction of platelets and tumor cells has been shown experimentally to influence metastasis as a result of both physical association and bidirectional activation [7].

Platelets modulate innate and adaptive immune responses with crucial roles in immune surveillance, inflammation and host defense. An important pre-requisite for platelet-mediated changes of immune functions involves direct engagement with different types of leukocyte [8] Under hemostatic conditions, platelets generally do not bind to leukocytes. However, when activated, platelets adhere to neutrophils and monocytes, and interactions with lymphocytes have also been identified [9]. Binding between platelets and other cell types is primarily mediated by P-selectin (also known as CD62p)[10]. P-selectin via its ligand, P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), has a central role in the interactions between platelets, monocytes, neutrophils and endothelial cells. P-selectin cross-links platelets and leukocytes and is a major mediator of platelet-leukocyte aggregate formation [11].

Activated platelets also express CD40L (also known as CD154). The role of CD40/CD40L in carcinogenesis is widely examined. The mechanisms linking the CD40/CD40L system and the soluble form of CD40 ligand (sCD40L) with neoplasia are nowadays a topic of intensive research [12]. Platelets expression of CD40L has been shown to affect dendritic cells as well as B and T lymphocytes, suggesting that it provides a communicative link between innate and adaptive immunity[13][11][9] Studies on CD40L have exposed that it enhances antineoplastic immune response, inhibits tumor growth, and induces apoptosis of cancer cells [14] [15]. Subsequent reports have suggested that in many tumors, CD40 activation by its ligand results in a completely contrary situation, i.e., enhancement of tumor growth and progression [16] [17].

The study of platelet function in cancer patients has many challenges. Activated platelets and aggregates seem to be crucially involved in cancer immunity and understand how it works in gastric cancer could open new possibilities of biomarkers and treatment, moreover, several pro-tumorigenic and cancer immunological relevant mechanisms can be addressed as well. The aim of the study was the evaluation of circulating platelet-leukocyte aggregates (PLAs) and platelet activation in patients with gastric cancer and compare PLAs levels regarding clinical stage.

2. Results

2.1 High PLAs levels of metastatic gastric cancer patients

The interaction between platelets and leukocytes, and endothelium can occur in various ways. PLAs have been detected in the blood of humans with a variety of diseases and are now considered as one of the most sensitive markers related to platelet activation.

This study, we observed reduced levels of T lymphocytes (T-Lymp) (Figure 1A) and increased levels of Platelet – T lymphocytes (P-T lymph) and Platelet – B lymphocytes (P-B lymph) in peripheral blood of gastric peripheral blood of gastric cancer patients with stages stage IV (metastatic) when compare to stages I-III (no metastatic) and control groups ($p < 0,05^*$) (Figure 1B and D). No significant

differences were observed in the levels of B lymphocytes (B-Lymp) between CG patients and controls groups (Figure 1C).

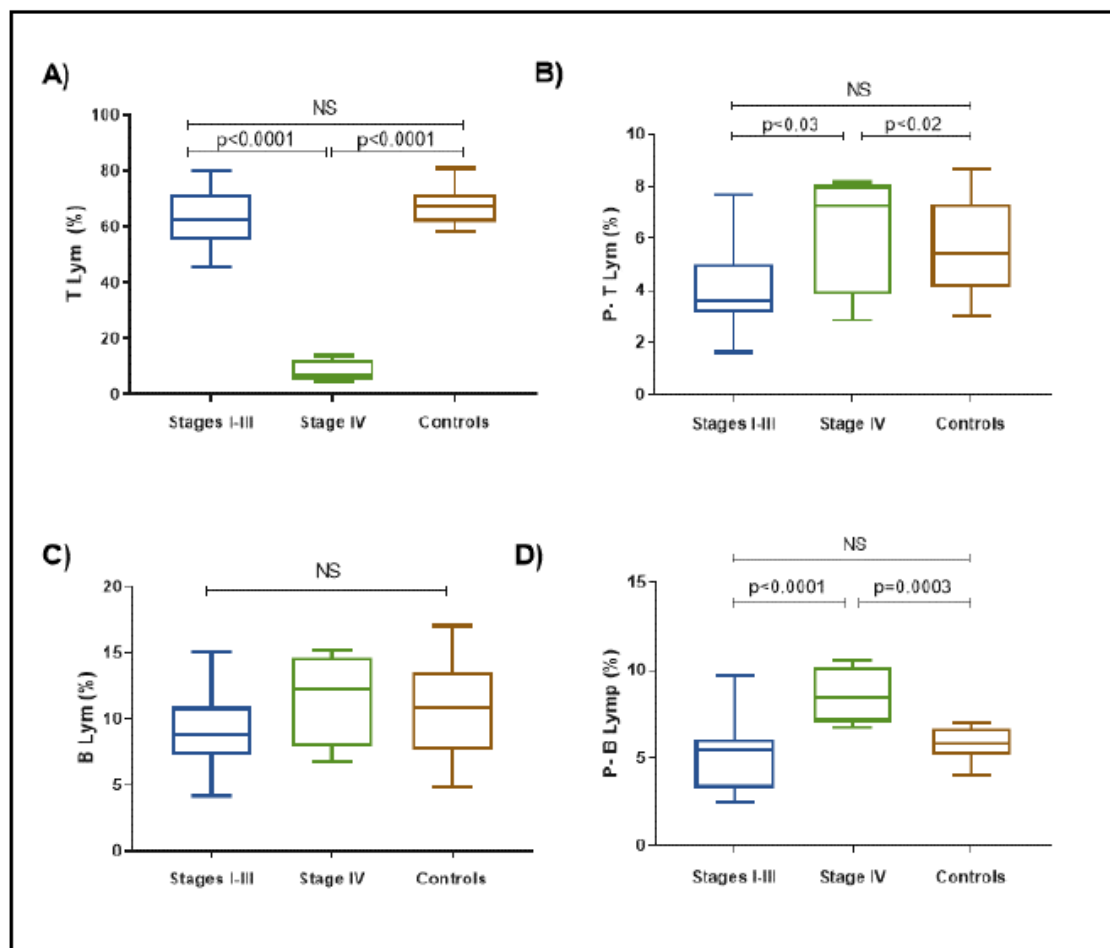


Figure 1. Percentage levels of: A) T lymphocytes (T-Lymp), B) Platelet – T lymphocytes (P-T lymph); C) B lymphocytes (B-Lymp) and D) Platelet – B lymphocytes (P-B lymph) in peripheral blood of gastric cancer patients with stages I-III (n=27), stage IV (n=7) and control group (n=30). Kruskal-Wallis test was performed. * $p < 0.05$. NS: No significant.

2.2 Analyses of the levels P-Lymp, P-neutrophils and P-monocytes with CD40L expression in peripheral blood of CG patients

We observed high levels of platelet - total lymphocytes aggregates (P-Lymp) and reduced levels of CD40+ P-lymp in blood of CG patients with stage IV compared to stages I-III and controls groups ($p < 0,05$; Figure 2A and B). No significant differences were observed in the levels of Platelets-neutrophils aggregate (P-neutrophils), CD40L+ P-neutrophils, Platelets-monocytes aggregate (P-monocytes) and CD40L+ P-monocytes between CG patients and controls groups (Figure 2C-F).

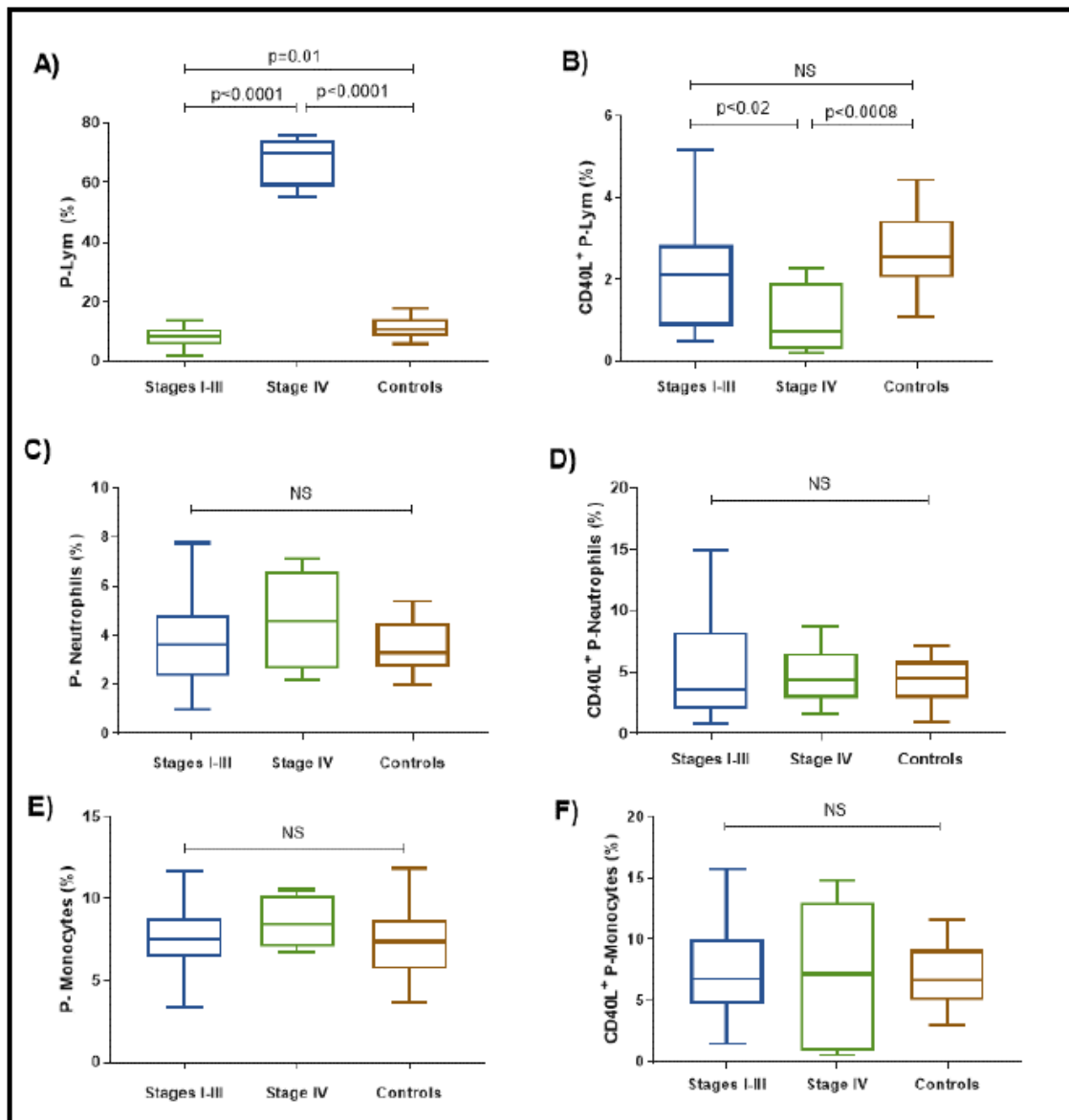


Figure 2. Percentage levels of: A) Platelet - Total lymphocytes aggregates (P-Lymp) B) CD40+ P-lymp; C) Platelets-neutrophils aggregate (P-neutrophils); D) CD40L+ P-neutrophils; E) Platelets-monocytes aggregate (P-monocytes); and E) CD40L+ P-monocytes in the peripheral blood of gastric cancer patients with stages I-III (n=27), stage IV (n=7) and control group (n=30). Kruskal-Wallis test was performed. *p<0.05. NS: No significant.

2.3 Analyses of the levels CD62p+ CD41a+, CD62p+ P-neutrophils and CD62p+ P-monocytes in blood of GC patients

We observed high levels of activated platelets (CD62p+ CD41a+) and activated platelets-monocytes aggregate (CD62p+ P-monocytes) in GC patients with stages I-III and stage IV when compared to controls ($p < 0.05$) (Figure 3A and 3C). No significant difference between in the levels of CD62p+ P-neutrophils between CG patients and controls groups (Figure 3B).

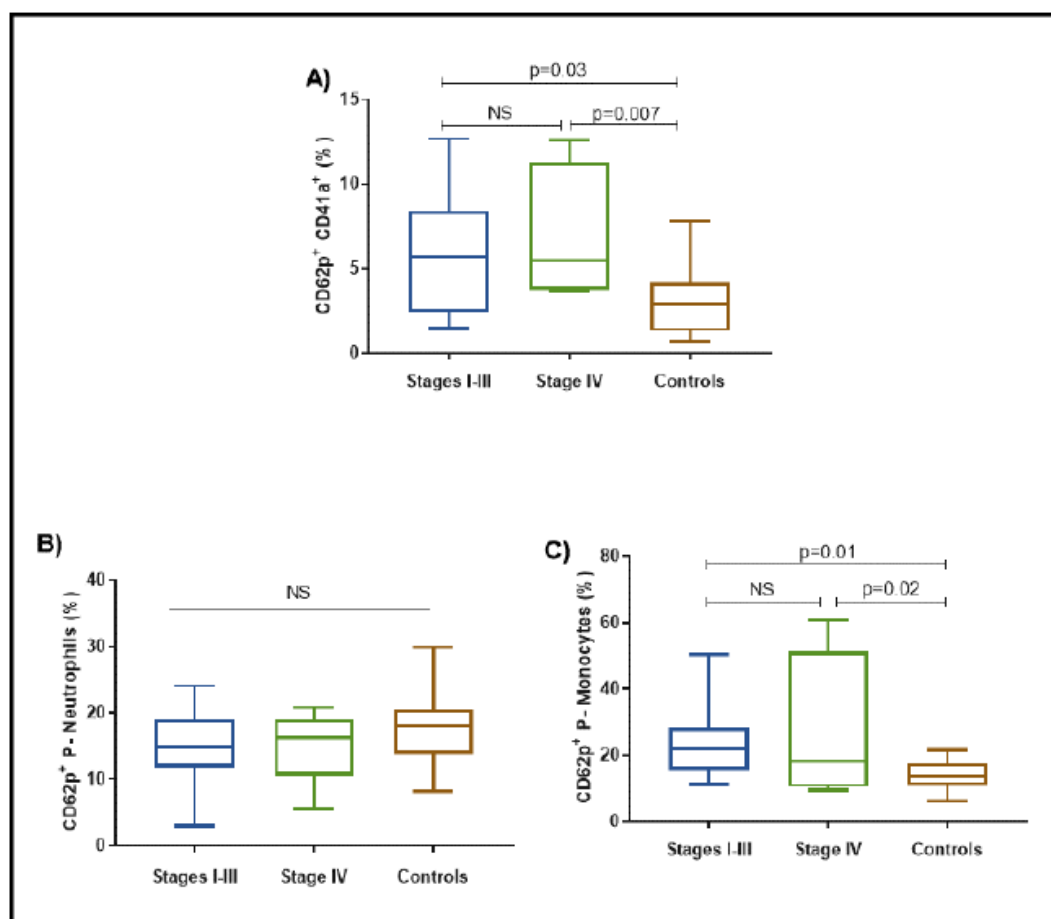


Figure 3. Percentage levels of: A) activated platelets (CD62p+ CD41a+); B) activated platelets-neutrophils aggregate (CD62p+ P-neutrophils) C) activated platelets-monocytes aggregate (CD62p+ P-monocytes) in peripheral blood of gastric cancer patients with stages I-III (n=27), stage IV (n=7) and control group (n=30). Kruskal-Wallis test was performed. * $p < 0.05$. NS: No significant.

3. Discussion

Platelets, besides their specialized role in hemostasis and atherothrombosis, actively modulate innate and adaptive immune responses with crucial roles in immune surveillance, inflammation and host defense. An important pre-requisite for platelet-mediated changes of immune functions involves direct engagement with different types of leukocytes [8]. Platelet activation and concomitant degranulation enables platelets to engage with leukocytes via soluble factors and physical interaction facilitated by a variety of receptors [18]. Most importantly receptors involved in direct interactions include platelet P-selectin (CD62p) and CD40 ligand (CD40L), as well as PSGL-1, CD40 and Mac-1 (integrin $\alpha M\beta 2$, CD11b/CD18) on leukocytes [19].

To the best of our knowledge, our study is the first to investigate the associations between parameters of platelet activation (CD62p+ and CD40L) as well as the associations of these biomarkers with PLAS formation and GC. We observed a close correlation between the plasma levels of P-T lymph and P-B lymph and disease, especially metastatic GC. Activated platelets play multiple roles in the progression of tumor metastasis, including facilitation of tumor cell epithelial-mesenchymal transition (EMT), degradation of surrounding extracellular matrix (ECM), increasing vascular permeability, and aiding in the establishment of malignancies in distant tissues [20]. Besides that, we find out the same levels of B-lymphocytes among the CG and control group and a reduction in T lymphocyte levels in stage IV patients of the disease. Platelet-released platelet factor 4 (PF4) that inhibits T cell proliferation and regulates the functional activities of T cells via binding to glycosaminoglycan and that could justify the results [21-26].

Despite the increase in levels of P- lymph found in CG patients with metastases (stage IV), reduced levels of CD40L + P-lymph were observed at this stage of the disease, whereas patients without distant metastases had higher levels of CD40L + P-lymph. Our results demonstrate that CD40L immune responses at stage IV GC are involved in the progression and metastasis. Platelets are an abundant and systemic source of CD40L. When platelets were reported to express functional CD40L, it became intriguing to hypothesize that platelets could somehow participate in or influence adaptive immune responses [27]. Platelets can directly stimulate proliferation and antibody production of B cells in vitro via CD40L-mediated cell-cell contact. CD40L is identical in terms of structure and physiological function to membrane bound CD40L expressed in activated T-lymphocytes and other cells [28]. It can notably generate signals for the recruitment and extravasation of leukocytes. It induces, through the engagement of CD40, the secretion of chemokines and the expression of adhesion receptors in endothelial cells. It provides a powerful link between platelets and the immune system: CD40L expressed on activated platelets induces dendritic cell maturation, B-cell isotype switching, and augments CD8+ T-cell responses in both in vitro and in vivo models [29][27][30][31]. The CD40 – CD40L interaction is very important for the host defense against cancer.

In this paper, we did not observe quantitative changes in P-monocytes, P-neutrophils, CD40L + P-monocytes and CD40L + P-neutrophils in CG patients when compared to controls. On the other hand, there was an increase in activated platelet levels (CD41a + CD62p +) and CD62p + P-monocytes in CG patients (figure 3), with or without distant metastasis. The platelet-monocyte aggregates have longer persistence in peripheral blood and were shown to be more sensitive markers of in vivo platelet activation than other platelet surface markers. Platelets can induce production of pro-inflammatory factors from other cells in the tumor microenvironment and in this way indirectly promote recruitment of leukocytes to primary and metastatic tumors. For example, platelets have been shown to induce CCL2 expression in tumor cells, and CCL2 can recruit monocytes that promote metastatic seeding at distant sites [32-34].

The role of platelets in the progression of malignant tumors has gained attention, moreover, the complex interactions among tumor cells, leukocytes, and platelets induced a specific expression profile in microvascular endothelial cells, characterized by the up-regulation of several molecules previously associated with metastasis including CCL5 [35]. The (RANTES)/CCR5 pathway is important for mediating physiological processes required for tumor invasion and progression [36]. Platelets, together with leukocytes and tumor cells, induced CCL5 secretion from endothelial cells in an experimental model of colorectal cancer, which enhanced metastatic seeding due to recruitment of monocytes [37]. Metastasis is the major cause of cancer-associated mortality and therapeutic options are limited since the underlying mechanisms remain incompletely understood. Our studies provide new insights into the molecular pathways that mediate progression of GC.

One of the most interesting results found in this study was the reduced level of T-lymphocytes associated with metastatic stage of GC (figure 1). The decline in T-lymphocytes observed in gastric cancer patients may reflect both reduced proliferation and clonal expansion, or exhaustion of T cells with increased apoptosis these cells. Some immune checkpoints may be involved as well. Rolfe et al 2018 showed an increase of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in circulating blood platelets in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)(33). PDL1 binds to the immune

checkpoint protein programmed cell death protein 1 (PD-1) expressed on antigen-specific CD8(+) T cells, induce the exhaustion of T cells and increased apoptosis these cells. These authors also extended to other cancer types and found increased PD-L1 expression on platelets from patients with lung cancer [38]. What mechanism(s) might underlie the decline in T-lymphocytes upon the development of GC? Thus, GC can lead to the long-term impairment of lymphoid homeostasis, a condition that may need to be addressed for immunotherapy.

Although the results are promising, the number of patients enrolled was relatively small. Prospective studies on larger cohorts of patients are needed to confirm the results achieved and further studies need to elucidate and confirm more precisely the roles and mechanisms for CD40L during the gastric cancer development. Since CD40L and CD40 molecules are strong immune stimulators, they are considered useful in anticancer therapy [39]. However, understanding the balance between the benefits and risks are crucial to the best approached.

4. Materials and Methods

4.1 Study and subjects

This is a cross-sectional study performed in CG patients undergoing treatment for potentially curable in Hospital Cancer Pernambuco between 2017 to 2018. Laboratory analysis was in the Translational Research Laboratory of the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira. (IMIP) The inclusion criteria in this study was histologically confirmed adenocarcinoma of the stomach and all patients were newly diagnosed cases and none of patients had received chemotherapy, radiotherapy or immunotherapy before sampling. We collected information on clinical characteristics of the patients prospectively. Cancer Staging was performed according to the 7th edition of the American Joint Committee on Cancer TNM criteria [40]. The study protocol was reviewed and approved by the Hospital de Cancer de Pernambuco Ethics Research Committees (CAAE: 66228917.8.0000.5205).

Peripheral blood was taken before surgical treatment from 34 patients with gastric cancer (10 women and 24 men, aged 31-89 years), In all the gastric cancer patients adenocarcinoma in I (14,8%), II (32,35%), III (32,35%) and IV (20,5%) stages according to UICC/TNM classification was found. Histopathological gastric cancer classification according to Lauren revealed intestinal type cancer in 28% of the patients, diffuse cancer in 56 %, and no determinate in 16% of the cases. Lymph node involvement were detected in 63% of the cases, and distant metastases in 20,5% of the patients. In 72% of the patients was determined as G3, and in 28% - G1/G2 (Table 1). None of the patients performed radiotherapy or chemotherapy before peripheral blood collection. Individuals with autoimmune disease, infectious diseases and primary cancer were excluded. The basic patient demographic characteristics are summarized in table 1.

Control group were 30 healthy persons (10 women and 20 men), aged 30 – 85 years (median 53 years). These volunteer donors had not been on any medication including aspirin or non-steroid anti-inflammatory drugs during the previous two weeks. Controls subjects who were referred had no previous history of malignancy or auto-immune disease.

Table 1. Basic characteristics of CG patients (n=34)

PATIENTS CHARACTERISTICS	N=34 (%)
AGE	
Median (range)	51 (31 – 89)
SEX	
Male	24 (70,5)
Female	10 (29,5)
LYMPH NODE INVOLVEMENT	
Negative	10 (37)
Positive	17 (63)
DISTANT METASTASIS	
No	27 (79,5)
Yes	7 (20,5)
TNM STAGE*	
I	5 (14,8)
II	11 (32,35)
III	11 (32,35)
IV	7 (68)
HISTOLOGIC GRADE	
Differentiated (G1/G2)	10 (28)
Undifferentiated (G3)	24 (72)
LAUREN CLASSIFICATION	
Intestinal	9 (28)
Diffuse	19 (56)
No determinated	5 (16)

Values are presented as number (%) or median (range). *Classification according to the American Joint Committee on Cancer 7th edition.

4.2 Sample Preparation

Venous Blood samples were collected in EDTA tubes and maintained at 4 °C until being processed within 60 minutes of collection. Immunophenotyping of peripheral blood was performed by flow cytometry on a BD FACSVerser™ (BD Biosciences). For sample preparation, we performed the protocols described by Harding, et al (2007), Bournazos et al (2008) and Macey et al 2002 [41-43].

4.3 Measurement of circulating platelet-leukocyte aggregates (PLAs) by flow Cytometry

Two milliliters of red blood cell lysis buffer (FACS Lysing Buffer; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) was added to a 50-µL aliquot of peripheral blood, incubated for 20 min at room temperature, and protected from light. Next, 2 mL concentrated 1× phosphate-buffered saline (PBS) was added to wash the cells, and samples were centrifuged at 300 × g for 5 min at 20°C. Was added five microliters of monoclonal anti-CD3 for label T Cells, anti-CD20 for label B cells [44] anti-CD41a (GpIIb/IIIa) for label platelets, anti-CD62p (GMP 140) and anti-CD40L for label platelets activation, anti-CD16 for label neutrophils [45] and anti-CD14 for label monocytes [46] (BD, Pharmigen, San Diego, CA, USA) and incubated at 20 °C for 20 min in the dark, as described by Granja T, et al. 2015)

[47][48]. Washing of cells was performed with 2 mL Phosphate Buffered Saline (PBS) (1×), and cells were then centrifuged at $300 \times g$ for 5 min at 20°C. The flushing procedure was repeated twice. After washing, the supernatants were discarded, and the cells were analyzed with 250 µL saline on a flow cytometer (FACSVERSE; Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). For flow cytometry, 20,000 cellular events were acquired, and the results were analyzed by FACSuite program (Becton Dickinson).

The CD41a antibodies were used for platelet labeling and CD62p to measure percentages of platelet activation. Platelet - Total lymphocytes aggregates (P-Lymp and CD40+ P-lymp) was performed using anti-CD41a and anti-CD40L on total lymphocytes gate. Platelet - T lymphocytes (P-T lymph) was performed using the monoclonal anti-CD3/anti-CD41a; Platelet - B lymphocytes (P-B lymph) was performed using the monoclonal anti-CD20/anti-CD41a; platelet-monocyte aggregates (P-monocytes and CD40+ P-monocytes) were analyzed by labeling with monoclonal antibodies anti-CD41a, anti-CD14 and anti-CD40L in monocytes gate. Platelet-neutrophil aggregates (P-Neutrophils and CD40L+ P-neutrophils) with monoclonal antibodies anti-CD41a, anti-CD16 and anti-CD40L in granulocytes gate. For T and B cell immunophenotyping, were used monoclonal antibodies anti-CD3 (T Lymph) and anti-CD20 antibodies (B-Lymp), respectively. Analyzes were expressed as percentages (%).

4.4 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad® Prism 7 (GraphPad Software Inc., USA). All variables were analyzed in terms of normality using Shapiro-Wilk normality tests. Kruskal-wallis U-test were used to analyze quantitative variables. Quantitative data are expressed as median and interquartile interval (IQR 25-75). Categorical variables are expressed as number (N) and as percentage (%). A value of $p < 0.05$ was considered significant.

5. Conclusions

In conclusion, understanding the platelet activation pathways and potential biomarkers could promise new diagnostic and therapeutic possibilities in monitoring the disease activities and responses to treatment. Because platelet-tumor cell interactions induce platelet activation and aggregation, it is reasonable to interfere with this process as a therapeutic intervention. Therefore, platelets are a promising therapeutic target for the attenuation of metastatic events in GC. We have dissected some mechanisms (CD40L) governing the interplay between T lymphocytes cells and the immunosuppressive microenvironment. Most significantly, we have found distinct way of immune regulation in gastric cancer that can be exogenously manipulated to cancer immunotherapy.

Author Contributions: M.R.M. and L.C.T. conceived and designed the experiments; R.L.S., K.N.J and M.C.M. performed the experiments; M.R.M, R.S.A and J.I.C analyzed the data; R.L.S., M.D.F.S.B. contributed reagents/materials/analysis tools; M.R.M. and L.C.T. wrote the paper. L.C.T. responsible for funding acquisition and supervised the study

Funding: This study was supported by grants from CNPq/FACEPE/SES-PE (APQ: 0688-4.01/15 to L.C.T)

Acknowledgments: We thank Valéria Lúcia de Melo Lobo Tavares and Italaney Silva for their support in data collection. We thank the AC Camargo Center and Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer for institutional support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bray, F; Ferlay, J; Soerjomataram, I Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018, 68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492
2. Machlowska, J; Puculek, M; Sitarz, M; Terlecki, P; Maciejewski, R; Sitarz, R. State of the art for gastric signet ring cell carcinoma: from classification, prognosis, and genomic characteristics to specified treatments. *Cancer Manag Res.* 2019, 11:2151–61.
3. Hao, N-B; He, Y-F; Li, X-Q; Wang, K; Wang, R-L. The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer. *Oncotarget.* 2017, 8(46):81572–82.
4. Coussens, LM; Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002, 420(6917): 860–867. doi:10.1038/nature01322.
5. Yan, M; Jurasz, P. The role of platelets in the tumor microenvironment: From solid tumors to leukemia. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016, 1863(3):392–400.
6. Yap, M.L; McFadyen, J.D; Wang, X; Ziegler, M; Chen, Y-C; Willcox, A. et al. Activated platelets in the tumor microenvironment for targeting of antibody-drug conjugates to tumors and metastases. *Theranostics.* 2019, 9(4):1154–69.
7. Labelle, M; Hynes, R.O. The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host-Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. *Cancer Discov.* 2012, 2(12):1091–9.
8. Finsterbusch, M; Schrottmaier, W.C; Kral-Pointner, J.B; Salzmann, M; Assinger, A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets.* 2018, 29(7):677–85.
9. Jerne, C.N; Urrutia, R; Kubes, P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol.* 2013, 35(3):254–61.
10. Yun, S-H; Sim, E-H; Goh, R-Y; Park, J-I; Han, J-Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int.* 2016, 2016:1–5.
11. Herter, J.M; Rossaint, J; Zarbock, A. Platelets in inflammation and immunity. *J Thromb Haemost.* 2014, 12(11):1764–75.
12. Angelou, A; Antoniou, E; Gampis, N; Damaskos, C; Theocharis, S; Margonis, G-A. The Role of Soluble CD40L Ligand in Human Carcinogenesis. *Anticancer Res.* 2018, 38(5):3199–201.
13. Thomas, M; Storey, R. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost.* 2015, 114(09):449–58.
14. Tong, A.W; Stone, M.J. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer. *Cancer Gene.* 200, 10(1):1–13.
15. Bereznaya, N.M; Chekhun, V.F. Expression of CD40 and CD40L on tumor cells: the role of their interaction and new approach to immunotherapy. *Exp Oncol.* 2007, 29(1):2–12.
16. Bergmann, S; Pandolfi, P.P. Giving blood: a new role for CD40 in tumorigenesis. *J Exp Med.* 2006, 203(11):2409–12.

17. Murugaiyan, G; Martin, S; Saha, B. CD40-induced countercurrent conduits for tumor escape or elimination? *Trends Immunol.* 2007, 28(11):467–73.
18. Schrottmaier, W; Kral, J; Badrnya, S; Assinger, A. Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb Haemost.* 2015, 114(09):478–789.
19. Lievens, D; Zerneck, A; Seijkens, T; Soehnlein, O; Beckers, L; Munnix, I.C.A. et al. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood.* 2010, 116(20):4317–27.
20. Guillem-Llobat, P; Dovizio, M; Bruno, A; Ricciotti, E; Cufino, V; Sacco, A. et al. Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cells. *Oncotarget.* 2016, 7(22):32462–77.
21. Fleischer, J; Grage-Griebenow, E; Kasper, B; Heine, H; Ernst, M; Brandt, E. et al. Platelet Factor 4 Inhibits Proliferation and Cytokine Release of Activated Human T Cells. *J Immunol.* 2002, 169(2):770–7.
22. Lasagni, L; Francalanci, M; Annunziato, F; Lazzeri, E; Giannini, S; Cosmi, L. et al. An Alternatively Spliced Variant of CXCR3 Mediates the Inhibition of Endothelial Cell Growth Induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and Acts as Functional Receptor for Platelet Factor 4. *J Exp Med.* 2003, 197(11):1537–49.
23. Katz, I.R; Hoffmann, M.K; Zucker, M.B; Bell, M.K; Thorbecke, G.J. A platelet-derived immunoregulatory serum factor with T cell affinity. *J Immunol.* 1985, 134(5):3199–203.
24. Katz, I.R; Thorbecke, G.J; Bell, M.K; Yin, J.Z; Clarke, D; Zucker, M.B. Protease-induced immunoregulatory activity of platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986, 83(10):3491–5.
25. Katz, I.R; Bell, M.K; Hoffman, M.K; Thorbecke, G.J. Reversal of Con A-induced suppression by a platelet-derived factor which binds to activated suppressor T cells. *Cell Immunol.* 1986, 100(1):57–65.
26. Liu, C.Y; Battaglia, M; Lee, S.H; Sun, Q-H; Aster, R.H; Visentin, G.P. Platelet Factor 4 Differentially Modulates CD4+CD25+ (Regulatory) versus CD4+CD25- (Nonregulatory) T Cells. *J Immunol.* 2005, 174(5):2680–6.
27. Elzey, B.D; Ratliff, T.L; Sowa, J.M; Crist, S.A. Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. *Thromb Res.* 2011, (3):180-3. doi: 10.1016/j.thromres.2010.10.011.
28. Aloui, C; Prigent, A; Sut, C; Tariket, S; Hamzeh-Cognasse, H; Pozzetto, B; Richard, Y; Cognasse, F; Laradi, S; Garraud, O. The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion. *Int J Mol Sci.* 2014, 15(12):22342-64. doi: 10.3390/ijms151222342
29. Herr, V; Steinbach, S; Büchner, K; Presek, P; Kroczeck, R.A The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood.* 2001, 98(4):1047-54.
30. Elzey, B.D; Tian, J; Jensen, R.J; Swanson, A.K; Lees, J.R; Lentz, S.R; Stein, C.S; Nieswandt, B; Wang, Y; Davidson, B.L; Ratliff, T.L. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity.* 2003, (1):9-19
31. Cognasse, F; Hamzeh-Cognasse, H; Lafarge, S; Chavarin, P; Cogné, M; Richard, Y; Garraud, O. Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins. *Exp Hematol.* 2007, 35(9):1376-87

32. Wolf, M.J; Hoos, A; Bauer, J; Boettcher, S; Knust, M; Weber, A. et al. Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer Cell*. 2012, 22(1):91–105.
33. Qian, B-Z; Li, J; Zhang, H; Kitamura, T; Zhang, J; Campion, L.R. et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011, 475(7355):222–5.
34. Palframan, R.T; Jung, S; Cheng, G; Weninger, W; Luo, Y; Dorf, M. et al. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med*. 2001, 194(9):1361–73.
35. Läubli, H; Spanaus, K-S; Borsig, L. Selectin-mediated activation of endothelial cells induces expression of CCL5 and promotes metastasis through recruitment of monocytes. *Blood*. 2009, 114(20):4583–91.
36. Borczuk, A.C; Papanikolaou, N; Toonkel, R.L; Sole, M; Gorenstein, L.A; Ginsburg, M.E. et al. Lung adenocarcinoma invasion in TGFbetaR2-deficient cells is mediated by CCL5/RANTES. *Oncogene*. 2008, 27(4):557–64.
37. Laubli, H; Spanaus, K-S; Borsig, L. Selectin-mediated activation of endothelial cells induces expression of CCL5 and promotes metastasis through recruitment of monocytes. *Blood*. 2009, 114(20):4583–91.
38. Rolfes, V; Idel, C; Pries, R; Plötze-Martin, K; Habermann, J; Gemoll, T. et al. PD-L1 is expressed on human platelets and is affected by immune checkpoint therapy. *Oncotarget*. 2018, 9(44):27460–70.
39. Iida, T; Shiba, H; Misawa, T; Ohashi, T; Eto, Y; Yanaga, K. Immunogene therapy against colon cancer metastasis using an adenovirus vector expressing CD40 ligand. *Surgery*. 2010, 148(5):925–35.
40. Edge, SB; Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010, 17(6):1471–4.
41. Harding, S.A; Din, J.N; Sarma, J; Jessop, A; Weatherall, M; Fox, K.A. Flow cytometric analysis of circulating platelet-monocyte aggregates in whole blood: methodological considerations. *Thromb Haemost*. 2007, 98(2):451–6.
42. Bournazos, S; Rennie, J; Hart, S.P; Fox, K.A.A. Dransfield I. Monocyte Functional Responsiveness After PSGL-1-Mediated Platelet Adhesion Is Dependent on Platelet Activation Status. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008, 28(8):1491–8.
43. Macey, M; Azam, U; McCarthy, D; Webb, L; Chapman, E.S; Okrongly, D. et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. *Clin Chem*. 2002, 48(6 Pt 1):891–9.
44. Molero, T; Roemer, B; Perera, Alvarez, M.D.M; Lemes, A; Iglesia, I. S; Palacios, G. et al. Analysis and enumeration of T cells, B cells and NK cells using the monoclonal antibody fluorescence capability of a routine haematology analyser (Cell-Dyn CD4000). *Clin Lab Haematol*. 2005, 27(4):224–34.
45. Lakschevitz, F.S; Hassanpour, S; Rubin, A; Fine, N; Sun, C; Glogauer, M. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp Cell Res*. 2016, 342(2):200–9.
46. Ziegler-Heitbrock, L. Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions.

47. Granja, T; Schad, J; Schüssel, P; Fischer, C; Häberle, H; Rosenberger, P. et al. Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes – A new assay suitable for bench and bedside conditions. *Thromb Res.* 2015, 136(4):786–96.
48. Li, N; Goodall, A.H; Hjemdahl, P. A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet-leucocyte aggregates. *Br J Haematol.* 1997, 99(4):808–16.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho proporcionou o conhecimento dos parâmetros epigenéticos e da resposta imune dos pacientes com neoplasia gástrica atendidos no Serviço de Cirurgia Oncológica do HCP/PE.

Nos últimos anos, houve um número crescente de estudos funcionais de miRNAs usando tecnologias experimentais e ferramentas de bioinformática que produziram uma grande quantidade de dados de alta qualidade em relação aos genes-alvo de miRNA e suas interações. Esses ricos conjuntos de informações permitiram a criação de redes abrangentes ligando miRNAs a várias entidades biologicamente importantes para esclarecer suas funções coletivas e mecanismos regulatórios.

Para conhecer mais sobre o papel dos miRNAs estudados em nossa amostra, foi realizada uma análise de vias biológicas relacionadas aos genes-alvo destas moléculas, entretanto, foram considerados separadamente os alvos de miRNAs reprimidos em câncer gástrico e o induzido na doença. Foram descritas várias vias enriquecidas para os alvos de miRNAs sub- e superexpressos, respectivamente, sendo algumas delas comuns aos dois grupos, como *Gap junction*, *mRNA surveillance pathway*, *GnRH signaling pathway*, *proteoglycans in cancer*, *Ras signaling pathway*, *pathways in cancer*, *pancreatic and colorectal cancer* e *TNF signaling pathway*, sendo a maioria relacionada à sinalização celular. Isso mostra que, possivelmente, diferentes genes codificantes de proteínas de uma mesma via biológica apresentam uma expressão reduzida ou aumentada, e, dependendo de sua função, podem estar contribuindo para um desequilíbrio nos processos celulares

normais característicos da linhagem de células T, por exemplo, além de colaborar com a desregulação de redes de interação entre várias vias do sistema imune.

Além disso, muitas vias e genes-alvo dos microRNAs diferentemente expressos mostraram-se efetivamente afetadas, tais como a via do TNF. Os resultados de alterações de expressão de proteínas OX40 e CD40L (família do TNF) nas células do sistema imune ratificam os resultados das análises prévias.

Os microRNAs estão emergindo como reguladores cruciais das respostas imunes (HOU et al. 2009), e sua expressão e/ou função anormal no sistema imunológico tem sido associada a múltiplos cânceres. Assim, se a maioria dos cânceres é caracterizada por uma desregulação da expressão miRNA e da resposta imune, e se há uma correlação entre essas alterações, será que a restauração do miRNome global pode ser uma abordagem atraente na terapia do câncer? Em conclusão, uma melhor compreensão da função dos miRNAs tem fornecido novos insights sobre as bases moleculares da neoplasia gástrica e permitindo o desenvolvimento de novas possibilidades de tratamento. Novos avanços no campo experimental trarão melhorias no campo computacional, que, por sua vez, proporcionarão adicionais progressos aos métodos laboratoriais, num ciclo promissor que produzirá nos próximos anos um crescimento significativo no conhecimento de diversas atividades celulares importantes que ainda necessitam de elucidação.

Outro ponto interessante foi a identificação do aumento de expressão de CD62p⁺ das plaquetas e agregados plaquetários nos pacientes com neoplasia gástrica, especialmente no contexto metastático. Os agregados monócitos-plaquetas foram detectados no sangue de humanos com uma variedade de doenças (YIP et al. 2013; STEGNER et al. 2014) e agora são considerados como um dos marcadores

mais sensíveis e promissores relacionados à ativação plaquetária. Os agregados plaquetários ativados poderiam ser utilizados como biomarcadores de atividade tumoral na neoplasia gástrica? Abre-se mais uma nova perspectiva para futuras pesquisas.

Estudos prévios já haviam descrito a participação das plaquetas nos mecanismos de metástase tumoral (ABBASCIANO et al. 1995; STEGNER et al 2014). Entretanto, pela primeira vez, foi revelada uma possível interface da ativação plaquetária e mecanismos de regulação de células imunes na neoplasia gástrica, o que poderia justificar alguns mecanismos de escape. O papel das plaquetas na resposta imune inata tem sido reconhecido há várias décadas. Entretanto, o papel das plaquetas na resposta imune adaptativa está emergindo e não foi claramente elucidado.

Vários estudos sugerem que as plaquetas e seus produtos influenciam a imunidade adaptativa e desempenham papéis significativos na formação da resposta imune (ELZEY et al. 2005; RAMADAN e PACZESNY 2015). Por exemplo, foi demonstrado que as plaquetas expressam (CD40L), uma molécula crítica para a modulação da resposta imune adaptativa. A ligação de CD40L de células T a CD40 em células dendríticas (DC) promove a ativação destas últimas, com a consequente melhor apresentação de antígenos. A ausência ou diminuição de expressão de CD40L afeta tanto as respostas imunes humorais quanto as mediadas por células (ELZEY et al. 2011). Nossos resultados sugerem falhas nesses mecanismos imunológicos, especialmente nos pacientes metastáticos, e abrem novas possibilidades de intervenções terapêuticas.

Por sua vez, o objeto de estudo deste projeto é de grande interesse para a oncologia pela necessidade da descoberta de biomarcadores e pela utilização crescente de tratamentos visando respostas imunes mais efetivas. A imunoterapia foi considerada, em 2016, pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO), como o avanço mais promissor contra o câncer, e a presente tese abre várias novas perspectivas de pesquisas em diferentes pontos da regulação do sistema imune.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com o presente estudo, conclui-se:

- Existem microRNAs diferentemente expressos (miR-196b-5p, miR-374-5p e miR-375) no tumor gástrico, estando envolvidos com a expressão de genes/proteínas associados a importantes vias de sinalização da resposta imune;
- A expressão de OX40 nos linfócitos T mostrou estar associada a progressão tumoral no CG;
- As alterações dos níveis de agregados de plaquetas-linfócitos T e plaquetas-linfócitos B, e de expressão de CD40L foram associadas à progressão e metástase no GC;
- Os pacientes com metástases à distância apresentaram alterações dos mecanismos moleculares (miRNA) e celulares avaliados neste estudo, estando esses mecanismos envolvidos na regulação e ativação da resposta imune.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasiano V, Bianchi MP, Trevisani L, Sartori S, Gilli G, Zavagli G. Platelet activation and fibrinolysis in large bowel cancer. **Oncology** 1995; 52:381-4.

Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood** 2012; 119:651-65.

[ACS] American Cancer Society. Stomach cancer risk factors. Available from: <URL:<https://bit.ly/2AVT3eY>> [2019 abr 15]

Anonymous. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group. **Lancet** 1993; 341:1359-62.

Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:361-71.

Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature** 2014; 513:202-9.

BD Biosciences-US. Available from: <http://wwwbdbiosciences.com/us/home>. [2019 abr 15].

Bezradica JS, Medzhitov R. Integration of cytokine and heterologous receptor signaling pathways. **Nat Immunol** 2009; 10:333-9.

Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO Classification of Tumours of the Digestive System: tumours of the stomach. 4th ed. Lyon: IARC; 2010. (WHO Classification of Tumours, v. 3; IARC WHO Classification of Tumours, n° 3).

Bournazos S, Rennie J, Hart SP, et al. Monocyte functional responsiveness after PSGL-1-mediated platelet adhesion is dependent on platelet activation status. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2008; 28:1491-8.

Brain O, Owens BMJ, Pichulik T, et al. The Intracellular Sensor NOD2 Induces MicroRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. **Immunity** 2013; 39:521-36.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:394-424.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature** 2014; 513:202-9.

Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. Molecular sciences MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. **Int J Mol Sci** 2016; 17:E1712.

Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nat Rev Immunol** 2013; 13:227-42.

Cheng Z, Liu F, Zhang H, et al. miR-135a inhibits tumor metastasis and angiogenesis by targeting FAK pathway. **Oncotarget** 2017; 8:31153-68.

Cho S, Wu C-J, Yasuda T, et al. miR-23~27~24 clusters control effector T cell differentiation and function. **J Exp Med** 2016; 213:235-49.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci** 2005; 102:13944-9.

Curtale G. cells MiRNAs at the Crossroads between innate immunity and cancer: focus on macrophages. **Cells** 2018; 7:E12.

DAVID. **Functional annotation bioinformatics microarray analysis**. Available from: <https://david.ncifcrf.gov/>. [2019 abr 15].

Davidson-Moncada J, Papavasiliou FN, Tam W. MicroRNAs of the immune system. **Ann N Y Acad Sci** 2010; 1183:183-94.

Detassis S, Grasso M, Del Vescovo V, Denti MA. microRNAs make the call in cancer personalized medicine. **Front Cell Dev Biol** 2017; 22:5:86.

Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB, Watari H. Tumor-intrinsic PD-L1 signaling in cancer initiation, development and treatment: beyond immune evasion. **Front Oncol** 2018; 8:386.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol** 2002; 3:991-8.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:1471-4.

Elzey BD, Sprague DL, Ratliff TL. The emerging role of platelets in adaptive immunity. **Cell Immunol** 2005; 238:1-9.

Elzey BD, Ratliff TL, Sowa JM, Crist SA. Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. **Thromb Res** 2011; 127:180-3.

Eslick GD, Lim LL, Byles JE, et al. Association of Helicobacter pylori infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. **Am J Gastroenterol** 1999; 94:2373-9.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** 2015; 136:E359-86.

Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. **J Natl Cancer Inst** 1970; 45:773-82.

Finsterebusch M, Schrottmaier WC, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Assinger A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. **Platelets** 2018; 29:677-85.

Garattini SK, Basile D, Cattaneo M, et al. Molecular classifications of gastric cancers: novel insights and possible future applications. **World J Gastrointest Oncol** 2017; 9:194-208.

Garraud O, Cognasse F. Are platelets cells? and if yes, are they immune cells? **Front Immunol** 2015; 6:70.

Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1968; 61:46-52.

Granja T, Schad J, Schüssel P, et al. Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes--A new assay suitable for bench and bedside conditions. **Thromb Res** 2015; 136:786-96.

Gu D, Jiang M, Mei Z, et al. microRNA-7 impairs autophagy-derived pools of glucose to suppress pancreatic cancer progression. **Cancer Lett** 2017; 400:69-78.

Guglietta S, Chiavelli A, Zagato E, et al. Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis. **Nat Commun** 2016; 7:11037.

Ha TY. The Role of MicroRNAs in regulatory t cells and in the immune response. **Immune Netw** 2011; 11:11-41.

Harding SA, Din JN, Sarma J, et al. Flow cytometric analysis of circulating platelet-monocyte aggregates in whole blood: methodological considerations. **Thromb Haemost** 2007; 98:451-6.

Honarpisheh M, Köhler P, Von Rauchhaupt E, Lech M. The involvement of MicroRNAs in modulation of innate and adaptive immunity in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **J Immunol Res** 2018; 2018:1-15.

Honn KV, Tang DG, Crissman JD. Platelets and cancer metastasis: a causal relationship? **Cancer Metastasis Rev** 1992; 11:325-51.

Hou J, Wang P, Lin L, et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. **J Immunol** 2009; 183:2150-8.

Ikeda M, Furukawa H, Imamura H, et al. Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with gastric cancer. **Ann Surg Oncol** 2002; 9:287-91.

Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. **Carcinogenesis** 2012; 33:1126-33.

Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. **Nature** 2006; 441:431-6.

Kim HW, Svendsen CN. Gene editing in stem cells hits the target. **Cell Stem Cell** 2011; 9:93-4.

Kuchen S, Resch W, Yamane A, et al. Regulation of MicroRNA expression and abundance during lymphopoiesis. **Immunity** 2010; 32:828-839.

Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. **Nat Immunol** 2016; 17:230-40.

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1965; 64:31-49.

Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:321-33.

Lindsay MA. microRNAs and the immune response. **Trends Immunol** 2008; 29:343-51.

Macey M, Azam U, McCarthy D, et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. **Clin Chem** 2002; 48:891-9.

Malik AB. Pulmonary microembolism. **Physiol Rev** 1983; 63:1114-207.

Marqués-Lespier JM, González-Pons M, Cruz-Correa M. Current perspectives on gastric cancer. **Gastroenterol Clin North Am** 2016; 45:413-28.

Mehta A, Baltimore D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. **Nat Rev Immunol** 2016; 16:279-94.

Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. **Circulation** 2001; 104:1533-7.

Miles FL, Pruitt FL, Van Golen KL, Cooper CR. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. **Clin Exp Metastasis** 2008; 25:305-24.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro; INCA: 2018.

miRWalk. **A database on Predicted and Published MicroRNAs**. Available from: <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/documentation.html>. [2019 abr 15].

Moran AE, Kovacsovics-Bankowski M, Weinberg AD. The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy. **Curr Opin Immunol** 2013; 25:230-7.

O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. **Breast Cancer Res** 2010; 12:201.

Palumbo JS, Talmage KE, Massari J V, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. **Blood** 2005; 105:178-85.

Pan M, Huang P, Li S, Chen J, Wei S, Zhang Y. Double contrast-enhanced ultrasonography in preoperative Borrmann classification of advanced gastric carcinoma: comparison with histopathology. **Sci Rep** 2013; 3:3338.

Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature** 2004; 431:461-6.

Piovan C, Palmieri D, Di Leva G, et al. Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer. **Mol Oncol** 2012; 6:458-72.

Pizzini S, Bisognin A, Mandruzzato S, et al. Impact of microRNAs on regulatory networks and pathways in human colorectal carcinogenesis and development of metastasis. **BMC Genomics** 2013; 29:14:589.

Ramadan A, Leah M, Wuescher, et al. Platelets: essential components of the immune system. **Curr Trends Immunol** 2015; 16: 65-78.

Rhee J-S, Black M, Schubert U, et al. The functional role of blood platelet components in angiogenesis. **Thromb Haemost** 2004; 92:394-402.

Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. **Science** 2007; 316:608-11.

Setianto BY, Hartopo AB, Gharini PPR, Anggrahini DW, Irawan B. Circulating soluble CD40 ligand mediates the interaction between neutrophils and platelets in acute coronary syndrome. **Heart Vessels** 2010; 25:282-7.

Shah MY, Ferrajoli A, Sood AK, Lopez-Berestein G, Calin GA. microRNA therapeutics in cancer - an emerging concept. **EBioMedicine** 2016; 12:34-42.

Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, et al. Platelet functions beyond hemostasis. **J Thromb Haemost** 2009; 7:1759-66.

Squadrito ML, Etzrodt M, De Palma M, Pittet MJ. MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer. **Trends Immunol** 2013; 34:350-9.

Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. **J Mol Med (Berl)** 2011; 89:109-21.

Stegner D, Dütting S, Nieswandt B. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. **Thromb Res** 2014; 133:149-57.

Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. **Thromb Haemost** 2015; 114:449-58.

Tili E, Michaille J-J, Croce CM. MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. **Immunol Rev** 2013; 253:167-84.

Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. **Clin Med** 1873; 2:654-712.

Tsugane S, Sasazuki S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. **Gastric Cancer** 2007; 10:75-83..

Ueda T, Volinia S, Okumura H, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. **Lancet Oncol** 2010; 11:136-46.

Valastyan S, Benaich N, Chang A, Reinhardt F, Weinberg RA. Concomitant suppression of three target genes can explain the impact of a microRNA on metastasis. **Genes Dev** 2009; 23:2592-7.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annu Rev Immunol** 2011; 29:235-271.

Wang Y, Wang D, Xie G, et al. MicroRNA-152 regulates immune response via targeting B7-H1 in gastric carcinoma. **Oncotarget** 2017; 8:28125-34.

Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene** 2008; 27:5904-12.

Willimsky G, Blankenstein T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. **Nature** 2005; 437:141-6.

Xiao C, Calado DP, Galler G, et al. MiR-150 Controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. **Cell** 2007; 131:146-59.

Xu G, Shao G, Pan Q, et al. MicroRNA-9 regulates non-small cell lung cancer cell invasion and migration by targeting eukaryotic translation initiation factor 5A2. **Am J Transl Res** 2017; 9:478-88.

Yasui W, Sentani K, Motoshita J, Nakayama H. Molecular pathobiology of gastric cancer. **Scandin J Surg** 2006; 95:225-31.

Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. **Nat Rev Microbiol** 2014; 12:426-37.

Yip C, Ignjatovic V, Attard C, Monagle P, Linden MD. First report of elevated monocyte-platelet aggregates in healthy children. **PLoS One** 2013; 8:e67416.

Zhou B, Xu H, Xia M, et al. Overexpressed miR-9 promotes tumor metastasis via targeting E-cadherin in serous ovarian cancer. **Front Med** 2017; 11:214-22.

Zhou X, Xu G, Yin C, Jin W, Zhang G. Down-regulation of miR-203 induced by Helicobacter pylori infection promotes the proliferation and invasion of gastric cancer by targeting CASK. **Oncotarget** 2014; 5:11631-40.

Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. **Nat Rev Clin Oncol** 2011; 8:151-60.

Zucchella M, Dezza L, Pacchiarini L, et al. Human tumor cells cultured "in vitro" activate platelet function by producing ADP or thrombin. **Haematologica** 1989; 74:541-5.

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa “PERFIL DE AGREGADO PLAQUETÁRIO CIRCULANTE E DA EXPRESSÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO CÂNCER GÁSTRICO”

Convido o senhor (a) a participar deste estudo:

Nome do participante: _____

O trabalho tem por finalidade avaliar o perfil de agregado plaquetário circulante e da expressão de mediadores inflamatórios em pacientes com neoplasia gástrica, visando substâncias com potencial terapêutico (de tratamento). Por isso está sendo convidado a participar de um projeto que envolve a de uma pequena alíquota (amostra) de sangue periférico. Para que você possa decidir se quer participar ou não deste projeto, precisa conhecer seus benefícios, riscos e consequências. Após receber todas as informações abaixo você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso queira participar.

PROPÓSITO E OBJETIVO DO PROJETO

Este projeto é um esforço conjunto entre pesquisadores para utilizar os recentes avanços na medicina na tentativa de diagnosticar precocemente casos de câncer de estômago, como também buscar soluções que facilitem o tratamento dos pacientes com câncer gástrico.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se concordar participar deste estudo será necessário coletar amostras do sangue da veia, totalizando um volume de 10ml, aproximadamente uma colher de sopa de sangue. Você não precisará ser submetido a nenhum procedimento a mais para participar desta pesquisa já que poderemos aproveitar o mesmo tecido que será utilizado para fazer o seu diagnóstico. Este material será armazenado em “congeladores” no Laboratório de Pesquisa do IMIP até o momento de ser utilizado na nossa pesquisa. Além disto, serão pesquisadas informações no seu prontuário, como por exemplo: idade, tipo do tumor e estágio do tumor após a cirurgia.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTARIA

Caso você não deseje participar deste projeto de pesquisa, basta que você não assine este Termo de Consentimento e nenhuma amostra será utilizada nem os seus registros médicos serão consultados. O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. Não haverá risco adicional para a obtenção de amostras para o presente estudo. Durante o projeto você terá o acompanhamento normal junto ao seu médico do HCP que é responsável pela sua assistência.

BENEFÍCIOS

Não haverá benefícios imediatos a você, porém a sua participação neste estudo poderá contribuir para o entendimento de casos como o seu no futuro. Este estudo poderá, no entanto, resultar em benefícios para outros pacientes que terão o diagnóstico de câncer de estômago e que irão fazer o tratamento.

RISCOS

Ao participar dessa pesquisa o risco e desconforto serão mínimos. O desconforto poderá ser sentido durante a punção venosa para coleta do sangue. Os riscos, se ocorrerem serão mínimos por se tratar de uma punção venosa no antebraço. Reações locais poderão ocorrer, tais como: hematomas e muito raramente inflamação na veia puncionada. Nestes casos, os voluntários da pesquisa serão devidamente orientados por profissionais qualificados da Instituição tanto no ambulatório de cirurgia oncológica ou no Serviço de emergência do HCP em caso de necessidade.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital do HCP e equipe de pesquisadores envolvidos. As amostras de tecido serão processadas de tal forma que sua privacidade e identidade sejam preservadas. Seu nome não será revelado ainda que as informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos. Os pacientes poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Caso haja a necessidade de atendimento médico, durante ou após este estudo, este ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Você não terá qualquer custo ou forma de pagamento pela participação no projeto de pesquisa. A participação no projeto é voluntária e você não sofrerá nenhuma penalidade caso não autorize a sua participação. Todo o seu tratamento e acompanhamento médico serão os mesmos, independente de sua decisão de autorizar ou não a participação no projeto. Os pacientes não terão nenhum custo pessoal durante a realização do trabalho, incluindo exames e consultas. Não haverá compensação financeira para os pacientes. Em caso de dano físico, diretamente causado pela coleta de sangue, o participante tem direito a tratamento médico no Hospital do Câncer de Pernambuco.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de desistência, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida. Este TCLE será assinado em duas vias, sendo uma retida pelo pesquisador responsável e outra com o participante da pesquisa, conforme resolução CNS 466 de 2012.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para o Dr. Mário Rino Martins no telefone (81) 96077665. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do HCP ou se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa do HCP na Avenida Cruz

Cabugá 1597, Santo Amaro, Recife - PE (Telefone: 81 32178005). Horário: segunda a sexta, das 8h as 12h e das 14h as 16h. Avenida Cruz Cabugá S/N, telefones (81) 32178005. Email: cep@hcp.org.br.

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho.

Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também estou isenta de despesas e que terei a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste serviço.

Declaro estarem claros para mim quais são os objetivos desta atividade, como participarei, que terei garantia de confidencialidade e a certeza de que obterei esclarecimentos a qualquer momento, bem como retirada deste consentimento a qualquer momento. Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento.

(nome e contato do familiar ou representante legal)

Nome e assinatura do paciente _____ /_____/_____
Data

Assinatura do Responsável Legal/Testemunha Imparcial _____ /_____/_____
Data

Recife, ___/___/____

Dr. Mario Rino Martins
Pesquisador Responsável

Apêndice 1 - Questionário de pesquisa

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA - ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	
CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	
Responsável pela coleta dos dados: _____	Data da coleta: _____ /_____/_____
Nome do paciente: _____	
Hospital de origem: (1) IMIP (2) Hospital do Câncer _____/_____/_____	Data da matrícula: _____
Data de Nascimento: ____/____/_____	
Verificação dos critérios de elegibilidade:	
Idade <input type="checkbox"/> 18 anos	(1) Sim (2) Não
Diagnóstico confirmado de adenocarcinoma de estômago	(1) Sim (2) Não
Ausência de história pessoal de câncer prévio	(1) Sim (2) Não
Ausência de história pessoal de segundo tumor primário sincrônico	(1) Sim (2) Não
Ausência tipo tratamento oncológico prévio	(1) Sim (2) Não
Nas questões anteriores, respondeu SIM a todos: (EXCLUSÃO)	(1) Sim (INCLUSÃO) (2) Não
Assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: (EXCLUSÃO)	(1) Sim (INCLUSÃO) (2) Não
ENTREVISTA NO INÍCIO DO ESTUDO	
Responsável pela coleta dos dados: _____	Data da coleta: _____ /_____/_____
Nº do Prontuário: _____	
Residência (cidade e estado): _____	Naturalidade: _____
Sexo (1) Masculino (2) Feminino	
Qual foi a data aproximada do primeiro sintoma relativo ao câncer? ____/____/_____	
COLETA DE DADOS NO PRONTUÁRIO	
Informações Clínicas	
Data da confirmação diagnóstica de câncer (BPO): ____/____/_____	
Data da primeira consulta no serviço: ____/____/_____	
Classificação de Lauren: (1) Tipo intestinal, (2) tipo difuso (3) misto	
Localização do tumor: (1) JEG (junção esôfago gástrica) (2) Fundo gástrico (3) Corpo gástrico (4) piloro	
Data do início do tratamento: ____/____/_____	
Estadiamento cirúrgico:	
Estadiamento patológico: (1)I (2)IIA (3)IIB (4)IIIA (5)IIIB (6)IIIC (7)IV (8) Sem Informação	
Presença de metástases: (0)M0 (1)M1 Local: _____	
INFORMAÇÕES DO TRATAMENTO	
Indicação do tratamento inicial: (1) Curativo (2) Paliativo	(9) Sem Informação
Margens Livres: (1) Não (2) Sim	(9) Sem Informação
Número de linfonodos comprometidos _____	(9) Sem Informação
Tipo de cirurgia: (1) Gastrectomia total (2) Gastrectomia parcial (3) paliativa	

GalNAc-T15 in gastric adenocarcinoma: Characterization according to tissue architecture and cellular location

Mário S. de Souza Albuquerque,^{1*}
 Antônio F. da Silva Filho,^{1*}
 Marina Ferraz Cordeiro,¹
 Maria de Fátima Deodato de Souza,¹
 Michael W. L. Quirino,²
 Luiza R. Amorim Lima,²
 Maira G. da Rocha Pitta,³
 Mário R. Martins,³
 Moacyr J. B. de Melo Rêgo¹

¹Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco, Recife

²Universidade de Pernambuco, Campus Garanhuns

³Hospital do Câncer de Pernambuco, Recife, Brazil

Abstract

Gastric cancer (GC) is the second most common cause of cancer-related deaths in the world. This study aims to investigate the differential tissue expression of ppGalNAc-T15 and to evaluate its possible association with clinical-pathological parameters and outcome of gastric adenocarcinoma patients. For these 70 patients were evaluated the expression by immunohistochemistry to ppGalNAc-T15. Our results showed that 33 (47.1%) patients were ppGalNAc-T15+ positive and 37 (52.9%) negative. Positive staining for ppGalNAc-T15 was significantly present in patients older than 60 years ($P=0.0306$) and submitted to total gastrectomy ($P=0.0087$). Also, some results remained at the limit of significance as surgical standing ($P=0.0562$) and histological grade ($P=0.0549$). Therefore, the ppGalNAc-T15 immunoreactivity can be useful to understand the prognosis of patients with gastric cancer.

Introduction

Gastric cancer (GC) is a heterogeneous disease and the endpoint of a long multistep process largely influenced by *Helicobacter pylori* infection, genetic susceptibility, and environmental factors. Despite the decrease in incidence, avoidance of gastric cancer remains a priority.^{1,2} Gastric carcinoma demonstrates marked heterogeneity at both

architectural and cytologic level.^{3,4} According to the World Health Organization guidelines, GC can be classified in four major histologic patterns of gastric cancers: tubular, papillary, mucinous, poorly cohesive and others uncommon histologic variants.⁵

Many secretory and cell surface proteins are modified through the addition of carbohydrate portion formed by mucin-type O-linked oligosaccharide structures, present in organs that have secretory characteristics like the stomach.⁶ The biosynthesis of mucin-type O-linked oligosaccharides is catalyzed by UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (ppGalNAc-Ts), an enzyme family responsible for transferring GalNAc from UDP-GalNAc to a serine or threonine residue on the polypeptide acceptor.⁷ A total of 20 human GalNAc-T gene entries are available, in which 17 have been characterized.⁸ Several isoforms are expressed in various tissues and catalyze a broad spectrum of substrates (ppGalNAc-T1, T2), whereas the other isoforms are more restricted in expression and/or in substrate preference (ppGalNAc-T3, T4, T7, T9, T11 and T13).⁹

ppGalNAc-T15 is mainly detected in Golgi apparatus where the enzyme catalyzes its reaction but, also can be founded on endoplasmic reticulum. Your transcript is broadly expressed in various tissues, mainly in small intestine, nervous and female reproductive systems.¹⁰ This enzyme has a homologous sequence to ppGalNAc-T2, however it exhibits different substrate specificities and diverges in the number of GalNAcs they incorporate into the acceptor peptide.⁹ In addition, there is little information about ppGalNAc-T15 importance on maintenance and development of normal and neoplastic cells. The clinical relevance of immunoreactivity of pp-GalNAc-T15 in gastric cancer and normal tissues was evaluated in this study.

Materials and Methods

Samples

Seventy patients sample of primary gastric adenocarcinoma, diagnosed between 2013 and 2016, were selected from the Service Registry of the Pernambuco Cancer Hospital. All samples obtained from this service were approved by the Certificate of Presentation for Ethical Assessment (CAAE: 39976214.90000.5205). Following variables were collected in medical charts: age, sex, extension of the surgery performed, therapeutic modality, surgical staging, lymph node involvement, histological grade, submission to chemotherapy and radiation therapy, and recurrence.

Correspondence: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil.
 E-mail: moacyr.rego@gmail.com

*These authors contributed equally

Key words: Gastric adenocarcinoma; polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases; clinical-pathological analyses; immunohistochemistry.

Funding: The Authors thank to CNPq, CAPES, and FACEPE for financial support

Received for publication: 23 March 2018.
 Accepted for publication: 4 June 2018.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

©Copyright M.S. de Souza Albuquerque et al., 2018
 License: PAGEPress, Italy
 European Journal of Histochemistry 2018; 62:2931
 doi:10.4081/ijh.2018.2931

Immunohistochemistry

Biopsy slices (4 μ m) were deparaffinized with xylol and rehydrated in graded ethanol (100%, 95%, 80% and 70%). Antigen retrieval was done using 100 mM citrate buffer, pH 6.0. Endogenous peroxidase blocker was performed with hydrogen peroxide followed by blocking the non-specific binding (phosphate-buffered saline-1% bovine serum albumin PBS-BSA). Incubation of samples was performed with polyclonal primary antibody anti-ppGalNAc-T15 (CUSABIO) 1:100 with 1% PBS-BSA for 18 h at 4°C or 2 h at 37°C. The amplification system (Easylink On, ImmPRESS™ and DAKO EnVision™) was applied. Reaction was visualized with diaminobenzidine (DAB-H₂O₂) and tissues were counterstained with hematoxylin. Positive control was used following the antibody manufacturer's designation and the negative controls were established by replacing the primary antibody with anti-human IgG (Dako) antibody (Supplementary Figure 1).

Image analysis

Histomorphological analysis was performed with an integrated image system (BIOPTICA B20) microscope coupled to a CMOS camera (2584 x 1936 pixels resolution) with ISCapture image capture software and objectives 20x and 40x for image acquisition. Semi-quantitative analysis of

the stained cells was done using immunoreactive score (IRS) classification¹¹ by analyzing 5 random fields in each slide. The score evaluation was done by two independent evaluators through the analysis of images at 200x magnification, and the results expressed as negative, weak, intermediate and strong staining (supplementary Table 1).

Statistical analysis

Statistical analysis we carried out considering the results positive for ppGalNAc-T15 when the staining was weak, intermediate or strong. Fisher's exact test was performed in GraphPad Prism version 6.0. $P < 0.05$ was considered significant. Analysis of outcome was evaluated through log-rank method and Kaplan-Meier survival curves.

Results

Gastric cancer patients included in this study had a mean age of 59.4 ± 12.9 (range = 30-89) years and 47 (66.1%) were male and 24 (33.9%) were female. Evaluation of ppGalNAc-T15 using immunohistochemistry in paraffin sections of a series of 70 patients showed expression of this enzyme in 33 (47.14%) cases and in 37 (52.86%) its absence. Among these samples 12 had weak staining, 16 intermediate and 5 strong.

The four histological lesions of gastric cancer were found in this study (Figure 1 A-D). These lesion types were present in individual samples and simultaneously in the same sample. Immunohistochemical analysis showed that (23/70) 32.86% of the samples had a cytoplasmic staining pattern while (10/70) 14.29% presented a combination of cytoplasmic, nuclear and perinuclear staining (Figure 2). Thirty-four patients (48.6%) exhibit samples with normal gastric glands areas. This non-cancerous gastric tissue showed expression in 24 cases with cytoplasmic staining restricted to basal portion (Figure 3 C,D). When comparing enzyme staining between tumor and its adjacent normal area the patterns are well heterogeneous (Supplementary Table 2).

Statistics analysis revealed significant association between the ppGalNAc-T15 immunoreactivity and the parameters age ($P = 0.0306$) and extension of the surgery performed ($P < 0.05$). Association with surgical staging ($P = 0.0562$) and histological grade ($P = 0.0549$) was close to significance. Of analyzed samples 32 (31.42%) were positive for ppGalNAc-T15 and belonged to patients older than 60 years, while 23 (32.85%) were ppGalNAc-T15 and younger than 60 years. In relation to the extension of surgery performed, 25

(35.71%) samples that expressed ppGalNAc-T15 was obtained from a total gastrectomy, while 21 (30%) samples ppGalNAc-T15 negative came from partial gastrectomy (Table 1). In the paired analysis of total positive cases, tumor staining with adjacent normal tissue showed marking concordance in 17 cases (51.51%), and the remaining 16 (48.48%) cases were discordant. Associations with overall patient survival 496 days for the negative group and 414 days for the positive group ($P = 0.6672$) and relapse-free time 11 months for the negative group and 12 months for the positive group ($P = 0.6195$) do not show

statistics significance (supplementary Figure 2).

Discussion

Changes in the glycosylation patterns occur on cell surface and secreted glycoproteins during cancer tumorigenesis and progression. Modifications in glycosyltransferase and/or glycosidase expression, activity, and structure play a key role in the onset and progression of cancer, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and metastasis.¹²

Table 1. Association analysis of ppGalNAc-T15 expression with clinicopathological features of gastric cancer patients.

Clinicopathological features	ppGalNAc-T15(+) n (%)	ppGalNAc-T15(-) n (%)	P value
Age (years)			
≥60	22 (31.42)	13 (18.57)	0.0306*
<60	12 (17.14)	23 (32.85)	
Sex			
Female	10 (14.28)	14 (20)	0.4570*
Male	24 (34.28)	22 (31.42)	
Surgery			
Total gastrectomy	25 (35.71)	15 (21.42)	0.0087*
Partial gastrectomy	9 (12.85)	21 (30)	
Neoadjuvant treatment			
I	32 (45.71)	33 (47.14)	1.0000*
III	2 (2.85)	3 (4.28)	
Surgical staging (TNM)			
(I and II)	5 (7.14)	13 (18.57)	0.0562*
(III and IV)	29 (41.42)	23 (32.85)	
Lymph node involvement			
Yes	24 (34.28)	21 (30)	0.3260*
No	10 (14.28)	15 (21.42)	
Positive/retrieved (Node ratio)	4.8/18.45 (0.28)	4.9/18.64 (0.34)	0.5238
Lymphadenectomy			
D1	16 (22.86)	15 (21.43)	0.0667
D2	18 (25.71)	19 (27.14)	
D3	0	2 (2.85)	
Lauren classification			
Intestinal	18 (26.47)	16 (23.53)	0.4664
Diffuse	14 (20.59)	20 (29.41)	
Histological grade			
GI + GII	21 (30)	13 (18.57)	0.0549*
GIII	13 (18.57)	23 (32.85)	
Chemotherapy			
Yes	19 (27.14)	20 (28.57)	1.0000*
No	15 (21.42)	16 (22.85)	
Radiotherapy			
Yes	12 (17.14)	10 (14.28)	0.6086*
No	22 (31.42)	26 (37.14)	
Recurrence			
Yes	7 (10)	9 (12.85)	0.7785*
No	27 (38.57)	27 (38.57)	

*Fisher's exact test.

GalNAc transferases (GALNTs) are crucial *O*-glycosyltransferases that initiate the formation of mucin-type *O*-glycan are differentially expressed in various tissues. This enzyme transfers GalNAc from UDP-GalNAc to a serine or threonine residue on the polypeptide acceptor mucin-type *O*-gly-

cosylation processing, forming the Tn antigen.⁹ This glycoconjugate is an immature structure that is modified or elongated to produce *O*-glycans like mucin. In some tumor cells, *O*-glycosylation is dramatically altered, resulting in expression of incomplete *O*-glycans, as represented by the Tn

and STn antigens.¹³ These structures are markers for poorly differentiated adenocarcinomas and mucinous carcinomas, whose increased occurrence is associated with advanced cancer, invasive and highly proliferative tumors, metastasis and a poor clinical outcome.¹⁴ Here, we show that the

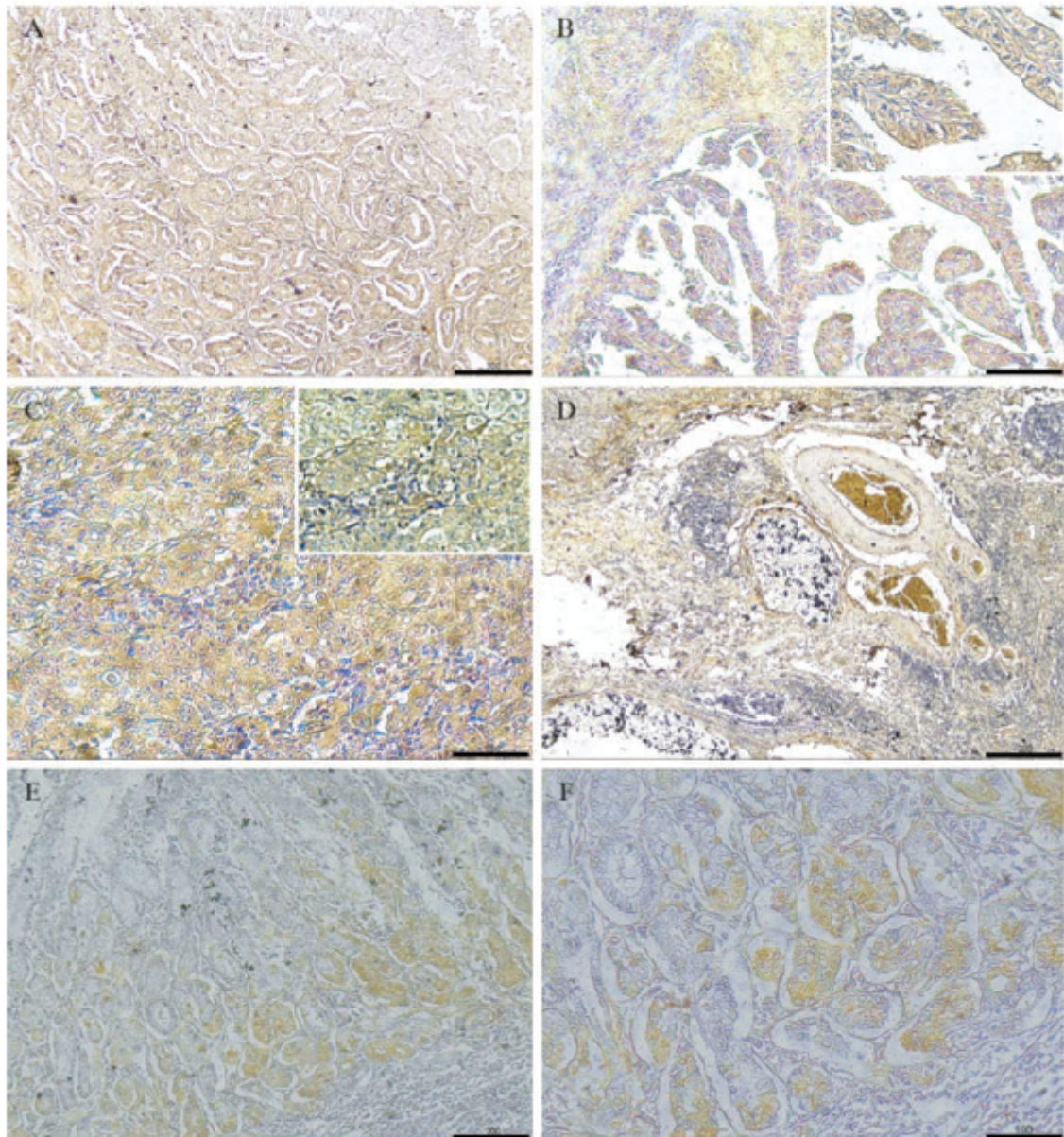


Figure 1. Histological classification of gastric cancer evidenced by PpGalNAc-T15 Immunohistochemistry. Representative areas of tubular region (A), papillary region (B), poorly differentiated region (C) and delimited mucine region (D). E,F) Normal gastric glands. Scale bars: A-E) 200 μ m; F) 100 μ m.

ppGalNAc-T15 expression was present in approximately half of the GC samples, presenting a general cytoplasmic pattern, and in smaller percentages, nuclear, perinuclear and membrane staining. Observation of non-cancerous gastric tissue revealed the same cytoplasmic profile but restricted to basal and productive portion of gastric glands. Besides, ppGalNAc-T15 immunoreactivity was associated with the following clinical parameters: age, extension of the surgery performed, surgical staging and histological grade. Age was a factor analyzed in our study. Gastric cancer patients with ppGalNAc-T15 expression were relatively older than those without ppGalNAc-T15 expression. Some protein biomarkers are important in regulating metabolism, stress resistance and aging. It is likely that ppGalNAc-T15 may be an important element in the aging process through regulation of metabolism by reducing stress-related cell damage. This hypothesis, however, needs further experiments to elucidate the detailed mechanism.

ppGalNAc-T15 staining profile in gastric cancer samples was mostly cytoplasmic. Similarly, a study in 2016 reported the same pattern for ppGalNAc-T2.⁷ Normal gastric tissue had a higher ppGalNAc-T2 expression than the gastric cancer samples and was present to basal portion of gastric

glands. This is likely due to the homology between the two enzymes, which has been described by a previous study.⁹

It was observed that the expression of several ppGalNAcTs is increased in colon and other carcinomas.¹⁵ Shibao *et al.*¹⁶ reported that GalNAc-T3 expression was not associated with age, gender, tumor size, tumor location, or disease stage but was related to histologic differentiation and depth of invasion. Moreover, they showed that enzyme expression was related to enhance the likelihood of survival and as an independent prognostic factor. According to Brockhausen,¹⁵ the arrangement of biosynthetic enzymes in the *cis*-Golgi is an important factor controlling O-glycan biosynthesis and can vary between cell types. However, in cancer cells ppGalNAcTs could be present in medial Golgi and trans-Golgi compartments. Therefore, the altered Golgi localization of enzymes in cancer cells contribute to a disturbance in the assembly line and to the synthesis of truncated or aberrant glycans. However, the nuclear and membrane localization remains unknown.

It has been reported¹⁷ that Src protein, after stimulation with EGF (Epidermal Growth Factor) and PDGF (Platelet Derivate Growth Factor), regulates O-glycosylation through redistribution of the

GalNAc-Ts from the Golgi apparatus to the ER indicating that Src activates a COP-I-dependent trafficking event. This change increases the GalNAc addition on polypeptide acceptor and produces higher density of Tn antigen. Therefore, GalNAc-T relocation could favor shorter glycan chain lengths. This mechanism could affect mucin-type protein synthesis. Alteration of mucin expression is a hallmark of numerous epithelial cancers and has often been correlated to bad prognosis of the tumor. Muc2 expressed by goblet cells is the most abundant secreted gastrointestinal mucin, the protein component of the viscous-elastic mucus that protects this epithelium against mechanical and chemical aggressions. Yang *et al.*¹⁸ demonstrated that Muc2 deficiency results in the spontaneous development of tumors along the entire gastrointestinal tract through an inflammation related pathway. According to a previous study,¹⁹ chronic inflammatory status of the stomach play an important role in the initiation and progression of gastric cancer.

The expression of ppGalNAc-T15 in gastric lesions was identified an association between an enzyme staining with relatively elderly people and the type of surgical procedure. These conclusions may indicate that decreasing metabolism with age may alter ppGalNAc-T15 expression. The type of surgery to be performed on a gastric cancer patient is always a challenge to the surgeon and biomarkers that help in this decision are always welcome. This result indicates that ppGalNAc-T15 has relevant characteristics for these patients. However, further studies are needed to uncover the role of ppGalNAc-T15 in gastric cancer.

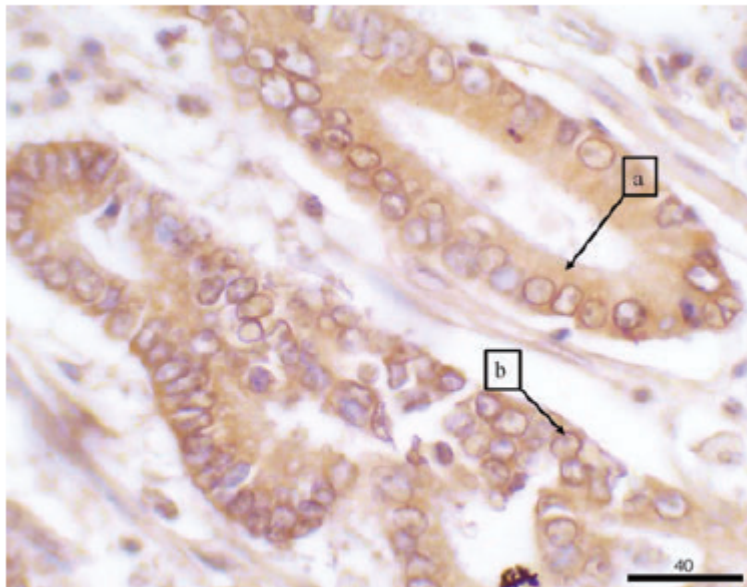


Figure 2. PpGalNAc-T15 subcellular staining in gastric cancer. a, cytoplasmic staining; b, perinuclear staining. Scale bar: 40 μ m.

References

1. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res* 2018;10:239-48.
2. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:700-13.
3. Hwang SW, Lee DH, Lee SH, Park YS, Hwang JH, Kim JW, et al. Preoperative staging of gastric cancer by endoscopic ultrasonography and multidetector-row computed tomography. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:512-8.
4. Mansure JJ, Nassim R, Kassouf W. Peroxisome proliferator-activated

- receptor gamma in bladder cancer: a promising therapeutic target. *Cancer Biol Ther* 2009;8:6-15.
5. Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. IARC Press; Lyon; 2000; 48 p.
 6. Duarte HO, Freitas D, Gomes C, Gomes J, Magalhães A, Reis CA. Mucin-type O-glycosylation in gastric carcinogenesis. *Biomolecules* 2016; 6:33.
 7. Liu S-Y, Shun C-T, Hung K-Y, Juan H-F, Hsu C-L, Huang M-C, et al. Mucin glycosylating enzyme GALNT2 suppresses malignancy in gastric adenocarcinoma by reducing MET phosphorylation. *Oncotarget* 2016;11251-62.
 8. Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, Tabak LA. Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* 2012;736-56.
 9. Cheng L, Tachibana K, Iwasaki H, Kameyama A, Zhang Y, Kubota T, et al. Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T15. *FEBS Lett* 2004;566:17-24.
 10. Human Protein Atlas. Available from: www.proteinatlas.org/ENSG00000131386-GALNT15/cell
 11. Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1993;72:3641-7.
 12. Silva-Filho AF, Sena WLB, Lima LRA, Carvalho LVN, Pereira MC, Santos LGS, et al. Glycobiology modifications in intratumoral hypoxia: The breathless side of glycans interaction. *Cell Physiol Biochem* 2017;41:1801-1829.
 13. Ju T, Wang Y, Aryal RP, Lehoux SD, Ding X, Kudelka MR, et al. Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers. *Proteomics Clin Appl* 2013;7:618-31.
 14. Itzkowitz SH, Bloom EJ, Kokal WA, Modin G, Hakomori S, Kim YS. Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer* 1990;66:1960-6.
 15. Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep* 2006;7:599-604.
 16. Shibao K, Izami H, Nakayama Y, Ohta R, Nagata N, Nomoto M et al. Expression of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine-polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in relation to differentiation and prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 2002;94:1939-46.
 17. Gill DJ, Chia J, Senewiratne J, Bard F. Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *J Cell Biol* 2010;189:843-58.
 18. Yang K, Popova NV, Yang WC, Lozonschi I, Tadesse S, Kent S, et al. Interaction of Muc2 and Apc on Wnt signaling and in intestinal tumorigenesis: potential role of chronic inflammation. *Cancer Res*. 2008;68:7313-22.
 19. Chung HW, Lim JB. Role of the tumor microenvironment in the pathogenesis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2014;20:1667-80.

may also suppress PC cell growth through inhibiting inflammatory signaling⁸ or downregulating the expression of proto-oncogenes.⁹ Pancreatic cancer cells overexpress enzymes involved in fatty acid and cholesterol synthesis,¹⁰ and metformin may affect de novo fatty acid synthesis via downregulation of specificity protein transcription factors.¹⁰

This study avoided selection bias by using a nationwide database covering more than 99% of the Taiwan's population. Potential bias related to self-reporting was much reduced by using medical records. Detection bias due to different socioeconomic status was less likely in the present study because the drug cost-sharing is low in the National Health Insurance health care system and can always be waived in patients with low income, in veterans, and in those who received prescription refills for chronic diseases.

Prevalent user bias, indication bias, and immortal time bias are major methodological limitations in pharmacoepidemiological studies, but these have been carefully addressed as discussed previously.^{6,7}

There are some limitations. First, the present study could not completely consider the effect of some important risk factors. For example, 5% to 10% of the cases may have familial aggregation, but we did not have information of family history or genetic markers for analyses. Second, because of the lack of actual measurement data of some confounders such as anthropometric factors, smoking, alcohol drinking, lifestyle, nutritional status, fat consumption, and fiber intake, it is also not possible to exclude their residual impacts.

In summary, this study supports a lower risk of PC associated with metformin use in Taiwanese patients with type 2 diabetes mellitus, especially when it has been used for more than 4 years. The potential usefulness of metformin on the prevention of PC in either the diabetes patients or in nondiabetes individuals is worthy of more extensive study.

The author declares no conflict of interest.

Chin-Hsiao Tseng, MD, PhD

Department of Internal Medicine
National Taiwan University College of Medicine
Taipei, Taiwan
cckts@ms6.hinet.net

REFERENCES

1. Dumstrei K, Chen H, Brenner H. A systematic review of serum autoantibodies as biomarkers

for pancreatic cancer detection. *Oncotarget*. 2016;7:11151–11164.

2. De Souza A, Khawaja KI, Masud F, et al. Metformin and pancreatic cancer: is there a role? *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77:235–242.
3. Andersson G, Wernnersten C, Borgquist S, et al. Pancreatic cancer risk in relation to sex, lifestyle factors, and pre-diagnostic anthropometry in the Malmö Diet and Cancer Study. *Biol Sex Differ*. 2016;7:66.
4. Wang Z, Lai ST, Xie L, et al. Metformin is associated with reduced risk of pancreatic cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;106:19–26.
5. Walker EJ, Ko AH, Holly EA, et al. Metformin use among type 2 diabetics and risk of pancreatic cancer in a clinic-based case-control study. *Int J Cancer*. 2015;136:E646–E653.
6. Tseng CH. Metformin is associated with a lower risk of colorectal cancer in Taiwanese patients with type 2 diabetes: a retrospective cohort analysis. *Diabetes Metab*. 2017;43:438–445.
7. Tseng CH. Metformin is associated with decreased skin cancer risk in Taiwanese patients with type 2 diabetes. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78:694–700.
8. Tan XL, Bhattacharyya KK, Dutta SK, et al. Metformin suppresses pancreatic tumor growth with inhibition of NF- κ B/STAT3 inflammatory signaling. *Pancreas*. 2015;44:636–647.
9. Yue W, Wang T, Zachariah E, et al. Transcriptomic analysis of pancreatic cancer cells in response to metformin and aspirin: an implication of synergy. *Sci Rep*. 2015;5:13390.
10. Cohen R, Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, et al. Targeting cancer cell metabolism in pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2015;6:16832–16847.

Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Have High Serum Galectin-9 Levels A Sweet Molecule to Keep an Eye On

To the Editor:

Prognosis for pancreatic adenocarcinoma (PADC) tends to be poor because of its delayed diagnosis and aggressive behavior.¹ Whereas some solid tumors such as breast cancer have survival rates of 90%, PADC has rising rates of mortality and a 5-year survival rate approximately 9%. Therefore, diagnosing PADC early is the most important factor of improving its prognosis.²

As part of the lectin family, galectins perform their primary biological functions

by interacting with β -galactosides carbohydrate structures in proteins, peptides, and lipids.³ Galectin-9 (Gal-9) is a tandem-repeat type galectin with two carbohydrate-recognition domains. Studies have revealed that Gal-9 modulates various biological functions, including tumor cell apoptosis, aggregation, and adhesion, and participates in the progression of different tumors. By extension, altered galectin expression has diagnostic or prognostic value in different types of cancer, including gastric and colon cancers.⁴

In this article, we present an evaluation of Gal-9 expression in the serum and tissue of patients diagnosed with PADC.

MATERIALS AND METHODS

After the approval of the ethics committee, blood samples were collected from 34 patients with confirmed diagnoses of PADC. Galectin-9 serum levels were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay sandwich following the supplier's instructions (R & D Systems, Minneapolis, Minn). None of the patients had received any anticancer therapy before sample collection. Formalin-fixed paraffin-embedded PADC specimens were also retrieved from the archives of the Department of Pathology at the Hospital of Cancer in Pernambuco, Brazil.

Tissue Gal-9 expression was evaluated by immunohistochemistry. Deparaffinized sections were incubated with primary antibody (rabbit polyclonal anti-Gal-9 (1:50) for 2 hours. Gastric tissue was used as a positive control, and in the negative control, the primary antibody was replaced with nonspecific IgG in a PBS-BSA 1% solution. Each section image was captured using an Eclipse Ts2 microscope (Nikon, Melville, NY).

RESULTS

Patients with PADC (n = 34) and healthy controls (n = 66) were paired by sex (P = 0.11130) and age (P = 0.1205). Females represented 71% of the PADC group and 81% of control group. The median age of the control group and PADC group were 62 and 64 years, respectively. All 34 serum samples from patients with PADC were Gal-9 positive and present a significantly higher level (median, 6862 [interquartile range, 4457–8647] pg/mL) than that of controls (median, 46.88 [interquartile range, 46.88–46.88] pg/mL), as shown in Figure 1 (left panel). To investigate possible sources of Gal-9 production, we performed an immunostaining reaction using formalin-fixed paraffin-embedded samples of PADC. Histologically, Gal-9 staining was positive in all cases analyzed except one. Neoplastic cells presented homogeneous cytoplasmic staining

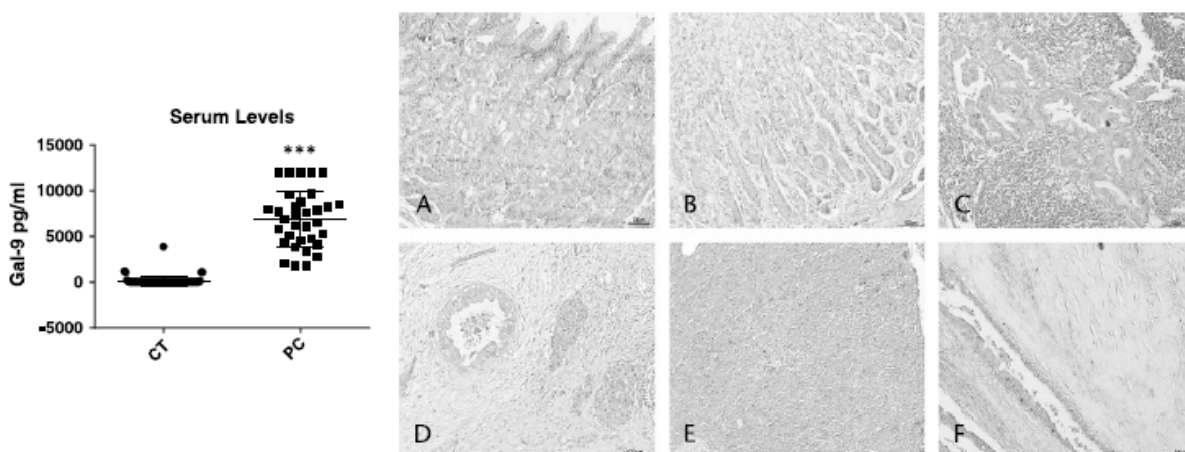


FIGURE 1. Left panel, Serum Gal-9 levels of healthy controls and patients diagnosed with pancreatic ductal adenocarcinoma (***) $P < 0.0001$. CT indicates control sera of healthy controls; PC, sera of patients with pancreatic cancer. Right panel, Immunohistochemical evaluation of Gal-9 in PDAC samples. A, Gastric tissue as a positive control (B) negative control. Gal-9 staining was observed mainly in cytoplasm but in membrane too (C, D). Gal-9 was also found in the stroma (E, F).

and the tumor showed a positive stroma. Gal-9 was present in endothelial structures, blood vessels, and inflammatory cells (Fig. 1, right panel).

DISCUSSION

To our knowledge, our evaluation of Gal-9 serum levels in PDAC patients is the first of its kind. According to our data, Gal-9 presents a remarkable expression in both serum and tissue. To date, the role of Gal-9 in PDAC remains incompletely understood, and literature has reported dual functions. In PDAC, Gal-9 overexpression is associated with a capacity to promote a tolerogenic macrophage that programs adaptive immune suppression and binding to dectin-1 receptors in tumor macrophages.⁵ However, Gal-9 is also associated with antitumor effects by suppressing cell proliferation and inducing intrinsic apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways.⁶

CONCLUSIONS

We have detected a high expression of Gal-9 in PDAC serum and tissue analyses suggest that Gal-9 overexpression in PDAC derives from different sources in tumor microenvironment.

This study was supported by Decit/SCITIE/MS, CNPq, SES/PE, and FACEPE.

The authors declare no conflict of interest.

Lucas B. Tavares, MSc
 Antônio F. Silva-Filho, MSc
 Bioscience Center (CB)
 Federal University of Pernambuco (UFPE)
 Recife, Brazil

Mario R. Martins, MD
 Hospital do Cancer de Pernambuco (HCP)
 Recife, Brazil

Kamila M. Vilar, MSc
 Bioscience Center (CB)
 Federal University of Pernambuco (UFPE)
 Recife, Brazil

Maira G. R. Pitta, MSc, PhD
 Moacyr J. B. M. Rêgo, MSc, PhD
 Biochemistry Department
 Bioscience Center (CB)
 Federal University of Pernambuco (UFPE)
 Recife, Brazil
 moacyr.rego@gmail.com

REFERENCES

- Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22:9694–9705.
- Kenner BJ, Go VLW, Chari ST, et al. Early detection of pancreatic cancer: the role of industry in the development of biomarkers. *Pancreas.* 2017;46:1238–1241.
- Punt S, Thijssen VL, Vrolijk J, et al. Galectin-1, -3 and -9 expression and clinical significance in squamous cervical cancer. *PLoS One.* 2015; 10:e0129119.
- Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, et al. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: a systematic review. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1855:235–247.
- Okura R, Fujihara S, Iwama H, et al. MicroRNA profiles during galectin-9-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Oncol Lett.* 2018;15: 407–414.
- Daley D, Mani VR, Mohan N, et al. Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral

immune tolerance. *Nat Med.* 2017;23: 556–567.

Stabilized Incidence of Pediatric Acute Pancreatitis

To the Editor:

The rise in acute pancreatitis (AP) in the pediatric population has drawn attention in recent decades. Numerous studies of adults have shown that the incidence of AP rose steadily over the last 30 to 40 years in the United States and Europe.^{1,2} The first report of an increasing number of AP cases in children came from a single institution, the Children's Medical Center of Dallas, in the 1990s.³ The incidence of first diagnosed AP cases at the Children's Hospital of Pittsburgh Medical Center increased from about 2/100,000 in 1993 to 13/100,000 in 2004.⁴ At the Royal Children's Hospital in Melbourne, Australia, there was an increase in the number of new cases and the estimated incidence of AP rose from about 2/100,000 to 3.5/100,000 between 1993 and 2002.⁵ Overall, it is unclear whether the rise in diagnosed cases was a result of increasing incidence or more awareness and testing. Little is known about the incidence and epidemiological trends of pediatric AP in the last decade. The aim of our study was to estimate incidence and prevalence rates of AP in children between 2010 and 2015.

We examined data from electronic medical records of patients admitted to Cincinnati Children's Hospital Medical Center (CCHMC) between January 2010 and December 2015. All cases with AP as either primary or secondary diagnoses were

Anexo 1 - Pareceres consubstanciados - do Comitê de Ética em Pesquisa - CAEE

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARCINOMA GÁSTRICO: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS CIRCULANTES COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO PRECOCE E TERAPÊUTICA

Pesquisador: MARIO RINO MARTINS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 39976214.9.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 972.109

Data da Relatoria: 10/03/2015

Apresentação do Projeto:

O câncer gástrico (CG) é o quarto câncer mais comum no mundo, com um total de 989.600 novos casos e 738 mil mortes estimadas em 2008. No Brasil são estimados 20.390 novos casos e 13.328 mortes para o ano de 2014. Ainda hoje, permanece como desafio a caracterização de biomarcadores sensíveis, específicos e pouco invasivos que possam detectar o câncer de estômago em estágios iniciais, avaliar o prognóstico e auxiliar no monitoramento da resposta ao tratamento. Os micro-RNAs (miRNAs) são moléculas pequenas de RNA cuja principal função é a regulação pós-transcricional da expressão gênica. Estas moléculas estão envolvidas na maioria dos processos biológicos como: regulação do ciclo celular, crescimento celular, apoptose, diferenciação celular. No contexto de câncer gástrico (CG), o número de publicações que investigam a relação entre miRNAs e CG vem aumentando a cada ano. Alguns autores relataram diferentes expressões de miRNAs em tecido tumoral e circulante em portadores de neoplasia gástrica, destacando o potencial de miRNAs para o diagnóstico da doença. Além disso, existe também uma relação da expressão de miRNAs e a progressão da neoplasia, além das metástases no CG, sugerindo que alguns miRNAs podem ser utilizados como ferramentas de prognóstico e de monitorização. A detecção de miRNA no sangue periférico pode ser uma nova ferramenta para monitorar as

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)217-8197

Fax: (813)217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

Continuação do Parecer: 972.109

células tumorais circulantes em pacientes com tumores gástricos. Além disso, o miRNA circulantes podem ser um marcador promissor, pouco invasivo, para rastreamento patológico, marcador de progressão do CG, prever o prognóstico e acompanhamento dos efeitos terapêuticos dos tratamentos sistêmicos em câncer gástrico. Portanto, a identificação de novos biomarcadores para o diagnóstico precoce do CG é um grande desafio e motivo de investigação em diversos centros de pesquisa. Os miRNAs podem servir de biomarcadores, tanto para diagnóstico precoce quanto como preditor de evolução clínica e de resposta aos tratamentos. Portanto, o projeto em questão tem como objetivo principal, a investigação da expressão de miRNA e da expressão de TLR8 nos tecidos tumorais e de miRNA no sangue periférico de pacientes com GC.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão de microRNAs em pacientes com adenocarcinomas gástricos

Objetivo Secundário:

Em pacientes com adenocarcinoma gástrico: • Descrever características demográficas, clínicas e terapêuticas; • Determinar a expressão de MiRNA (MiR-375, MiR-421, MiR-10a, MiR-221, MiR-212, MiR-195, MiR-335, MiR-196a, MiR-146a, MiR-204, MiR-21, MiR-29a, MiR-15b, MiR-16, MiR-106, MiR-378) e circulantes e no tecido tumoral; • Realizar a marcação dos receptores de TLR8 nas células do microambiente tumoral; • Descrever os MiRNAs mais frequentes no câncer gástrico; • Correlacionar a expressão dos microRNAs com a classificação histológica de Lauren, com o estadiamento clínico radiológico (TNM/UICC) e histopatológico cirúrgico, e com o desfecho clínico (resposta a tratamento).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos para os sujeitos são inerentes ao tipo de tratamento e não a pesquisa em questão, embora os benefícios diretos para os sujeitos sejam inexistentes, há preocupação em informá-los acerca destas limitações. Os riscos para a comunidade são mínimos.

Benefícios:

O potencial benefício advindo das informações geradas na pesquisa pode contribuir para o manejo de casos semelhantes no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem um objetivo válido e atual

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)217-8197

Fax: (813)217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 972.109

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

sugerimos retirar do TCLE do paciente controle:

- "Responsável Legal" já que a pesquisa será realizada em adultos;
- "Coleta de sangue em paciente com câncer gástrico"

Recomendações:

Sugerimos retirar do TCLE do paciente controle:

- "Responsável Legal" já que a pesquisa será realizada em adultos;
- "Coleta de sangue em paciente com câncer gástrico"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

todas as recomendações sugeridas acima foram realizadas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RECIFE, 04 de Março de 2015

Assinado por:
ISABEL CRISTINA LEAL
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)217-8197

Fax: (813)217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL DE AGREGADO PLAQUETÁRIO CIRCULANTE E DA EXPRESSÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO CÂNCER GÁSTRICO

Pesquisador: MARIO RINO MARTINS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 66228917.8.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A CIENCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.126.881

Apresentação do Projeto:

O prognóstico dos portadores de câncer gástrico tem melhorado pouco nas últimas décadas e o melhor entendimento das interações imunes no microambiente tumoral podem revelar novas possibilidades de tratamento. O ambiente tumoral é composto por células do sistema imune, que refletem a tentativa desse sistema em promover uma resposta antitumoral. Complexas interações entre células e mediadores imunes no microambiente tecidual regulam o crescimento de tumores, progressão, metástase e angiogênese. O entendimento das alterações da imunidade na população com câncer gástrico permitirá a intervenção terapêutica para melhorar a resposta à cirurgia e quimioterapia. **Objetivo:** avaliar o perfil de agregado plaquetário circulante e da expressão de OX40, CD40L e 4-1BB em pacientes com neoplasia gástrica. **Métodos:** Será realizado um estudo de coorte transversal, translacional e prospectivo com grupo de comparação interna, envolvendo 60 portadores de câncer gástrico e 30 saudáveis. Será realizada a análise dos valores percentuais de linfócitos T e B, de agregado de plaquetas ativadas aos linfócitos, monócitos e neutrófilos no sangue periférico. Níveis percentuais de expressão de OX40 em células T, B, neutrófilo e plaquetas por citometria de fluxo e a dosagem no plasma de s4-1BB e sCD40L através de ELISA. Para análise estatística, será utilizado o teste de Mann Withney através do programa Graphpad v6,0.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 2.126.881

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o perfil de agregado plaquetário circulante e da expressão de mediadores inflamatórios com câncer gástrico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o Pesquisador:

Riscos

Ao participar dessa pesquisa os riscos dos voluntários serão mínimos. O desconforto poderá ser sentido durante a punção venosa para coleta do sangue. Os riscos, se ocorrerem serão mínimos por se tratar de uma punção venosa no antebraço. Reações locais poderão ocorrer, tais como: hematomas e muito raramente inflamação na veia puncionada. Nestes casos, os voluntários da pesquisa serão devidamente orientados por profissionais qualificados da Instituição tanto no ambulatório de cirurgia oncológica ou no Serviço de emergência do HCP em caso de necessidade.

Benefícios

Verifica-se a importância de investigar a associação entre as características de resposta imune e os padrões de resposta clínica em pacientes com neoplasia gástrica. Isto permitirá o desenvolvimento de ferramentas prognósticas e possíveis vias de tratamento para neoplasia gástrica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa que visa avaliar o perfil de agregado plaquetário circulante e da expressão de mediadores inflamatórios com câncer gástrico.

População do estudo

O estudo compreenderá um total de 60 pacientes, entre 18 e 80 anos de idade, com diagnóstico clínico, laboratorial e estadiamento para carcinoma gástrico (CG), admitidos para tratamento no serviço de cirurgia oncológica do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP).

Controles saudáveis (grupo de comparação): Os indivíduos controles serão 30 adultos saudáveis (de 18 a 80 anos de vida) sem passado de neoplasia, sem comorbidades.

O estudo será realizado com os pacientes atendidos no ambulatório de cirurgia oncológica do Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP).

O período de estudo será de Junho de 2017 a Dezembro de 2018. Neste período serão realizados: coleta de sangue periférico, testes laboratoriais com análises dos dados, análise estatística e elaboração dos manuscritos para publicação científica.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

Continuação do Parecer: 2.126.881

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos: documento devidamente preenchido datado e assinado
- 2) Projeto de Pesquisa - adequado
- 3) Orçamento financeiro e fonte de financiamento: adequado
- 4) Termos de consentimento livre e esclarecido - adequado
- 5) carta de anuência: documento devidamente preenchido datado e assinado
- 6) Termo de autorização do setor: documento devidamente preenchido datado e assinado
- 7) Termo de confidencialidade: adequado
- 8) Instrumento de coleta de dados, questionário, formulário, etc: adequado

Recomendações:

NENHUMA

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

NENHUMA

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO APROVADO - APÓS ANÁLISE de PENDÊNCIA PELOS RELATORES

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil.

Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS N° 466/12).

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 2.126.881

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS N° 466/12).

O CEP/HCP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS N° 466/12). É papel do pesquisador assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_866273.pdf	23/05/2017 19:00:40		Aceito
Orçamento	ORCAMENTOmaio2017.pdf	23/05/2017 18:58:08	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Outros	CEPcorrecoesmaio2017carta.pdf	23/05/2017 18:57:02	MARIO RINO MARTINS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpacienteprojetoagregadoplaquetariomaio2017.pdf	23/05/2017 18:55:14	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	AVALIAcaoODOAGREGADOPLAQUETA RIONOCaNCERGaSTRICOREvisaomaio2017.pdf	23/05/2017 18:53:07	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Outros	Cartaderespostaspendenciasabril.	26/04/2017	MARIO RINO	Aceito

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Parecer: 2.126.881

Outros	pdf	15:12:52	MARTINS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECONTROLE_plaquetasrevisaoabril.pdf	26/04/2017 15:08:29	MARIO RINO MARTINS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMOREGISTROCANCERassinadoii.pdf	21/03/2017 23:41:34	MARIO RINO MARTINS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODOSAMEassinadoII.pdf	21/03/2017 23:41:11	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Outros	cartaanuenciajoaoalberto.pdf	21/03/2017 23:38:42	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Outros	cartadrpeixoto.pdf	21/03/2017 23:38:00	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostocomassinaturas.pdf	21/03/2017 23:35:21	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Outros	termodeconfidencialidadeversaolV.pdf	20/03/2017 18:09:48	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	20/03/2017 17:39:21	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Outros	QUESTIONARIODEPESQUISA.pdf	20/03/2017 17:26:54	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Declaração do Patrocinador	Termodeoutorgapesquisafacepe.pdf	20/03/2017 17:21:34	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Outros	TermoAutorizacao_DraLeuridan.pdf	20/03/2017 17:17:49	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Outros	TermodoServicoassinado.pdf	05/03/2017 11:47:57	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartadeanuencialeuridan.pdf	05/03/2017 11:20:30	MARIO RINO MARTINS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia_Joao_alberto.docx	05/03/2017 11:19:49	MARIO RINO MARTINS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 2.126.881

RECIFE, 20 de Junho de 2017

Assinado por:
ISABEL CRISTINA LEAL
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

Anexo 2 - Declaração de revisão de Língua Portuguesa



DECLARAÇÃO DE REVISÃO

Declaro, para os devidos fins, que foi realizada a revisão de Língua Portuguesa na tese “Análise da expressão de microRNA e candidatos a alvo terapêutico em carcinomas gástricos”, de autoria de Mário Rino.

Por ser verdade, firmo a presente.

Belo Horizonte, 14 de maio de 2019.

Mariana Clark Peres Rabello

Oficina Só Português - Mariana Clark Peres Rabello

CNPJ 22.157.201/0001-30

CEP 30310-480 - BH - MG.

(31) 2511-9910 / 9 9208-8391 / 9 9619-0099

OficinaSoPortugues@gmail.com - www.oficinasoportugues.com.br

Anexo 3 - Certificado de revisão de Língua Inglesa (artigo 1).

CERTIFICATE OF ENGLISH EDITING

This document certifies that the paper listed below has been edited to ensure that the language is clear and free of errors. The logical presentation of ideas and the structure of the paper were also checked during the editing process. The edit was performed by professional editors at Editage, a division of Cactus Communications. The intent of the author's message was not altered in any way during the editing process. The quality of the edit has been guaranteed, with the assumption that our suggested changes have been accepted and have not been further altered without the knowledge of our editors.

TITLE OF THE PAPER

MicroRNA expression profiling provides novel insights into immune-related pathways involved in gastric cancer

AUTHORS

Mario Rino Martins

JOB CODE

IOMAR_1_7



Signature

Vikas Narang,
Senior Vice President,
Operations-Author Services, Editage

Date of Issue
May 22, 2019

Editage, a brand of Cactus Communications, offers professional English language editing and publication support services to authors engaged in over 500 areas of research. Through its community of experienced editors, which includes doctors, engineers, published scientists, and researchers with peer review experience, Editage has successfully helped authors get published in internationally reputed journals. Authors who work with Editage are guaranteed excellent language quality and timely delivery.



CACTUS.

Contact Editage

Worldwide
request@editage.com
+1 877-334-8243
www.editage.com

Japan
submissions@editage.com
+81 03-6868-3348
www.editage.jp

Korea
submit-
korea@editage.com
1544-9241
www.editage.co.kr

China
fabiao@editage.cn
400-005-6055
www.editage.cn

Brazil
contato@editage.com
0800-892-20-97
www.editage.com.br

Taiwan
submitjobs@editage.com
02 2657 0306
www.editage.com.tw