

COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL1B, IL6, IL8 E CCL2 ENTRE INDIVÍDUOS TABAGISTAS E PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS

ANA CAROLINA FERREIRA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Fábio José Haddad

Co-Orientadora: Dra. Ludmilla T. D. Chinen

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Ferreira, Ana Carolina

Comparação dos níveis séricos de IL1B, IL6, IL8 e CCL2 entre indivíduos tabagistas e portadores de câncer de pulmão de células não-pequenas / Ana Carolina Ferreira – São Paulo, 2012.

55p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fábio José Haddad

Descritores: 1. CÂNCER PULMONAR DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS
2. INFLAMAÇÃO. 3. TABACO. 4. CITOCINAS.

**Nada disso seria possível sem o amor
e o incentivo dos meus pais...**

**"A vida é breve, mas cabe nela muito
mais do que somos capazes de viver"**

José Saramago

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos pacientes, que em um momento tão difícil de suas vidas generosamente aceitaram participar desta pesquisa. Agradeço da mesma forma a todos os outros voluntários.

Ao Dr. Fábio José Haddad pela gentileza e disponibilidade em me aceitar como sua aluna.

A Dra Ludmilla Thomé Domingos Chinen, por me introduzir no mundo ELISA. Agradeço também por todas as risadas e desabafos durante os imunoensaios e análise de dados.

Ao Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima, por seu entusiasmo pela pesquisa e imensurável colaboração.

As amigas de hoje e sempre: Ana Lúcia Teodoro, Luciane Nogueira, Bárbara Cruz, Dani Moidano, Sônia Masson e Magda Silva, inestimáveis em todos os momentos.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis, que gentilmente cedeu seu laboratório de pesquisa para o aprendizado inicial do ELISA.

Aos médicos e residentes do Departamento de Cirurgia do Tórax, em especial ao Dr. Jefferson Luiz Gross, exemplo de caráter e profissionalismo, pelos conselhos e correções do projeto.

A toda equipe de Hematologia e Banco de Sangue, pela inestimável ajuda no início das coletas.

Aos médicos, residentes, enfermeiros e escriturários da Quimioterapia e do Departamento de Oncologia Clínica, pela cooperação no recrutamento dos pacientes e ajuda nas coletas de dados.

Aos médicos, enfermeiros e funcionários do Centro Cirúrgico e da Congelação, pela ajuda com a coleta e armazenamento das amostras.

A secretaria da Pós-Graduação, por ser uma equipe comprometida com a pesquisa e sempre disposta a ajudar e resolver os "esquecimentos".

Aos funcionários da Biblioteca pela competência, presteza e disponibilidade.

A todos os funcionários e pós-graduandos do CIPE, onde tive a sorte e a oportunidade de realizar os experimentos.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por seu comprometimento e empenho pela excelência da Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente.

Ao auxílio FAPESP, imprescindível para a realização desta pesquisa.

A todos os funcionários e colaboradores do Hospital A. C. Camargo.

E finalmente, mas não menos importante, agradeço minha linda e sapeca Sarah, por me mostrar que a maternidade é uma dádiva, mesmo em dias tão difíceis. Agradeço também meu genial e amado esposo, por todo apoio e incentivo.

RESUMO

Ferreira AC. **Comparação dos níveis séricos de IL1B, IL6, IL8 e CCL2 entre indivíduos tabagistas e portadores de câncer de pulmão de células não-pequenas.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Os tabagistas têm mais chances de desenvolver câncer de pulmão, considerado o segundo tumor mais incidente e a primeira causa de morte por câncer. O câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP) é o tipo histológico mais comum e a inflamação está relacionada a ele de várias maneiras. O uso de tabaco afeta a ação de mediadores anti-inflamatórios e imunossupressores, induzindo proliferação celular e alterações no DNA. Também interfere na resposta imunológica global do indivíduo, modificando quimicamente componentes de diversas vias de sinalização. Estudos detectaram e identificaram os principais mediadores desse complexo processo, dentre estes estão as interleucinas pró-inflamatórias IL6 e IL1B, e as quimiocinas CCL2 (MCP1) e CXCL8 (IL8).

Objetivo: Avaliar o nível circulante de IL6, IL8, IL1B e CCL2 no soro de indivíduos não-tabagistas, ex-tabagistas, tabagistas atuais e portadores de câncer de pulmão inicial e avançado (tabagistas e não-tabagistas), e correlacioná-los com a carga tabágica. **Casuística e Métodos:** Estudo transversal, para avaliar os mediadores supracitados em indivíduos maiores de 18 anos. Separamos e armazenamos o soro obtido de 10,0mL de sangue periférico de cada indivíduo, após coagulação espontânea do sangue e centrifugação sob refrigeração. Após quantificação das proteínas totais, os mediadores foram quantificados por ELISA sanduíche. As concentrações foram expressas em pg/ml. Dados clínicos foram coletados em ficha própria. Empregamos estatística descritiva e teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Dunn para comparar as medianas das concentrações entre os grupos. Teste de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação entre

carga tabágica e o nível dos mediadores. Consideramos diferenças significativas quando $p < 0,05$. **Resultados:** Obtivemos amostras de 165 indivíduos. A citocina IL6 não mostrou associação com os grupos, mas sim com a presença de câncer de pulmão. A citocina IL1B também não apresentou diferença entre os grupos, porém esteve associada com ausência de metástase linfonodal. A quimiocina IL8 não mostrou nenhuma associação significativa. Níveis mais elevados de CCL2 foram encontrados entre portadores de tumores avançados em relação aos controles e aos ex-tabagistas. Houve associação desta quimiocina com a presença de câncer, com estádios avançados e com a presença de metástases. Encontramos correlação positiva das citocinas entre si. Não verificamos correlação entre os níveis das citocinas e a carga tabágica. **Conclusão:** Níveis mais elevados CCL2 foram encontrados entre portadores de tumores avançados em relação a não-tabagistas e ex-tabagistas, e estão associados com tumores avançados e presença de metastáses. Os níveis de IL1B, IL6, IL8 e CCL2 apresentam correlação entre si, mas não com carga tabágica.

SUMMARY

Ferreira AC. [IL1B, IL8, IL6 and CCL2 serum level comparison in smokers and non-small cell lung cancer patients]. São Paulo, 2012. [Dissertação de Mestrado Fundação Antônio Prudente].

Background: Tobacco smokers have a higher probability of developing lung cancer, the second most incident tumor and the leading cause of cancer death worldwide. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common histologic subgroup and is related to inflammation in many ways. The chronic exposition to tobacco smoke modifies the activity of anti-inflammatory and immunosuppressive mediators, inducing cellular proliferation and DNA damage. It does also interfere with the systemic immune response, chemically modifying components of diverse signaling pathways. Different investigators identified putative mediators in this complex process, among them the pro-inflammatory interleukins IL6 and IL1B, and the chemokines CCL2 (MCP1) and CXCL8 (IL8). **Objective:** To measure the serum level of IL6, IL8, IL1 and CCL2 among never-smokers, former-smokers, smokers and lung cancer patients (early and advanced disease in smokers and non-smokers), and correlate it with tobacco consumption history. **Materials and methods:** This a transversal study which evaluated the aforementioned mediators in individuals older or equal to 18 years-old. Serum was separated from 10,0ml of peripheral blood, collected from each participant, after spontaneous coagulation and centrifugation under refrigeration. After total protein quantification, the inflammatory mediators were measured using a commercially available ELISA kit. Concentration was expressed in pg/ml. Clinical data were registered in appropriate forms. Descriptive statistics and Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test, were used to compare median concentration values among the different subgroups. Spearman method was employed to correlate smoking history and cytokine levels. The type I error was set at 5%. **Results:** A total of 165 individuals were enrolled. IL6 level

was not significantly different among subgroups, but was associated with having lung cancer. IL1B did not show any significant difference among the subgroups, nevertheless it was associated with not having lymph node metastasis. IL8 was not associated with any other variable. CCL2 levels were higher among advanced stage patients when compared to healthy never-smokers and former smokers. It was also associated with having cancer, advanced disease stage and having metastasis. No correlation between cytokine/chemokine and tobacco consumption history was observed.

Conclusion: IL6, IL1B and IL8 levels were not significantly different among study subgroups. IL6 was associated with having cancer, and IL1B with lymph node metastasis. Higher CCL2 levels were observed among advanced stage patients in comparison to never smokers and former smokers. Besides, it was also associated with having cancer, advanced disease and metastasis. The serum level of the mediators correlated among them. They did not correlate with tobacco consumption history, on the other hand.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Comparação dos níveis de IL6 entre os grupos analisados.....	27
Figura 2	Comparação dos níveis de IL1B entre os grupos analisados...	28
Figura 3	Comparação dos níveis de IL8 entre os grupos analisados.....	29
Figura 4	Comparação dos níveis de CCL2 entre os grupos analisados..	30
Figura 5	Comparação dos níveis de CCL2 entre os grupos analisados..	31
Figura 6	Curva de Sobrevida Livre de Progressão.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados epidemiológicos dos indivíduos da amostra.....	22
Tabela 2	Dados referentes ao estadiamento e tamanho (T) dos tumores.....	23
Tabela 3	Dados referentes ao comprometimento linfonodal (N), presença de metástases (M) e carga tabágica.....	24
Tabela 4	Dados referentes à carga tabágica entre os grupos de indivíduos tabagistas.....	24
Tabela 5	Dados referentes à correlação das concentrações das citocinas.....	32
Tabela 6	Dados referentes à associação entre as variáveis clínico-patológicas e as medianas das concentrações de IL1B, IL8, IL6 e CCL2.....	34
Tabela 7	Dados referentes à correlação entre as variáveis relacionadas à carga tabágica e as medianas das concentrações de IL1B, IL6, IL8 e CCL2.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAL	Lavado brônquico alveolar
CCL2	Quimiocina tipo CC 2
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CPCNP	Câncer de pulmão de células não-pequenas
CPCP	Câncer de pulmão de células pequenas
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GAT	Grupo de apoio ao tabagista
IL1B	Interleucina 1B
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KDa	Kilodáton
NFKB	Fator nuclear kappa B
PAMP	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TAM	Macrófagos associados ao tumor
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TNFA	Fator de necrose tumoral alfa

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Tabagismo.....	1
1.2	Câncer de pulmão e resposta inflamatória	3
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo primário	11
2.2	Objetivo secundário.....	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1	Desenho do Estudo e Cálculo de Amostra.....	12
3.2	Elegibilidade	14
3.2.1	Crítérios de Inclusão	14
3.2.2	Crítérios de Exclusão.....	15
3.3	Coleta de Sangue	15
3.4	ELISA	17
3.5	Análise Estatística	17
3.6	Financiamento e Infra-Estrutura	18
4	RESULTADOS.....	19
4.1	Casuística e Métodos	19
4.1.1	Obtenção das amostras de sangue.....	19
4.1.2	Dados Clínicos	20
4.1.3	Quantificação de Citocinas	25
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	47
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de coleta de dados

Anexo 2 Termo de consentimento livre e esclarecido

Anexo 3 Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do
Hospital A.C. Camargo

1 INTRODUÇÃO

1.1 TABAGISMO

O consumo do tabaco, principalmente o seu uso prolongado, por milhões de pessoas em todo mundo mantém as estatísticas alarmantes em relação às suas consequências para a saúde. Os tabagistas, que utilizam o cigarro como o principal produto do tabaco, têm mais chances de desenvolver algum tipo de câncer comparado com não-fumantes, assim como estão predispostos a outras doenças crônicas que acometem principalmente o pulmão, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Os fumantes também têm mais que o dobro de chance de apresentar doenças coronarianas e acidentes vasculares cerebrais (WALSER et al. 2008).

O tabagismo permanece mais prevalente entre o sexo masculino, particularmente em países como a China, mas com tendência de diminuição do uso entre aqueles que habitam os países chamados industrializados, como Reino Unido e Estados Unidos. Em contrapartida, os índices entre as mulheres têm aumentado significativamente, principalmente em países asiáticos e do leste europeu, nos quais anualmente, morrem 300 mil mulheres em consequência deste fato. Para os países em desenvolvimento, no ano de 2020, calcula-se que haverá 10 milhões de mortes causados pelo tabaco (MACKAY e AMOS 2003; World Health Organization-WHO 2012).

No Brasil, em estudo retrospectivo, verificou-se que, em 16 capitais, aproximadamente 13% da população foi a óbito em decorrência do tabagismo e a diferença de gênero seguiu a tendência mundial, morrendo mais homens comparados às mulheres (CORRÊA et al. 2009). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2008, 17,2% da população brasileira, acima dos 15 anos, fumava derivados do tabaco, sendo que o percentual destes usuários era maior entre homens, com idade entre 45 a 64 anos. A maior concentração de fumantes está na região Sul do Brasil e entre moradores da zona rural. A escolaridade e a renda *per capita* mostram-se como fatores impactantes no aumento da proporção de tabagistas.

Como resultado da queima do tabaco é liberada uma grande quantidade de produtos químicos, também provenientes das matérias primas adicionadas na sua fabricação. Dentre elas a nicotina, o monóxido de carbono e os componentes oxidantes têm efeito sobre mediadores anti-inflamatórios e imunossupressores, além de induzirem proliferação celular e alterações no DNA celular. Além disso, o fumo também interfere na resposta imunológica global do indivíduo, modificando quimicamente vias de sinalização e componentes da matriz extracelular, através de acetilação, nitrosilação, carbonilação e oxidação, o que pode ter algum efeito na sobrevivência, ativação e diferenciação celular (LEE et al. 2009; STÄMPFLI e ANDERSON 2009).

Na Europa e EUA, o tabagismo responde por 90% dos casos de câncer de pulmão entre homens e de 75-85% dos casos entre mulheres. O

consumo de cigarro ou outros derivados do tabaco aumenta em cerca de 30 vezes o risco de se desenvolver câncer de pulmão (SUBRAMANIAN e GOVINDAN 2007; MOLINA et al. 2008). Este risco é proporcional ao tempo de uso do tabaco e ao número de cigarros fumados por dia, calculado como anos-maço (PETO et al. 2000; ALBERG e SAMET 2003).

Pesquisas mostram que a probabilidade de se desenvolver câncer de pulmão é menor entre os indivíduos que param de fumar comparados com aqueles que continuam com o hábito, assim como o período de abstinência influencia esta probabilidade. Porém mesmo que o tempo de abstinência seja longo, comparado com os não-fumantes, estes indivíduos ainda mantêm alto o risco, principalmente se o consumo maços/ano for elevado. Após 5 anos da interrupção do uso do tabaco, já se observa benefícios para a saúde, havendo melhora da função pulmonar (ALBERG e SAMET 2003; GUO et al. 2009).

1.2 CÂNCER DE PULMÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Atualmente, o câncer de pulmão é um importante problema de saúde pública, resultado de fatores genéticos e ambientais e ocorre, predominantemente, em pessoas com história de uso prolongado de tabaco (WOENCKHAUS et al. 2006). Estatísticas colocam o câncer de pulmão como a primeira causa de morte por câncer, independente do gênero (JEMAL et al. 2011).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer - INCA, continua sendo o segundo tumor mais incidente entre homens e o quinto entre mulheres (Ministério da Saúde 2011).

O câncer de pulmão é classificado em dois grandes grupos, divididos através de achados histopatológicos, sendo um dos grupos o câncer de pulmão de células pequenas (CPCP) e o outro o câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP). Os CPCNPs são representados na sua grande maioria por dois grandes subgrupos: carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas. Aproximadamente 85% dos tumores pulmonares diagnosticados são carcinomas de células não-pequenas, sendo o adenocarcinoma mais incidente e fortemente relacionado ao uso contínuo do tabaco (WOENCKHAUS et al. 2006; MOLINA et al. 2008; RISCH e PLASS 2008; CHANSKY et al. 2009).

Várias evidências sugerem que a exposição ao tabaco desencadeia respostas inflamatórias no pulmão que podem levar ao desenvolvimento de doenças pulmonares crônicas irreversíveis e câncer. Nos indivíduos portadores de DPOC, a inflamação pulmonar causada e intensificada pelo tabaco pode persistir ou progredir mesmo quando há interrupção do uso. Estudos sugerem que o pulmão, que apresenta inflamação crônica e exacerbada, tem as chances de carcinogênese aumentadas, devido principalmente a alterações do mecanismo de resposta imunológica (DASARI et al. 2006; LEE et al. 2009; QU et al. 2009b).

Apesar do envolvimento de muitos fatores que promovem eventos mutacionais e moleculares no epitélio pulmonar, a inflamação parece

desempenhar um papel crucial na patogênese do câncer de pulmão, através de suas inúmeras vias de atuação, agindo tanto no tumor quanto no seu microambiente (WALSER et al. 2008).

A resposta inflamatória é desencadeada quando há o reconhecimento de agentes invasores ou da presença de tecido lesionado e é montada uma resposta de defesa do organismo contra estes. Este processo ocorre através do equilíbrio entre vias pró-inflamatórias e mediadores anti-inflamatórios, iniciando-se através da resposta inata que reconhece padrões moleculares (PAMPs - *pathogen associated molecular patterns*) nos patógenos e em associação aos tecidos danificados através de receptores celulares e humorais específicos chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRR - *pattern recognition receptors*) (DE BOER et al. 2000).

Após o reconhecimento, ocorre ativação celular e produção de polipeptídeos chamados de citocinas, que exercendo efeitos pleiotrópicos e redundantes mediam e regulam a resposta inflamatória. As citocinas podem ter atividades imunossupressivas, pró ou anti-inflamatórias, dependendo do microambiente envolvido. Estas proteínas agem fundamentalmente no crescimento, desenvolvimento, diferenciação e ativação celular (SERUGA et al. 2008; YOSHIMURA 2009).

A inflamação está relacionada ao câncer de várias maneiras e de formas não totalmente esclarecidas. Dentre essas, acredita-se que a inflamação age no silenciamento epigenético de genes associados com a supressão de fatores de crescimento, através de reações associadas ao

estresse oxidativo e promovendo angiogênese e linfangiogênese (DE BOER et al. 2000).

No pulmão a inflamação é deflagrada pela ação direta da fumaça resultante da queima do tabaco sobre o epitélio brônquico-alveolar, modificando a resposta inata, com alteração do fenótipo dos macrófagos e ativação dos mesmos, ocasionando maior produção de mediadores pró-inflamatórios, porém causando ineficiência destes na tarefa de fagocitar células apoptóticas ou alteradas. Há também aumento de enzimas proteolíticas e elevação da produção de espécies reativas de oxigênio. Todos estes fatores são produzidos ciclicamente tornando a inflamação crônica, causando a destruição do tecido pulmonar e predispondo a mutações somáticas (RUSSELL et al. 2002; SOPORI 2002; STÄMPFLI e ANDERSON 2009).

Estudos experimentais em animais e pesquisas envolvendo seres humanos detectaram e identificaram os principais mediadores desse complexo processo que causa o câncer de pulmão, relacionando toda trajetória da inflamação ao microambiente tumoral e conseqüente carcinogênese. Dentre os mediadores estão as interleucinas pró-inflamatórias como IL6 e IL1B e as quimiocinas CCL2 (MCP1) e CXCL8 (IL8). Dentre estas proteínas, WALSER et al. (2008) relatam que a IL1B se destaca por possuir propriedades deletérias sobre a promoção da transição epitélio-mesenquimal (TEM) e a destruição de células específicas que mediam a resposta imune contra antígenos tumorais.

Pesquisas realizadas por LI et al. (2007) e QU et al. (2009a) em modelo animal e em amostras de tecido pulmonar humano, respectivamente, demonstraram o importante papel da via IL6/STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), na promoção do DPOC e do adenocarcinoma pulmonar, quando ocorre inflamação persistente no pulmão.

As funções da IL6 são muitas e diversificadas. É sintetizada por macrófagos e células do epitélio vascular e possui tamanho variável entre 19-26 KDa. Tem papel na imunidade inata, estimula os hepatócitos a produzir proteínas que agem na fase aguda da resposta inflamatória e também estimula a produção de neutrófilos. Outra importante função é o estímulo da produção de outras citocinas, principalmente IL17, para inibição das células T regulatórias, tornando a resposta imune mais eficaz. O STAT3 é uma molécula de sinalização intracelular, presente nas células epiteliais alveolares tipo II e que age como principal mediador da resposta celular a IL6 (LI et al. 2007; QU et al. 2009a e b).

A citocina IL1 representa uma grande família subdividida em IL1B, IL1A e IL1RA (receptor antagonista). Desempenha várias e importantes funções, incluindo indução de proliferação, diferenciação e apoptose das células envolvidas na resposta imunológica. Também desempenha papel fundamental na resposta inflamatória facilitando a transmigração de leucócitos para o sítio de infecção. Em humanos sob uso do tabaco foi detectado aumento de IL1B em células mononucleares sanguíneas (COMANDINI et al. 2009; YOSHIMURA 2009). Num modelo animal, onde camundongos foram expostos ao tabaco, houve indução da expressão da

IL1B com conseqüente ativação do fator nuclear kappa B (NFKB) e este efeito mostrou ter um papel importante na promoção de inflamação e carcinogênese do pulmão (STATHOPOULOS et al 2007; HART et al 2008; LEE et al 2009).

Em outro estudo, realizado por KUBO et al. (2005), foi investigado o perfil de expressão gênica na resposta inflamatória no pulmão de cobaias submetidas à exposição aguda e crônica ao tabaco. Observou-se que após a fase de exposição aguda não houve lesão tecidual no parênquima pulmonar, mas já havia aumento significativo da expressão de IL1B e aumento moderado de IL8, dentre outros mediadores. Na fase de exposição crônica a expressão do IL1B continuou aumentando e a expressão de IL8 permaneceu no mesmo patamar, paralelamente já havia aparecimento de alterações da estrutura pulmonar e aumento da resistência de vias aéreas. O aumento persistente de IL1B, segundo estes autores, corrobora dados da literatura, pois a mesma já foi descrita como importante na função de promover doença pulmonar devido a sua característica de mediar o tráfego de células inflamatórias para as vias aéreas.

Na tentativa de associar o uso do tabaco com doença pulmonar inflamatória e câncer a IL8 também tem sido bastante estudada. Pertencente à família das quimiocinas, com tamanho entre 8-14 KDa, tem habilidade de agir sobre os neutrófilos, que também são seus produtores, induzindo quimiotaxia, explosão oxidativa (*oxidative burst*) e superexpressão de moléculas de adesão na superfície daquelas células (SCAPINI et al. 2000). Estudos com biópsia de tecido pulmonar humano e com lavado brônquico-

alveolar (BAL) mostraram aumento da expressão gênica de IL8 em pacientes fumantes e em portadores de DPOC (CHARO e RANSOHOFF 2006). Outra pesquisa, realizada por KUSCHNER et al. (1996), mostrou que o aumento da expressão da IL8 foi dependente do grau de exposição ao tabaco, assim como RUSZNAK et al. (2000) e SCHULZ et al. (2003) que demonstraram, através da análise de células epiteliais de biópsia pulmonar de indivíduos com DPOC, que há um aumento significativamente maior de IL8 neste material comparado com pessoas fumantes porém saudáveis.

As pesquisas também relacionam a quimiocina CCL2 com a dinâmica da inflamação tecidual pulmonar. No geral, as quimiocinas atuam como recrutadores de leucócitos, mas a CCL2 atua especificamente sobre os monócitos, atraindo-os para os sítios de infecção e regulando sua infiltração durante a inflamação (CHARO e RANSOHOFF 2006). Sabe-se que no parênquima pulmonar acometido por DPOC há elevada infiltração e acúmulo de neutrófilos e monócitos. KUBO et al. (2005) também observaram elevação da expressão de CCL2, tanto na fase aguda como na fase crônica da exposição ao tabaco.

Alguns pesquisadores observaram elevação de CCL2 em pacientes fumantes com DPOC em comparação com fumantes saudáveis e relacionaram a produção deste fator ao próprio epitélio pulmonar, que acometido por inflamação crônica aumentaria a expressão de quimiocinas como a CCL2, o que regularia a infiltração dos macrófagos. Em contrapartida outras pesquisas encontraram no BAL maior elevação da CCL2 em pacientes com DPOC e em fumantes assintomáticos quando

comparados a não-fumantes, sugerindo que esta quimiocina pode ser uma das causas da inflamação pulmonar no fumante (STÄMPFLI e ANDERSON 2009; COMANDINI et al. 2009).

De todos estes dados depreende-se que um conjunto de mediadores está ao mesmo tempo envolvido na regulação da resposta inflamatória no pulmão em resposta à exposição ao tabaco e na patogênese do câncer de pulmão, e que, provavelmente, a inflamação crônica pulmonar desempenha um papel crucial na iniciação e progressão do processo de malignização pulmonar.

Desta forma, tentamos averiguar a existência de algum padrão ou perfil avaliando a expressão deste conjunto de proteínas associadas com a resposta inflamatória, e para as quais existissem dados na literatura associando-as a algum dos passos no processo de iniciação ou progressão do câncer de pulmão. Para tanto, estes mediadores foram avaliados através do sangue de indivíduos não fumantes, fumantes atuais, ex-fumantes e em indivíduos portadores de câncer de pulmão inicial (estádios I a IIIA ressecável) antes do tratamento cirúrgico, e avançado (estádios IIIA irresssecável, IIIB e IV), para, eventualmente, identificar que indivíduos apresentariam um risco mais elevado de desenvolver câncer quando expostos ao tabaco. Acreditamos que tal achado poderia ser útil para orientação dos indivíduos fumantes, na identificação e seguimento de indivíduos com risco elevado de desenvolver câncer de pulmão e no melhor entendimento da patogênese do câncer de pulmão e sua relação com a resposta inflamatória.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

- Avaliação dos níveis circulantes de IL1B, IL6, CXCL8 (IL8) e CCL2 (MCP1) no soro sanguíneo de indivíduos normais, tabagistas atuais, ex-tabagistas (que pararam há mais de 1 ano), portadores de CPCNP com doença localizada e portadores de CPCNP com doença localmente avançada ou metastática não-resssecável.

2.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO

- Determinar a associação dos níveis de IL1B, IL6, CXCL8 (IL8) e CCL2 (MCP1) com características clínico-demográficas da população estudada.
- Correlacionar o nível dos marcadores supracitados com a carga tabágica entre os tabagistas atuais e os ex-tabagistas.
- Correlacionar os níveis dos mediadores inflamatórios estudados entre si.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO E CÁLCULO DE AMOSTRA

Trata-se de um estudo transversal realizado de Agosto/2010 a Outubro/2011. Foram avaliados sete grupos de indivíduos:

- Não-tabagistas - utilizados como controle e formado por doadores do Banco de Sangue, funcionários do Hospital A.C. Camargo (HACC) e participantes das campanhas do HACC para prevenção do câncer. Todos sem história prévia de tabagismo e sem qualquer doença oncológica conhecida.
- Tabagistas ativos – indivíduos que consomem ativamente tabaco em qualquer forma inalável. Foram recrutados no Grupo de Apoio ao Tabagista (GAT), entre os doadores do Banco de Sangue, dentre os funcionários do hospital e participantes das campanhas do HACC de prevenção ao câncer. Todos os indivíduos sem doença oncológica conhecida.
- Ex-tabagistas - foram considerados ex-tabagistas os indivíduos abstêmios há pelo menos um ano. Também foram recrutados a partir do GAT, doadores do Banco de Sangue, funcionários do hospital e participantes das campanhas de prevenção ao câncer. Todos os indivíduos sem doença oncológica conhecida.

- Portadores de câncer de pulmão inicial sem história de tabagismo – pacientes com câncer de pulmão confirmado histologicamente como de células não-pequenas estádios I a IIIA (ressecável), antes da ressecção do tumor primário com intenção curativa ou tratamento neoadjuvante. Foram recrutados no ambulatório de cirurgia torácica.
- Portadores de câncer de pulmão inicial com história de tabagismo – pacientes com câncer de pulmão confirmado histologicamente como de células não-pequenas estádios I a IIIA (ressecável), antes da ressecção do tumor primário com intenção curativa ou tratamento neoadjuvante. Foram recrutados no ambulatório de cirurgia torácica.
- Portadores de câncer de pulmão metastático ou localmente avançado não-fumantes - foram recrutados no ambulatório de oncologia clínica antes de qualquer tratamento sistêmico ou radioterapia. Admitidos apenas os indivíduos com diagnóstico histologicamente confirmado de CPCNP com doença estádios IIIA irressecável, IIIB ou IV.
- Portadores de câncer de pulmão metastático ou localmente avançado, com história de tabagismo ativo, foram recrutados no ambulatório de oncologia clínica antes de qualquer tratamento sistêmico ou radioterapia. Admitidos apenas os indivíduos com diagnóstico histologicamente confirmado de CPCNP com doença estádios IIIA irressecável, IIIB ou IV.

Utilizamos para os pacientes com CPCNP o estadiamento clínico, de acordo com o *AJCC Cancer Staging Manual* (EDGE et al. 2010)

Como não existiam dados na literatura sobre os valores das citocinas avaliadas neste estudo, para os grupos de indivíduos estudados (controle, fumantes, ex-fumantes, portadores de câncer inicial ressecável e localmente avançado e metastático), empregamos os resultados do estudo de SIN et al. (2006) para estimar o tamanho de nossa amostra. Este estudo mediu os níveis de Proteína C Reativa, CCL2 (MCP1), IL6 e IL8 em indivíduos fumantes e ex-fumantes portadores de displasia brônquica, que progrediram ou não após 6 meses. Assumindo médias e desvios padrões semelhantes aos obtidos neste estudo para as citocinas estudadas para os dois grupos (com progressão e sem progressão) e uma variação da mesma magnitude nas medidas destas citocinas na nossa amostra, assumindo um erro do tipo alfa de 5% e um erro do tipo beta de 20%, calculamos que seriam necessários 67 pacientes por grupo (335 indivíduos ao todo) a fim de encontrar alguma diferença estatisticamente significativa, na média dos valores das citocinas medidas no sangue, entre os grupos estudados.

3.2 ELEGIBILIDADE

3.2.1 Critérios de inclusão

- Idade maior ou igual a 18 anos.
- Concordar em participar da pesquisa, assinando o TCLE.
- Para os portadores de câncer, diagnóstico histológico ou citológico de carcinoma de pulmão de células não-pequenas;

3.2.2 Critérios de exclusão

- Complicações infecciosas ativas, incluindo uso de antibióticos até 30 dias antes da coleta de sangue;
- Doenças inflamatórias crônicas de caráter auto-imune ou infeccioso;
- Tabagismo passivo apenas (aplicável apenas nos indivíduos tabagistas);
- Uso crônico de corticóides ou anticoagulantes (exceto anti-agregante plaquetário);
- Ter realizado tratamento sistêmico (quimioterapia, imunoterapia ou terapia-alvo de qualquer tipo) ou radioterapia prévios e recentemente;
- Pacientes com *performance status* (ECOG) maior que dois;
- Diagnóstico prévio de outro tipo de câncer, exceto carcinoma cervical *in situ* e carcinoma basocelular de pele, totalmente ressecados, ou outro tipo de tumor sem recidiva ou progressão há mais de cinco anos do término do tratamento;
- Pacientes portadores de doenças psiquiátricas descompensadas;
- Pacientes analfabetos sem um representante legal;
- Paciente deficiente mental incapaz de manifestação de vontade;

3.3 COLETA DE SANGUE

Foram coletados 10,0mL de sangue por punção venosa periférica de cada indivíduo. Nos indivíduos dos grupos controle, tabagista e ex-tabagista, as coletas foram realizadas em diferentes momentos e setores do hospital A.

C. Camargo, conforme a disponibilidade e localização dos voluntários. Nos pacientes com câncer de pulmão inicial, as coletas foram realizadas durante a internação pré-cirúrgica ou no Centro Cirúrgico, antes da indução anestésica. Dentre os pacientes com câncer de pulmão avançado, as coletas foram realizadas em diversos locais e momentos, como no ambulatório da Oncologia Clínica, logo após a consulta médica, durante a internação do paciente para exames diagnósticos ou cuidados clínicos, ou então no ambulatório da Quimioterapia, antes da infusão do primeiro ciclo de quimioterapia.

As amostras de sangue foram colocadas em tubo seco (*Vacutainer*) das quais separamos o soro, após incubação em banho-maria a 37°C por 30min e centrifugação a 4°C por 10min a 2000rpm. Estas amostras foram novamente centrifugadas sob refrigeração para remoção de hemácias e debris residuais, aliquotadas e mantidas a 80°C negativos até o momento da análise.

Em paralelo, dados clínicos foram anotados em fichas de coleta de dados especificamente desenhada para o presente trabalho (Anexo 1) e realizados imediatamente antes da coleta de sangue. Todos os voluntários assinaram o termo de consentimento esclarecido para então serem incluídos. No caso dos indivíduos com câncer inicial, como a confirmação histológica não estava disponível para todos antes da realização da cirurgia, o termo de consentimento era aplicado quando existia suspeita clínica, e no caso de não haver confirmação do diagnóstico de câncer o paciente era excluído e sua amostra de soro descartada.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente sob o número 1388/10, em 08 de Junho de 2010.

3.4 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Inicialmente quantificamos a concentração de proteínas totais nas amostras pelo método de Bradford.

Os mediadores supracitados (IL6, IL1B, CCL2 e IL8) foram quantificados por ELISA sanduíche, empregando *kits* específicos *DuoSet - R&D Systems* (Minneapolis, MN - USA), seguindo as especificações do fabricante para cada kit. As concentrações dos mediadores foram expressas como a relação massa do mediador (em pg) por volume de soro (em ml).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados clínicos empregamos a estatística descritiva para descrição de frequências, medidas de tendência central e dispersão.

O teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Dunn foi empregado para comparar as medianas das concentrações das citocinas entre os grupos do estudo.

Correlação entre carga tabágica (maços/ano) e os níveis sanguíneos dos mediadores, assim como entre as concentrações das citocinas entre si, foi realizada pelo método de Spearman. A comparação entre as medianas

das concentrações das citocinas dos diversos subgrupos e os dados clínico-patológicos foi realizado pelo teste de Mann-Whitney.

Para todas as análises consideramos diferenças estatisticamente significativas aquelas cujo p fosse inferior a 0,05. Empregamos para as análises estatísticas e confecção de gráficos os programas SPSS 17.0 for *Windows* (Chicago, IL - USA) e o *GraphPad Prism* 5.0 (La Jolla, CA - USA).

3.6 FINANCIAMENTO E INFRA-ESTRUTURA

Recebemos auxílio-pesquisa da FAPESP, no intuito de custear o projeto (PROCESSO 2010/09530-4).

Utilizamos o Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) do Hospital A C Camargo/Fundação Antônio Prudente para a realização dos ensaios propostos.

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Obtenção das amostras de sangue

Nesta pesquisa, de 335 amostras de sangue, previamente calculado como o número ideal, obtivemos 165 amostras, sendo o grupo controle o único com a quantidade pré-estabelecida como satisfatória. Nos demais grupos obtivemos 26 amostras de indivíduos fumantes, 19 amostras de ex-fumantes, 35 amostras de pacientes com câncer de pulmão em estágio avançado e tabagistas, 11 amostras de pacientes com câncer de pulmão em estágio avançado não-tabagistas, e somente 9 amostras de pacientes com câncer de pulmão em estágio inicial, já adicionados os tabagistas e os não-tabagistas.

Iniciamos o recrutamento do grupo controle dentre os doadores do Banco de Sangue, porém percebemos que, como esta população era pré-triada antes da coleta, não era representativa da população em geral. Desta maneira reiniciamos as coletas recrutando funcionários, colaboradores e participantes de campanhas oferecidas pelo hospital, fato que dificultou sobremaneira a obtenção das amostras de sangue.

Outra dificuldade enfrentada foi relacionada aos grupos de tabagistas ativos e ex-tabagistas, pois contávamos com a presença deles no GAT, o que não ocorreu da maneira que prevíamos. Para o grupo dos tabagistas,

posteriormente adquirimos um número satisfatório, também através dos colaboradores e funcionários do hospital.

No grupo de tumor inicial, nossa dificuldade para a obtenção do número ideal de amostras foi relacionada aos pacientes, que apresentaram, muitas vezes, esta doença como um segundo tumor primário, com menos de 5 anos do tratamento do anterior, o que os tornou inelegíveis. Quanto aos pacientes com tumor localmente avançado e metastático, obtivemos uma quantidade maior comparado ao grupo com tumor inicial, porém, neste grupo, a dificuldade da coleta foi relacionada ao tratamento quimioterápico ou radioterápico iniciado previamente em outro serviço, ou o uso prévio de antibiótico ou corticosteróides, também resultando em inelegibilidade.

4.1.2 Dados clínicos

Através da ficha de coleta de dados e análise dos prontuários obtivemos informações clínicas dos voluntários do estudo.

Analizando todos os dados agrupados temos que a idade variou de 21 a 82 anos, com média, mediana e desvio padrão de 50,5, 52,5 e 15,72 respectivamente. Para todas as pessoas que fumam, a média e a mediana de maços/ano foi de 49,7 e 39,0 respectivamente, com um desvio padrão de 43,76. Com relação ao gênero, prevaleceu o sexo masculino, e à raça, indivíduos da cor branca.

Analizando os grupos separadamente, observamos que os pacientes com tumor avançado possuem a maior média de idade e são as pessoas com maior carga tabágica. Observa-se que há somente mulheres nos

grupos de tumores iniciais e avançados não-fumantes, assim como não há pessoas da cor negra dentre todos os pacientes com câncer (Tabelas 1, 2, 3 e 4).

Tabela 1 - Dados epidemiológicos dos indivíduos da amostra.

VARIÁVEIS	GRUPOS						
	Controle N=64	Ex-tabagista [#] N=19	Tabagista N=26	CPCNP inicial [@] N=6	CPCNP avançado* N=35	CPCNP inicial não-tabagista N=3	CPCNP avançado não-tabagista N=11
IDADE							
Média (SD)	39,5 (12,1)	51,4 (12,6)	48,9 (13,6)	62,8 (9,0)	64,2 (10,4)	60,3 (7,63)	63,2 (13,5)
Mediana	37,0	52,0	52,5	64,0	63,0	62,0	66,0
SEXO							
Masculino	51,6%	47,4%	53,8%	66,7%	68,6%	-	-
COR							
Branca	65,6%	84,2%	61,3%	100%	80,0%	33,3%	72,7%
Negra	7,8%	10,5%	11,5%	-	-	-	-
Parda	25%	5,3%	23,1%	-	14,3%	33,3%	27,3%
Amarela (Asiáticos)	1,6%	-	3,8%	-	5,7%	33,3%	-

[#] Indivíduos que pararam de fumar há pelo menos 1 ano.

[@] Estádios I, II e IIIA ressecáveis.

- Estádios IIIA irressecável, IIIB e IV.

Tabela 2 - Dados referentes ao estadiamento e tamanho (T) dos tumores.

VARIÁVEIS	GRUPOS			
	CPCNP inicial [@] N=6	CPCNP avançado* N=35	CPCNP Inicial não- tabagista N=3	CPCNP avançado não- tabagista N=11
ESTÁDIO				
I ^{''}	2	-	3	-
II ^{'''}	2	1	-	-
IIIA	2	9	-	1
IIIB	-	6	-	-
IV	-	19	-	10
T				
Tx	-	3	-	-
T1 ^{&}	3	6	1	-
T2 ^{**}	2	10	2	4
T3	-	9	-	6
T4	1	7	-	1

[@] Estádios I, II e IIIA ressecáveis.

* Estádios IIIA irresssecável, IIIB e IV.

[&] Tumores T1a e T1b

^{**} Tumores T2a e T2b

Tabela 3 - Dados referentes ao comprometimento linfonodal (N) e presença de metástases (M).

VARIÁVEIS	GRUPOS			
	CPCNP	CPCNP	CPCNP	CPCNP
	inicial [@] N=6	avançado ^{\$} N=35	inicial não-tabagista N=3	avançado não-tabagista N=11
N				
N0	2	8	3	1
N1	2	2	-	-
N2	2	15	-	5
N3	-	9	-	2
Nx	-	1	-	3
M				
M0	6	13	3	1
M1*	-	20	-	10
Mx	-	2	-	-

* M1a e M1b

[@] Estádios I, II e IIIA ressecáveis.^{\$} Estádios IIIA irresssecável, IIIB e IV.**Tabela 4** - Dados referentes à carga tabágica entre os grupos de indivíduos tabagistas.

VARIÁVEIS	GRUPOS			
	Ex-tabagista [#]	Tabagista	CPCNP	CPCNP
	N=19	N=26	inicial [@] N=6	avançado ^{\$} N=35
Maços-ano				
Média (SD)	21,83 (28,67)	32,92 (29,7)	51,83 (32,4)	70,49 (48,7)
Mediana	12,5	22,0	45,0	57,0

[#] Indivíduos que pararam de fumar há pelo menos 1 ano.[@] Estádios I, II e IIIA ressecáveis.^{\$} Estádios IIIA irresssecável, IIIB e IV.

4.1.3 Quantificação dos mediadores inflamatórios

Primeiramente, através do método de Bradford, realizamos as medidas de concentração de proteínas das amostras de soro. Em seguida iniciamos os imunoensaios com os kits da DuoSet (R&D Systems).

A princípio, optamos pela padronização e dosagem das citocinas IL6, IL8, IL1B, utilizando 8 amostras de cada grupo. Na preparação das placas montamos curvas-padrão com 7 pontos para cada placa e pipetamos as amostras em duplicata, como preconizado pelos *kits*.

Na análise desta padronização, verificamos que o *kit* mostrou-se pouco sensível para a análise das concentrações das interleucinas IL6 e IL1B, pois resultaram em valores indetectáveis para a maioria das amostras e em todos os grupos analisados. Para a IL8 verificamos valores mistos de detecção, e finalmente para a CCL2 observamos maior homogeneidade de detecção dentre as amostras e entre os grupos.

Após estes primeiros experimentos e diante dos resultados obtidos, realizamos os imunoensaios em todas as amostras de todos os grupos. Foram realizados ensaios de ELISA para IL6, IL8, IL1B e CCL2.

Após quantificação das concentrações dos mediadores supracitados, excluimos os resultados das amostras que mostraram valores divergentes na duplicata, então em um segundo experimento repetimos o imunoensaio destas amostras divergentes. Observamos que este evento ocorreu, principalmente, nos soros com aspecto lipídico.

Em uma análise estatística preliminar, observamos que para as concentrações das citocinas analisadas, os grupos com tumores iniciais não-

fumantes e com tumores avançados não-fumantes não divergiram de maneira significativa. Então, realizamos nova análise agrupando estes grupos, respectivamente, com as amostras de pacientes com tumores iniciais e fumantes e com o grupo dos tumores avançados e fumantes.

Não foi observado diferença estatística das amostras submetidas a ELISA para as interleucinas IL6 e IL1B (Figuras 1 e 2). Em todos os grupos, e na grande maioria das amostras, os valores foram indetectáveis, como observado na fase de padronização. Diante deste resultado, para que pudéssemos realizar os cálculos estatísticos, substituímos os valores indetectáveis pelo menor valor detectável dividido por 10, similarmente ao realizado por PINE et al. (2011).

Não verificamos diferenças estatisticamente significativas na concentração sérica da quimiocina IL8 em relação aos grupos, mesmo após realizarmos o agrupamento das amostras: tumores avançados (tumores avançados não-tabagistas com tabagistas), tumores iniciais (tumores iniciais tabagistas com não-tabagistas) e tabagistas (tabagistas sem câncer e ex-tabagistas sem câncer) (Figura 3).

Para a CCL2 foi observada diferença estatisticamente significante dos níveis circulantes desta quimiocina entre os grupos estudados. Ao analisarmos os sete grupos separadamente, verificamos existir diferença entre os grupos controle e de tumores avançados ($p < 0,05$), bem como entre os grupos de ex-tabagistas e de tumores avançados ($p < 0,05$). Realizamos então, como no cálculo da IL8, a junção entre os grupos dos tumores avançados não-fumantes com os fumantes, e dos grupos dos tumores

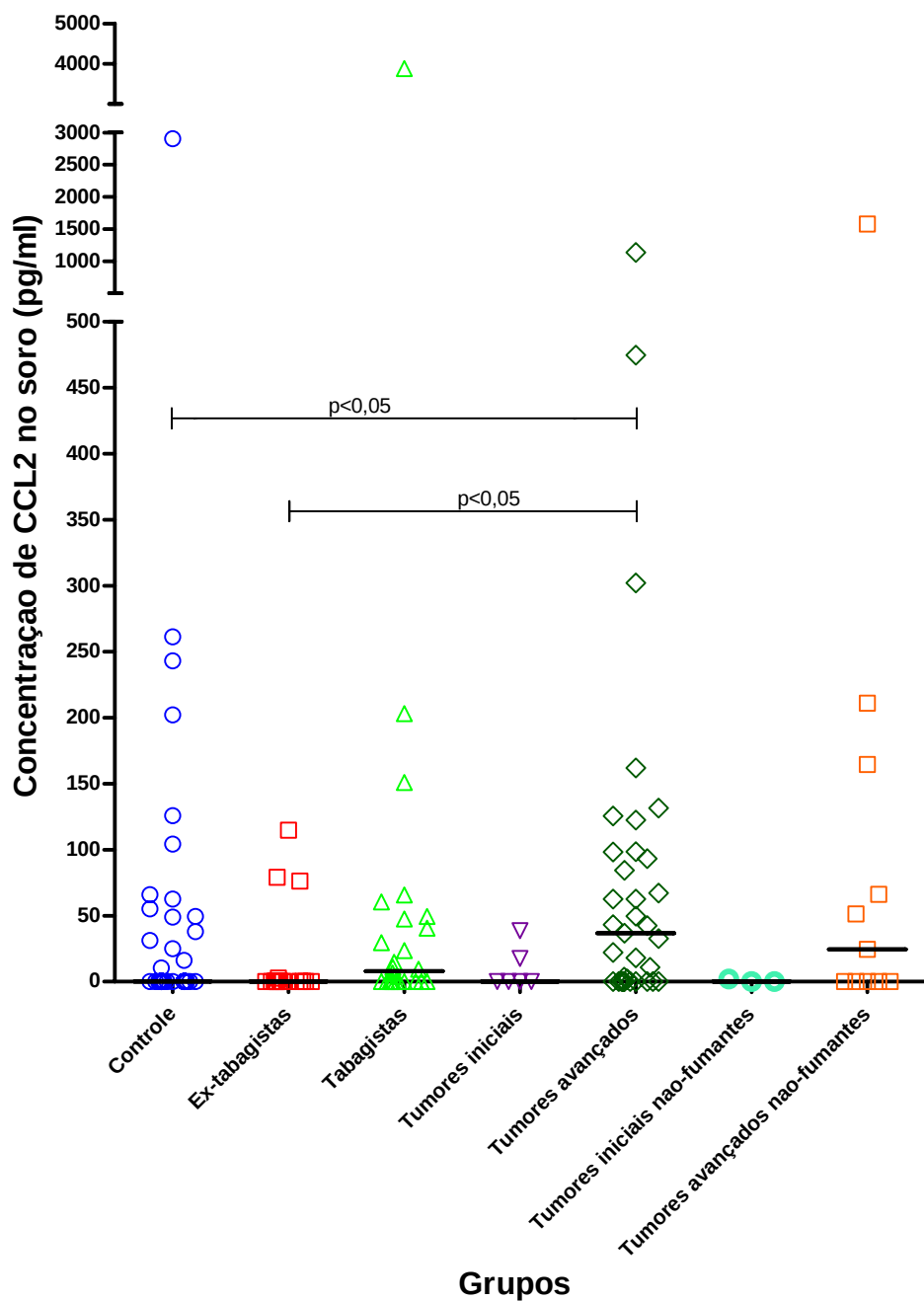


Figura 4 - Comparação dos níveis de CCL2 entre os grupos analisados. Scatter-plot da concentração de CCL2 em pg/ml no soro dos indivíduos dos grupos controle (n=64), ex-tabagista (n=19), tabagista (n=26), tumores iniciais (n=6), tumores avançados (n=35), tumores iniciais não-fumantes (n=3) e tumores avançados não-fumantes (n=11).

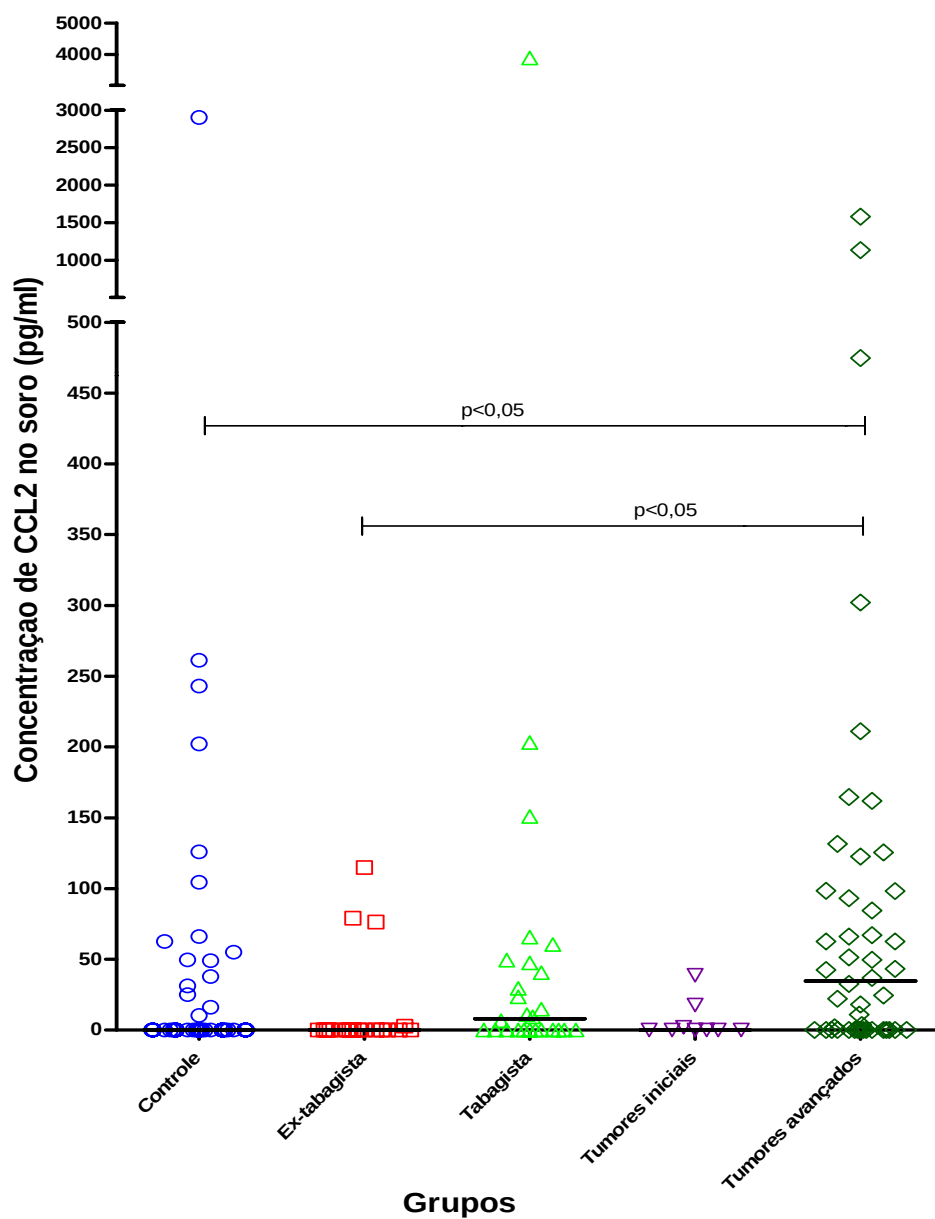


Figura 5 - Comparação dos níveis de CCL2 entre os grupos analisados, após agregação dos 7 grupos iniciais. *Scatter-plot* da concentração de CCL2 em pg/ml no soro dos indivíduos dos grupos controle (n=64), ex-tabagistas (n=19), tabagista (n=26), tumores iniciais (n=9) e tumores avançados (n=46). Para esta análise foram agrupados em um único grupo pacientes tabagistas e não-tabagistas com tumores iniciais (tumores iniciais) e pacientes tabagistas e não-tabagistas com tumores avançados (tumores avançados).

Houve correlação positiva das concentrações das citocinas entre si (Tabela 5).

Observamos uma correlação fraca entre CCL2 e IL6, entre CCL2 e IL1B e entre CCL2 e IL8. Da mesma forma, houve correlação fraca entre IL8 e IL6 e entre IL8 e IL1B. Encontramos correlação moderada entre IL1B e IL6.

Tabela 5 - Dados referentes à correlação entre as concentrações das citocinas.

	IL1B		IL6		IL8		CCL2	
	r	p	r	p	r	p	r	p
IL1B	NA		0,512	<0,001	0,130	0,097	0,269	<0,001
IL6	-		NA		0,251	0,001	0,209	0,007
IL8	-		-		NA		0,159	0,042

NA – não aplicável

Foram observados níveis de CCL2 significativamente mais elevados nos indivíduos com câncer ($p=0,002$), em indivíduos portadores de metástases ($p=0,025$) e em estádios mais avançados (IIIA irressecável, IIIB e IV) ($p=0,029$).

A interleucina IL1B mostrou níveis significativamente mais elevados somente em associação com ausência de comprometimento linfonodal ($p=0,037$).

Assim como a CCL2, os níveis da interleucina IL6 também mostraram-se significativamente mais elevados nos pacientes com câncer ($p=0,028$). Ao contrário das demais, IL8 não mostrou associação significativa com nenhum dado clínico-demográfico (Tabela 6).

Não encontramos interação entre os níveis sanguíneos dos mediadores inflamatórios, relacionados nos objetivos, com o hábito de fumar e não fumar.

Analisando a população como um todo, separando todos os voluntários que fumam, mas não levando em consideração se são portadores de câncer de pulmão, não houve correlação dos níveis das citocinas com a carga tabágica. Da mesma maneira, realizamos esta análise entre níveis de citocinas obtidas e a carga tabágica, porém focando somente nos tabagistas e ex-tabagistas sem câncer de pulmão. Também não houve correlação entre estas variáveis (Tabela 7).

Analisando as variáveis clínicas, os valores médios de leucócitos totais mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tumores iniciais e avançados (11883,33 leucócitos/ml x 8580,41 leucócitos/ml, respectivamente), com $p=0,011$.

Tabela 6 - Dados referentes à associação entre as variáveis clínico-patológicas e as medianas das concentrações de IL1B, IL8, IL6 e CCL2.

VARIÁVEIS	IL1B		IL8		IL6		CCL2	
	Mediana (pg/ml)	p	Mediana (pg/ml)	p	Mediana (pg/ml)	p	Mediana (pg/ml)	p
Tabagismo								
Sim [#]	82,3	0,902	85,1	0,435	82,7	0,867	88,4	0,068
Não*	82,6		79,5		82,2		76,0	
Câncer								
Sim	81,4	0,601	77,5	0,319	87,4	0,028	97,5	0,002
Não	83,0		85,0		79,9		74,9	
Estádio*								
Avançado	27,6	0,404	27,6	0,232	28,2	0,473	30,0	0,029
Inicial	29,5		29,5		27,0		19,8	
Metástase[#]								
Sim	26,8	0,785	27,8	0,597	28,6	0,121	30,8	0,025
Não	27,2		25,8		24,7		21,5	
Linfonodo⁺								
Positivo	24,5	0,037	25,4	0,953	24,38	0,129	27,2	0,209
Negativo	27,6		25,6		27,88		21,8	

* **Estádio avançado:** estádios IIIA irressecáveis, IIIB e IV. **Estádio inicial:** estádios IA, IB, IIA, IIB e IIIA ressecáveis.

Metástase: M1a e M1b

+ Linfonodo positivo: N1, N2 e N3

Tabela 7 - Dados referentes à correlação entre as variáveis relacionadas à carga tabágica e as medianas das concentrações de IL1B, IL6, IL8 e CCL2.

VARIÁVEIS		IL1B		IL8		IL6		CCL2	
		r	p	r	p	r	p	r	p
Maços-ano[#]		- 0,159	0,150	- 0,173	0,118	- 0,033	0,770	0,133	0,229
Maços-ano *	Tabagistas	- 0,133	0,516	0,043	0,833	- 0,067	0,746	- 0,017	0,936
	Ex-tabagistas	-	-	- 0,334	0,162	-	-	- 0,176	0,472

Incluídos todos os indivíduos tabagistas da população estudada, independente de serem portadores de câncer de pulmão.

*Incluídos todos os indivíduos tabagistas ou ex-tabagistas da população estudada e que não tem câncer de pulmão

Com a intenção de dar uma perspectiva global do desfecho clínico de todos os portadores de câncer de pulmão, independentemente do estadiamento em que se encontravam, e somente de forma exploratória, calculamos a curva de Sobrevida Livre de Progressão empregando o método de Kaplan-Meier (Figura 6).

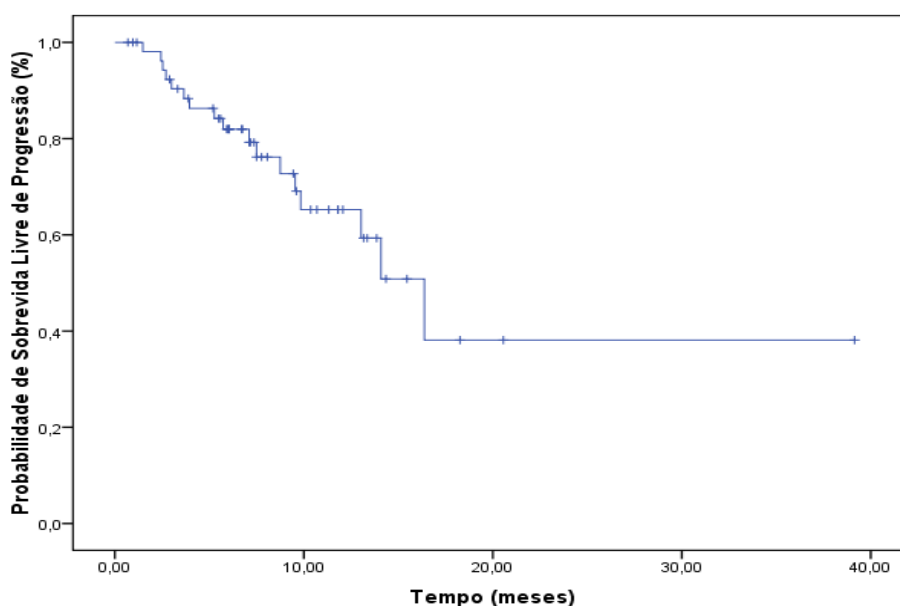


Figura 6 - Curva de Sobrevida Livre de Progressão dos indivíduos portadores de câncer. A probabilidade acumulada de sobrevida livre de progressão foi calculada para todos os pacientes portadores de câncer de pulmão, independente do estágio, pelo método de Kaplan-Meier, com a porcentagem de pacientes livres de progressão em função do tempo em meses. O tempo mediano de seguimento da população é de 16,38 meses.

5 DISCUSSÃO

Amplamente estudada, a relação causa-efeito entre tabagismo, inflamação e câncer de pulmão ainda mostra muitas lacunas e estimula muitas indagações. A intenção desta pesquisa foi pautada nestas questões, mas com o intuito de utilizar conhecimentos previamente adquiridos para aplicá-los em uma população peculiar, atendida por um hospital oncológico de referência.

Durante a realização da pesquisa, percebemos várias dificuldades relacionadas à coleta prospectiva de material. Comparados a estudos internacionais, ainda somos incipientes na elaboração de bancos de dados, aquisição e armazenamento de material biológico para pesquisas futuras. Também verificamos em nosso país pouca cooperação entre instituições, para finalidades comuns relacionadas a pesquisas. Nosso principal desafio foi a obtenção do número ideal de amostras de sangue, para que não houvesse prejuízo à análise dos resultados.

Diante disso, a maior limitação desta pesquisa foi relacionada a este fator, pois a casuística de alguns grupos ficou abaixo do previamente esperado, levando-nos a algumas dúvidas que, talvez poderiam ser melhor esclarecidas se houvesse uma quantidade maior de amostras.

Os imunoensaios mostraram resultados divergentes e inesperados, se pontuarmos que todas as 165 amostras foram submetidas da mesma maneira ao ELISA para as citocinas pró-inflamatórias IL6 e IL1B e para as

quimiocinas IL8 (CXCL8) e CCL2 (MCP1). Estes resultados podem ser analisados de diversas maneiras, visto que, em algum momento, todas estas citocinas podem ter atividades redundantes nas situações que escolhemos para este estudo.

Analisar o perfil de cada citocina isoladamente, diante dos resultados obtidos, também nos mostrou que ainda há muito o que ser esclarecido, pois, por exemplo, não averiguamos o quanto a heterogeneidade da nossa população, e as condições sócio-econômicas e ambientais em que vivem os pacientes, podem ter influência no perfil das citocinas estudadas.

Primeiramente nos surpreendemos com os valores obtidos nos imunoenaios da IL6. As leituras das placas mostraram valores de detecção muito baixos, ou mesmo indetectáveis em muitas amostras, dificultando uma análise mais acurada do perfil desta citocina. Este fato foi observado em todos os grupos.

Poucos estudos, como de ENEWOLD et al. (2009) relataram em suas pesquisas o mesmo que encontramos, a ocorrência de amostras de soro com valores de citocinas abaixo do limite de detecção para o método empregado. Acreditamos que estes nossos resultados possam, eventualmente, ser em decorrência de uma limitação do método utilizado, que poderia ser sanado, por exemplo, pela utilização de *kits* capazes de detectar níveis mais baixos destas citocinas. O método utilizado em nossas amostras oferece para a IL6 o valor mínimo de detecção de 9,375 pg/ml e de 3,906 pg/ml para a IL1B, porém PINE et al. (2011) encontrou valores da IL6 em pessoas saudáveis com uma média de 2,1 pg/ml, enquanto BORGIA et

al. (2009) e FARLOW et al. (2010) relataram que suas amostras mostraram medidas de IL1B abaixo da curva de detecção oferecido pelo seus *kits*, tanto no grupo controle quanto nos portadores de CPCNP, porém não especificaram o valor.

Amplamente estudada, a IL6 é descrita como uma citocina pleiotrópica pró-inflamatória, que apresenta tanto níveis elevados como baixos em diversas condições e patologias. É muito descrita na inflamação crônica e na sua possível contribuição ao câncer de pulmão (BERMUDEZ et al. 2002).

Não encontramos associação desta citocina com nenhum dos grupos de voluntários sem câncer, o que de certa forma nos surpreendeu. ARA e DECLERCK (2010) relatam que apesar de mostrar níveis baixos e indetectáveis em condições fisiológicas normais, o aumento da IL6 já foi associada a inúmeras condições fisiológicas como dieta, estresse, obesidade e presença de infecções.

A análise deste resultado nos leva a difícil idealização de que nossos voluntários estivessem livres de qualquer uma destas situações durante a coleta das amostras de sangue, que por si só pode desencadear algum grau de estresse. Porém nossos resultados são similares ao de TAS et al. (2005), que também não encontrou diferença significativa entre pessoas saudáveis e portadores de câncer de pulmão de células não-pequenas.

Alguns estudos mostram que os níveis de IL6 também estão aumentados em pacientes com câncer de pulmão. Esta elevação pode estar relacionada a sua interação com várias vias de sinalização pró-

tumorigênicas, em sua coparticipação na promoção da inflamação do epitélio pulmonar, além de possível ação na angiogênese tumoral (YANAGAWA et al. 1995; BARNES et al. 2003; SCHELLER et al. 2006; SU et al. 2011). Outra hipótese para esta elevação é relatado por pesquisadores como LEWIS e POLLARD (2006) e SICA et al. (2008); que atribuem este evento às próprias células tumorais, que também podem produzir citocinas como a IL6.

YANAGAWA et al. (1995); KATSUMATA et al. (1996) e ENEWOLD et al. (2009), descreveram o aumento do nível da IL6 em pacientes com tumor de pulmão avançado. Em nossa pesquisa encontramos associação desta citocina com o fato de ser portador de câncer de pulmão, porém sem correlação com o estadiamento. Este resultado pode ser explicado pela limitação da casuística do grupo de pacientes com tumores avançados.

Da mesma maneira, o perfil da interleucina 1B ficou aquém do esperado, provavelmente devido à casuística e também ao fato de muitas amostras mostrarem valores iguais à IL6, abaixo do limite de detecção oferecido pelo *kit*. Não observamos diferenças significativas de IL1B dentre os grupos de pessoas saudáveis, tampouco entre tabagistas e ex-tabagistas.

Esta citocina é largamente descrita na inflamação pulmonar, tanto aguda quanto crônica, pois sob o uso do tabaco, as células do epitélio pulmonar podem produzir ou responder a ação direta desta citocina, com consequente dano tecidual (KUBO et al. 2005).

Entre todas as amostras analisadas, a IL1B somente mostrou correlação com ausência de metástase linfonodal. Não encontramos dados na literatura referente ao papel da IL1B na metástase linfonodal de

portadores de CPCNP. NAKAYAMA et al. (2002) fez experimentos em ratos com uma linhagem de adenocarcinoma gástrico (BV9) e observou que as células do tumor aderiram a células do endotélio linfático com afinidade oito vezes maior do que ao endotélio vascular em condições de estresse mecânico de fluxo, e que houve aumento significativo desta interação após pré-estimulação do endotélio linfático com IL1B. Esse dado experimental, muito preliminar, entretanto, diverge de nosso achado de níveis mais elevados desta citocina entre pacientes que não apresentam acometimento linfonodal.

Segundo WU et al. (2010), é bem estabelecido o fato de que esta citocina contribui para a progressão e metastatização tumoral, agindo em diversas frentes, como em moléculas de adesão, em células do estroma ou nas próprias células do tumor para promoção de neovascularização. Em experimentos *in vitro*, YANO et al. (2003) mostraram que células de uma linhagem de adenocarcinoma pulmonar secretam espontaneamente IL6, IL8, CCL2 e TNFA, mas quando há superexpressão da IL1B há consequente aumento da expressão gênica de algumas destas citocinas. Este evento favorece a produção de outros fatores, que em conjunto agem na promoção, progressão e metástase tumoral. Ao contrário desta pesquisa, encontramos uma correlação fraca da IL1B com as demais citocinas.

Para nossa surpresa, a quimiocina IL8 não mostrou diferença significativa entre os grupos, nem correlação com o hábito de fumar e carga tabágica. Ao contrário dos resultados da IL6 e IL1B, as amostras mostraram

valores detectáveis, e em muitos casos valores próximos ao limite superior de detecção.

Embora a IL8 seja bastante associada a condições patológicas pulmonares, influenciadas pelo uso contínuo do tabaco, em nosso estudo nem mesmo o grupo dos tabagistas mostrou resultados estatisticamente relevantes. Este resultado é bastante peculiar, pois em pesquisas como a de KUSCHNER et al. (1996) e KUBO et al. (2005) houve aumento significativo desta quimiocina relacionada a exposições agudas e crônicas ao tabaco.

De outra maneira, esta quimiocina também é amplamente descrita em pesquisas que tentam associar a inflamação ao câncer de pulmão, como o trabalho de ORDITURA et al. (2002), que, em seus experimentos com pacientes portadores de câncer de pulmão em estágio IV, observaram aumento expressivo desta quimiocina.

Considerando que nossos pacientes com câncer avançado também são aqueles que mostram a maior carga tabágica, com uma média de 70,49 maços-anos, estes resultados também nos mostraram que, possivelmente, o método utilizado para a análise da IL8 nestas amostras não foi o ideal e também tenha sofrido prejuízo devido à casuística obtida.

Em relação à CCL2, obtivemos resultados interessantes e promissores. Por ser uma quimiocina, a CCL2 tem ações mais específicas do que as citocinas em geral, e seu papel principal é regular a migração celular, especialmente agindo sobre células mononucleares. É produzida pelos próprios monócitos, mas em condições patológicas sua produção pode

se dar por células tumorais, e por células do estroma, como fibroblastos ou células endoteliais (UENO et al. 2000; ALLAVENA et al. 2008).

Nossos experimentos mostraram níveis mais elevados de CCL2 no grupo de portadores de tumor avançado quando comparado ao grupo controle e ao grupo de ex-tabagistas.

Em relação ao grupo de ex-tabagistas, este resultado nos levou a alguns questionamentos, pois estes voluntários estão abstêmios do cigarro há pelo menos um ano e têm em média uma história de carga tabágica de 21,8 maços-ano, o que os caracteriza como os de menor carga tabágica dentre os grupos com história de tabagismo. Podemos hipotetizar que estes fatores resultaram em valores de citocinas mais próximos aos do grupo controle.

A análise da CCL2 em nossas amostras também mostrou que esta quimiocina tem seus níveis significativamente mais elevados nos indivíduos com câncer, na presença de metástase e em indivíduos com estádios avançados agrupados.

Esta quimiocina diretamente recruta e ativa os monócitos em situações inflamatórias ou patológicas. Com propriedades imunossupressoras, atrai células T regulatórias para o foco da inflamação e inibe a função efetora das células T CD8⁺. Também está associada à promoção tumoral e ocorrência de metástases em muitos tumores sólidos, sendo que no câncer de pulmão há evidências de ações pró e anti-tumorigênicas (UENO et al. 2000; LU et al. 2006; FRIDLENDER 2010; 2011).

Em tumores sólidos, como o de pulmão, a interação entre o tumor e seu microambiente é essencial para a progressão tumoral e a promoção de metástases. Muitos estudos mostram que este fenômeno está relacionado aos macrófagos, pois são as principais células dos infiltrados inflamatórios tumorais. Estas células podem apresentar funções diferentes, dependendo do subgrupo funcional em que se diferenciam. Os macrófagos M1 agem na destruição de células e patógenos e produzem citocinas pró-inflamatórias, e os macrófagos do pólo M2 são macrófagos associados a reparo tecidual e promotores de angiogênese (ZHANG et al. 2010).

As células tumorais também secretam mediadores que regulam o tráfego dos macrófagos ao seu microambiente, como a CCL2. Dentro do ambiente tumoral estas células se diferenciam em um fenótipo específico e passam a ser chamadas de TAMs (macrófagos associados ao tumor) (LEWIS e POLLARD 2006; MOSSER e EDWARDS 2008).

De acordo com SICA et al. (2008), há correlação entre os níveis de CCL2 produzidos por células tumorais e a densidade de TAMs presentes em certos tipos de tumores, como câncer de mama e de ovário. Sob efeito do microambiente tumoral, os TAMs desenvolvem habilidades e características de células neoplásicas e ações pró-tumorigênicas como a indução de angiogênese (UENO et al. 2000; OHTA et al. 2003; QIAN e POLLARD 2010).

Não sabemos de fato se os níveis de CCL2 aferidos nas amostras de soro da nossa pesquisa são secretados diretamente pelas células tumorais. Para tanto, através de imunoistoquímica, poderíamos analisar os tumores

dos pacientes em busca da expressão tecidual de CCL2. ARENBERG et al. (2000), analisou a expressão de CCL2 em células tumorais de CPCNP, assim como em células do estroma, e verificou que este, de fato, está elevado nas células tumorais em comparação com tecido pulmonar normal.

CAI et al. (2009), em um grande estudo sobre CPCNP, analisaram citocinas no sangue de portadores de CPCNP e em sobrenadantes de culturas de linhagens tumorais, verificando que, em comparação às pessoas sem tumor e às culturas de células normais, o nível de CCL2 está significativamente mais elevado nas duas primeiras situações. Outro resultado importante destes autores foi a correlação do aumento desta citocina no sangue com a presença de metástase óssea.

Nosso estudo não correlacionou o aumento da CCL2 especificamente à presença de metástase óssea, mas sim à presença de metástase como um todo. Em contrapartida, encontramos correlação de níveis mais altos desta quimiocina com estádios avançados (IIIA irressecável, IIIB e IV), enquanto que MIOTTO et al. (2007) encontraram níveis similares de CCL2 plasmático entre pacientes tabagistas portadores de câncer de pulmão em estágios iniciais e avançados.

Acreditamos que nosso resultado é bastante interessante por ser um dos poucos, se não o primeiro, a avaliar prospectivamente os níveis de citocinas circulantes, de forma comparativa entre indivíduos normais, fumantes, ex-fumantes e portadores de câncer na população brasileira.

Pretendemos no futuro, completar o número de indivíduos programados em cada grupo, correlacionar o nível sérico de CCL2 com a

imunoexpressão de CCL2 nas amostras de tecido das biópsias correspondentes e, eventualmente, avaliar o impacto de CCL2 no risco de progressão e morte dos pacientes.

Precisamos ainda de outros experimentos para validar nossos achados, principalmente por estarmos pesquisando uma doença tão heterogênea como o câncer de pulmão. Entretanto, os dados relativos a CCL2 sugerem que esta citocina apresenta uma associação importante com volume de doença (*tumor burden*) e talvez pudesse ser empregada como um marcador rápido e facilmente acessável do estágio da doença. Além disso, face ao papel de CCL2 no recrutamento e ativação de macrófagos e da importância destas células na promoção de neoangiogênese, metástase e invasão tecidual, poderia ser, eventualmente, explorado como um alvo potencial para terapias dirigidas ao microambiente tumoral.

6 CONCLUSÃO

A população estudada foi majoritariamente masculina e da cor branca, e os grupos mostraram bastante heterogeneidade em relação à idade.

A avaliação dos níveis circulantes das citocinas IL1B, IL6, IL8 e CCL2 mostraram perfis diferentes entre os grupos, como esperávamos.

As citocinas IL1B e IL16 mostraram valores abaixo do limite de detecção do *kit* utilizado, prejudicando a análise do perfil destas citocinas em todos os grupos.

A IL6 mostrou associação com a presença de câncer.

IL1B mostrou associação com a ausência de metástase linfonodal.

A IL8 não mostrou associação com nenhum dos grupos do estudo.

A quimiocina CCL2 mostrou-se significativamente mais elevada entre os portadores de câncer de pulmão avançado quando comparados ao grupo controle ou aos ex-tabagistas. Sua elevação também associou-se a presença de metástases.

Observamos correlação dos níveis dos mediadores entre si, sendo fraca entre CCL2 e IL6, da mesma forma entre CCL2 e IL1B e entre CCL2 e IL8. De maneira semelhante, houve correlação fraca entre IL8 e IL6, e correlação moderada entre IL1B e IL6.

Na nossa amostra, não houve correlação do nível destas citocinas com a carga tabágica entre os tabagistas atuais e ex-tabagistas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. **Chest** 2003; 123:21S-49S.

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. **Crit Rev Oncol Hematol** 2008; 66:1-9.

Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. **Eur J Cancer** 2010; 46:1223-31.

Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, et al. Macrophage infiltration in human non-small-cell lung cancer: the role of CC chemokines. **Cancer Immunol Immunother** 2000; 49:63-70.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. **Eur Respir J** 2003; 22:672-88.

Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2002; 22:1668-73.

de Boer WI, Sont JK, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken JH, Hiemstra PS. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. **J Pathol** 2000; 190:619-26.

Borgia JA, Basu S, Faber LP, et al. Establishment of a multi-analyte serum biomarker panel to identify lymph node metastases in non-small cell lung cancer. **J Thorac Oncol** 2009; 4:338-47.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med** 2006; 354:610-21.

Chansky K, Sculier JP, Crowley JJ, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project: prognostic factors and pathologic TNM stage in surgically managed non-small cell lung cancer. **J Thorac Oncol** 2009; 4:792-801.

Cai Z, Chen Q, Chen J, et al. Monocyte chemotactic protein 1 promotes lung cancer-induced bone resorptive lesions in vivo. **Neoplasia** 2009; 11:228-36.

Comandini A, Rogliani P, Nunziata A, Cazzola M, Curradi G, Saltini C. Biomarkers of lung damage associated with tobacco smoke in induced sputum. **Respir Med** 2009; 103:1592-613.

Corrêa PC, Barreto SM, Passos VM. Smoking-attributable mortality and years of potential life lost in 16 Brazilian capitals, 2003: a prevalence-based study. **BMC Public Health** 2009; 26:206.

Dasari V, Gallup M, Lemjabbar H, Maltseva I, McNamara N. Epithelial-mesenchymal transition in lung cancer: is tobacco the "smoking gun"? **Am J Respir Cell Mol Biol** 2006; 35:3-9.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC Cancer Staging Manual**. Chicago: Springer; 2010. Lung; p.299-323.

Enewold L, Mechanic LE, Bowman ED, et al. Serum concentrations of cytokines and lung cancer survival in African Americans and Caucasians. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:215-22.

Farlow EC, Vercillo MS, Coon JS, et al. A multi-analyte serum test for the detection of non-small cell lung cancer. **Br J Cancer** 2010; 103:1221-8.

Fridlender ZG, Buchlis G, Kapoor V, et al. CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. **Cancer Res** 2010; 70:109-18.

Fridlender ZG, Kapoor V, Buchlis G, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 blockade inhibits lung cancer tumor growth by altering macrophage phenotype and activating CD8⁺ cells. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2011; 44:230-7.

Guo NL, Tosun K, Horn K. Impact and interactions between smoking and traditional prognostic factors in lung cancer progression. **Lung Cancer** 2009; 66:386-92.

Hart K, Haugen A, Zienolddiny S. Allele-specific induction of IL1B -31T/C promoter polymorphism by lung carcinogens. **Mutat Res** 2008; 656:14-8.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics, 2011. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Ministério da Saúde. Instituto do Câncer. **Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

[IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa nacional por amostra de domicílio tabagismo 2008**. Disponível em: <URL:http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2008/suplementos/tabagismo/pnad_tabagismo.pdf> [2012 jan 10]

Katsumata N, Eguchi K, Fukuda M; et al. Serum levels of cytokines in patients with untreated primary lung cancer. **Clin Cancer Res** 1996; 2:553-9.

Kubo S, Kobayashi M, Masunaga Y, et al. Cytokine and chemokine expression in cigarette smoke-induced lung injury in guinea pigs. **Eur Respir J** 2005; 26:993-1001.

Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. **Eur Respir J** 1996; 9:1989-94.

Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. **Cancer Res** 2006; 15; 66:605-12.

Lee G, Walser TC, Dubinett SM. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. **Curr Opin Pulm Med** 2009; 15:303-7.

Li Y, Du H, Qin Y, Roberts J, Cummings OW, Yan C. Activation of the signal transducers and activators of the transcription 3 pathway in alveolar epithelial cells induces inflammation and adenocarcinomas in mouse lung. **Cancer Res** 2007; 67:8494-503.

Lu Y, Cai Z, Galson DL, et al. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) acts as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion. **Prostate** 2006; 66:1311-8.

Mackay J, Amos A. Women and tobacco. **Respirology** 2003; 8:123-30.

Miotto D, Boschetto P, Bononi I, et al. CC ligand 2 levels are increased in LPS stimulated peripheral monocytes of patients with non-small cell lung cancer. **Respir Med** 2007 101:1738-43.

Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. **Mayo Clin Proc** 2008; 83:584-94.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immuno** 2008; 8:958-69.

Nakayama H, Kitayama J, Nagawa H. Rat gastric adenocarcinoma cell line BV9 avidly adheres to lymphatic endothelium under lymphatic flow condition. **J Exp Clin Cancer Res** 2002; 21(2):289-94.

Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. **Int J Oncol** 2003; 22:773-8.

Orditura M, De Vita F, Catalano G, et al. Elevated serum levels of interleukin-8 in advanced non-small cell lung cancer patients: relationship with prognosis. **J Interferon Cytokine Res** 2002; 22:1129-35.

Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. **BMJ** 2000; 321:323-9.

Pine SR, Mechanic LE, Enewold L, et al. Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer. **J Natl Cancer Inst** 2011; 103:1112-22.

Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell** 2010; 141:39-51.

Qu P, Roberts J, Li Y, et al. Stat3 downstream genes serve as biomarkers in human lung carcinomas and chronic obstructive pulmonary disease. **Lung Cancer** 2009a; 63:341-7.

Qu P, Du H, Wang X, Yan C. Matrix metalloproteinase 12 overexpression in lung epithelial cells plays a key role in emphysema to lung bronchioalveolar adenocarcinoma transition. **Cancer Res** 2009b; 69:7252-61.

Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. **Int J Cancer** 2008; 123:1-7.

Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2002; 283:L867-73.

Rusznak C, Mills PR, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Lozewicz S. Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1beta and sICAM-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2000; 23:530-6.

Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol Rev** 2000; 177:195-203.

Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. **Scand J Immunol** 2006; 63:321-9.

Schulz C, Wolf K, Harth M, Krätzel K, Kunz-Schughart L, Pfeifer M. Expression and release of interleukin-8 by human bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease, smokers, and never-smokers. **Respiration** 2003; 70:254-61.

Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. **Nat Rev Cancer**. 2008; 8:887-99.

Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. **Cancer Lett** 2008; 267:204-15.

Sin DD, Man SF, McWilliams A, Lam S. Progression of airway dysplasia and C-reactive protein in smokers at high risk of lung cancer. **Am J Respir Crit Care Med** 2006; 173:535-9.

Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. **Nat Rev Immunol** 2002; 2:372-7.

Stämpfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. **Nat Rev Immunol** 2009; 9:377-84.

Stathopoulos GT, Sherrill TP, Cheng DS, et al. Epithelial NF-kappaB activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007; 104:18514-9.

Su C, Zhou C, Zhou S, Xu J. Serum cytokine levels in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival. **Med Oncol** 2011; 28:1453-7.

Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. **J Clin Oncol** 2007; 25:561-70.

Tas F, Duranyildiz D, Argon A, et al. Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in advanced-stage non-small cell lung cancer. **Med Oncol** 2005; 22:353-8.

Ueno T, Toi M, Saji H, et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3282-9.

Walser T, Cui X, Yanagawa J, et al. Smoking and lung cancer: the role of inflammation. **Proc Am Thorac Soc** 2008; 5:811-5.

[WHO] World Health Organization. **Tobacco free initiative (TFI)**. Disponível em: <URL:<http://www.who.int/entity/tobacco/research/legislation>> [2011 nov 10]

Woenckhaus M, Klein-Hitpass L, Grepmeier U, et al. Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. **J Pathol** 2006; 210:192-204.

Wu KS, Zhou X, Zheng F, Xu XQ, Lin YH, Yang J. Influence of interleukin-1 beta genetic polymorphism, smoking and alcohol drinking on the risk of non-small cell lung cancer. **Clin Chim Acta** 2010; 411:1441-6.

Yanagawa H, Sone S, Takahashi Y, et al. Serum levels of interleukin 6 in patients with lung cancer. **Br J Cancer** 1995; 71:1095-8.

Yano S, Nokihara H, Yamamoto A, et al. Multifunctional interleukin-1beta promotes metastasis of human lung cancer cells in SCID mice via enhanced expression of adhesion-, invasion- and angiogenesis-related molecules. **Cancer Sci** 2003; 94:244-52.

Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling by the SOCS and Spred family proteins. **Keio J Med** 2009; 58:73-83.

Zhang J, Patel L, Pienta KJ. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. **Cytokine Growth Factor Rev** 2010; 21:41-8.

Anexo 1 - Ficha de coleta de dados

1. Identificação

RGH: _____

Iniciais: _____

Idade: _____

Sexo: (1) Fem (2) Masc

Cor: (1) Branca (2) Negra (3) Parda (4) Asiático (99) NA

Data da consulta/coleta: _____

Câncer de pulmão: (1) Sim (2) Não (**se Não ir para 3**)

Diagnóstico: (1) Adenocarcinoma (2) CEC (3) Grandes células (4) Bronquíolo-alveolar (5) Outra histologia Qual? _____ (6) Não especificada

Data do diagnóstico: ____/____/____

Status performance (ECOG): (1) 0 (2) 1 (3) 2 (4) 3 (5) 4 (99) NA

2. Estadiamento e tratamento

Estádio Clínico: (1) IA (2) IB (3) IIA (4) IIB (5) IIIA (6) IIIB (7) IV (8) 0 (99) NA

Tumor: (1) T1a (2) T1b (3) T2a (4) T2b (4) T3 (5) T4 (6) Tis (99) NA

Linfonodos (1) N1 (2) N2 (3) N3 (4) N0 (99) NA

Metastáse: (1) M1a (2) M1b (3) M0

Sítios de metástase: _____

Cirurgia: (1) Sim (2) Não

Data da cirurgia: ____/____/____

Tipo de cirurgia: (1) Ressecção em cunha (2) Lobectomia (3) Bilobectomia (4) Pneumectomia (5) Segmentectomia (6) Outra

Qual? _____

3. Dados clínicos

Tabagista: (1) Sim (2) Não

Duração (anos):

Tipo de tabaco: (1) Cigarro (2) Charuto (3) Cachimbo (4) Outro Qual? _____

Número de maços (dia):

Maços-ano:

Parou de fumar: (1) Sim (2) Não

Data:

Etilista: (1) Sim (2) Não

Duração (anos):

Tipo de bebida:

Quantidade:

Frequência:

Parou de beber: (1) Sim (2) Não

Uso de drogas: (1) Sim (2) Não (3) Qual? _____

Comorbidades: (1) DM (2) HAS (3) DPOC (4) IRC (5) ICo (6) Dislipidemia

(7) Hipotireoidismo (8) Outra

Qual? _____

Medicações em uso: _____

Alergia: (1) Sim (2) Não

Se sim, especificar: _____

História familiar de câncer: (1) Sim (2) Não (99) NA

Se sim, especificar: _____

Hemograma (se disponível):

Hb: _____ Ht: _____ Leuc: _____ No: _____ Eo: _____

Baso: _____ Ly: _____ Mo: _____ Plaq: _____

Uso de antibiótico (últimos 30dias): (1) Sim (2) Não

Quais?: _____

Data de início: _____ Data de término: _____

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PARTICIPANTE

TÍTULO: “Influência do consumo de tabaco e do câncer de pulmão de células não-pequenas nos níveis circulantes de mediadores de resposta inflamatória”.

Pesquisador Responsável: Dr. Fábio José Haddad/CRM-SP 73313

Autora do Estudo: Enfermeira Ana Carolina Ferreira/COREN-SP 81543

INSTITUIÇÃO: Hospital AC Camargo

R. Prof. Antonio Prudente, 211 – Liberdade, São Paulo-SP.

OBJETIVO DESTE ESTUDO

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar deste estudo cujo objetivo é determinar, através de exames laboratoriais, algum padrão ou perfil de resposta inflamatória (conjunto de processos que resultam da produção de substâncias pelo corpo para eliminar agressões às suas células ou órgãos) em resposta ao consumo de tabaco ou ao câncer. Acreditamos que tal achado poderia ser útil para orientação dos indivíduos que desejam parar de fumar, na identificação e seguimento de indivíduos com risco elevado de desenvolver câncer de pulmão e no melhor entendimento da patogênese (mecanismos e processos envolvidos com o desenvolvimento do câncer) do câncer de pulmão e sua relação com a resposta inflamatória.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Este estudo incluirá indivíduos com idade superior ou igual a 18 anos, no período de Maio de 2010 a Julho de 2011. Estes indivíduos (você) serão recrutados nos Ambulatórios de Hemoterapia e Hematologia (Banco de Sangue), Cirurgia Torácica, Oncologia Clínica e Psiquiatria-GAT (Grupo de Apoio ao Tabagista) do Hospital A.C. Camargo, no período de Maio de 2010 a Julho de 2011. Sua participação no estudo consistirá em permitir a coleta de 10 ml de amostra de sangue para análises laboratoriais de algumas substâncias envolvidas com inflamação. A coleta de sangue será realizada por punção venosa (feita com “scalp” e seringa após a limpeza adequada do local de punção) em uma veia do braço. **Esta coleta ocorrerá durante alguma visita para tratamento, doação de sangue voluntária ou consulta que você faça ao Hospital A C Camargo em algum dos departamentos médicos supracitados, após entrevista e assinatura deste termo. Para os pacientes submetidos à cirurgia torácica, a coleta será realizada antes e 30 dias após a intervenção cirúrgica. Em relação aos colaboradores do hospital que concordarem**

em participar do estudo, a coleta será pré-agendada e realizada fora do horário de trabalho, no ambulatório da Oncologia Clínica.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Os riscos a que você estará sujeito são os riscos inerentes a qualquer punção venosa como: dor local no ato da punção, sangramento no local, hematoma e raramente flebite (infecção na veia puncionada), mas isto será evitado pela limpeza adequada do local de punção e realização do procedimento por profissional capacitado.

Os exames realizados em seu sangue não implicarão em nenhuma mudança em seu tratamento ou qualquer conduta médica que esteja sendo realizada ou venha a ser realizada no seu seguimento, uma vez que todos esses marcadores são ainda experimentais, não havendo nenhum prejuízo para o sucesso das condutas médicas outras aos quais você esteja se submetendo. Essa pesquisa poderá, contudo, vir a beneficiá-lo, e outros indivíduos na sua condição, caso os resultados mostrem alguma associação **com o fato de ter câncer**, por exemplo, ou um melhor resultado dos tratamentos aos quais você se submeterá. Nesta situação, você será contatado e informado dos resultados, se estes forem de fato mudar a condução do seu caso.

Esta pesquisa não oferece nenhuma remuneração aos participantes, nem implica em custos extras para o mesmo ou sua seguradora de saúde.

CONFIDENCIALIDADE

Sua identidade, incluindo seu nome completo e as informações obtidas sobre você durante este estudo permanecerão confidenciais. Os resultados deste estudo podem ser publicados em jornais científicos ou apresentados em encontros médicos, mas você não será identificado pelo nome.

ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) deste hospital. Se você decidir participar, você deverá primeiramente assinar este Termo de Consentimento Informado declarando seu acordo em participar espontaneamente, e confirmando que você leu e entendeu todas as informações fornecidas neste termo. É garantida a sua liberdade de se retirar deste estudo a qualquer hora que você desejar, sem causar nenhum prejuízo à continuidade do seu tratamento ou acompanhamento nesta instituição.

CONTATOS

Entre em contato com os responsáveis pelo estudo para esclarecer quaisquer dúvidas que você venha a ter.

Autora do estudo: Enfermeira Ana Carolina Ferreira

Telefone: (11) 94929583

Pesquisador responsável: Dr Fábio José Haddad

Telefone: (11) 81212468

Se não houve fornecimento de informações/ esclarecimentos suficiente, por favor, entre em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos(CEP)

Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - AC Camargo/SP

Telefone: (11) 2189-5020

cephcancer@hcancer.org.br.

CONSENTIMENTO EM PARTICIPAR

Considero ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo **“Influência do consumo de tabaco e do câncer de pulmão de células não-pequenas nos níveis circulantes de mediadores de resposta inflamatória”**

Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre minha decisão em participar deste estudo. Estão claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados e seus riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação neste estudo é voluntária e isenta de despesas.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o estudo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste serviço.

Nome do Paciente: _____

Assinatura do Paciente:

Data: ____ / ____ / ____

Declaro que esclareci todos os propósitos do estudo, solucionei todas as dúvidas do paciente e obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Dr. Fábio José Haddad

Data: ____ / ____ / ____

Pesquisador Responsável

**Anexo 3 - Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital
A.C. Camargo**

São Paulo, 04 de Junho de 2010.

**Ao
Dr. Fábio José Haddad**

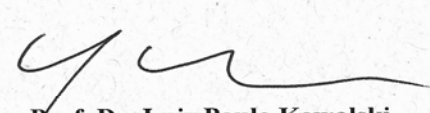
**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1388/10
“Influência do consumo de tabaco e do câncer de pulmão de células não-pequenas nos
níveis circulantes de mediadores de resposta inflamatória”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 25/05/2010, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 13/04/2010, aprovaram a realização do projeto em referência, datado de 10/05/2010, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Maio/2010 – versão 2) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre o Plano de Recrutamento dos Sujeitos de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela Obtenção do TCLE;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Infra-Estrutura e Instalações;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Hemoterapia e Hematologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Psiquiatria;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia Torácica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à
assistente do CEP dentro de 6 meses.**

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1