

**Paula Roberta Aguiar Pastrez**

**Análise da relação de citocinas e TREX-1 com o carcinoma de células escamosas do esôfago**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho

Coorientadora: Profa. Dra. Vânia Sammartino  
Mariano

Barretos, SP

2021

P291a Pastrez, Paula Roberta Aguiar.

Análise da relação de citocinas e TREX-1 com o carcinoma de células escamosas do esôfago. / Paula Roberta Aguiar Pastrez. - Barretos, SP 2022.  
134 f. : il.

Orientadora: Adhemar Longatto Filho.  
Coorientador: Vânia Sammartino Mariano.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2022.

1. Citocinas. 2. Câncer de Esôfago. 3. Interleucina-8. 4. Diagnóstico.  
5. Inflamação. 6. Biomarcadores. I. Autor. II. Título.

CDD 571.633

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Nayara Bernardo de Mattos CRB 8/10172  
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos



**INSTITUTO DE ENSINO & PESQUISA**

Rua Antenor Duarte Villela, 1331  
Bairro Dr. Paulo Prata  
Barretos (SP), Brasil  
CEP: 14.784-400  
Telefone: +55 (17) 3321-6600

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Paula Roberta Aguiar Pastrez Ramalho**

Título: "Análise da relação de citocinas e TREX-1 com o carcinoma de células escamosas do esôfago"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 29/04/2021

Banca Examinadora:

Dr. Antônio Gil Pereira de Castro

Instituição: Universidade do Minho.

Dr. Lúcio Lara Santos

Instituição: Universidade do Porto.

Dr. Enrique Boccardo

Instituição: Universidade de São Paulo.

Dr. Adhemar Longatto Filho

Orientador

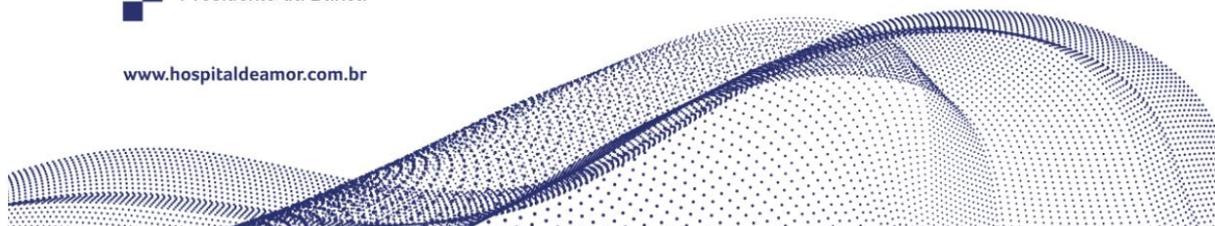
Dra. Vânia Sammartino Mariano

Coorientador

Dra. Lidia Rebolho Arantes

 Presidente da Banca

[www.hospitaldeamor.com.br](http://www.hospitaldeamor.com.br)



## SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Hospital de Câncer de Barretos (Fundação PIO XII) através de bolsa de doutorado institucional; Capes/PDSE através de bolsa de doutorado sanduiche no exterior (processo número 88881.135146/2016-01); *Foundation for Science and Technology* (FCT) projetos PTDC/MED-ONC/28658/2017, UIDB/50026/2020 and UIDP/50026/2020, e projetos NORTE-01-0145-FEDER-000013 e NORTE-01-0145-FEDER-000023, financiados por *Norte Portugal Regional Operational Programme* (NORTE 2020), através do Acordo de Parceria PORTUGAL 2020 Partnership Agreement, através do *European Regional Development Fund (ERDF)*.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão das agências de fomento.

Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

À Deus, minha família, amigos, colegas de trabalho e orientadores pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Adhemar Longatto Filho**, por todos os ensinamentos e pela impecável condução deste meu trabalho. Obrigada por sempre me atender prontamente e mesmo com a distância, conseguir acalmar minhas ansiedades e angustias, com toda sua paciência e serenidade. Obrigada pela paciência em entender as dificuldades que enfrentei no final desse doutorado, o senhor é um ser humano incrível. Eu tenho muito orgulho de ter esse exemplo de pessoa como orientador!

À minha coorientadora e amiga, Dra. **Vânia Sammartino Mariano**, por lançar esse desafio que foi a execução desse projeto com um tema que foi tão desafiador para mim. Em meio a tantas voltas que a vida deu durante esses anos do doutorado, a nossa distância me obrigou a ser mais independente e com isso amadurecer muito. Você é uma grande amiga que ganhei de presente do mestrado, que me fez muita falta durante o doutorado e que sempre terá um lugar no meu coração. O meu imenso carinho, gratidão e admiração por você!

A meus pais, **Roberta e Paulo**, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam A MELHOR de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

À toda a **minha família**, avós, tios e tias, os quais amo muito, obrigada pelo carinho e incentivo.

Às minhas **queridas amigas** que tanto me aguentaram falando e chorando por esse doutorado, vocês foram fundamentais para não me deixarem enlouquecer rsrs. Obrigada pelo carinho e amizade de vocês!

Aos **amigos do CPOM** que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando. Obrigada por dividirem comigo as angústias e alegrias e ouvirem meus desabaços durante nossos incontáveis cafés, almoços e momentos de descontração. Vocês foram fundamentais durante todos esses anos e quero levá-los comigo para toda a vida.

À minha grande amiga **Rhafa**, muito obrigada por muitas vezes fazer o papel de me orientar com toda sua sabedoria, paciência e forma desenrolada de resolver todo e qualquer problema! Você é única amiga! Muito obrigada por tudo, o final desse trabalho não seria possível sem a sua ajuda!

Aos **biólogos do CPOM** que foram fundamentais para a execução desse trabalho, em especial à **Carol Laus** pela amizade e solidariedade de sempre, por me ouvir, aconselhar e por toda ajuda e suporte com as técnicas de análises dos polimorfismos; **André**, muito obrigada pela prontidão em me ajudar e em alguns momentos aprender junto comigo sobre as análises da citometria, você foi fundamental para a realização desse experimento que foi um dos principais do meu trabalho; **Renato**, nunca esquecerei o intensivão de cultura de células

que tive com você antes de ir para Portugal, se não fosse os seus ensinamentos não sei o que seria de mim lá. Obrigada por ser sempre tão atencioso e prestativo! **Karina, Leticia...** sempre prontas e dispostas a nos ajudar em tudo o que precisamos. Vocês ficarão para sempre em meu coração!

A todos do **Laboratório ICVS da Universidade do Minho, Portugal**, por me receberem tão bem durante quatro inesquecíveis meses do doutorado sanduiche, em especial à **Ana Margarida Barbosa**, uma amiga portuguesa que ganhei e tenho muito carinho! Dedicou todo o seu tempo a me ensinar e ajudar a desenvolver meu trabalho durante esses quatro meses! Todo o meu agradecimento será pouco a você! Ao Dr **Antônio Gil** e Dr **Egídio Torrado** que me orientaram de forma brilhante durante esse período, e que foram fundamentais para a execução da parte envolvendo modelo animal deste trabalho. O meu eterno agradecimento ao acolhimento e ensinamentos de vocês. Sem dúvida foi um período da minha vida que jamais será esquecido.

Aos **pacientes** do Hospital de Câncer de Barretos e AME Clínico de Barretos que participaram espontaneamente deste trabalho. Por causa deles é que esta tese se concretizou. Vocês merecem meu eterno agradecimento!

Aos colaboradores do **Departamento de Endoscopia do Hospital de Câncer de Barretos**, em especial à Dra Denise Peixoto Guimarães, Dr. Gilberto Fava, Dra Kelly Menezio Giardina Oliveira, Dr Leonorado Nogueira Taveira, à toda a equipe de enfermagem, técnicos de enfermagem e recepcionistas, pela imensa ajuda durante o longo período de coleta de amostras e recrutamento de pacientes. A ajuda de cada um de vocês foi fundamental para a execução desse projeto.

Ao **Departamento do Biobanco**, sem exceção, pelo cuidadoso trabalho de armazenamento de amostras dos pacientes para os projetos e confecção de lâminas para o estudo.

Ao **Departamento de imunohistoquímica**, sem exceção, pela prontidão em realizar as reações deste estudo nos intervalos daquelas para a rotina do hospital.

Ao **Departamento do SAME**, pela prontidão em separar os inúmeros prontuários.

Aos membros das bancas de acompanhamento e qualificação Dra **Edenir Inez Palmero** e Dr **Enrique Boccardo**, pelas sugestões, atenção e grande colaboração para a finalização deste estudo.

Aos **estatísticos** do Núcleo de Apoio ao Pesquisador, em especial ao **Marco Antônio**, pela realização das análises estatísticas desde o meu mestrado. Muito obrigada pela paciência e por fazer tudo de maneira tão cuidadosa.

*Aos membros da banca de defesa, Dr **Enrique Boccardo**, Dr **Antônio Gil Pereira Castro** e Dr **Lucio Lara Santos**, por aceitarem prontamente em participar desse momento importante da minha vida.*

*Ao **Programa de Pós-graduação** do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Amor.*

*À **secretaria de pós-graduação**, sem excessão, pela prontidão em ajudar sempre no que fosse possível.*

*A todos os **pesquisadores** do CPOM e IEP.*

*Ao **Grupo de Pesquisa da Dra Lara Termini** no Laboratório de Inovação em Câncer do ICESP (Faculdade de Medicina da USP São Paulo), em especial à Dra **Laura Termini**, Dr **Enrique Boccardo** e **Rafaella Almeida** pela parceria na execução das imunohistoquímicas de TREX1.*

*Ao **Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP) do Hospital de Amor** por financiar esse projeto de pesquisa com a bolsa de doutorado.*

*À **CAPES** pela bolsa de doutorado sanduiche através do Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (PDSE).*

*Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!*

*“O que você faz com amor e cuidado tem uma chance de fazer diferença, tanto para você como para a vida de outras pessoas. Tudo o que se faz sem amor e sem convicção é fadado ao fracasso e à perda de tempo, para você e para os outros” (Wim Wenders).*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Câncer de esôfago e fatores de risco</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Biomarcadores para o câncer esofágico</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Citocinas</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2</b>	<b>TREX1</b>	<b>7</b>
<b>1.3</b>	<b>Modelo animal de CE</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral</b>	<b>12</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>13</b>
<b>4.1</b>	<b>Etapa realizada com amostras de humanos</b>	<b>13</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Delineamento, definição da população do estudo e tamanho amostral</b>	<b>13</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Considerações éticas</b>	<b>15</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Quantificação do nível plasmático de citocinas</b>	<b>16</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Análise de polimorfismos de genes das citocinas</b>	<b>16</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Imunohistoquímica para avaliação de TREX1</b>	<b>17</b>
<b>4.2</b>	<b>Etapa com modelo animal</b>	<b>18</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Linhagem celular</b>	<b>18</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Modelo animal de tumor esofágico</b>	<b>19</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Isolamento de células dos tumores primários</b>	<b>20</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Determinação das células imunológicas predominantes nos tumores induzidos em animais por Citometria de fluxo (FACS)</b>	<b>21</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Realização de cortes para montagem de lâminas histológicas</b>	<b>22</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Avaliação da expressão de mRNA</b>	<b>22</b>
<b>4.3</b>	<b>Análises estatísticas</b>	<b>24</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
	<b>Etapa realizada com amostras de humanos</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Análise do perfil de citocinas em pacientes com CEC de esôfago (Grupo caso 1) e indivíduos saudáveis</b>	<b>28</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Caracterização da população do estudo</b>	<b>28</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Quantificação dos níveis plasmáticos de citocinas</b>	<b>31</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise da sobrevivência de pacientes com CEC de esôfago</b>	<b>33</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise do SNP IL-8 (rs4073) -251A&gt;T</b>	<b>42</b>
<b>5.4</b>	<b>Coleta prospectiva de sangue e informações sociodemográficas e clinicopatológicas de pacientes com CEC de esôfago para avaliação do perfil plasmático de citocinas</b>	<b>45</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Caracterização da população de estudo</b>	<b>45</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Quantificação dos níveis plasmáticos das citocinas</b>	<b>50</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Análise da sobrevivência de pacientes com CEC de esôfago (Grupos Caso 1 e 2)</b>	<b>52</b>
<b>5.5</b>	<b>Padronização anticorpo anti-TREX1</b>	<b>60</b>
<b>5.6</b>	<b>Análise da expressão de TREX1</b>	<b>64</b>
	<b>Etapa com modelo animal</b>	<b>74</b>
<b>5.7</b>	<b>Injeção de células tumorais em animais B6</b>	<b>74</b>
<b>5.8</b>	<b>Injeção de células tumorais em animais NOD scid gamma (NSG)</b>	<b>75</b>
<b>5.9</b>	<b>Processamento de materiais biológicos coletados dos animais</b>	<b>76</b>
<b>5.10</b>	<b>Avaliação da expressão de mRNA por PCR em tempo real</b>	<b>77</b>
<b>5.11</b>	<b>Determinação das células imunológicas predominantes nos tumores induzidos em animais com o uso de Citometria de fluxo (FACS)</b>	<b>80</b>
<b>5.12</b>	<b>Análise do infiltrado tumoral em lâminas histológicas</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>91</b>

<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>92</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>101</b>
	<b>Anexo A</b> - Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos	<b>101</b>
	<b>Anexo B</b> - Carta de aprovação do estudo pela Subcomissão de Ética para as Ciências da Vida e da Saúde da Universidade do Minho, Braga, Portugal	<b>107</b>
	<b>Anexo C</b> – Instrumento de coleta de dados (Grupo caso 1 e controle 1)	<b>108</b>
	<b>Anexo D</b> – Instrumento de coleta de dados clínicos (Grupo caso 1)	<b>112</b>
	<b>Anexo E</b> – TCLE Grupo Caso 2	<b>113</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fluxograma representando o delineamento do estudo e as amostras biológicas utilizadas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 15
- Figura 2** – Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global dos indivíduos com câncer de esôfago (n=70). Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 39
- Figura 3** - Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global correlacionados com variáveis estatisticamente significativas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 40
- Figura 4** – Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global dos indivíduos com câncer de esôfago correlacionada com o polimorfismo IL8-251A>T (rs4073) (n=61). Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 44
- Figura 5** – Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global dos indivíduos com câncer de esôfago (n=113). Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 57
- Figura 6** - Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global correlacionados com variáveis estatisticamente significativas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 57
- Figura 7** – Padronização do anticorpo anti-TREX1 (ab52947) em CEC de esôfago e carcinoma de colo uterino. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 61
- Figura 8** – Padronização do anticorpo anti-TREX1 comparando os anticorpos ab52947 e GR57779-4 em lâminas de adenocarcinoma de colo uterino. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 62
- Figura 9** – Padronização do anticorpo anti-TREX1 comparando os anticorpos ab83890 e GR57779-4 em lâminas de adenocarcinoma de colo uterino. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 63

- Figura 10** – Padronização do anticorpo ab185228 anti-TREX1, após realização de troca pela empresa. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 63
- Figura 11** – Imunohistoquímica para detecção de TREX1 em tecidos esofágicos. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 67
- Figura 12** – Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global e correlacionada com expressão de TREX1 em pacientes com câncer de esôfago. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 73
- Figura 13** – Curva de crescimento dos tumores nos camundongos NSG inoculados com as linhagens Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021. 76
- Figura 14** – Procedimento de coleta, pesagem e fragmentação dos tumores nos animais NSG, induzidos pelas linhagens Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021. 77
- Figura 15** – Gráficos de barras da expressão relativa dos genes de interesse realizados por PCR em tempo real. Universidade do Minho, Portugal, 2021. 78
- Figura 16** - Gráficos de expressão relativa dos genes de interesse realizados por PCR em tempo real. Universidade do Minho, Portugal, 2021. 79
- Figura 17** - Dados de citometria de fluxo representativos de leucócitos polimorfonucleares intratumorais (CD11b + Ly6G +) em camundongos com tumor Kyse-30 ou Kyse-410. Universidade do Minho, Portugal, 2021. 80
- Figura 18** – Avaliação do infiltrado intratumoral de células imunes nos tumores induzidos pelas linhagens Kyse 30 e Kyse 410, por citometria de fluxo. Universidade do Minho, Portugal, 2021. 81

**Figura 19** - Estratégia usada para a análise de leucócitos polimorfonucleares 81 intratumorais (CD11b + Ly6G +) em camundongos com tumor Kyse-30 ou Kyse-410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.

**Figura 20** – Lâminas histológicas de cortes de 5µm dos tumores induzidos pelas 83 linhagens Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Componentes da reação utilizados na genotipagem do SNP IL-8 (rs4073) - 251 T/A. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	17
<b>Tabela 2</b> - <i>Primers</i> para análises de PCR em tempo real. Universidade do Minho, Portugal, 2021.	24
<b>Tabela 3</b> – Cálculo do poder e tamanho do efeito para a realização do modelo de regressão de Cox. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	25
<b>Tabela 4</b> – Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> . Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	26
<b>Tabela 5</b> - Caracterização da população de estudo segundo as variáveis sócio-demográficas e estilo de vida. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	29
<b>Tabela 6</b> – Caracterização do grupo caso segundo as variáveis clínica - patológicas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	31
<b>Tabela 7</b> – Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas entre os grupos de estudo (caso/ controle). Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	32
<b>Tabela 8</b> - Modelo de regressão logística múltipla das variáveis estatisticamente significativas entre os grupos (caso/ controle). Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	33
<b>Tabela 9</b> - Ponto de corte para citocinas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	34
<b>Tabela 10</b> - Descritiva das citocinas categorizadas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	35
<b>Tabela 11</b> - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier	35

considerando as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida, dados clínico-patológicos e os níveis plasmáticos das citocinas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

**Tabela 12** - Estimativa de Razão de risco (*Hazard Ratio*) pelo modelo de Cox para o tempo de sobrevida global em indivíduos com CEC de esôfago. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 41

**Tabela 13** - Frequências dos genótipos de IL-8 (rs4073) -251 A>T. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 42

**Tabela 14** – Avaliação dos genótipos de IL-8 (rs4073)-251 A>T em relação aos níveis plasmáticos da citocina IL-8 e às características do tumor. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 43

**Tabela 15** - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier considerando os genótipos AA, AT e TT. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 44

**Tabela 16** - Caracterização da população de estudo (Grupo Caso 2) segundo as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida e clínico-patológicas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 46

**Tabela 17** - Caracterização da população de estudo segundo as variáveis sócio-demográficas e estilo de vida. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 48

**Tabela 18** – Caracterização do grupo caso 1 e 2 segundo as variáveis clínico - patológicas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 50

**Tabela 19** – Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas entre os grupos de estudo (caso 1 e 2/ Controle). Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 51

**Tabela 20** - Modelo de regressão logística múltipla das variáveis estatisticamente 52

significativas entre os grupos (casos 1 e 2/ controle). Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

**Tabela 21** - Ponto de corte para citocinas (Grupos caso 1 e 2). Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 53

**Tabela 22** - Descritiva das citocinas categorizadas para caso e controle. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 54

**Tabela 23** - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier considerando as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida, dados clínico-patológicos e os níveis plasmáticos das citocinas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 55

**Tabela 24** - Estimativa de Razão de risco (Hazard Ratio) pelo modelo de Cox para o tempo de sobrevida global em indivíduos com CEC de esôfago. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 59

**Tabela 25** – Padronização do anticorpo anti-TREX1 (ab52947) para IHQ. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 60

**Tabela 26** - Caracterização da população de estudo. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 64

**Tabela 27** - Caracterização do tecido tumoral. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 66

**Tabela 28** - Descrição da expressão de TREX1 nos tecidos obtidos de casos e controles. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 69

**Tabela 29** - Expressão de TREX1 entre os grupos caso e controle. Hospital de Câncer de Barretos, 2021. 69

<b>Tabela 30</b> - Caracterização das amostras tumorais em relação à expressão de TREG1 e variáveis sociais, clinicopatológicas e presença de HPV. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	70
<b>Tabela 31</b> - Caracterização da expressão de TREG1 em tecidos normal adjacente e controle em relação às variáveis sociais e status de HPV. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	72
<b>Tabela 32</b> - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier em relação à expressão de TREG-1 no grupo caso. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.	73
<b>Tabela 33</b> – Tamanhos dos tumores (cm) desenvolvidos nos animais B6 injetados com a linhagem Kyse 30. Universidade do Minho, Portugal, 2021.	75
<b>Tabela 34</b> – Tamanhos dos tumores (cm) desenvolvidos nos camundongos NSG injetados com as linhagens Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.	75
<b>Tabela 35</b> – Pesos dos tumores (g) desenvolvidos nos animais NSG injetados com as linhagens Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.	77
<b>Tabela 36</b> – Expressão relativa de mRNA em tecido tumorais de CE de animais induzidos pelas linhagens celulares Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CE</b>	Câncer esofágico
<b>CCEE</b>	Carcinoma de Células Escamosas do Esôfago
<b>EC</b>	Esophageal Cancer
<b>ESCC</b>	Esophageal Squamous Cell Carcinoma
<b>CEC</b>	Carcinoma de Células Escamosas
<b>HPV</b>	Papilomavírus humano
<b>QRT</b>	Quimio-radioterapia
<b>IL</b>	Interleucina
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>Célula T-reguladora</b>	Treg
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral - $\alpha$
<b>IHQ</b>	Imunohistoquímica
<b>VEGF-A</b>	Fator A de crescimento endotelial vascular
<b>VEGF-C</b>	Fator C de crescimento endotelial vascular
<b>VEGF-D</b>	Fator D de crescimento endotelial vascular
<b>bFGF</b>	Fator de crescimento de fibroblasto b
<b>HGF</b>	Fator de crescimento de hepatócito
<b>MIF</b>	Fator inibitório de migração
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator $\beta$ de crescimento tumoral
<b>FasL</b>	Fas ligante
<b>PDGF-BB</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>CTGF</b>	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
<b>CXCL12</b>	Fator 1 derivado de células do estroma
<b>EMT</b>	Transição epitélio-mesenquimal
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>SNP</b>	Polimorfismos de nucleotídeos únicos
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>TREX1</b>	Exonuclease three prime 1
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático

<b>TLR</b>	Receptores de do tipo <i>Toll</i>
<b>QPH</b>	Queratinócitos primários humanos
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Beads Array</i>
<b>EDA</b>	Endoscopia Digestiva Alta
<b>AME</b>	Ambulatório Medico de Especialidades
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>SECVS</b>	Subcomissão de Ética para as Ciências da Vida e da Saúde
<b>FACS</b>	Citometria de fluxo
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>OCT</b>	<i>Optimal Cutting Temperature</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>qRT-PCR</b>	PCR em tempo real quantitativo
<b>OR</b>	<i>Odds Ratio</i>
<b>NAP</b>	Núcleo de Apoio ao Pesquisador
<b>SEM</b>	Erro padrão da média
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>TNM</b>	Sistema de Classificação dos Tumores Malignos
<b>T</b>	Tumor
<b>N</b>	Linfonodo
<b>M</b>	Metástase
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>HR</b>	<i>Hazard Ratio</i>
<b>HRaj</b>	Razão de Risco ajustado
<b>NSG</b>	NOD scid gamma

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\Delta$	Delta
<b>mL</b>	Mililitro
/	Divisão
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
=	Igual
-	Menos ou Negativo
$\mu\text{L}$	Microlitro
<b>pg</b>	Picograma
<b>ng</b>	Nanograma
<b>g</b>	Gramas
x	Multiplicação
%	Porcentagem
+	Mais ou Positivo
<b>XII</b>	Doze
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>20<sup>o</sup></b>	Vigésimo
<	Menor
>	Maior
$\leq$	Menor ou igual
$\geq$	Maior ou igual
<b>I</b>	Um
<b>II</b>	Dois
<b>III</b>	Três
<b>IV</b>	Quatro
( )	Parênteses
[ ]	Colchetes
*	Asterisco

- ' Linha
- ± Mais ou menos
- : Dois pontos

## RESUMO

Pastrez PRA. Análise da relação de citocinas e TREX1 com o *carcinoma de células escamosas do esôfago*. **Tese (Doutorado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2021.

**JUSTIFICATIVA:** O câncer esofágico (CE), oitavo tipo de câncer mais incidente e sexto mais letal no mundo, é geralmente diagnosticado em estágio avançado, apresenta progressão rápida e prognóstico extremamente ruim, com sobrevida global em 5 anos abaixo de 20%. Apesar do avanço no tratamento de Carcinoma de Células Escamosas de Esôfago (CCEE) com as possibilidades de cirurgia, quimio e radioterapia, além da disponibilização de imunoterapia, pouca alteração foi observada na sobrevida dos pacientes e isto motiva a compreensão de perfis moleculares que possam ajudar no diagnóstico precoce, menos invasivo, e na melhoria do manejo dos portadores desta neoplasia maligna. Atualmente, os componentes imunológicos têm ganhado notoriedade na área oncológica. Dentre estes, as citocinas representam alvos potenciais porque são produzidas desde o início da progressão neoplásica, modulando a atividade de diferentes tipos celulares frequentemente encontrados no microambiente tumoral, podendo ainda ser detectadas sistemicamente. Além das citocinas, outras proteínas relacionadas com inflamação apresentam considerável aumento de expressão durante a carcinogênese e, por isso, tem sido alvos das pesquisas para desenvolvimento de terapia alvo. Dentre muitas, especial atenção tem sido dada à exonuclease TREX1 por estar significativamente elevada em várias neoplasias malignas e por sua potencial importância na história natural do carcinoma do esôfago, cujo impacto ainda está por ser avaliado satisfatoriamente. **OBJETIVOS:** Avaliar a expressão de TREX1, citocinas séricas e perfil de células imunológicas intratumorais em modelo animal e pacientes portadores de CCEE como possíveis biomarcadores da doença. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Os níveis plasmáticos das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12p70 foram avaliados em pacientes com CCEE e indivíduos saudáveis utilizando a metodologia do *Cytometric Bead Array (CBA)*. Após realizar uma busca na literatura de possíveis SNPs que possam influenciar a expressão de IL-8 relacionados a câncer, foi selecionado o SNP IL-8 (rs4073) -251 T/A para avaliação em nossa casuística. A genotipagem do SNP IL-8 (rs4073) -251 T/A foi determinada por PCR em Tempo Real, utilizando *TaqPath ProAmp Master Mix*, com *primers* e sondas comercialmente disponíveis. Ainda, para compreender o mecanismo responsável pela correlação de IL-8 com a agressividade do CE, foi desenvolvido um modelo animal de CE

utilizando a inoculação de linhagens Kyse-30 e Kyse-410 em camundongos e a detecção de células imunológicas nos tumores foi avaliada por Citometria de fluxo (FACS) utilizando os anticorpos monoclonais CD11b e Ly6G. A expressão da exonuclease TREX1 foi avaliada por imunohistoquímica, utilizando lâminas com cortes histológicos de 4 µm de espessura de tecidos esofágicos tumorais e sem tumor através do sistema streptavidina-biotina peroxidase, usando o anticorpo primário anti-TREX1. **RESULTADOS:** Foram encontrados níveis elevados de IL-1β, IL-6, IL-8, e IL-10 em pacientes com CCEE, quando comparados aos controles. Porém, a análise multivariada demonstrou que apenas a IL-8 foi um fator prognóstico independente para CCEE, assim como fatores de risco bem conhecidos como consumo de álcool, tabaco e exposição à pesticidas/inseticidas. Além disso, pacientes com baixos níveis plasmáticos de IL-6, IL-8, TNM I/II, ou aqueles que foram submetidos à cirurgia apresentaram uma sobrevida significativamente maior. Em relação à avaliação dos genótipos de IL-8 (rs4073) -251 T/A, os pacientes com altos níveis plasmáticos de IL-8 apresentaram uma maior frequência do genótipo AA, apresentando uma diferença estatisticamente significativa em relação aos demais genótipos. No modelo animal de CCEE, a linhagem Kyse-30 foi mais agressiva do que a linhagem Kyse-410, e o crescimento mais agressivo foi associado com aumento do acúmulo de neutrófilos intratumoral. Quando avaliamos a expressão de TREX1 em tecidos tumorais (grupo caso) e tecidos normais (grupo controle) observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles. Porém, quando foi avaliada a expressão de TREX1 em relação à sobrevida desses pacientes, observa-se que pacientes com expressão positiva de TREX1 tiveram uma sobrevida estatisticamente pior em 12, 36 e 60 meses em relação àqueles pacientes com expressão negativa de TREX1. **CONCLUSÃO:** A produção de IL-8 plasmática é um fator prognóstico valioso e potencial biomarcador para CCEE. Porém, falta avaliar em humanos, o mecanismo responsável pelos altos níveis de IL-8 nos pacientes com CCEE. TREX1 é um potencial marcador de sobrevida para CCEE.

**PALAVRAS-CHAVE:** Citocinas plasmáticas; Carcinoma de Esôfago; Interleucina 8; Diagnóstico; Inflamação; Biomarcadores.

## ABSTRACT

Pastrez PRA. Analysis of the relationship between cytokines and TREX1 with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Thesis (Doctorate degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2021.

**BACKGROUND:** Esophageal cancer (EC), the eighth most incident and sixth most lethal type of cancer in the world, is usually diagnosed at an advanced stage, has rapid progression and extremely poor prognosis, with overall 5-year survival below 20%. Despite advances in the treatment of Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) with the possibilities of surgery, chemo and radiotherapy, in addition to the availability of immunotherapy, little change was observed in the survival of patients and this motivates the understanding of molecular profiles that can help in the early and less invasive diagnosis, and in improving the management of patients with this malignant neoplasm. Currently, immunological components have gained notoriety in the oncology field. Among these, cytokines represent potential targets because they are produced since the beginning of neoplastic progression, modulating the activity of different cell types frequently found in the tumor microenvironment, which can also be detected systemically. In addition to cytokines, other inflammation-related proteins show a considerable increase in expression during carcinogenesis and, therefore, have been the target of research for the development of target therapy. Among them, special attention has been given to the exonuclease TREX1 because it is significantly elevated in several malignant neoplasms and for its potential importance in the natural history of EC, the impact of which has yet to be satisfactorily evaluated. **AIM:** To evaluate the expression of TREX1, serum cytokines and profile of intratumoral immune cells in an animal model and patients with ESCC as possible biomarkers of the disease. **MATERIAL AND METHODS:** Plasma levels of the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  and IL-12p70 were evaluated in patients with ESCC and healthy individuals using the Cytometric Bead Array (CBA) methodology. After conducting a literature search for possible SNPs that may influence the expression of cancer-related IL-8, SNP IL-8 (rs4073) - 251 T / A was selected for evaluation in our series. The genotyping of the SNP IL-8 (rs4073) - 251 T / A was determined by Real Time PCR, using TaqPath ProAmp Master Mix, with

commercially available primers and probes. In addition, to understand the mechanism responsible for the correlation of IL-8 with the aggressiveness of the EC, an animal model of EC was developed using the inoculation of Kyse-30 and Kyse-410 strains in mice and the detection of immune cells in tumors was evaluated by flow cytometry (FACS) using monoclonal antibodies CD11b and Ly6G. The expression of the exonuclease TREX1 was evaluated by immunohistochemistry, using slides with 4  $\mu$ m thick histological sections of tumoral esophageal tissues and without tumor tissues through the streptavidin-biotin peroxidase system, using the primary anti-TREX1 antibody. **RESULTS:** Elevated levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and IL-10 were found in patients with ESCC, when compared to controls. However, multivariate analysis showed that only IL-8 was an independent prognostic factor for ESCC, as well as well known risk factors such as alcohol consumption, tobacco and exposure to pesticides / insecticides. In addition, patients with low plasma levels of IL-6, IL-8, TNM I / II, or those who underwent surgery had significantly longer survival. Regarding the evaluation of IL-8 (rs4073) -251 T / A genotypes, patients with high plasma levels of IL-8 showed a higher frequency of the AA genotype, showing a statistically significant difference in relation to the other genotypes. In the animal model of ESCC, the Kyse-30 strain was more aggressive than the Kyse-410 strain, and more aggressive growth was associated with increased intratumoral neutrophil accumulation. When we evaluated the expression of TREX1 in tumor tissues (case group) and normal tissues (control group), we observed that there was no statistically significant difference between them. However, when the expression of TREX1 was evaluated in relation to the survival of these patients, it is observed that patients with positive expression of TREX1 had a statistically worse survival at 12, 36 and 60 months in relation to those patients with negative expression of TREX1. **CONCLUSION:** The production of plasma IL-8 is a valuable prognostic factor and can be a potential biomarker for ESCC. However, the mechanism responsible for the high levels of IL-8 in ESCC patients remains to be evaluated in humans. TREX-1 is a potential survival marker for ESCC.

**KEYWORDS:** Plasma cytokines; Esophageal carcinoma; Interleukin 8; Diagnosis; Inflammation; Biomarkers.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer de esôfago e fatores de risco

O câncer esofágico (CE), oitavo tipo de câncer mais incidente (604.100 casos/ano) e sexto mais letal no mundo (544.046 mortes/ano), é uma malignidade do trato gastrointestinal superior altamente agressiva que geralmente é diagnosticada em estágio avançado devido, principalmente, à ausência de sintomas iniciais específicos da doença e falta de testes não invasivos confiáveis para o rastreio<sup>1</sup>. Dessa forma, a doença evolui rapidamente e apresenta prognóstico extremamente ruim para o paciente<sup>2-5</sup> e sobrevida global em 5 anos abaixo de 20%<sup>6</sup>. No entanto, se os pacientes fossem diagnosticados em estágio inicial, a sobrevida global em 5 anos passaria a ser de 80-90%<sup>7</sup>. No Brasil, o CE está classificado entre os dez tipos de cânceres com maior incidência e há estimativa de que 11.390 novos casos da doença aconteceram em 2020, principalmente na população masculina<sup>8</sup>.

Existem dois principais tipos histológicos de câncer de esôfago, o adenocarcinoma e o carcinoma de células escamosas (CEC)<sup>6</sup>. Apesar da incidência do adenocarcinoma ter aumentado notoriamente nos países desenvolvidos nas últimas décadas, o CEC de esôfago ainda é o tipo mais incidente, representando quase 90% de todos os casos de CE no mundo<sup>6</sup>. Este último tipo histológico apresenta uma etiologia complexa e a participação de fatores de risco além de tabaco e álcool tem sido investigada. Entretanto, acredita-se que a combinação de vários fatores de risco seja responsável pela grande variabilidade da incidência da doença entre os diferentes grupos étnicos e regiões geográficas, permitindo a classificação dos países em alto ou baixo risco para o desenvolvimento da neoplasia<sup>2,9</sup>. Desta forma, o Brasil é considerado um país de alto risco<sup>2, 10, 11</sup>, sendo as regiões sul e sudeste aquelas com maior frequência da doença<sup>12, 13</sup>. O consumo de tabaco e álcool são os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CEC de esôfago, além de má higiene oral, deficiência nutricional (com baixo consumo de frutas e vegetais), dietas ricas em carne vermelha e alimentos processados, consumo de alimentos e bebidas quentes. e, possivelmente, infecção pelo papilomavírus humano (HPV)<sup>9, 13</sup>.

Por ser uma doença de diagnóstico tardio, mais da metade dos casos de CE relatados em todo o mundo encontra-se localmente avançado e apenas 25% dos indivíduos com a doença

são candidatos a um tratamento curativo<sup>14</sup>. Além disso, aproximadamente metade dos pacientes com CE apresentam metástases à distância, e para esses pacientes, o tratamento indicado geralmente é um regime de quimioterapia, como a combinação de 5-fluorouracil, cisplatina e taxanos, ou combinação de quimio e radioterapia. No entanto, apesar dos avanços recentes no tratamento do CE, muitas vezes ele ainda é resistente à quimioterapia, devido à sua grande heterogeneidade, e um novo caminho promissor para o tratamento dessa doença é a imunoterapia. Essa modalidade vem sendo explorada como alternativa para reduzir a recorrência, como tratamento de primeira linha e em novas combinações para câncer em estágio avançado<sup>15, 16</sup>. No entanto, para melhorar a eficácia da imunoterapia de CE e desenvolver novas estratégias para predição de prognóstico de CE ou tratamento clínico, é necessário compreender os cenários imunológicos em CE, já que ainda não há marcadores confiáveis que sejam preditivos de resposta ao tratamento<sup>16</sup>.

Um amplo espectro de biomarcadores relacionados com alterações genômicas do DNA, expressão de RNA mensageiro (mRNA), micro-RNA (miRNA) e expressão de proteínas têm sido identificados e analisados com objetivo de utilização para prever resposta à terapia, sendo em sua maioria, analisados a partir de biópsias. Entretanto, métodos menos invasivos para obtenção de amostras biológicas para pesquisa de marcadores moleculares podem ser mais aplicáveis e úteis na prática clínica<sup>17</sup>.

Atualmente, tem sido relatado que a quimio-radioterapia (QRT) faz com que as células tumorais aumentem a exposição de antígenos tumorais e isto contribui com a ativação de linfócitos T específicos responsáveis pela eliminação das células tumorais. Assim, o status da resposta imune pode influenciar a eficácia da QRT, como demonstrado por Makuuchi *et al.* (2013)<sup>18</sup> que, ao avaliarem o perfil sérico de 84 citocinas em pacientes com CEC de esôfago que receberam QRT neoadjuvante, detectaram o aumento do receptor solúvel de interleucina (IL)-6, correlacionado com pior resposta à terapia pré-operatória<sup>17, 18</sup>.

Recentemente, a imunoterapia utilizando, por exemplo, os anticorpos Car-T e PD-1 / PD-L1, foi aplicada à terapia tumoral e teve um impacto positivo como uma nova estratégia terapêutica. Foi constatado que um grande número de linfócitos se infiltra nos tecidos tumorais para vigilância imunológica, porém as células tumorais podem também desenvolver múltiplos mecanismos para escapar desta vigilância, sendo ainda necessária a busca por novas estratégias terapêuticas para a identificação de mecanismos distintos para a fuga imune<sup>19</sup>.

Mais especificamente para o tratamento com CE, estudos pré-clínicos ou clínicos de imunoterapia com CE, incluem tratamentos com vacinação do tumor, inibição do ponto de controle imunológico e terapia adotiva com células T. Um exemplo clássico que vem sendo fortemente estudado é em relação à probabilidade de pacientes responderem à terapias relacionadas à Proteína 1 de morte celular programada (PD-1) / bloqueio de PD-L1. Como exemplo, foi observado que as respostas ao tratamento com anticorpos anti-PD-1 podem ser observadas em tumores negativos para a expressão de PD-L1. Além disso, embora o Pembrolizumabe seja aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratar pacientes que progrediram após terapias de segunda linha e cujos tumores são PD-L1 positivos, este anticorpo anti-PD-1 não conseguiu melhorar a eficácia do tratamento em comparação com Paclitaxel como terapia de segunda linha para pacientes com câncer gastroesofágico PDL1 positivo avançado. Sendo assim, estes resultados sugerem que o microambiente imunológico em CE é muito complexo e que vários fatores podem estar relacionados com a regulação da imunidade antitumoral ou na intervenção da imunoterapia na CE, sendo de extrema importância estudos sobre o papel da imunidade antitumoral em CE<sup>16</sup>.

## **1.2 Biomarcadores para o câncer esofágico**

### **1.2.1 Citocinas**

A inflamação é um processo multi etapas associado com mudanças generalizadas nos componentes celular e molecular. A reação inflamatória é considerada um processo fisiológico necessário para cicatrização de feridas, reparo tecidual, assim como para a defesa contra vários agentes patogênicos. No entanto, evidências sugerem que a inflamação descontrolada, exacerbada, está relacionada com o desenvolvimento de muitas neoplasias, incluindo o CE<sup>6, 20</sup>. A rede de vários mediadores pró-inflamatórios no interior do microambiente tumoral pode desencadear um processo de sinalização que facilita a migração de células malignas através do estroma. Além da resposta inflamatória local, o desenvolvimento de neoplasias pode induzir a resposta sistêmica<sup>20</sup>.

Citocinas, quimiocinas, fatores solúveis e outras moléculas relacionadas são importantes mediadores no complexo meio inflamatório. Em tumores avançados, várias quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que favorecem o desenvolvimento do câncer são abundantes,

enquanto as citocinas que inibem o crescimento do tumor geralmente estão ausentes<sup>21</sup>. Assim, os níveis desses mediadores no sangue podem ser indicadores de inflamação local ou podem ter significado para a atividade sistêmica dessas moléculas efetoras. Em ambos os casos, essas medidas têm potencial utilidade em termos de etiologia, triagem e manejo clínico<sup>6</sup>.

Dentre os mediadores químicos liberados local e sistemicamente pela interação entre células neoplásicas e imunológicas no microambiente tumoral, as citocinas exercem importante papel no desenvolvimento e progressão tumoral e nível aumentado de moléculas inflamatórias foi identificado no soro de pacientes portadores desta neoplasia<sup>22</sup>, sugerindo a atuação destas como marcador biológico em CE. Assim como na maioria dos tumores, o microambiente do CE é imunossupressor, favorecendo o crescimento tumoral e o desenvolvimento de um fenótipo agressivo<sup>21</sup>.

Sabe-se que em certas condições como no início do desenvolvimento do câncer, as citocinas endógenas podem estimular a resposta das células imunológicas contra as células tumorais<sup>23</sup>. Entretanto, dados recentes indicam que as células tumorais também podem induzir disfunções nas células imunológicas e contribuir com o crescimento tumoral, progressão, metástase e imunossupressão do hospedeiro. Por essa razão, a detecção das alterações imunológicas no microambiente de CEC de esôfago pode ter um significado clínico no desenvolvimento da doença<sup>23</sup>. Classicamente, as citocinas, responsáveis pela sinalização intercelular que induz respostas biológicas como ativação celular, proliferação, crescimento, diferenciação, migração celular e citotoxicidade<sup>24</sup>, são estudadas no contexto de resposta imune, em que a secreção sequencial determina a inflamação e consequente imunidade. Dentre as células imunológicas produtoras de citocinas, destacam-se os linfócitos T CD4 (auxiliares) que modulam a resposta imunológica a agentes infecciosos e células transformadas. De acordo com o perfil de citocinas produzidas, as células T CD4 podem ser classificadas como: padrão 1 (secretor principalmente de Interferon (IFN)- $\gamma$  e IL (interleucina) -12); padrão 2 (caracterizado pela secreção predominante de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13); padrão 17 (IL-17, IL-21 e IL-22) e, reguladora (Treg, que secreta TGF- $\beta$  e IL-10).

Enquanto a maioria das citocinas promovem a proliferação do câncer, existem outras, tais como IFN- $\gamma$ , IL-27, IL-23, IL-12 e IL-2 que atuam como supressoras tumorais por estimular respostas auto-imunes, e ainda aquelas que estão associadas com regulação da transcrição, tais como IL-6, IL-8, e IL-1 $\beta$ <sup>21</sup>.

Tem sido detectada por imunohistoquímica (IHQ) a expressão aumentada de várias substâncias produzidas pelo sistema imunológico em tecidos de CEC de esôfago, principalmente citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas, em comparação com o tecido normal, sugerindo uma possível relação entre a produção de citocinas e a progressão do câncer<sup>23</sup>. Ainda, foi demonstrado que citocinas e quimiocinas estão associadas com parâmetros clínicos, patológicos e taxas de sobrevida em CEC de esôfago, destacando VEGF-A (fator A de crescimento endotelial vascular), VEGF-C (fator C de crescimento endotelial vascular), VEGF-D (fator D de crescimento endotelial vascular), bFGF (fator de crescimento de fibroblasto b), HGF (fator de crescimento de hepatócito), MIF (fator inibitório de migração), TGF- $\beta$  (fator  $\beta$  de crescimento tumoral), IL-6, IL-8, e FasL (Fas ligante), bem como IL-18, PDGF-BB (Fator de crescimento derivado de plaquetas), CTGF (Fator de crescimento do tecido conjuntivo), e CXCL12 (Fator 1 derivado de células do estroma)<sup>23</sup>. Embora tenha sido demonstrado que as citocinas circulantes estejam relacionadas positivamente com estágio tumoral, angiogênese, e metástase, o significado biológico ainda é pouco conhecido, mas sugere-se que altos níveis de algumas citocinas séricas podem estar relacionados com apoptose de linfócitos ativados, favorecendo a progressão de células tumorais e metástase<sup>23</sup>.

Dentre as funções já estudadas que as citocinas derivadas de CEC de esôfago exercem, as citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-6 e Fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) têm sido relacionadas com a patogênese do CE<sup>21</sup>. Embora a maioria das citocinas seja conhecida por contribuir para o crescimento do câncer e metástase, outras, tais como IL-2, IL-12, IL-23, IL-27 e IFN- $\gamma$ , podem estimular a resposta imune antitumoral por diferentes mecanismos moleculares<sup>23</sup>. IL-1 $\beta$ , uma citocina pró-inflamatória que promove invasão e migração, tem sido relatada por estar altamente expressa em tecidos de CE e estar envolvida no aumento da proliferação celular e associação com pior prognóstico em pacientes com CE<sup>21, 25</sup>. Alguns estudos indicam que IL-6 e TNF- $\alpha$  estão superexpressas em tecidos tumorais, quando comparados ao normal e ainda estão associadas com pior prognóstico em pacientes com CE<sup>26-28</sup>.

IL-19, um membro da família da citocina IL-10 também foi detectada estando altamente expressa em 60% (36 de 60) dos tecidos de pacientes com CCEE, enquanto que em tecido esofágico normal apresentou fraca ou nenhuma marcação, e sua expressão foi correlacionada com estágios avançados da doença e metástase linfonodal e à distância<sup>21, 29</sup>.

CXCR1 e CXCR2 são ambos receptores de CXCL8, também conhecidos como receptores de IL-8. As concentrações séricas tanto de CXCL8 e CXCR2 foram também encontradas elevadas em pacientes com CE, sugerindo que CXCL8 pode ser um potencial marcador tumoral em CE, já que os eixos CXCL8/CXCR2 promovem angiogênese, desenvolvimento tumoral e está associado com prognóstico ruim<sup>21,30</sup>.

Além disso, a sinalização de IL-8 pode induzir células epiteliais tumorais adjacentes à transição epitélio-mesenquimal (EMT), favorecendo a progressão tumoral<sup>31</sup>. Ainda, a expressão de IL-6 ou IL-8 em tecidos tumorais esofágicos foi positivamente correlacionada com a progressão tumoral e baixa sobrevida, levando à hipótese de que estratégias terapêuticas que estimulam o sistema imunológico voltadas para IL-8 ou IL-6 podem ser benéficas em pacientes com CEC de esôfago<sup>19</sup>. A citocina IL-8 isolada também apresenta bastante destaque como fator de risco para o desenvolvimento e pior prognóstico de pacientes com CE. Essa citocina possui propriedades quimioatratórias de leucócitos e atividades tumorigênicas e pró-angiogênicas e, é produzida por uma ampla gama de células normais, incluindo monócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais. Entretanto, também é produzida por diversos tipos de células tumorais e está envolvida na angiogênese e crescimento tumoral, estando superexpressa em uma variedade de tumores humanos e envolvida na invasão tumoral e metástase, podendo portanto constituir um fator de risco no desenvolvimento e progressão de tumores<sup>32</sup>.

Entretanto, a expressão aumentada de IL-17, uma citocina pró-inflamatória, melhora a sobrevida dos pacientes com CEC de esôfago, possivelmente por aumentar a resposta antitumoral de linfócitos T citotóxicos (CD8) e células *Natural Killer* (NK)<sup>33</sup>. Sendo assim, a investigação do papel dos mediadores inflamatórios na carcinogênese esofágica pode ser de grande relevância para o entendimento da patogênese dessa neoplasia, detecção e manejo dos pacientes.

Ainda neste contexto imunológico, tem sido demonstrado que polimorfismos localizados em genes que regulam a resposta imune, como por exemplos as citocinas, podem resultar em aumento da susceptibilidade e/ou pior prognóstico de vários tipos de cânceres<sup>34, 35</sup>. Atualmente, mais de 10 milhões de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) são conhecidos e estão incluídos em bases de dados públicas, enquanto outros continuam a ser pesquisados, porque podem fornecer informações importantes da ação do sistema imune no CE.

O gene IL-8 (4q13-q21) por exemplo, exibe vários polimorfismos funcionais em seu código genético. Ele é composto por quatro exons, três introns, uma região promotora proximal e três SNPs bem caracterizados e, haplótipos comuns da região promotora e região' (na região promotora principal a -251 T/A, 1 SNP íntron a +396 T/G e +781 C/T)<sup>36</sup>.

O SNP IL-8 (rs4073) -251 T/A, é um polimorfismo de nucleotídeo simples, localizado na região promotora do gene da IL-8, e sua presença pode influenciar a produção da proteína IL-8 através da regulação da atividade transcricional do gene<sup>32</sup>. Além disso, esse SNP é uma das variantes genéticas mais extensivamente estudadas em diversas condições inflamatórias<sup>37</sup>. Buscando avaliar o papel do polimorfismo -251T/A em tipos variados de câncer, uma meta análise com mais de 13.000 casos e 16.000 controles de 42 estudos caso controle demonstraram que portadores do alelo -251 A possuíam risco aumentado para o desenvolvimento do câncer analisado, entre eles câncer de mama, gástrico e de nasofaringe<sup>37</sup>. Para câncer de esôfago sabe-se muito pouco sobre a relação desse SNP com a doença. Apenas um trabalho detectou o SNP, porém não houve diferença estatística na distribuição de frequência alélica e genotípica entre pacientes e controles<sup>36</sup>.

### 1.2.2 TREX1

Durante o processo de transformação maligna, a instabilidade genômica é um fator de extrema importância, já que leva ao desenvolvimento de mutações e conseqüentemente a um estado de estresse replicativo em células neoplásicas, juntamente com respostas desreguladas de reparos de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA). O DNA que é deslocado para o citosol de células cancerosas é um subproduto dessa instabilidade genômica e da resposta de reparo de dano ao DNA subsequente, e leva a uma ativação de vias de defesa viral em todas as células, com conseqüente ativação da resposta imune inata e adaptativa, e levando ao desenvolvimento de diversas doenças autoimunes. Portanto, as células cancerosas devem evadir as vias de detecção de DNA citoplasmático para evitar a destruição imunomediada. Nesse sentido, o regulador chave a montante da estimulação imunológica mediada por DNA citosólico é a exonuclease *three prime 1* (TREX1)<sup>38</sup>.

TREX1 é codificada pelo gene *TREX1* em humanos, está localizada no retículo endoplasmático (RE) e é responsável por catalisar a excisão de nucleotídeos monofosfatos da extremidade 3' do DNA<sup>39, 40</sup>, e tem como função impedir a ativação imune indevida mediada pelo ácido nucléico<sup>41</sup>. As ideias iniciais sobre a função de TREX1 surgiram da

observação de que camundongos deficientes em TREX1 tinham sobrevida reduzida (2-4 meses) e apresentavam inflamação no miocárdio<sup>42</sup>. Ainda, foi demonstrado que TREX1 localizado no RE atua de modo semelhante aos receptores de do tipo *Toll* (TLR), regulando a resposta imune inata contra material genético citosólico de HIV.

Os TLR, pertencentes à família de receptores de reconhecimento de padrões, estão distribuídos na membrana citoplasmática e citosol, onde atuam fazendo a distinção entre o próprio e não-próprio. Aqueles membros localizados no citosol (3, 7, 8 e 9) são capazes de reconhecer os ácidos nucléicos, sendo que o TLR 3 é ativado por RNA dupla fita, TLR 7 e 8 por RNA fita simples e, TLR9 que é ativado por DNA de fita simples. A localização intracelular destes TLRs evita a ativação espontânea do sistema imunológico diante de ácido nucléico circulante. Entretanto, em certas condições patológicas, ácidos nucléicos endógenos conseguem sobrepor esta barreira e ativar a resposta imune<sup>43</sup>.

Em fibroblastos de animais deficientes em TREX1 ou células T CD4+ e macrófagos humanos com TREX1 deletado por RNA de interferência, o RNA de HIV foi acumulado no citosol e liberou IFN<sup>44</sup>. Estes e outros resultados de estudos sugerem que as células dependem de mecanismos regulatórios negativos, tais como TREX1, para manter as vias sensoriais de material genético citosólicas em checagem<sup>44</sup>. Em humanos, mutações em *TREX1* estão associadas com doenças inflamatórias e autoimunes incluindo, síndrome de Aicardi-Goutieres (uma doença inflamatória cerebral que mimetiza os sintomas de infecção viral congênita), Lúpus chilblain familiar, Lúpus eritomatoso sistêmico e vasculopatia de retina com leucodistrofia cerebral<sup>40, 44, 45</sup>.

Além do papel de prevenção de doenças autoimunes, têm sido sugerido que TREX1 participe na resposta celular ao dano no DNA, porque é translocado para o núcleo de fibroblastos de camundongos tratados com radiação ionizante, hidroxirúria ou luz ultravioleta<sup>39</sup>. Entretanto, a proteína TREX1 não está superexpressa no núcleo de células tumorais<sup>46</sup>. A inibição de TREX1 promove a morte de células de melanoma e glioma tratados com agentes antitumorais. Além disso, Dong et al, 2011<sup>47</sup> relataram que polimorfismos em *TREX1* foram associados com menor sobrevida em pacientes com câncer pancreático<sup>46</sup>. Recentemente, análise comparativa da expressão de 135 genes envolvidos nas vias de reparo de dano ao DNA em queratinócitos primários humanos (QPH) e em linhagens derivadas de carcinomas do colo do útero positivas e negativas para HPV, encontrou que os níveis de TREX1 foram maiores nas linhagens tumorais transformadas por HPV e em

queratinócitos expressando oncogenes E6 e E7 de HPV. Além disso, os níveis de TREX1 estavam aumentados em amostras de lesões pré-cancerosas, carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas, indicando que a superexpressão de TREX1 é importante para o crescimento de células tumorais, podendo contribuir para o estabelecimento e progressão do tumor<sup>48</sup>.

A análise da expressão de TREX1 em amostras de 93 pacientes portadores de CEC de esôfago resultou, principalmente, em marcação nuclear nas células tumorais como em células não tumorais adjacentes e não houve correlação com sobrevida<sup>46</sup>. Sendo assim, ainda é interessante e necessário avaliar a expressão de TREX1 em células tumorais e normais de esôfago, para entender o papel da TREX1 no desenvolvimento desta neoplasia.

De modo geral, os dados disponíveis até o momento, suportam a hipótese de que TREX1 é responsável pela degradação das estruturas de DNA aberrantes que surgem durante o processo de replicação do DNA. Por ter atividade de endonuclease, a superexpressão nuclear de TREX1 pode ser deletéria para a célula. Assim, é possível sugerir que um sistema de aperfeiçoamento de superexpressão transcricional e translocação nuclear após dano ao DNA, foi desenvolvido como parte do sistema de defesa genotóxico da célula. Dessa forma, o papel estabelecido para TREX1 como marcador de defesa celular é um potencial alvo para terapias anti-câncer<sup>39</sup>.

### **1.3 Modelo animal em CE**

Os mecanismos celulares e moleculares que dirigem a patogênese do CE ainda são pouco conhecidos. Assim, a compreensão deles se torna crucial por poder contribuir com os resultados obtidos em pacientes. Então, os modelos de camundongos constituem ferramentas valiosas para mimetizar os cânceres humanos e avaliar estratégias terapêuticas pré-clínicas de um modo não possível em seres humanos. Esta preferência por modelos animais se deve à semelhança fisiológica e molecular com o ser humano, mas gestação e ciclo de vida mais curtos<sup>49, 50</sup>.

Para estudo de CEC de esôfago em animal, usa-se comumente o modelo xenográfico de tumor subcutâneo, que pode ser estabelecido através do transplante de células de CEC de esôfago humanas (xenoenxertos) por via subcutânea nos flancos dorsolaterais de camundongos imunodeficientes e, diversas linhagens celulares esofágicas humanas estão

disponíveis para esta finalidade, tais como KYSE-270, KYSE-30 e KYSE-70, que produzem CEC e, OACM5.1C, SK-GT-4, entre outras, que produzem adenocarcinoma<sup>50</sup>

Este modelo, além de ter estabelecimento e reprodução simples, permite que as células cancerígenas sejam submetidas à uma modificação *in vitro* antes da experimentação *in vivo* e, embora não sejam universais, os xenoenxertos subcutâneos mostraram-se úteis na previsão da atividade clínica de drogas, particularmente se doses e esquemas clinicamente relevantes forem utilizados<sup>50-52</sup>.

A utilização do modelo animal para o entendimento do papel do infiltrado intratumoral de células imunes e da expressão de mediadores inflamatórios em câncer de esôfago é de grande importância, principalmente devido à escassez de material biológico para realização de várias análises do mesmo paciente.

## 2 JUSTIFICATIVA

Diante da baixa sobrevida de 5 anos dos pacientes com CE resultante, principalmente, do diagnóstico tardio e estadiamento avançado dos casos, faz-se necessária a busca por marcadores moleculares para esta doença que auxiliem no diagnóstico e/ou acompanhamento e que sejam obtidos por procedimentos menos invasivos. De acordo com o crescente conhecimento sobre o sistema imunológico e seus constituintes na área oncológica nos últimos anos, pretendeu-se compreender se o perfil de moléculas envolvidas com vias do sistema imune estaria relacionado com evolução da doença. Ainda, a expressão de proteína cuja função está associada com inflamação, mas pouco analisada em câncer esofágico, torna-se um interessante alvo para novos estudos. Por essa razão, optou-se por um modelo animal onde as variáveis pudessem embasar mais adequadamente os promissores achados já observados em cultura celular.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar a expressão de TREX1 em tecido esofágico humano normal e neoplásico, citocinas séricas e perfil de células imunológicas intratumorais em modelo animal e portadores de CCEE como possíveis biomarcadores da doença.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar o perfil plasmático de citocinas de pacientes com CEC de esôfago, e comparar com os valores obtidos de controles utilizando *Cytometric Beads Array* (CBA).
- Avaliar a relação do perfil de citocinas em pacientes com CEC de esôfago e correlacionar com dados clínico-patológicos de pacientes com CE.
- Determinar a curva de sobrevida de pacientes com CEC de esôfago, e correlacionar com os dados das citocinas.
- Investigar o polimorfismo do gene IL-8 nas amostras de pacientes com CEC de esôfago e controles e avaliar a relação com o desenvolvimento de CE.
- Avaliar a expressão de TREX1 em tecidos parafinados de casos e controles por Imunohistoquímica e correlacionar com os dados sóciodemográficos e clinicopatológicos.
- Estabelecer modelo animal de CEC de esôfago pela inoculação de linhagens celulares em camundongos NSG, a fim de avaliar o infiltrado imune intratumoral e a produção de mediadores inflamatórios plasmáticos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Etapa realizada com amostras de humanos

#### 4.1.1 Delineamento, definição da população do estudo e tamanho amostral

Este estudo compreende coleta mista, prospectiva e retrospectiva, de amostras.

A primeira parte desse projeto compreende uma coleta retrospectiva de amostras que foram previamente selecionadas de trabalhos do nosso grupo e cujo tamanho amostral foi estipulado por conveniência, ou seja, foram incluídos os indivíduos que apresentaram as características descritas para cada grupo mencionado abaixo:

1. Grupo caso 1: composto por amostras obtidas de pacientes com diagnóstico de CEC de esôfago confirmado histopatologicamente pelo Departamento de Patologia da Instituição, entre 2013 e 2015, sem prévio tratamento para neoplasia no órgão, e que possuíam sangue e biópsias armazenadas no biobanco da instituição, totalizando 70 indivíduos, sendo que destes, 70 foram incluídos nas análises do perfil de citocinas e apenas 57 incluídos na análise de imunohistoquímica para TREX-1 por disponibilidade de material.
2. Grupo controle 1: composto por amostras (biópsias) obtidas de pacientes sem neoplasia com indicação de Endoscopia Digestiva Alta (EDA) por motivos não-oncológicos atendidos no Ambulatório Médico de Especialidades (AME) Clínico de Barretos durante o período de 2013 e 2014, e que possuíam biópsias armazenadas no biobanco da instituição, totalizando 29 indivíduos.
3. Grupo controle 2: composto de amostras sanguíneas obtidas de indivíduos saudáveis que doaram sangue no Hemonúcleo do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, e que foram pareados por sexo e idade (+ ou – 2 anos) com os indivíduos do grupo caso 1, totalizando 70 indivíduos.

Dados sóciodemográficos e clinicopatológicos dos indivíduos foram coletados por uma ficha de coleta de dados (anexos A e B).

A segunda parte do projeto compreende uma coleta prospectiva de amostras sanguíneas e informações clinicopatológicas de pacientes, de ambos os sexos, sem prévio tratamento

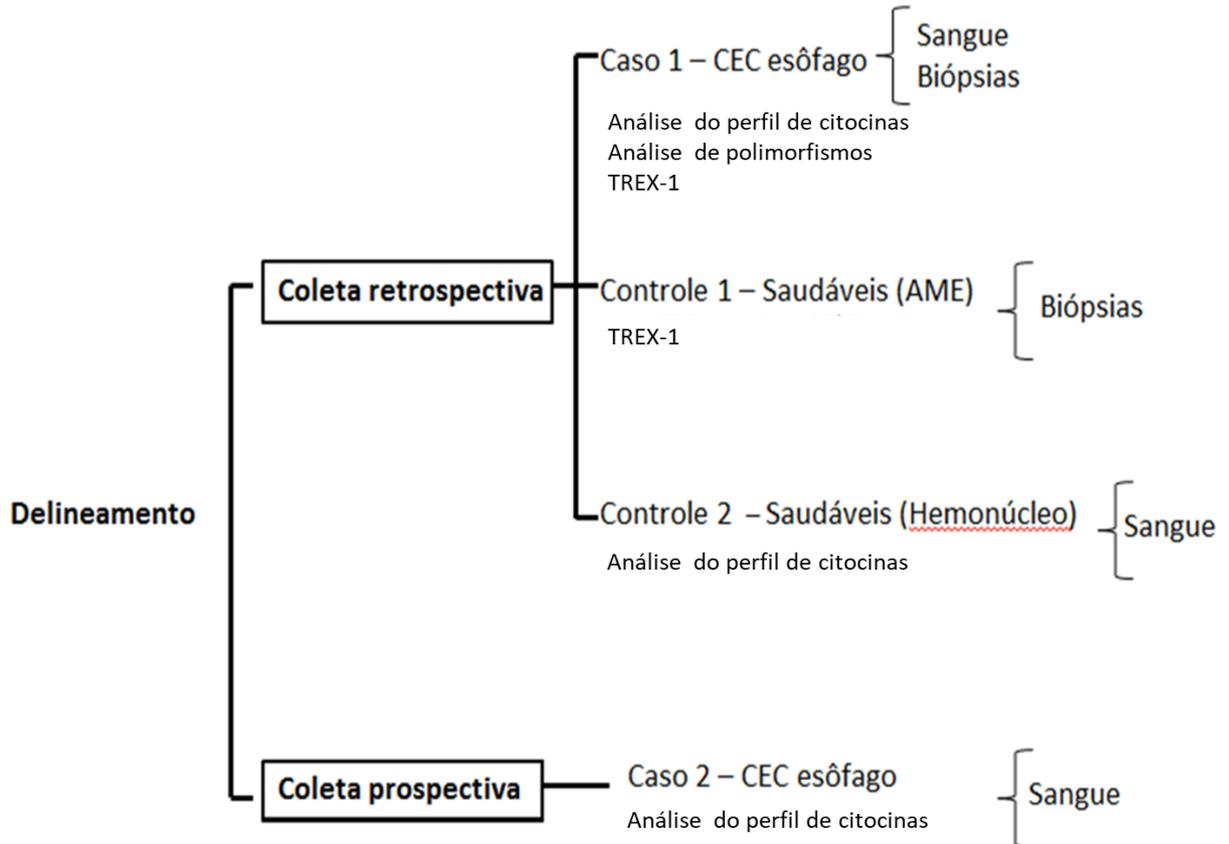
para neoplasia no órgão, recém-admitidos no Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XI, com diagnóstico histopatológico de câncer de esôfago emitido pelo Departamento de Patologia desta Instituição. Esses pacientes foram recrutados no momento da realização de exames para diagnóstico e estadiamento da doença, quando foi explicado a ele o motivo do recrutamento, que se tratava de uma pesquisa para avaliar o perfil imunológico em relação à resposta ao tratamento, e a necessidade da coleta de sangue para sua participação. Ao aceitar participar da pesquisa, o paciente e o pesquisador assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o paciente respondia a um questionário sociodemográfico, e a seguir, o volume de 5mL era coletado do paciente. As amostras foram coletadas antes do início do tratamento dos pacientes (Anexo C).

No processo de seleção dos participantes da pesquisa, foram excluídos aqueles com dificuldade de entendimento dos objetivos do trabalho durante o convite e/ou condição clínica desfavorável para realização dos procedimentos de coleta de material biológico.

O desenvolvimento do projeto é resultado da colaboração dos Departamentos de Patologia, Biobanco, Citometria de fluxo e Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII e o ICVS - *Life and Health Sciences Research Institute*, Universidade do Minho, Portugal.

O fluxograma de delineamento do estudo está demonstrado na **Figura 1**.

**Figura 1** – Fluxograma representando o delineamento do estudo e as amostras biológicas utilizadas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



#### 4.1.2 Considerações éticas

O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos, sob o nº de parecer 1.747.961, para a etapa realizada com humanos e Subcomissão de Ética para as Ciências da Vida e da Saúde (SECVS 074/2016) para etapa realizada com animais.

Levando em consideração que os TCLEs aplicados para a inclusão dos indivíduos do estudo não contemplam a opção de “Manifestação de uso futuro do material biológico após o término da pesquisa”, foi solicitado ao CEP a dispensa do TCLE.

Os pesquisadores garantem que o material parafinado armazenado não será esgotado, permanecendo material para testes diagnósticos futuros, se necessário.

#### 4.1.3 Quantificação do nível plasmático de citocinas

O nível plasmático das citocinas foi avaliado pela utilização do *Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines Kit (CBA Flex)* (Becton-Dickson) para quantificação de IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12p70 em uma única amostra, de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente, preparou-se a curva padrão colocando em um tubo de 15 mL todas as esferas padrões. Essas esferas foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e posteriormente, homogeneizadas com a pipeta para preparar a solução *top standard* (ponto inicial da curva 2.500 pg/mL de proteínas). As diluições da curva foram feitas a partir deste ponto, transferindo-se 300  $\mu$ L do *assay diluent*, de modo que os seguintes pontos foram constituídos: 1:2 (2.500 pg/mL), 1:4 (1.250 pg/mL), 1:8 (625 pg/mL), 1:16 (312,5 pg/mL), 1:32 (156 pg/mL), 1:64 (80 pg/mL), 1:128 (40 pg/mL) e 1:256 (20 pg/mL) e somente com *assay diluent* (controle negativo, 0 pg/mL). Após a preparação da curva, foi feita a diluição das esferas de captura, agitando vigorosamente cada suspensão de citocinas por 15 segundos antes de misturá-las. Então, o *pellet* das esferas de captura foi ressuspenso em *serum enhancement buffer* após centrifugação a 200g por 5 minutos. Posteriormente, as esferas foram incubadas protegidas da luz por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L da diluição das esferas de captura e 50  $\mu$ L de cada citocina em tubo de 15 mL. Então, adicionou-se 25  $\mu$ L da amostra sanguínea<sup>53</sup> e 50  $\mu$ L do reagente de detecção ficoeritrina (PE). As amostras foram incubadas por três horas à temperatura ambiente, protegidas da luz. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de tampão de lavagem nos tubos, que foram centrifugados a 200g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o *pellet* ressuspenso em 300  $\mu$ L de tampão de lavagem. As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, CA) e analisadas com o auxílio do software BDFCAP array™. Os resultados foram expressos através de MFI por pg/mL.

#### 4.1.4 Análise de polimorfismos de genes das citocinas

Diante do resultado que obtivemos inicialmente com a análise do perfil de citocinas, observamos que a IL-8 foi considerada um fator de risco para o CE na nossa casuística. Sendo assim, fizemos uma busca na literatura de possíveis SNPs que pudessem influenciar a expressão de IL-8 relacionados a câncer e optou-se por melhor investigar o papel do SNP IL-8 (rs4073) -251 T/A.

### Extração de DNA de sangue periférico

O DNA genômico utilizado para o ensaio foi extraído de amostras de sangue periférico, em plataforma automatizada QIASymphony, utilizando o QIAamp DSP DNA Mini Kit (Qiagen) e protocolo Blood\_200 e, posteriormente, armazenado a -20°C até o momento da utilização. Esta etapa foi realizada junto ao departamento do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos.

### Genotipagem SNP

A genotipagem do SNP IL-8 (rs4073) -251 T/A foi determinada por PCR em Tempo Real, utilizando TaqPath ProAmp Master Mix (Applied Biosystems, USA) com *primers* e sondas comercialmente disponíveis (C\_11748116\_10) (Applied Biosystems, USA). Para 20ng de DNA total foram adicionados 5µL de TaqPath ProAmp Master Mix, 0,5µL do TaqMan SNP Genotyping Assay, 4,5µL de DNA total para um volume final de 10µL (Tabela 1). A reação de PCR foi realizada no equipamento QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher, USA) com a ciclagem de 30 segundos à 60°C, 5 minutos à 95°C, 40 ciclos de 5 segundos à 95°C e 30 segundos à 60°C, seguido por 30 segundos à 60°C.

**Tabela 1** – Componentes da reação utilizados na genotipagem do SNP IL-8 (rs4073) -251 T/A. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Componente da reação	Volume da reação (µL)
DNA (diluído a uma concentração de 4ng/µl)	4,5
TaqPath ProAmp Master Mix	5
TaqMan SNP Genotyping Assay	0,5

SNP = Polimorfismo de nucleotídeo simples; ng = nanograma; µl = microlitro

#### **4.1.5 Imunohistoquímica para avaliação de TREX1**

Lâminas com cortes histológicos de 4 µm de espessura de tecidos esofágicos tumorais e sem tumor foram submetidas à análise de IHQ com sistema streptavidina-biotina peroxidase (Novolink Polimer Detection System – Leica Microsystems), usando o anticorpo primário anti-TREX1 (ab52947 – Anti-TREX1 antibody, lote GR126281, Biogen Comercial e Distribuidora Ltda).

Resumidamente, as lâminas foram submetidas à desparafinização e hidratação, seguida por recuperação antigênica utilizando tampão citrato, bloqueio das peroxidases e bloqueio das proteínas. O anticorpo primário foi então adicionado e incubado *overnight* em câmara úmida a 4°C. Em seguida, foi realizada a incubação no *post primary block*. Para detecção da reação imunológica, foi utilizado o sistema de amplificação por polímero, de acordo com as especificações do fabricante. A digitalização de imagens dos cortes histológicos foi realizada através de microscópio Olympus BX43 e analisado pelo software Olympus Soft Imaging Solution GmbH, versão 5.2 (Olympus Corporation, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan).

## **4.2 Etapa com Modelo Animal**

### **4.2.1 Linhagem celular**

As linhagens celulares de carcinoma de células escamosas do esôfago humano, Kyse-30 (# 94072011) e Kyse-410 (# 94072023), foram adquiridas da Sigma. De acordo com a descrição da linhagem celular fornecida pela empresa, Kyse-30 é derivada de carcinoma de células escamosas de esôfago invasivo bem diferenciado ressecado do esôfago intratorácico médio de um homem de 64 anos não tratado, antes do tratamento, carregando mutação em p53 e amplificação de cERB B, MYC e CYCLIN D1, e foi estabelecida a partir de tumores inicialmente transplantados para camundongos atímicos, apresentando um tempo de duplicação de 20,8 horas na fase de crescimento exponencial<sup>54</sup>. A Kyse-410, por outro lado, foi estabelecida a partir do carcinoma espinocelular invasivo do esôfago pouco diferenciado ressecado do esôfago cervical de um homem de 51 anos não tratado, tem superexpressão do fator de crescimento de ligação à heparina (hst-1) e ciclina D e tem um tempo de duplicação de aproximadamente 45 horas<sup>55</sup>.

Após a chegada, as células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade em frascos T75 contendo cRPMI, meio sem soro (RPMI) (# 11875093) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (# 10270-106), 1% de L-glutamina (# 25030-024), 1% de HEPES (# 15630-056), 1% de piruvato de sódio (# 11360-056) e 1% de penicilina / estreptomicina (# 15070-063) (todos de Gibco, Invitrogen), até atingir 80% de confluência. Neste ponto, as células foram coletadas, testadas e confirmadas como negativas para micoplasma e congeladas em alíquotas de 1 ml de nitrogênio líquido.

Sete dias antes de um experimento com animal, uma alíquota de cada linhagem celular foi descongelada e cultivada por 1 dia em um frasco T25. As células foram então cultivadas em frascos T75 e passadas a cada 48h até serem usadas para injetar em camundongos.

Para injeção das células nos animais, o meio foi removido e as células lavadas com tampão fosfato (PBS) pH 7.4. Posteriormente, foram adicionados 2mL de tripsina 2% (Gibco, EUA), previamente aquecida a 37°C, durante 5 minutos para a desadesão das células. As células foram recuperadas em RPMI e colocadas em tubo de Falcon de 50mL (Corning, EUA). Após centrifugação a 1200 rpm durante 8 minutos, o *pellet* celular foi ressuspensionado em RPMI para proceder à contagem, utilizando o corante vital azul de tripan. Após nova centrifugação, os *pellets* celulares foram ressuspensionados em PBS (cálculo do volume usado está abaixo representado) e armazenados em gelo até ao momento da injeção nos animais. Cálculo do volume final de PBS para ressuspender as células:

$$\text{Volume de PBS} = x \times fd \times 10^4$$

Sendo que:

$x$  = média dos números de células do quadrante

$fd$  = fator de diluição

#### 4.2.2 Modelo animal de tumor esofágico

Os camundongos NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) foram obtidos da *The Jackson Laboratory* (número de estoque: 005557, <https://www.jax.org/strain/005557>) (Bar Harbor, EUA) e mantidos no biotério do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde da Universidade do Minho, Braga-Portugal. Estes animais são imunodeficientes e caracterizados por não possuírem células T maduras, células B e células *natural killer* (NK). Além disso, são deficientes nas vias de sinalização de múltiplas citocinas e apresentam defeitos na imunidade inata, incluindo ausência do sistema complemento, redução das funções de células dendríticas e defeitos na atividade de macrófagos. Sendo assim, esses animais permitem o enxerto de uma gama de células humanas primárias como, por exemplo, células tumorais, que não são eliminadas. Dada esta imunodeficiência, os animais foram mantidos sob condições limpas e protegidos de agentes infecciosos com ração e água estéreis e manipulação feitas em capelas de fluxo laminar. Todos os camundongos usados neste estudo tinham idade e sexo pareados e entre 8-12 semanas.

O implante de células tumorais em camundongos NSG foi padronizado pelo Laboratório de Microbiologia e Infecção do Instituto de Investigação ICVS/3Bs - laboratório associado da Universidade do Minho, Braga-Portugal e foi executado de acordo com o protocolo pré-determinado pelo laboratório. Os animais ficaram em sala climatizada, com controle automático de iluminação, alternando períodos claros e escuros a cada 12 horas.

Camundongos NSG machos foram injetados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  células de Kyse-30 ou Kyse-410 no flanco traseiro esquerdo e o crescimento dos tumores foi medido usando um paquímetro e o volume dos tumores foi calculado usando a fórmula:  $(\pi \times d^2 \times D) / 6 \times 1000$ ,  $d$  = diâmetro pequeno e  $D$  = diâmetro grande. Aproximadamente no 20º dia após a inoculação das células, os camundongos foram sacrificados por inalação de  $\text{CO}_2$  e os tumores dissecados e processados para extração de RNA, citometria de fluxo e análise histológica. Todos os experimentos com animais foram realizados apenas uma vez com 5 animais por grupo e conduzidos de acordo com as recomendações da *European Union Directive 2010/63/EU* e previamente aprovados pela Subcomissão de Ética para as Ciências da Vida e da Saúde (SECVS 074/2016) e pela Direção Geral de Autoridade Portuguesa de Alimentação e Veterinária (014072).

#### **4.2.3 Isolamento de células dos tumores primários**

Resumidamente, os tumores primários foram lavados com PBS estéril e colocados sobre uma placa de Petri contendo meio RPMI 1640 com 10% FBS. Em seguida, os tumores primários foram divulsionados, com auxílio de êmbolos de seringas, em placas de Petri contendo RPMI 1640 10% FBS. Os grumos de células e fragmentos teciduais foram filtrados em peneiras de nylon com malha de 70  $\mu\text{m}$  (BD Bioscience, USA), lavados com mais 8mL de meio e recuperados para o mesmo tubo de Falcon. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm, à 4°C por 10 min. Adicionou-se 2mL de tampão de lise (solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 10% e PBS a 5% em água destilada) e após 2 min, adicionou-se 10mL de meio para interromper a hemólise. Centrifugou-se novamente a 1200 rpm por 10 min, descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* e adicionou-se meio de cultura até completar 5mL. As células foram mantidas em gelo durante todo o procedimento. Posteriormente, as células foram contadas utilizando-se uma câmara de Neubauer, em diluição 1:1 (10 $\mu\text{L}$  de células + 10 $\mu\text{L}$  de azul de tripan).

Para obter-se uma amostra enriquecida em células imunes, a suspensão celular foi centrifugada e ressuspendida em 3,5 mL de Percoll 40% (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA). A seguir, o Percoll 80% foi adicionado ao fundo do falcon, formando 2 fases. Centrifugou-se a 16500 rpm por 30 min, tendo o cuidado de parar a centrífuga lentamente ao final para que as fases não se misturassem.

Utilizando uma pipeta de Pasteur, coletou-se cuidadosamente o anel de células formado entre as duas fases e transferiu-se para um falcon contendo 8mL de meio de cultura. Centrifugou-se novamente a 1200 rpm por 8 min e ressuspendeu-se o *pellet* em 300  $\mu$ L de meio de cultura.

#### **4.2.4 Determinação das células imunológicas predominantes nos tumores induzidos em animais por Citometria de fluxo (FACS)**

Em etapa posterior, foram plaqueados 200 $\mu$ L de cada amostra, antes e após a adição do Percoll, em placas de 96 poços de fundo redondo, centrifugou-se a 1500 rpm por 5 min e descartou-se o meio. As células foram, então, lavadas com 200 $\mu$ L de FACS buffer, centrifugadas a 1500 rpm por 5 min, e 25 $\mu$ L do mix de anticorpos foram adicionados em cada poço durante 30 min. Adicionou-se novamente 200 $\mu$ L de FACS buffer e centrifugou-se a 1500 rpm por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se novamente com 200 $\mu$ L de FACS buffer. As amostras foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 2% por 20 min e depois ressuspendidas em FACS buffer. As amostras ficaram armazenadas ao abrigo da luz a 4°C até serem usadas.

O anel leucocitário coletado na interface 40:80% do Percoll, lavado e contados, foram incubados com anticorpos monoclonais CD11b (clone M1/70) e Ly6G (clone 1A8), adquiridos da BioLegend (San Diego, CA, EUA), conjugados com fluorocromos por 30 minutos em gelo. Após a lavagem, as células foram processadas para coloração intracelular utilizando o conjunto de tampões do fator de transcrição (eBioscience) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) com Diva Software e os dados adquiridos foram analisados usando o software FlowJo (TreeStar, Woodburn, Oregon, EUA). O número total de células foi calculado com base na porcentagem de células determinada por citometria de fluxo e o número total de células contadas.

#### 4.2.5 Realização de cortes para montagem de lâminas histológicas

Os tumores previamente emblocados em meio OCT (*Optimal Cutting Temperature*) foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  e posteriormente feitos cortes de  $6\mu\text{m}$  para lâminas histológicas utilizando um criostato. As lâminas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (HE, Merck KGaA, Alemanha) e avaliadas por um patologista experiente para demarcação da área tumoral.

#### 4.2.6 Avaliação da expressão de mRNA

##### Extração de RNA com trizol

O RNA total foi extraído utilizando o Triple X-Tractor (GB023.0100, Grisp, Porto, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante. Amostras tumorais congeladas em nitrogênio líquido foram mecanicamente maceradas utilizando esferas de vidro de  $1\text{mm}^3$  (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) em um batedor de *beads*. Em seguida, foram adicionados  $50\mu\text{L}$  de clorofórmio (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) por  $250\mu\text{L}$  de Triple X-Factor utilizado, e as amostras foram vortexadas e incubadas em gelo por 15 min. As amostras foram então centrifugadas a 13000 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , e a fase aquosa superior contendo o RNA foi recuperada para um novo tubo e misturada com o mesmo volume de álcool isopropílico (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) para precipitar o RNA. As amostras foram incubadas *overnight* a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de serem centrifugadas a 13000 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA foi lavado duas vezes com  $800\mu\text{L}$  de etanol 70%. O etanol foi completamente removido e o sedimento de RNA seco foi ressuspenso em água isenta de RNase / DNase (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A concentração de RNA foi medida em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000) e a pureza avaliada através das razões  $A_{260} / A_{280}$  e  $A_{260} / A_{230}$ .

##### Transcrição de cDNA

A transcrição reversa de RNA foi realizada utilizando-se o GRS cDNA Synthesis Master Mix (GK81.0100, Grisp, Porto, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante. O mix da reação foi composto por  $10\mu\text{L}$  de GRS RT Master Mix,  $1\mu\text{L}$  de Oligo(dT)<sub>20</sub> e  $10\mu\text{L}$  de amostra de RNA. A reação de síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada em um termociclador (MyCycler Thermal Cycler, Bio-Rad) por 10 min a  $25^{\circ}\text{C}$ , 30 min a  $42^{\circ}\text{C}$  seguido

por 5 min a 85°C. O cDNA resultante foi utilizado para quantificar a expressão dos genes alvos por PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) (Bio-Rad CFX96 Real-Time System com C1000 Thermal Cycler) utilizando o sistema de detecção SYBR green (# KK4602, Sigma) e normalizado para níveis de mRNA de Ubiquitina usando o método  $\Delta Ct$  ( $1,8^{\Delta Ct}$  (mRNA do gene doméstico expressão - expressão de mRNA do gene alvo) x 100000).

#### PCR em tempo real

Esta etapa foi realizada para analisar a expressão dos genes *CXCL1*, *CXCL2*, *CCL2* e *VEGF*, e a ubiquitina foi utilizada como gene normalizador.

Os níveis de expressão relativa dos genes e ubiquitina foram mensurados utilizando-se 60  $\mu$ L de *KAPA SYBR Fast qPCR master mix 2x* (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), 36 $\mu$ L de água nuclease free (*Ambion® Nuclease-Free Water, ThermoFisher Scientific, EUA*) e 12 $\mu$ L de primer (**Tabela 2**) no equipamento *CFX96 Real time system* (Bio Rad, EUA). Os níveis de expressão relativa dos genes alvos foram então normalizados para os valores correspondentes do controle interno (ubiquitina). Em todas as reações de PCR em tempo real foram adicionados água como controles negativo.

As reações foram realizadas seguindo o seguinte protocolo: 3 min a 95°C, 40 ciclos de 3 s a 95°C e 30 s a 60°C e aumento de 0,5°C a cada 5 s até atingir 95°C para os genes *CXCL1*, *CXCL2*, *CCL2* e 3 min a 95°C, 40 ciclos de 3 s a 95°C e 30 s a 55°C e aumento de 0,5°C a cada 5 s até atingir 95°C para os demais genes.

As reações de PCR em tempo real são caracterizadas pelo aumento da fluorescência da sonda a cada ciclo de polimerização das moléculas, atingindo um limiar (*threshold*) em que todas as amostras podem ser comparadas. O ciclo exato no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se Ct; as amostras mais concentradas (com maior número de fitas molde iniciais) atingem o limiar mais precocemente e mostram valores de Ct mais baixos. A expressão de mRNA dos genes alvos foi quantificada utilizando o método *SYBR green* (#KK4602, Sigma).

**Tabela 2** - Primers para análises de PCR em tempo real. Universidade do Minho, Portugal, 2021.

<b>Genes</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
Ubiquitina 2 $\mu$ M ( <i>Invitrogen Thermo Fisher</i> )	TGGCTATTAATTATTCGGTCTCGAT	GCAAGTGGCTAGAGTGACAGAGTAA
CXCL1 2 $\mu$ M ( <i>Invitrogen Thermo Fisher</i> )	AGCTTGAAGGTGTTGCCCTCAG	AGCTTCAGGGTCAAGGCAAGC
CXCL2 2 $\mu$ M ( <i>Invitrogen Thermo Fisher</i> )	CCCAGACAGAAGTCATAGCCAC	CTCCGTTGAGGGACAGCAG
CCL2 ( <i>Invitrogen Thermo Fisher</i> )	GTTGGCTCAGCCAGATGCA	AGCCTACTCATTGGGATCATCTTG
VEGF ( <i>Invitrogen Thermo Fisher</i> )	AACGATGAAGCCCTGGAGTG	TGAGAGGTCTGGTTCCCGA

### 4.3 Análises estatísticas

A caracterização da amostra foi feita através de medidas de posição e dispersão (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) para as variáveis quantitativas e tabelas de frequências e gráficos para as qualitativas, separada por grupo (caso/controle). E a análise de associação das características sócio demográficas e de hábitos entre os grupos foi realizada através do Teste Qui-quadrado.

A comparação do nível de citocinas entre os grupos foi verificada através do Teste Man-Whitney, tendo sido verificada anteriormente a normalidade dos dados através do Teste Kolmogorv-Smirnov.

Para estimar a Odds Ratio (OR), tendo como desfecho a presença do câncer de esôfago, utilizamos a Regressão Logística no contexto de análise Multivariada.

As dosagens de citocinas foram inicialmente tratadas como variáveis quantitativas para comparar os grupos caso e controle. Com o intuito de analisar a relação do nível de citocinas na sobrevida dos pacientes com câncer, utilizamos a curva ROC (privilegiando a maior sensibilidade) para encontrar um ponto de corte no nível de citocinas e assim dicotomizar em baixo e alto grau. Nas análises de sobrevida, as citocinas foram tratadas como variáveis qualitativas.

A curva de sobrevida foi estimada através do método de Kaplan Meier e as comparações entre as curvas foram através do teste Log-rank. Para selecionar as características para compor a análise multivariada, adotou-se um nível de significância de 20%. Para ajustar o modelo, foram considerados apenas os indivíduos que possuíam informações em todas as variáveis (n=56), portanto, não foi realizado nenhum tratamento específico para dados ausentes.

Para a seleção de variáveis, aplicou-se o método Backward Stepwise, considerando um nível de significância 5% para ajustar o modelo final. Apesar do tamanho da amostra nesta análise ser de 56 participantes, o modelo apresentou um poder superior a 0,90 quando IL-12, IL-8 ou TNF foram consideradas como variáveis de interesse (**Tabela 3**).

**Tabela 3** – Cálculo do poder e tamanho do efeito para a realização do modelo de regressão de Cox. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variáveis de interesse	DP	R2	HR	Power
IL-12	0,461	0,190	0,326	0,94
TNF- $\alpha$	0,468	0,051	0,226	> 0,99
IL=8	0,468	0,218	4,564	> 0,99

IL: Interleucina; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; DP: desvio padrão das covariáveis de interesse;

R2: coeficiente quadrado de correlação múltipla com outras covariáveis; HR: *hazard ratio* (razão de risco) (exponenciado b1) associado na covariável de interesse.

Para este cálculo, foi utilizado o software Stata v.14.0 sob a função powercox.

Para verificar a suposição de riscos proporcionais no modelo de regressão de Cox, foi utilizado um método descritivo que consiste em estimar  $\hat{\Lambda}_0(t)$  de acordo com a expressão abaixo,

$$\hat{\Lambda}_0(t) = \sum_{j:t_j < t} \frac{d_j}{\sum_{l \in R_j} \exp\{\mathbf{x}_l' \hat{\beta}\}}$$

Onde  $d_j$  é o número de eventos em cada um dos estratos  $t_j$ . Se a suposição de proporcionalidade for válida, espera-se que o gráfico  $\log(\hat{\Lambda}_0(t))$  versus  $t$  mostre diferenças aproximadamente constantes ao longo do tempo. Além disso, calculou-se o coeficiente de correlação de *Pearson* entre os tempos e os resíduos de Schoenfeld padronizados para cada uma das covariáveis. Espera-se que os coeficientes próximos de zero não mostrem evidências para rejeitar a suposição de riscos proporcionais. Desta forma, a suposição de riscos proporcionais é válida uma vez que os gráficos  $\log(\hat{\Lambda}_0(t))$  versus  $t$ , para cada covariável, apresenta distância constante ao longo do tempo e a **Tabela 4** mostra que os coeficientes de correlação de *Pearson* não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4** – Coeficiente de correlação de *Pearson*. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

<b>Covariáveis</b>	<b>r*</b>	<b>p</b>
<b>Raça</b>	0,073	0,635
<b>IL-12</b>	0,276	0,067
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-0,153	0,315
<b>IL-8</b>	-0,01	0,95
<b>Cirurgia</b>	-0,223	0,14
<b>Radioterapia</b>	-0,175	0,251
<b>Quimioterapia</b>	0,197	0,194
<b>Estadiamento TNM agrupado</b>	-0,077	0,614

\* Coeficiente de correlação de *Pearson*

Para avaliar a expressão de TREX1 em tecidos parafinados de casos e controles por IHQ, utilizou-se os teste Qui-Quadrado ou Exato de Fisher e, para relacionar a expressão de TREX1 com dados sócio-demográficos e clinicopatológicos, utilizou-se o teste Qui-Quadrado ou Exato de Fisher.

Para a avaliação dos genótipos de IL-8 (rs4073) -251 A>T em relação aos níveis plasmáticos da citocina IL-8 e às características do tumor foram utilizados os teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher. A curva de sobrevida foi estimada através do método de Kaplan Meier e as comparações entre as curvas considerando os genótipos AA, AT e TT foram através do teste Log-rank.

Para os referidos testes, adotou-se 5% como nível de significância. Para a tabulação e análise estatística dos resultados foi utilizado o software IBM® SPSS® Statistics 21.0 para Windows (IBM Corporation, Route 100, Somers NY 10589) e auxílio dos Estatísticos do Núcleo de Apoio ao Pesquisador (NAP).

Para as análises de amostras de modelo animal, os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Dois modos de ANOVA com comparações múltiplas de

Bonferroni pós-teste e o teste  $t$  de Student foram usados para comparações estatísticas usando GraphPad Prism 5. Os valores foram considerados significativos para  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### Etapa realizada com amostras de humanos

#### 5.1 Análise do perfil de citocinas em pacientes com CEC de esôfago (Grupo caso 1) e indivíduos saudáveis

Esta etapa do estudo foi realizada com 70 amostras de pacientes com CEC de esôfago e 70 de indivíduos saudáveis (controles).

##### 5.1.1 Caracterização da população de estudo

Com intuito de verificar os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CE, foi feita a caracterização da população de ambos os grupos do estudo, caso e controle e, o grupo caso também foi caracterizado em relação aos dados clínico-patológicos (grau histológico, estadiamento<sup>56</sup> e topografia do tumor).

A população do estudo foi composta, em sua maioria, por homens com idade média de 57,5 [DP (Desvio Padrão): 7,7] anos para o grupo controle e 57,8 (DP: 7,8) anos para o grupo caso. Como já esperado após o pareamento dos grupos, não houve diferença significativa entre caso e controle para as variáveis idade ( $p=0,922$ ) e sexo ( $p=0,820$ ). Além disso, as variáveis raça e estado civil também não foram estatisticamente diferente entre os grupos (**Tabela 5**).

Em relação às variáveis escolaridade ( $p < 0,001$ ), local onde mora/morou ( $p=0,007$ ), consumo de álcool ( $p < 0,001$ ) e de tabaco ( $p < 0,001$ ), exposição à pesticida ou inseticida ( $p < 0,001$ ) e prática de atividade física (0,024) foi encontrada diferença estatística entre os grupos caso e controle, sendo o grupo caso composto por maior frequência de indivíduos analfabetos/analfabetos funcionais (14,3%) em relação aos indivíduos do grupo controle (0,0%). Em relação ao local onde mora/morou, a maioria dos indivíduos do grupo caso residiu na zona rural (11,4%) ou na zona rural e urbana (71,4%), enquanto a maior parte dos indivíduos do grupo controle residiu apenas na zona urbana (41,4%), ou rural e urbana (51,4%). Além disso, a frequência de indivíduos do grupo caso que fizeram ingestão de álcool somente no passado (parada há mais de 12 meses) (44,3%) foi maior que a observada para indivíduos do grupo controle (12,9%), que declararam ainda fazer consumo de álcool (70%). Em relação ao tabagismo, observou-se que a maioria dos indivíduos do grupo caso ainda

fuma (67,1%), enquanto a maioria dos indivíduos do grupo controle nunca fumou (52,9%). Além disso, a maioria dos indivíduos do grupo caso fez exposição à pesticida ou inseticida (60,0%) e não praticava atividade física (70,0%), em comparação aos indivíduos do grupo controle (26,5% e 51,4% respectivamente) (**Tabela 5**).

**Tabela 5** - Caracterização da população de estudo segundo as variáveis sócio-demográficas e estilo de vida. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	Casos 1		Controles		P
	n(*)	(%)	n (*)	(%)	
<b>Sexo</b>					
Masculino	59	84,3	58	82,9	0,820
Feminino	11	15,7	12	17,1	
<b>Raça</b>					
Branco	50	73,5	51	72,9	0,929
Não branco	18	26,5	19	27,1	
<b>Estado civil</b>					
Não casado	17	24,3	22	31,4	0,346
Casado	53	75,7	48	68,6	
<b>Escolaridade</b>					
Analfabeto/Analf. Funcional	10	14,3	0	0,0	<0,001
Ensino fundamental/médio	56	80,0	54	77,1	
Ensino superior	4	5,7	16	22,9	
<b>Onde mora / morou</b>					
Somente zona urbana	12	17,1	29	41,4	0,007
Somente zona rural	8	11,4	5	7,1	
Ambas	50	71,4	36	51,4	
<b>Álcool</b>					
Nunca	3	4,3	12	17,1	<0,001
Sim, atualmente (se parou nos últimos 12 meses)	36	51,4	49	70,0	
Sim, no passado	31	44,3	9	12,9	
<b>Álcool</b>					
Não	3	4,3	12	17,1	0,026
Sim	67	95,7	58	82,9	

(Continua na próxima página)

**Tabela 5 (continuação)** - Caracterização da população de estudo segundo as variáveis sócio-demográficas e estilo de vida. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	Casos 1		Controles		P
	n(*)	(%)	n (*)	(%)	
<b>Tabaco</b>					
Nunca	10	14,3	37	52,9	<b>&lt;0,001</b>
Sim, atualmente (se parou nos últimos 12 meses)	47	67,1	11	15,7	
Sim, no passado	13	18,6	22	31,4	
<b>Tabaco</b>					
Não	10	14,3	37	52,9	<b>&lt;0,001</b>
Sim	60	85,7	33	47,1	
<b>Exposição a pesticida ou inseticida</b>					
Não	28	40,0	50	73,5	<b>&lt;0,001</b>
Sim	42	60,0	18	26,5	
<b>Pratica atividade física</b>					
Não	49	70,0	36	51,4	<b>0,024</b>
Sim	21	30,0	34	48,6	

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

n: número; %: porcentagem.

Teste utilizado: Qui-quadrado.

Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

Os dados clínico-patológicos do grupo caso estão demonstrados na **Tabela 6**. Os tumores esofágicos estavam predominantemente localizados no terço médio do órgão (57,4%) e o grau histológico predominante foi do tipo moderadamente diferenciado (53,8%). Considerando o Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, observou-se que 82,5% dos casos foram diagnosticados em T3 – T4, com comprometimento de linfonodo (N positivo = 65,5%) e sem metástase (M0 = 84,8%). Com o agrupamento das categorias TNM, constata-se que 71,2% dos pacientes foram admitidos com estadiamento avançado (III – IV).

**Tabela 6** – Caracterização do grupo caso segundo as variáveis clínica - patológicas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável	Categoria	n (*)	(%)
<b>Topografia do tumor</b>	Terço superior	2	(3,7)
	Terço médio	31	(57,4)
	Terço inferior	2	(3,4)
	SOE	19	(35,2)
<b>Grau de diferenciação</b>	Bem diferenciado	9	(13,8)
	Moderadamente diferenciado	35	(53,8)
	Pouco diferenciado	21	32,3)
<b>T</b>	T1 – T2	11	(17,5)
	T3 – T4	52	(85,5)
<b>N</b>	N0	19	(34,5)
	N positivo	36	(65,5)
<b>M</b>	M0	56	(84,8)
	M1	10	(15,2)
<b>Estadiamento TNM</b>	I – II	17	(28,8)
	III – IV	42	(71,2)
<b>Total</b>		<b>70</b>	<b>(100)</b>

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

Estadiamento TNM: Sistema baseado no tamanho e/ou extensão do tumor primário (T), quantidade de linfonodos comprometidos (N) e presença de metástases (M).

### 5.1.2 Quantificação dos níveis plasmáticos das citocinas

As 140 amostras sanguíneas, 70 referentes ao grupo caso e 70 do grupo controle, foram utilizadas na mensuração do nível das citocinas IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8, relacionadas com processo inflamatório. **Na Tabela 7**, pode-se observar que dentre as seis citocinas quantificadas, quatro apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo elas: IL-10 ( $p=0,027$ ), IL-6 ( $p <0,001$ ), IL-1 $\beta$  ( $p=0,032$ ) e IL-8 ( $p <0,001$ ); todas apresentaram valores maiores de mediana no grupo caso.

**Tabela 7** – Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas entre os grupos de estudo (caso/ controle). Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Citocinas	Grupos				P
	Caso 1		Controle		
	Média (DP) pg/mL	Mediana (min - máx) pg/ mL	Média (DP) pg/ mL	Mediana (min - máx) pg/ mL	
<b>IL-12p70</b>	0,78 (0,99)	0,39 (0,00 – 4,83)	0,93 (1,61)	0,28 (0,00 – 11,51)	0,991
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,95 (2,24)	0,05 (0,00 – 16,37)	0,86 (2,14)	0,05 (0,00 – 14,27)	0,772
<b>IL-10</b>	12,98 (97,53)	0,68 (0,00 – 816,59)	0,55 (0,78)	0,42 (0,00 – 5,73)	<b>0,027</b>
<b>IL-6</b>	1157,20 (9614,02)	6,72 (0,21 – 80446,68)	2,07 (2,49)	1,62 (0,00 – 18,18)	<b>&lt;0,001</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	1,21 (3,07)	0,49 (0,00 – 24,60)	0,66 (1,87)	0,00 (0,00 – 13,76)	<b>0,032</b>
<b>IL-8</b>	196,31 (1529,42)	7,51 (2,40 – 12806,73)	3,52 (3,05)	3,16 (0,64 – 25,59)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Total</b>		<b>70</b>		<b>70</b>	

DP: desvio padrão; pg/mL: picograma por mililitro; IL: interleucina; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral. Teste utilizado: Teste Mann-Whitney. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

Com o intuito de se conseguir uma observação mais abrangente dos resultados, realizou-se análise multivariada. Esta abordagem é empregada quando se deseja trabalhar com indicadores que sintetizam o efeito de cada variável estatisticamente significativa, permitindo analisar conjuntamente os dados obtidos na análise univariada. Para análise multivariada, foi adotado nível de significância  $\alpha = 0,20$ , e por isso, além das variáveis estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), foram incluídas aquelas com valor de  $p < 0,20$ .

A análise multivariada foi realizada através da regressão logística múltipla, considerando nível de significância  $\alpha = 0,05$  para o modelo final e, todas as variáveis significativas em relação aos grupos de estudo (caso/ controle) foram incluídas como: escolaridade, local onde mora/morou, consumo de álcool, tabagismo, exposição à pesticida ou inseticida, prática de atividade física e as citocinas IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8.

Esta análise permitiu estimar a OR, ou seja, a razão entre as chances daqueles com fator de risco de desenvolverem a doença e as chances daqueles sem fator de risco de desenvolverem a doença<sup>57</sup>. No modelo final, apenas consumo de álcool, tabagismo, exposição à pesticida ou inseticida e IL-8 permaneceram como variáveis estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Sendo assim, aqueles indivíduos que beberam no passado (pararam há mais de 12 meses) apresentam chance 14,5 vezes [IC (Intervalo de Confiança) 95%: 1,3 –

163,6)] de desenvolver a doença em relação àqueles que nunca beberam, apresentando diferença significativamente estatística ( $p=0,030$ ). Em relação ao uso de tabaco, aqueles indivíduos que fumam atualmente ( $p < 0,001$ ) apresentam chance de 11,3 vezes (IC 95%: 2,9 – 44,3) de desenvolver CE em comparação àqueles que nunca fumaram. Além disso, os indivíduos que foram expostos à inseticida ou pesticida ( $p=0,033$ ) apresentam chance 3,2 vezes (IC 95%: 1,1 – 9,4) de desenvolver a doença em comparação àqueles que não foram expostos. Ainda, o aumento da expressão de IL-8 ( $p < 0,001$ ) aumenta a chance de desenvolver o câncer esofágico (OR: 1,6 - IC 95%: 1,3 – 2,0) (**Tabela 8**).

**Tabela 8** - Modelo de regressão logística múltipla das variáveis estatisticamente significativas entre os grupos (caso/ controle). Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	n casos (n eventos)	OR (IC95%)	P
<b>Álcool</b>			
Nunca	15 (3)	1	-
Sim, atualmente (se parou nos últimos 12 meses)	85 (36)	3,9 (0,4 - 35,9)	0,227
Sim, no passado	40 (31)	14,5 (1,3 - 163,6)	<b>0,030</b>
<b>Tabaco</b>			
Nunca	47 (10)	1	-
Sim, atualmente (se parou nos últimos 12 meses)	58 (47)	11,3 (2,9 - 44,3)	<b>&lt;0,001</b>
Sim, no passado	35 (13)	1,5 (0,3 - 6,6)	0,581
<b>Exposição a pesticida ou inseticida</b>			
Não	78 (28)	1	-
Sim	60 (42)	3,2 (1,1 - 9,4)	<b>0,033</b>
<b>IL8</b>	140 (70)	1,6 (1,3 - 2,0)	<b>&lt;0,001</b>

N: número; OR: *Odds Ratio*; IC 95%: intervalo de confiança ao nível de 95%; IL: interleucina.

Teste utilizado: Teste de Wald. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

## 5.2 Análise da sobrevida de pacientes com CEC de esôfago

Para verificar a relação das citocinas com a sobrevida dos pacientes portadores de CE, foi estabelecido um ponto de corte para seu nível plasmático utilizando a curva ROC e o

valor final (pg/mL) obtido como resultado do ensaio de quantificação das citocinas por *CBA*, com intuito de discriminar os casos óbitos dos não óbitos. O ponto de corte estabelecido, a sensibilidade, especificidade e área abaixo da curva das seis citocinas analisadas estão descritos na **Tabela 9**.

**Tabela 9** - Ponto de corte para citocinas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Citocinas	Ponto de corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC (%)
IL-12p70	1,23	75,6	37,5	59,3
TNF- $\alpha$	0,825	75,6	42,0	57,7
IL-10	1,34	75,6	33,3	49,5
IL-1 $\beta$	1,35	77,8	30,0	55,8
IL-6	4,7	77,8	71,0	76,0
IL-8	6,75	73,3	71,0	76,0

AUC: área abaixo da curva ROC; IL: interleucina; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral.

Deste modo, os indivíduos foram divididos em dois grupos: baixo e alto nível plasmático de citocinas, e a descrição desta categorização está detalhada na **Tabela 10**.

Além da relação das citocinas com a sobrevida, analisamos também a relação com as características sócio-demográficas, estilo de vida e dados clínico-patológicos.

O tempo para a sobrevida global foi calculado como o intervalo entre a data de diagnóstico e a data de óbito por câncer ou a data da última informação. Entretanto, dentre todas as variáveis analisadas, somente IL-6, IL-8, cirurgia e TNM apresentaram influência significativa na sobrevida através das análises de Kaplan-Meier e teste de Log-rank.

O cálculo de sobrevida global foi reportado para 12, 36 e 60 meses. Na **Tabela 11**, observa-se que a estimativa da sobrevida global em 12 meses foi 60,8%, em 36 meses foi 36,0% e em 60 meses foi 21,5%.

**Tabela 10** - Descritiva das citocinas categorizadas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Citocinas	Categorias (nível)	n (%)
IL-12p70	Baixo (<1,23pg/mL)	49 (70)
	Alto (≥1,23 pg/mL)	21 (30)
TNF-α	Baixo (< 0,825 pg/mL)	48 (68,6)
	Alto (≥ 0,825 pg/mL)	22 (31,4)
IL-10	Baixo (< 1,34 pg/mL)	50 (71,4)
	Alto (≥ 1,34 pg/mL)	20 (28,6)
IL-1β	Baixo (< 1,35 pg/mL)	52 (74,3)
	Alto (≥ 1,35 pg/mL)	18 (25,7)
IL-6	Baixo (< 4,7 pg/mL)	27 (38,6)
	Alto (≥ 4,7 pg/mL)	43 (61,4)
IL-8	Baixo (< 6,75 pg/mL)	29 (41,4)
	Alto (≥ 6,75 pg/mL)	41 (58,6)

n: número; IL: interleucina; TNF-α: Fator de necrose tumoral; pg/mL: picograma por mililitro.

**Tabela 11** - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier considerando as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida, dados clínico-patológicos e os níveis plasmáticos das citocinas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	n casos (n eventos)	% Probabilidade de sobrevivência			p
		12 meses	36 meses	60 meses	
<b>Global</b>	70 (52)	60,8	36,0	21,5	-
<b>Sexo</b>					
Feminino	11 (7)	60,0	50,0	18,8	0,403
Masculino	59 (45)	60,7	33,2	21,1	
<b>Raça</b>					
Branco	50 (38)	64,0	35,1	23,6	0,208
Não branco	18 (14)	48,1	34,4	0,00	

(continua na próxima página)

**Tabela 11 (continuação)** - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier considerando as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida, dados clínico-patológicos e os níveis plasmáticos das citocinas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	n casos (n eventos)	% Probabilidade de sobrevivência			p
		12 meses	36 meses	60 meses	
<b>Exposição a pesticida ou inseticida</b>					
Não	28 (21)	64,3	46,4	26,7	0,360
Sim	42 (31)	58,6	28,0	17,4	
<b>Onde mora / morou</b>					
Somente zona urbana	12 (8)	66,7	41,7	41,7	0,553
Somente zona rural	8 (7)	62,5	25,0	12,5	
Ambas	50 (37)	59,1	36,5	17,7	
<b>Álcool</b>					
Nunca bebeu / Só no passado	34 (26)	58,0	36,7	17,8	0,839
Sim, ainda bebe	36 (26)	63,5	35,1	24,6	
<b>Tabaco</b>					
Nunca	10 (8)	30,0	20,0	20,0	0,315
Sim, atualmente (se parou nos últimos 12 meses)	47 (35)	60,8	39,1	20,3	
Sim, no passado	13 (9)	84,6	38,5	28,8	
<b>Grau histológico</b>					
Bem diferenciado	9 (7)	55,6	22,2	22,2	0,807
Moderadamente diferenciado	35 (26)	56,4	37,6	23,9	
Pouco diferenciado	21 (16)	66,0	30,5	16,9	
<b>IL-12p70</b>					
<1,23	49 (39)	51,0	29,8	19,7	0,073
≥1,23	27 (13)	84,7	50,8	25,4	

(continua na próxima página)

**Tabela 11 (continuação)** - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier considerando as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida, dados clínico-patológicos e os níveis plasmáticos das citocinas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	n casos (n eventos)	% Probabilidade de sobrevivência			p
		12 meses	36 meses	60 meses	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>					
<0,825	48 (39)	58,3	25,9	18,9	0,100
$\geq$ 0,825	22 (13)	66,7	61,2	28,5	
<b>IL-10</b>					
<1,34	50 (38)	59,1	29,6	22,0	0,470
$\geq$ 1,34	20 (14)	65,0	53,2	19,7	
<b>IL-6</b>					
<4,7	27 (14)	80,4	64,3	45,1	<b>&lt;0,001</b>
$\geq$ 4,7	43 (38)	48,8	18,2	6,9	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>					
<1,35	52 (40)	62,6	29,2	19,6	0,364
$\geq$ 1,35	18 (12)	55,6	55,6	28,8	
<b>IL-8</b>					
<6,75	29 (16)	89,1	50,4	41,2	<b>0,001</b>
$\geq$ 6,75	41 (36)	41,5	25,9	9,3	
<b>Cirurgia</b>					
Não	44 (40)	47,1	16,5	8,2	<b>&lt;0,001</b>
Sim	20 (9)	90,0	80,0	51,3	
<b>Radioterapia</b>					
Não	25 (22)	56,0	28,0	7,0	0,117
Sim	43 (29)	61,8	41,2	29,7	
<b>Quimioterapia</b>					
Não	24 (20)	41,7	33,3	15,6	0,186
Sim	45 (32)	70,3	36,3	24,6	
<b>TNM</b>					
I/II	17 (8)	87,8	81,6	49,8	<b>&lt;0,001</b>
III/IV	42 (38)	52,4	16,7	9,5	

(continua na próxima página)

**Tabela 11 (continuação)** - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier considerando as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida, dados clínico-patológicos e os níveis plasmáticos das citocinas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	n casos (n eventos)	% Probabilidade de sobrevivência			p
		12 meses	36 meses	60 meses	
<b>Localização do tumor</b>					
Terço médio/superior	33 (27)	69,7	42,4	20,5	0,447
SOE	19 (14)	51,3	22,8	22,8	

n: número; IL: interleucina; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral; TNM: Sistema baseado no tamanho e/ou extensão do tumor primário (T), quantidade de linfonodos comprometidos (N) e presença de metástases (M).

Teste utilizado: Log-rank.

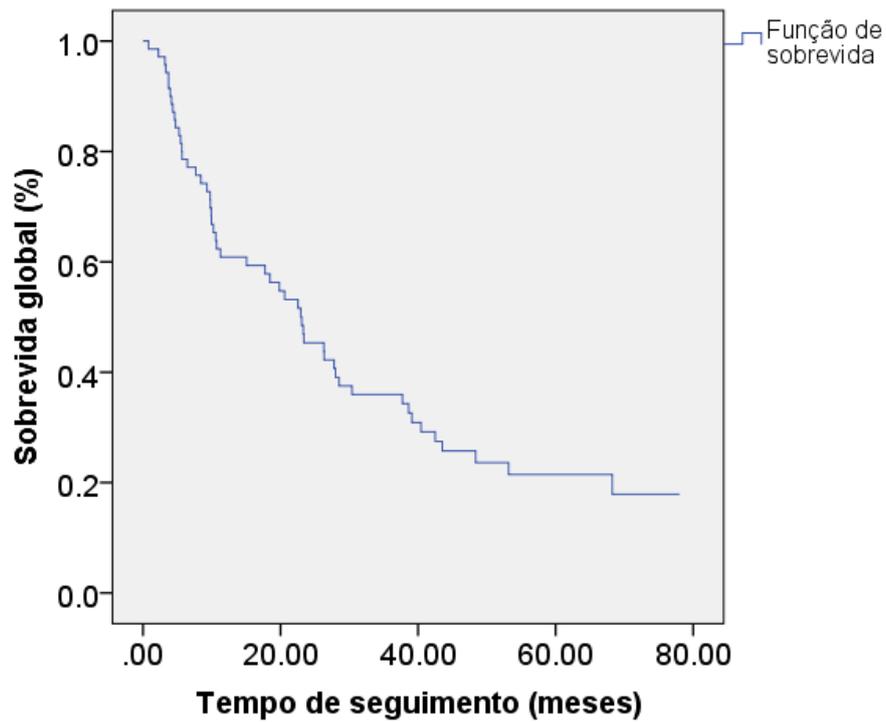
Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

Ao analisarmos a expressão das citocinas em relação à sobrevida, obteve-se que os indivíduos com nível elevado da citocina IL-6 apresentaram pior sobrevida (48,8% em 12 meses, 18,2% em 36 meses e 6,9% em 60 meses) comparados com indivíduos portadores de baixo nível plasmático de IL-6 (80,4% em 12 meses, 64,3% em 36 meses e 45,1% em 60 meses). Ainda, pacientes com nível plasmático elevado de IL-8 tiveram pior sobrevida (41,5% em 12 meses, 25,9% em 36 meses e 9,3% em 60 meses) quando comparado com aqueles indivíduos que apresentaram baixo nível da citocina (89,1% em 12 meses, 50,4% em 36 meses e 41,2% em 60 meses).

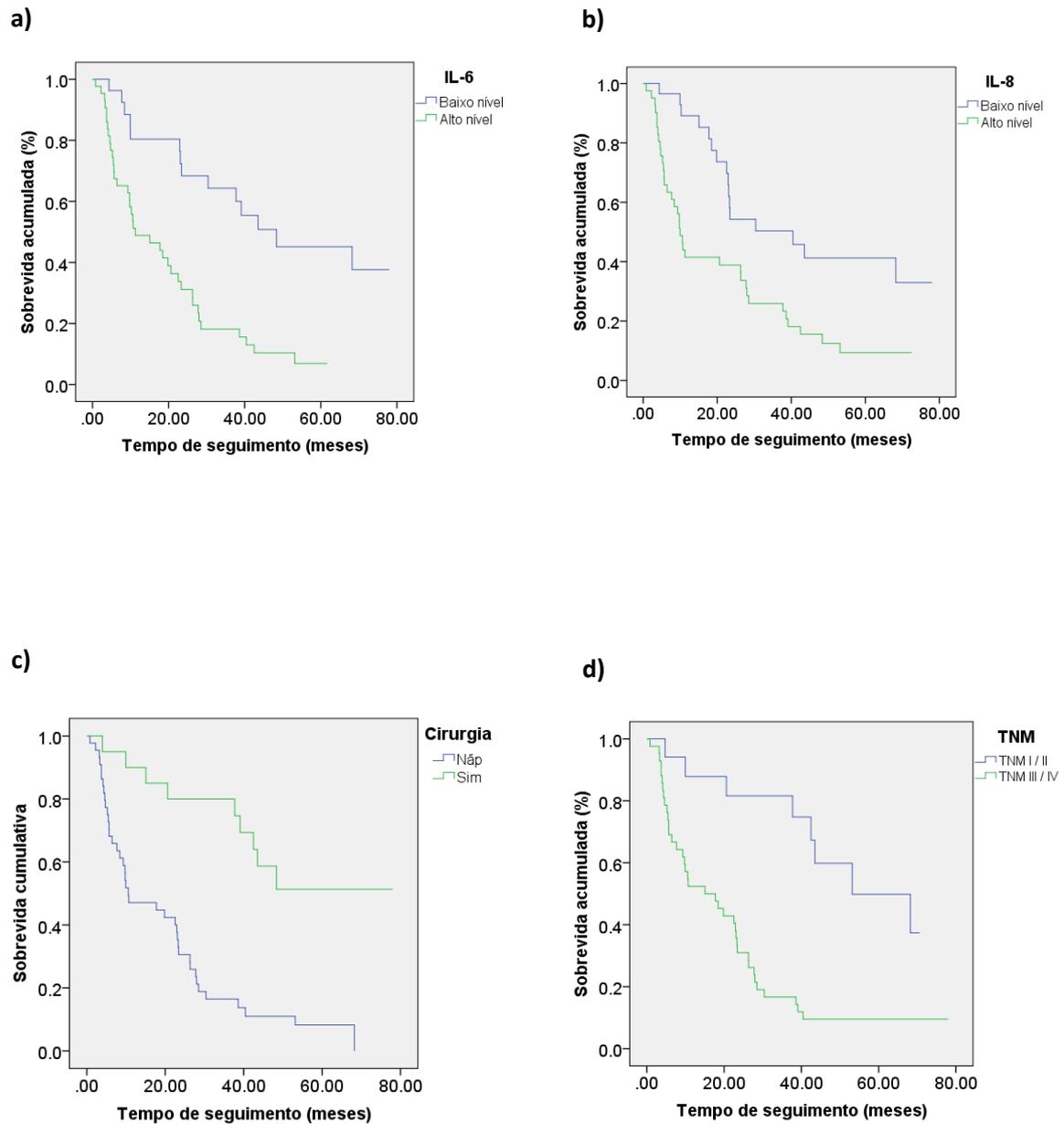
Além disso, os pacientes que foram submetidos à cirurgia apresentaram sobrevida (90,0% em 12 meses, 80,0% em 36 meses e 51,3% em 60 meses) significativamente melhor ( $p < 0,001$ ) quando comparados àqueles que não fizeram cirurgia (47,1% em 12 meses, 16,5% em 36 meses e 8,2% em 60 meses) e, aqueles com estadiamento inicial (TNM I/II) apresentaram melhor sobrevida (87,8% em 12 meses, 81,6% em 36 meses e 49,% em 60 meses) quando comparados com pacientes diagnosticados com estadiamento avançado (TNM III/IV) (52,4% em 12 meses, 16,7% em 36 meses e 9,5% em 60 meses), apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

A sobrevida global de indivíduos com CEC de esôfago em relação aos níveis plasmáticos (baixo e alto) de IL-6 e IL-8, cirurgia (não / sim) e estadiamento TNM (I – II/ III – IV) está representada nas curvas de Kaplan-Meier das **Figuras 2 e 3**.

**Figura 2** – Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global dos indivíduos com câncer de esôfago (n=70). Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



**Figura 3** - Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global correlacionados com variáveis estatisticamente significativas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global correlacionada com a) IL-6 (n=70; 43 com altos níveis e 27 com baixos níveis), b) IL-8 (n=70; 41 com altos níveis e 29 com baixos níveis), c) Cirurgia (n=64; 44 que não realizaram cirurgia e 20 que realizaram cirurgia) e d) Estadiamento TNM (n=59; 17 com TNM I/II e 42 com TNM III/IV).

As variáveis que apresentaram um valor de  $p < 0,2$  foram selecionadas para compor a análise multivariada utilizando a Regressão de COX. Na **tabela 12** estão apresentadas as estimativas de razão de risco [*Hazard Ratio* (HR)] e seus respectivos intervalos de confiança (IC) 95% para as variáveis estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ).

**Tabela 12** - Estimativa de Razão de risco (*Hazard Ratio*) pelo modelo de Cox para o tempo de sobrevida global em indivíduos com CEC de esôfago. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	n casos (n eventos)	HR (IC95%)	P
<b>IL-12p70</b>			
<1,23	40 (33)	-	-
≥1,23	16 (12)	0,33 (0,15 – 0,73)	0,007
<b>TNF-α</b>			
<0,825	41 (36)	-	-
≥0,825	15 (9)	0,23 (0,09 – 0,59)	0,003
<b>IL-8</b>			
<6,75	22 (14)	-	-
≥6,75	34 (31)	4,56 (2,21 – 9,41)	0,002
<b>Cirurgia</b>			
Não	40 (37)	-	-
Sim	16 (8)	0,21 (0,08 – 0,55)	0,002
<b>Radioterapia</b>			
Não	25 (22)	-	-
Sim	31 (23)	0,27 (0,14 – 0,54)	<0,001
<b>TNM</b>			
I/II	16 (8)	-	-
III/IV	40 (37)	3,68 (1,45 – 9,37)	0,006

n: número; HR: Hazard Ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; IL: interleucina; TNF-α: Fator de necrose tumoral; TNM: Sistema baseado no tamanho e/ou extensão do tumor primário (T), quantidade de linfonodos comprometidos (N) e presença de metástases (M).

Teste utilizado: Regressão de Cox.

Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

Observa-se que, em relação às citocinas, aqueles indivíduos que apresentam nível elevado da citocina IL-12p70 possuem um menor risco de evoluir ao óbito quando comparados àqueles com menor nível da citocina [HRaj (Razão de Risco ajustado): 0,34 – IC95%: 0,14 – 0,79]. Além disso, os indivíduos que apresentam nível elevado da citocina TNF-α possuem um risco menor de vir a óbito quando comparados àqueles com baixo nível de TNF-α (HRaj: 0,23 – IC95%: 0,09 – 0,59).

Ao contrário de IL-12p70 e TNF- $\alpha$ , em que os níveis elevados são considerados fatores protetores para o desenvolvimento do CE, a citocina IL-8 parece ser um fator de risco para a doença, já que os indivíduos que apresentaram níveis aumentados da citocina tiveram maior risco de ir a óbito quando comparado aos indivíduos com baixo nível de IL-8 (HRaj: 4,56 – IC95%: 2,21 – 9,41).

Como esperado, os pacientes que foram submetidos à cirurgia e radioterapia apresentaram risco menor de ir à óbito quando comparado aos que não passaram por cirurgia ou não realizaram radioterapia [(HRaj: 0,21 – IC95%: 0,08 – 0,55); (HRaj: 0,27 – IC95%: 0,14 – 0,54)] respectivamente. Além disso, pacientes com TNM em estágio inicial (I/II) também apresentaram risco menor de ir à óbito quando comparado àqueles com TNM avançado (III/IV) (HRaj: 3,68 – IC95%: 1,45 – 9,37).

### 5.3 Análise do SNP IL-8 (rs4073) -251A>T

As frequências dos genótipos de IL-8 (rs4073) -251 A>T foram determinadas e estão descritas na **Tabela 13**, sendo: 49,1% para AT, 27,9% para AA e 23,0% para TT.

**Tabela 13** - Frequências dos genótipos de IL-8 (rs4073) -251 A>T. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Genótipos IL8 -251A>T (rs4073)	Frequência	
	n	(%)
AA	17	27,9
AT	30	49,1
TT	14	23,0
<b>Total</b>	<b>61</b>	<b>100,0</b>

Em seguida, os genótipos foram avaliados em relação aos níveis plasmáticos da citocina IL-8 e às características do tumor. Como demonstrado na **Tabela 14**, os pacientes com altos níveis plasmáticos de IL-8 apresentaram uma maior frequência do genótipo AA, apresentando uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,019$ ). Em relação às variáveis relacionadas com as características do tumor (TNM, grau de diferenciação e topografia do tumor) não houve diferença estatística entre os genótipos avaliados.

**Tabela 14** – Avaliação dos genótipos de IL-8 (rs4073)-251 A>T em relação aos níveis plasmáticos da citocina IL-8 e às características do tumor. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	IL8 -251A>T (rs4073)						P
	AA		AT		TT		
	n(*)	(%)	n(*)	(%)	n (*)	(%)	
<b>IL-8</b>							
<6,75	2	11,8	16	53,3	6	42,9	<b>0,019</b>
≥6,75	15	88,2	14	46,7	8	57,1	
<b>T</b>							
T1 – T2	1	6,7	5	18,5	2	16,7	0,609**
T3 – T4	14	93,3	22	81,5	10	83,3	
<b>N</b>							
N0	3	33,3	9	34,6	4	36,4	>0,999**
N positivo	6	66,7	17	65,4	7	63,6	
<b>M</b>							
M0	13	86,7	24	85,7	10	71,4	0,542**
M1	2	13,3	4	14,3	4	28,6	
<b>TNM</b>							
I –II	5	41,7	7	25,9	2	15,4	0,381**
III - IV	7	58,3	20	74,1	11	84,6	
<b>Grau de diferenciação</b>							
Bem diferenciado	2	14,3	3	10,3	4	28,6	0,270**
Moderadamente diferenciado	9	64,3	17	58,6	4	28,6	
Pouco diferenciado	3	21,4	9	31,0	6	42,9	
<b>Topografia do tumor</b>							
Terço superior	0	0,0	1	4,2	1	8,3	0,709**
Terço médio	7	53,8	15	62,5	5	41,7	
Terço inferior	0	0,0	1	4,2	1	8,3	
SOE	6	46,2	7	29,2	5	41,7	

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

n: número; %: porcentagem.

Teste utilizado: Qui-quadrado ou \*\*Exato de Fisher

Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

Diante destes resultados, optou-se por também avaliar a influência dos genótipos do SNP IL-8 (rs4073)-251A>T encontrados nos pacientes com CE e a sobrevida destes pacientes em 12, 36 e 60 meses (**Tabela 15, Figura 4**)

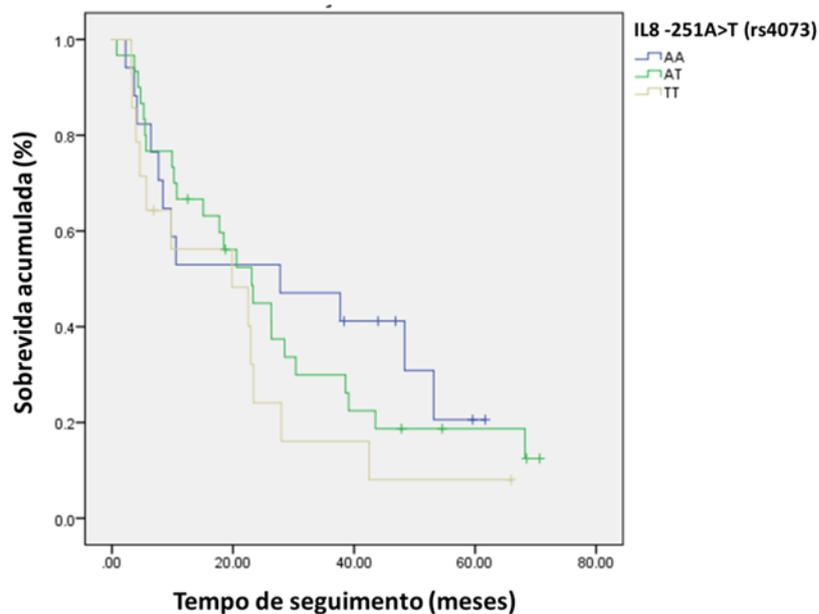
**Tabela 15** - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier considerando os genótipos AA, AT e TT. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Genótipos	n casos (n eventos)	% Probabilidade de sobrevivência			p
		12 meses	36 meses	60 meses	
AA	17 (27,9)	52,9	47,1	20,6	0,325
AT	30 (49,1)	66,7	29,9	18,7	
TT	14 (23,0)	56,3	16,1	8,0	

Teste utilizado: Log-rank.

Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

**Figura 4** – Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global dos indivíduos com câncer de esôfago correlacionada com o polimorfismo IL8-251A>T (rs4073) (n=61). Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



Como pode ser observado, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os SNPs de IL-8 (rs4073)-251 A>T e a sobrevida dos pacientes com CE.

## 5.4 Coleta prospectiva de sangue e informações sociodemográficas e clinicopatológicas de pacientes com CEC de esôfago para avaliação do perfil plasmático de citocinas

### 5.4.1 Caracterização da população de estudo

Com o intuito de aumentar o tamanho amostral do presente estudo, foram incluídos prospectivamente 47 pacientes com as mesmas características do grupo caso 1 previamente analisado, sendo que desses, 4 precisaram ser excluídos (3 por ausência de amostras sanguínea e 1 por diagnóstico de adenocarcinoma). Sendo assim, 43 pacientes permaneceram nesse grupo possuindo sangue e informações sócio-demográficas para a realização das análises. Fazendo uma breve caracterização dessa população, em sua maioria foi composta por homens (79,1%), de raça branca (72,1%), não casados (62,8%), com nível de escolaridade ensino fundamental/médio (79,1%) e que residiram em zona rural e urbana (78,0%). Além disso, a maioria dos indivíduos relatou já ter consumido bebida alcoólica (92,7%) e ter fumado (90,2%) (**Tabela 16**).

Em relação às características clínico-patológicas do grupo caso 2, a maioria dos tumores apresentaram grau histológico 2 (41,9%) e considerando o Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, observou-se que 86,5% dos casos foram diagnosticados em T3 – T4, com comprometimento de linfonodo (N positivo = 57,5%) e sem metástase (M0 = 84,6%). Com o agrupamento das categorias TNM, constata-se que 69,0% dos pacientes foram admitidos com estadiamento avançado (III – IV). Além disso, 83,7% dos pacientes não realizaram cirurgia, sendo que a grande maioria realizou tratamentos de radio (72,1%) e quimioterapia (93,0%) (**Tabela 16**).

**Tabela 16** - Caracterização da população de estudo (Grupo Caso 2) segundo as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida e clínico-patológicas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	Casos	
	n(*)	(%)
<b>Sexo</b>		
Masculino	34	79,1
Feminino	9	20,9
<b>Raça</b>		
Branco	31	72,1
Não branco	12	27,9
<b>Estado civil</b>		
Não casado	27	62,8
Casado	16	37,2
<b>Escolaridade</b>		
Analfabeto/Analf. Funcional	9	20,9
Ensino fundamental/médio	34	79,1
Ensino superior	0	0,0
<b>Onde mora / morou</b>		
Somente zona urbana	7	17,1
Somente zona rural	2	4,9
Ambas	32	78,0
<b>Álcool</b>		
Não	3	7,3
Sim	38	92,7
<b>Tabaco</b>		
Não	4	9,8
Sim	37	90,2
<b>Grau Histológico</b>		
Grau 1	1	2,3
Grau 2	18	41,9
Grau 3	9	20,9
Indisponível	15	34,9
<b>T</b>		
T1 – T2	5	13,5
T3 – T4	32	86,5

(continua na próxima página)

**Tabela 16 (continuação)** - Caracterização da população de estudo (Grupo Caso 2) segundo as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida e clínico-patológicas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	Casos	
	n(*)	(%)
<b>N</b>		
N0	14	42,4
N positivo	19	57,5
<b>M</b>		
M0	33	84,6
M1	6	15,4
<b>Estadiamento TNM</b>		
I – II	9	31,0
III – IV	20	69,0
<b>Cirurgia</b>		
Não	36	83,7
Sim	7	16,3
<b>Radioterapia</b>		
Não	12	27,9
Sim	31	72,1
<b>Quimioterapia</b>		
Não	3	7,0
Sim	40	93,0
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>100</b>

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

n: número; %: porcentagem.

Estadiamento TNM: Sistema baseado no tamanho e/ou extensão do tumor primário (T), quantidade de linfonodos comprometidos (N) e presença de metástases (M).

Como esperado, a caracterização da população do grupo caso 2 foi bem semelhante a do grupo caso 1, já que foram incluídos o mesmo perfil de pacientes em ambos os grupos. Sendo assim, decidimos por unir os 2 grupos casos, aumentando nosso tamanho amostral, para prosseguir com as análises do perfil plasmático de citocinas como possível ferramenta indicadora de prognóstico da doença.

Sendo assim, a união dos 2 grupos casos (1 e 2) resultou no tamanho amostral de 113 indivíduos no grupo caso e 70 indivíduos no grupo controle e a caracterização desta população geral está demonstrada na **Tabela 17**.

**Tabela 17** - Caracterização da população de estudo segundo as variáveis sócio-demográficas e estilo de vida. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	Casos 1 e 2		Controles		P
	n(*)	(%)	n (*)	(%)	
<b>Sexo</b>					
Masculino	93	82,3	58	82,9	0,923
Feminino	20	17,7	12	17,1	
<b>Raça</b>					
Branco	81	73,0	51	72,9	0,986
Não branco	30	27,0	19	27,1	
<b>Estado civil</b>					
Não casado	44	38,9	22	31,4	0,304
Casado	69	61,1	48	68,6	
<b>Escolaridade</b>					
Analfabeto/Analf. Funcional	19	16,8	0	0,0	<b>&lt;0,001</b>
Ensino fundamental/médio	90	79,6	54	77,1	
Ensino superior	4	3,5	16	22,9	
<b>Onde mora / morou</b>					
Somente zona urbana	19	17,1	29	41,4	<b>0,001</b>
Somente zona rural	10	9,0	5	7,1	
Ambas	82	73,9	36	51,4	
<b>Álcool</b>					
Não	6	5,4	12	17,1	<b>0,010</b>
Sim	105	94,6	58	82,9	
<b>Tabaco</b>					
Não	14	12,6	37	52,9	<b>&lt;0,001</b>
Sim	97	87,4	33	47,1	
<b>Exposição a pesticida ou inseticida</b>					
Não	47	42,3	50	73,5	<b>&lt;0,001</b>
Sim	64	57,7	18	26,5	

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

n: número; %: porcentagem.

Teste utilizado: Qui-quadrado. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

Após, foi feita a caracterização clínico-patológicos (grau histológico, estadiamento e topografia do tumor) dos dois grupos.

A população do estudo foi composta, em sua maioria, por homens com idade média de 57,48 (DP:7,72) anos para o grupo controle e 58,99 (DP: 9,29) anos para o grupo caso. Como já esperado, por se tratar de inclusão de sujeito de pesquisa seguindo os mesmo critérios, após o pareamento dos grupos, não houve diferença estatisticamente significativa entre caso e controle para as variáveis idade ( $p=0,452$ ) e sexo ( $p=0,923$ ). Além disso, as variáveis raça e estado civil também não foram estatisticamente diferente entre os grupos. Em relação às variáveis escolaridade ( $p < 0,001$ ), local onde mora/morou ( $p=0,001$ ), consumo de álcool ( $p < 0,010$ ) e de tabaco ( $p < 0,001$ ) e exposição à pesticida ou inseticida ( $p < 0,001$ ) foi encontrada diferença estatística entre os grupos caso e controle, sendo o grupo caso composto por maior frequência de indivíduos analfabetos/analfabetos funcionais (16,8%) em relação aos indivíduos do grupo controle (0,0%). Em relação ao local onde mora/morou, a maioria dos indivíduos do grupo caso residiu nas zonas urbana e rural (73,9%), enquanto a maior parte dos indivíduos do grupo controle residiu apenas na zona urbana (41,4%), ou rural e urbana (51,4%). Além disso, a frequência de indivíduos do grupo caso que fizeram ingestão de álcool (94,6%) foi maior que a observada para indivíduos do grupo controle (82,9%). Em relação ao tabagismo, a frequência de indivíduos do grupo caso que relataram ter fumado (87,4%) foi maior que a observada para indivíduos do grupo controle (47,1%). Além disso, tivemos uma maior frequência de indivíduos do grupo caso que fizeram exposição à pesticida ou inseticida (57,7%), em comparação aos indivíduos do grupo controle (26,5%).

A caracterização do grupo caso 1 + 2 em relação às variáveis clínico-patológicas está descrita na **Tabela 18**.

**Tabela 18** – Caracterização do grupo caso 1 e 2 segundo as variáveis clínico - patológicas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável	Categoria	n (*)	(%)
<b>T</b>	T1 – T2	16	16,0
	T3 – T4	84	84,0
<b>N</b>	N0	33	37,5
	N positivo	55	62,5
<b>M</b>	M0	89	84,8
	M1	16	15,2
<b>Estadiamento TNM</b>	I – II	26	29,5
	III – IV	62	70,5
<b>Cirurgia</b>	Não	80	74,8
	Sim	27	25,2
<b>Radioterapia</b>	Não	37	33,3
	Sim	74	66,7
<b>Quimioterapia</b>	Não	27	24,1
	Sim	85	75,9

(\*) Casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

Estadiamento TNM: Sistema baseado no tamanho e/ou extensão do tumor primário (T), quantidade de linfonodos comprometidos (N) e presença de metástases (M).

A maioria dos tumores (84,0) % foi diagnosticada em T3 – T4, com comprometimento de linfonodo (N positivo = 62,5%) e sem metástase (M0 = 84,8%), e 70,5% dos pacientes foram admitidos com estadiamento TNM agrupado considerado avançado (III – IV). Além disso, 74,8% dos pacientes não realizaram cirurgia, e a grande maioria realizaram tratamentos de radio (66,7%) e quimioterapia (75,9%).

#### 5.4.2 Quantificação dos níveis plasmáticos das citocinas

Para avaliar se o perfil de citocinas estaria relacionado com o CCEE, as 113 amostras sanguíneas referentes aos grupos caso (1 e 2) e 70 referentes ao grupo controle, foram submetidas à mensuração do nível das citocinas envolvidas em processo inflamatório, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8. Na **Tabela 19**, pode-se observar que dentre as seis

citocinas quantificadas, apenas duas apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo elas: IL-6 ( $p < 0,001$ ) e IL-8 ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 19** – Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas entre os grupos de estudo (caso 1 e 2/ Controle). Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Citocinas	n (válido)	Caso 1 e 2		n (válido)	Controle		p
		Média (DP) pg/mL	Mediana (min - máx) pg/ mL		Média (DP) pg/ mL	Mediana (min - máx) pg/ mL	
IL-12p70	113	0,58 (1,04)	0,00 (0,00 – 6,64)	70	0,93 (1,61)	0,28 (0,00 – 11,51)	0,093
TNF- $\alpha$	113	0,87 (2,12)	0,20 (0,00 – 16,37)	70	0,86 (2,14)	0,05 (0,00 – 14,27)	0,841
IL-10	113	8,16 (76,80)	0,29 (0,00 – 816,59)	70	0,55 (0,78)	0,42 (0,00 – 5,73)	0,476
IL-6	113	719,66 (7567,06)	4,45 (0,21 - 80446,68)	70	2,07 (2,49)	1,62 (0,00 – 18,18)	<b>&lt;0,001</b>
IL-1 $\beta$	113	0,95 (2,60)	0,13 (0,00 – 24,60)	70	0,66 (1,87)	0,00 (0,00 – 13,76)	0,236
IL-8	113	124,38 (1203,99)	6,74 (1,70 - 12806,73)	70	3,52 (3,05)	3,16 (0,64 – 25,59)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Total</b>	<b>113</b>			<b>70</b>			

DP: desvio padrão; pg/mL: picograma por mililitro; IL: interleucina; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral. Teste utilizado: Teste Mann-Whitney. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

Do mesmo modo como foi realizado quando considerou-se apenas o grupo caso 1 e, almejando análise mais abrangente dos resultados, realizou-se análise multivariada, adotando um nível de significância  $\alpha = 0,20$ , e por isso, além das variáveis estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), foram incluídas aquelas com valor de  $p < 0,20$ .

A análise multivariada foi realizada através da regressão logística múltipla, considerando nível de significância  $\alpha = 0,05$  para o modelo final e, todas as variáveis significativas em relação aos grupos de estudo (casos 1 e 2 / controle) foram incluídas como: local onde mora/morou, consumo de álcool, tabagismo, exposição à pesticida ou inseticida, e as citocinas IL-6, IL-8 e IL-12p70. Esta análise permitiu estimar a *Odds Ratio* (OR), ou seja, a probabilidade daqueles indivíduos com fator de risco para desenvolverem a doença e as chances daqueles sem fator de risco de desenvolverem a doença.

No modelo final, apenas tabagismo, exposição à pesticida ou inseticida, IL-8 e IL-12p70 permaneceram como variáveis estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Sendo assim, aqueles indivíduos que relataram já ter fumado ( $p < 0,001$ ) apresentam chance de 7,4 vezes (IC 95%: 2,6 – 21,2) de desenvolver CE em comparação àqueles que nunca fumaram. Além disso, os indivíduos que foram expostos à inseticida ou pesticida ( $p=0,011$ ) apresentam chance 2,9 vezes (IC 95%: 1,3 – 6,9) de desenvolver a doença em comparação àqueles que não foram expostos (**Tabela 20**).

**Tabela 20** - Modelo de regressão logística múltipla das variáveis estatisticamente significativas entre os grupos (casos 1 e 2/ controle). Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	n casos (n eventos)	OR (IC95%)	p
<b>Tabaco</b>			
Não	49 (14)	1	-
Sim	130 (97)	7,4 (2,6 – 21,2)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Exposição a pesticida ou inseticida</b>			
Não	97 (47)	1	-
Sim	82 (64)	2,9 (1,3 – 6,9)	<b>0,011</b>
<b>IL-8</b>	179 (111)	1,7 (1,3 – 2,1)	<b>&lt;0,001</b>
<b>IL-12p70</b>	179 (111)	0,6 (0,4 – 0,9)	<b>0,022</b>

n: número; OR: *Odds Ratio*; IC 95%: intervalo de confiança ao nível de 95%; IL: interleucina. Teste utilizado: Teste de Wald. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

Ainda, o aumento da expressão de IL-8 ( $p < 0,001$ ) aumenta a chance de desenvolver o câncer esofágico (OR: 1,7 - IC 95%: 1,3 – 2,1), enquanto o aumento da expressão de IL-12p70 ( $p=0,022$ ) reduz o risco de desenvolver a doença (OR: 2,9 - IC 95%: 0,4 – 0,9) (**Tabela 20**).

#### 5.4.3 Análise da sobrevida de pacientes com CEC de esôfago (Grupos Caso 1 e 2)

Sabendo que as citocinas têm grande influencia no desenvolvimento das neoplasias malignas, na definição de microambiente tumoral e ainda podem atuar de modo sistêmico, optou-se por avaliar a relação das citocinas com a sobrevida dos pacientes com CE e para

isto, foi estabelecido um novo ponto de corte para o nível plasmático utilizando a curva ROC e, o valor final (pg/mL) obtido como resultado do ensaio de quantificação das citocinas por CBA, foi utilizado para discriminar óbitos. O ponto de corte estabelecido, a sensibilidade, especificidade e área abaixo da curva das seis citocinas analisadas estão descritos na **Tabela 21**.

**Tabela 21** - Ponto de corte para citocinas (Grupos caso 1 e 2). Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Citocinas	Ponto de corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC (%)
IL-12p70	5,74	1,30	100,0	43,2
TNF- $\alpha$	2,20	11,4	94,1	48,0
IL-10	1,87	16,5	100,0	53,7
IL-1 $\beta$	0,235	46,8	55,9	46,4
IL-6	2,84	81,0	61,8	72,9
IL-8	7,67	48,0	82,4	67,7

AUC: área abaixo da curva ROC; IL: interleucina; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral.

À partir da determinação do ponto de corte para cada citocina, dois níveis plasmáticos foram definidos, baixo e alto, para categorização (**Tabela 22**).

Assim, para avaliar a influencia das citocinas na sobrevida dos pacientes, fez análise em relação às características sócio-demográficas, estilo de vida, dados clínico-patológicos (**Tabela 23**).

Dentre todas as variáveis analisadas, somente IL-6, IL-8, IL-12p70, cirurgia, radioterapia e TNM apresentaram influência significativa na sobrevida de pacientes com CE através das análises de Kaplan-Meier e teste de Log-rank. Como pode ser observado na **Tabela 23**, a estimativa da sobrevida global em 12 meses é 56,7%, em 36 meses é 33,4% e em 60 meses, 19,1%.

Então, ao analisar a expressão das citocinas em relação à sobrevida, obteve-se que os indivíduos com nível elevado da citocina IL-6 apresentaram pior sobrevida (45,2% em 12 meses, 22,9% em 36 meses e 8,1% em 60 meses) comparados com indivíduos portadores de baixo nível plasmático de IL-6 (82,3% em 12 meses, 60,3% em 36 meses e 48,8% em 60 meses). Os pacientes com nível plasmático elevado de IL-8 tiveram pior sobrevida (34,1% em

12 meses, 22,9% em 36 meses e 6,5% em 60 meses) quando comparado com aqueles indivíduos que apresentaram baixo nível da citocina (71,6% em 12 meses, 40,0% em 36 meses e 28,7% em 60 meses).

Além disso, os pacientes que foram submetidos à cirurgia (92,6% em 12 meses, 81,3% em 36 meses e 52,2% em 60 meses) e realizaram radioterapia (61,7% em 12 meses, 39,3% em 36 meses e 26,6% em 60 meses) apresentaram sobrevida significativamente melhor quando comparados àqueles que não fizeram cirurgia (43,8% em 12 meses, 15,7% em 36 meses e 6,9% em 60 meses) ou não realizaram radioterapia (44,1% em 12 meses, 22,0% em 36 meses e 5,5% em 60 meses). Além disso, aqueles pacientes com estadiamento inicial (TNM I/II) apresentaram melhor sobrevida (92,1% em 12 meses, 79,4% em 36 meses e 44,8% em 60 meses) quando comparados com pacientes diagnosticados com estadiamento avançado (TNM III/IV) (44,3% em 12 meses, 15,0% em 36 meses e 8,6% em 60 meses), apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

A curva de Kaplan-Meier para a sobrevida global de indivíduos com CEC de esôfago esta representada na **Figura 5**.

**Tabela 22** - Descritiva das citocinas categorizadas para caso e controle. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Citocinas	Categorias (nível)	n (%)
<b>IL-12p70</b>	Baixo (<5,74pg/mL)	181 (98,9)
	Alto ( $\geq$ 5,74 pg/mL)	2 (1,1)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Baixo (< 2,20 pg/mL)	168 (91,8)
	Alto ( $\geq$ 2,20 pg/mL)	15 (8,2)
<b>IL-10</b>	Baixo (< 1,87 pg/mL)	168 (91,8)
	Alto ( $\geq$ 1,87 pg/mL)	15 (8,2)
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Baixo (< 0,235 pg/mL)	103 (56,3)
	Alto ( $\geq$ 0,235 pg/mL)	80 (43,7)
<b>IL-6</b>	Baixo (< 2,84 pg/mL)	95 (51,9)
	Alto ( $\geq$ 2,84 pg/mL)	88 (48,1)
<b>IL-8</b>	Baixo (< 7,67 pg/mL)	138 (75,4)
	Alto ( $\geq$ 7,67 pg/mL)	45 (24,6)

n: número; IL: interleucina; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral; pg/mL: picograma por mililitro.

**Tabela 23** - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier considerando as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida, dados clínico-patológicos e os níveis plasmáticos das citocinas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	n casos (n eventos)	% Probabilidade de sobrevivência			p
		12 meses	36 meses	60 meses	
<b>Global</b>	113 (79)	56,7	33,4	19,1	-
<b>Sexo</b>					
Feminino	20 (16)	42,9	26,8	10,0	0,500
Masculino	93 (63)	59,6	34,4	20,7	
<b>Raça</b>					
Branco	81 (56)	59,9	34,1	21,7	0,120
Não branco	30 (23)	45,9	28,2	0,00	
<b>Exposição a pesticida ou inseticida</b>					
Não	47 (33)	59,2	41,1	22,0	0,511
Sim	64 (44)	56,7	28,2	17,5	
<b>Onde mora / morou</b>					
Somente zona urbana	19 (12)	68,4	37,3	37,3	0,539
Somente zona rural	10 (8)	60,0	25,0	12,5	
Ambas	82 (57)	54,9	34,5	15,7	
<b>Álcool</b>					
Não	6 (5)	50,0	50,0	0,0	0,912
Sim	105 (72)	58,2	32,8	21,0	
<b>Tabaco</b>					
Não	14 (11)	28,6	21,4	21,4	0,204
Sim	97 (66)	62,1	35,6	19,0	
<b>IL-12p70</b>					
<5,74	112 (78)	57,2	33,7	19,3	<0,001
≥5,74	1 (1)	0,00	0,00	0,00	
<b>TNF-α</b>					
<2,20	102 (70)	57,0	30,8	21,4	0,961
≥2,20	11 (9)	54,5	54,5	10,9	

(continua na próxima página)

**Tabela 23 (continuação)** - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier considerando as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida, dados clínico-patológicos e os níveis plasmáticos das citocinas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

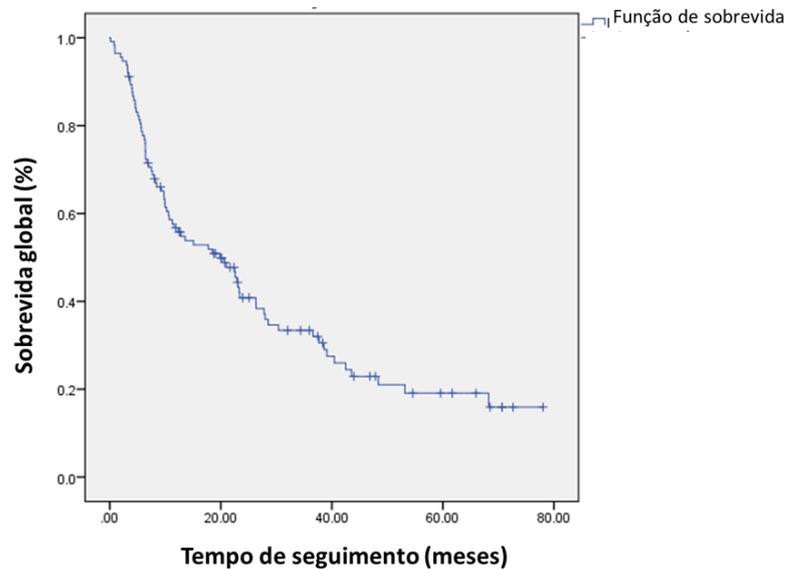
Variável / Categoria	n casos (n eventos)	% Probabilidade de sobrevivência			p
		12 meses	36 meses	60 meses	
<b>IL-10</b>					
<1,87	100 (66)	57,1	32,7	24,7	0,428
≥1,87	13 (13)	53,8	38,5	0,00	
<b>IL-6</b>					
<2,84	36 (15)	82,3	60,3	48,8	<b>&lt;0,001</b>
≥2,84	77 (64)	45,2	22,9	8,1	
<b>IL-1β</b>					
<0,235	61 (42)	59,7	27,8	21,2	0,921
≥0,235	52 (37)	53,3	39,2	18,1	
<b>IL-8</b>					
<7,67	69 (41)	71,6	40,0	28,7	<b>0,001</b>
≥7,67	44 (38)	34,1	22,9	6,5	
<b>Cirurgia</b>					
Não	80 (66)	43,8	15,7	6,9	<b>&lt;0,001</b>
Sim	27 (10)	92,6	81,3	52,2	
<b>Radioterapia</b>					
Não	37 (31)	44,1	22,0	5,5	<b>0,024</b>
Sim	74 (47)	61,7	39,3	26,6	
<b>Quimioterapia</b>					
Não	27 (23)	37,0	29,6	13,9	0,141
Sim	85 (56)	62,6	33,5	21,3	
<b>TNM</b>					
I/II	26 (11)	92,1	79,4	44,8	<b>&lt;0,001</b>
III/IV	62 (53)	44,3	15,0	8,6	

n: número; IL: interleucina; TNF-α: Fator de necrose tumoral; TNM: Sistema baseado no tamanho e/ou extensão do tumor primário (T), quantidade de linfonodos comprometidos (N) e presença de metástases (M).

Teste utilizado: Log-rank.

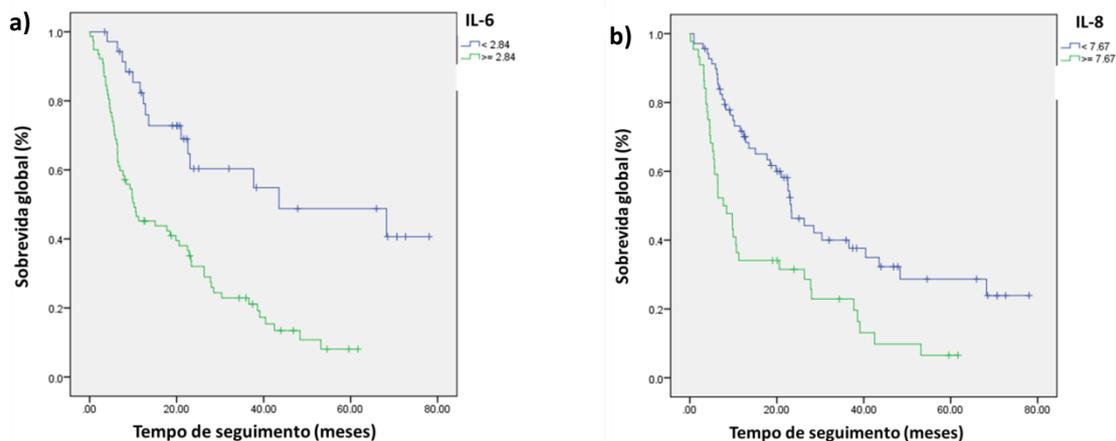
Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

**Figura 5** – Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global dos indivíduos com câncer de esôfago (n=113). Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



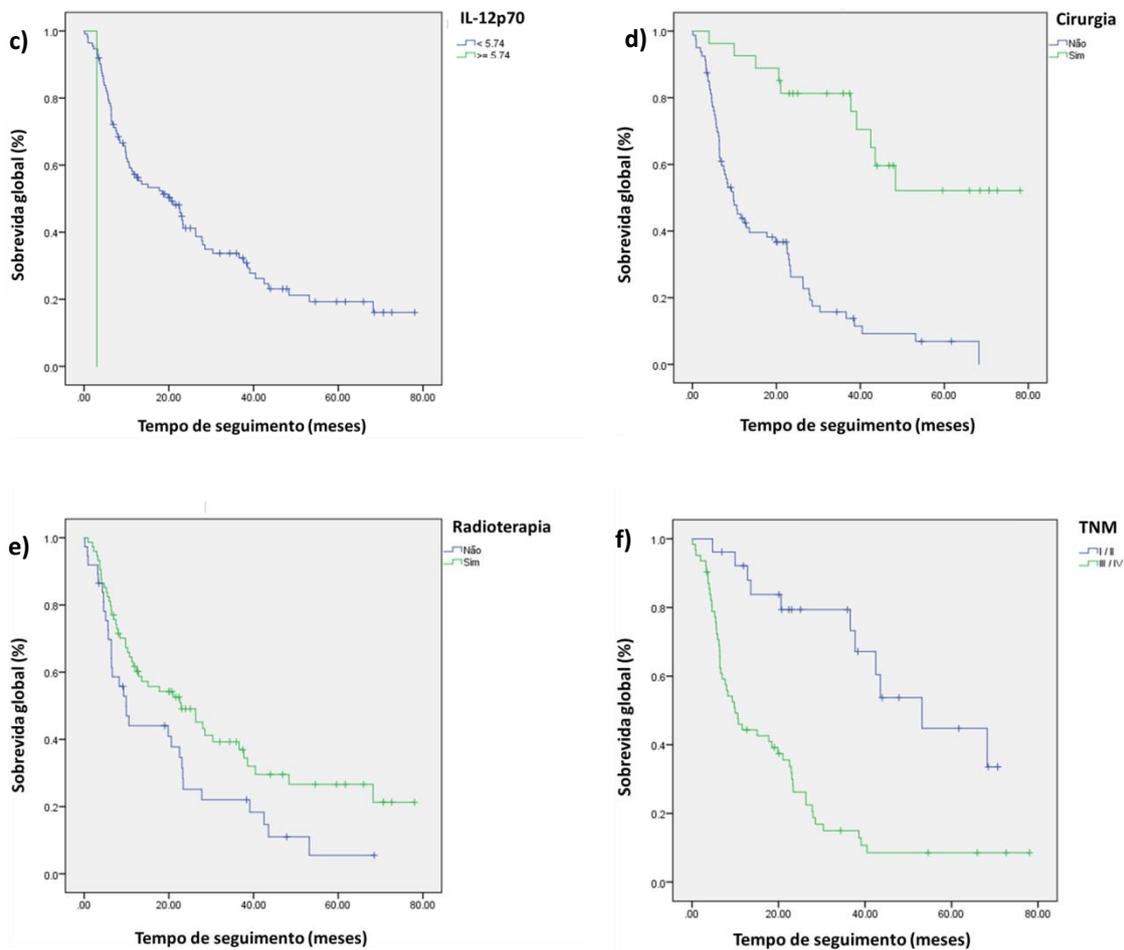
As curvas de Kaplan Meier em relação aos níveis plasmáticos (baixo e alto) de IL-6, IL-8, IL-12p70, cirurgia (não / sim), radioterapia (não / sim) e estadiamento TNM (I – II/ III – IV) estão demonstradas na **Figura 6**.

**Figura 6** - Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global correlacionados com variáveis estatisticamente significativas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



(continua na próxima página)

**Figura 6 (continuação)** - Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global correlacionados com variáveis estatisticamente significativas. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



Curvas de Kaplan-Meier da sobrevida global correlacionada com a) IL-6 (n=113; 77 com altos níveis e 36 com baixos níveis), b) IL-8 (n=113; 44 com altos níveis e 69 com baixos níveis), c) IL-12p70 (n=113; 1 com alto nível e 112 com baixos níveis) d) Cirurgia (n=107; 80 que não realizaram cirurgia e 27 que realizaram cirurgia), e) Radioterapia (n=111; 37 que não realizaram radioterapia e 74 que realizaram radioterapia) e f) Estadiamento TNM (n=88; 26 com TNM I/II e 62 com TNM III/IV).

As variáveis que apresentaram um valor de  $p < 0,2$  foram selecionadas para compor a análise multivariada utilizando a Regressão de COX. Então, foram calculadas as estimativas de razão de risco [*Hazard Ratio* (HR)] e seus respectivos intervalos de confiança (IC) 95% para as variáveis estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ) (Tabela 24).

**Tabela 24** - Estimativa de Razão de risco (Hazard Ratio) pelo modelo de Cox para o tempo de sobrevida global em indivíduos com CEC de esôfago. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	n casos (n eventos)	HR (IC95%)	P
<b>IL-8</b>			
<7,67	50 (30)	-	-
≥7,67	37 (33)	1,92 (1,15 – 3,20)	0,012
<b>Cirurgia</b>			
Não	66 (54)	-	-
Sim	21 (9)	0,32 (0,15 – 0,69)	0,004
<b>Radioterapia</b>			
Não	33 (28)	-	-
Sim	54 (35)	0,58 (0,35 – 0,98)	0,041
<b>TNM</b>			
I/II	26 (11)	-	-
III/IV	61 (52)	3,31 (1,63 – 6,75)	0,001

n: número; HR: Hazard Ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; IL: interleucina; TNM: Sistema baseado no tamanho e/ou extensão do tumor primário (T), quantidade de linfonodos comprometidos (N) e presença de metástases (M).

Teste utilizado: Regressão de Cox.

Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

Como pode ser notado, os indivíduos que apresentaram níveis aumentados de IL-8 tiveram maior risco de ir a óbito quando comparado aos indivíduos com baixo nível da citocina (HRaj: 1,92 – IC95%: 1,15 – 3,20), sugerindo que a citocina IL-8 seja um fator de risco para o desenvolvimento do CE.

Ainda, como esperado, os pacientes que foram submetidos à cirurgia e radioterapia apresentaram risco menor de ir à óbito quando comparado aos que não passaram por cirurgia ou não realizaram radioterapia [(HRaj: 0,32 – IC95%: 0,15 – 0,69); (HRaj: 0,58 – IC95%: 0,35 – 0,98)]. Além disso, pacientes com TNM em estágio inicial (I/II) também apresentaram risco menor de ir à óbito quando comparado àqueles com TNM avançado (III/IV) (HRaj: 3,31 – IC95%: 1,63 – 6,75).

### 5.5 Padronização anticorpo anti-TREX1

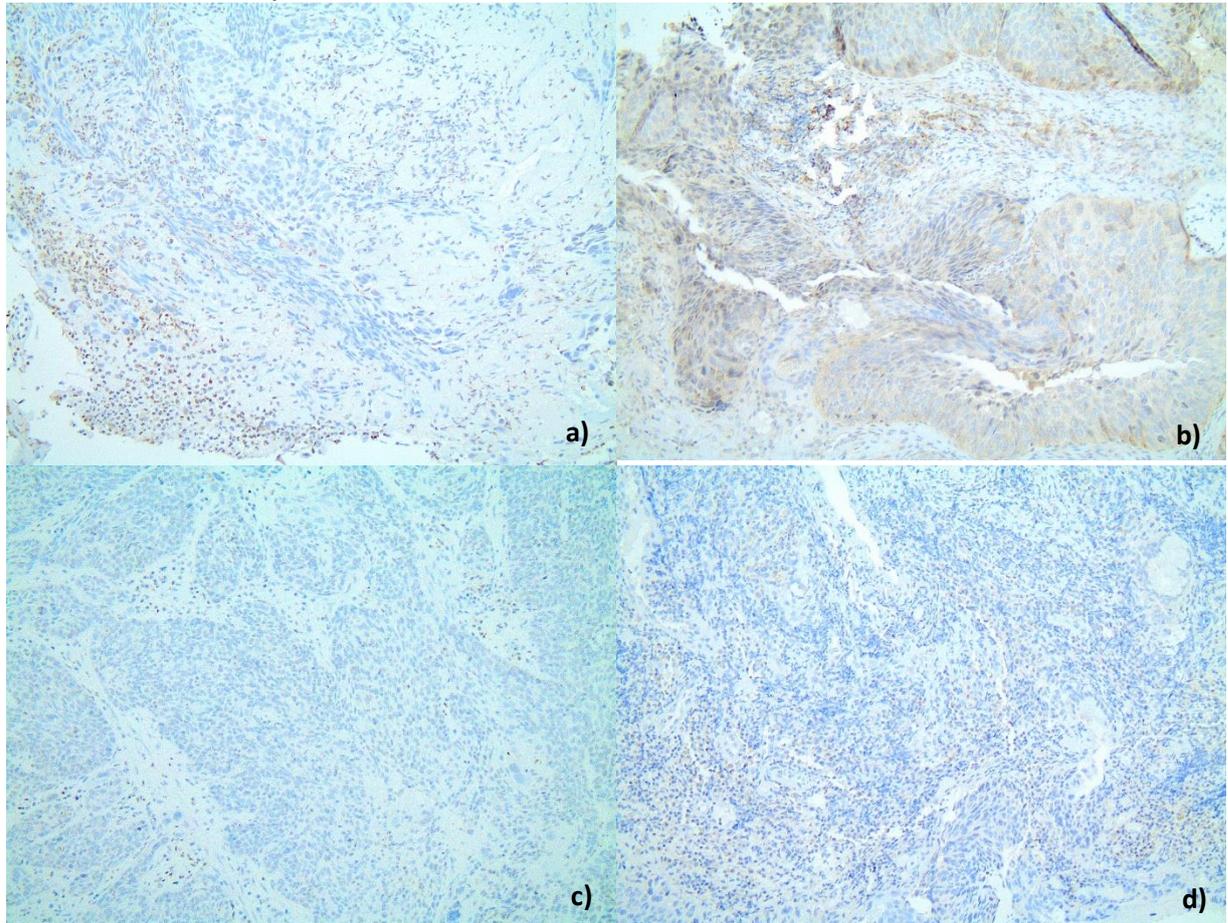
Inicialmente, foi realizada a padronização das reações de IHQ utilizando duas diluições de anticorpo anti-TREX1 (ab52947 – Anti-TREX1 antibody, lote GR126281, Biogen Comercial e Distribuidora Ltda), com base em estudo prévio<sup>46</sup> e informações de contato pessoal que diziam a marcação ocorrem em células de câncer de colo uterino, além de duas plataformas automatizadas diferentes (Ventana e Dako) no Hospital de Câncer de Barretos. Na **tabela 25** está descrito os detalhes das reações de padronização testadas.

**Tabela 25** – Padronização do anticorpo anti-TREX1 (ab52947) para IHQ. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Plataforma	Diluições	Amostras
Ventana	1:150	Ca colo uterino (NIC 3) Ca colo uterino (NIC 3) Ca colo uterino (CEC invasor) Colo de útero normal CEC esôfago CEC esôfago
	1:250	Ca colo uterino (NIC 3) Ca colo uterino (NIC 3) Ca colo uterino (CEC invasor) Colo de útero normal CEC esôfago CEC esôfago
Dako	1:150	Ca colo uterino (CEC invasor) Ca colo uterino (CEC invasor) Colo de útero normal CEC esôfago CEC esôfago
	1:250	Ca colo uterino (CEC invasor) Ca colo uterino (CEC invasor) Colo de útero normal CEC esôfago CEC esôfago

As reações preparadas em ambas as plataformas e em ambas as diluições não resultaram em marcação nuclear ou citoplasmática dos tecidos analisados, como era esperado (**Figura 7**).

**Figura 7** – Padronização do anticorpo anti-TREX1 (ab52947) em CEC de esôfago e carcinoma de colo uterino. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

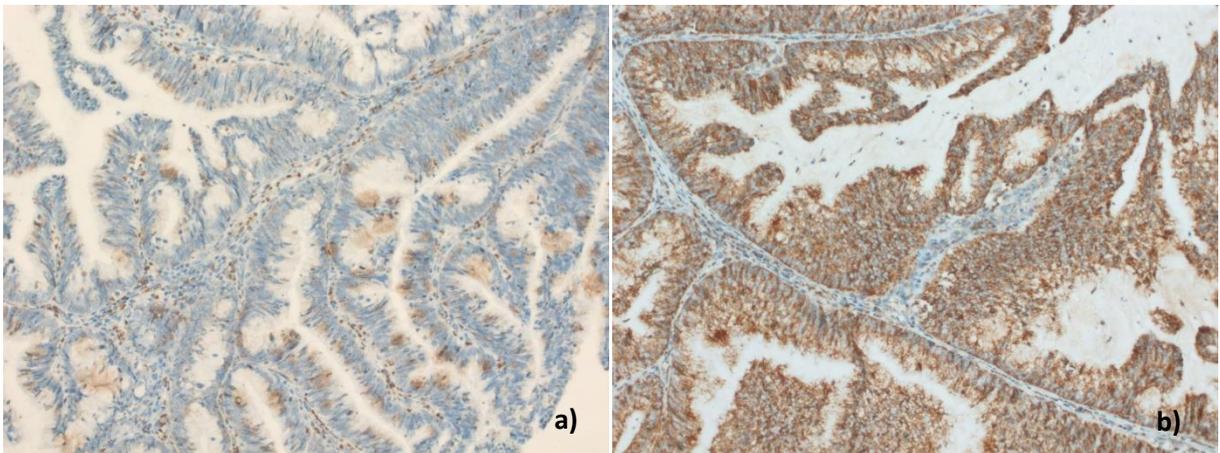


**a)**CEC de esôfago, testado com anticorpo ab52947 anti-TREX1, diluição 1:150; **b)** Carcinoma de colo uterino, testado com anticorpo ab52947 anti-TREX1, diluição 1:150; **c)** CEC de esôfago, testado com anticorpo ab52947 anti-TREX1, diluição 1:250; **d)** Carcinoma de colo uterino, testado com anticorpo ab52947 anti-TREX1, diluição 1:150;

Diante desse resultado, optou-se por estabelecer parceria com o grupo de pesquisa da Dra Lara Termini, do Laboratório de Inovação em Câncer, Centro de Investigação Translacional em Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Octavio Frias de Oliveira – ICESP, uma vez que o grupo tem experiência e publicações abordando IHQ para TREX1. Para a realização dos testes iniciais, o anticorpo (ab52947), previamente testado no Hospital de Câncer de Barretos (HA) foi comparado com o anticorpo anti-TREX1 (antibody,

lote GR57779-A, Biogen Comercial e Distribuidora Ltda) utilizado pelo grupo do ICESP e, observou-se que o anticorpo anti-TREX1 ICESP resultou forte marcação em carcinomas de colo uterino. Além disso, foram utilizadas lâminas dos casos de CEC de esôfago provenientes do Hospital de Câncer de Barretos e lâminas de carcinoma de colo uterino previamente analisadas pelo grupo de São Paulo e com resultado positivo para marcação de TREX1 em ambas as amostras. Para lâminas do mesmo caso, a marcação para TREX1 foi positiva apenas quando o anticorpo do grupo de São Paulo (GR57779-4) foi utilizado (**Figura 8**).

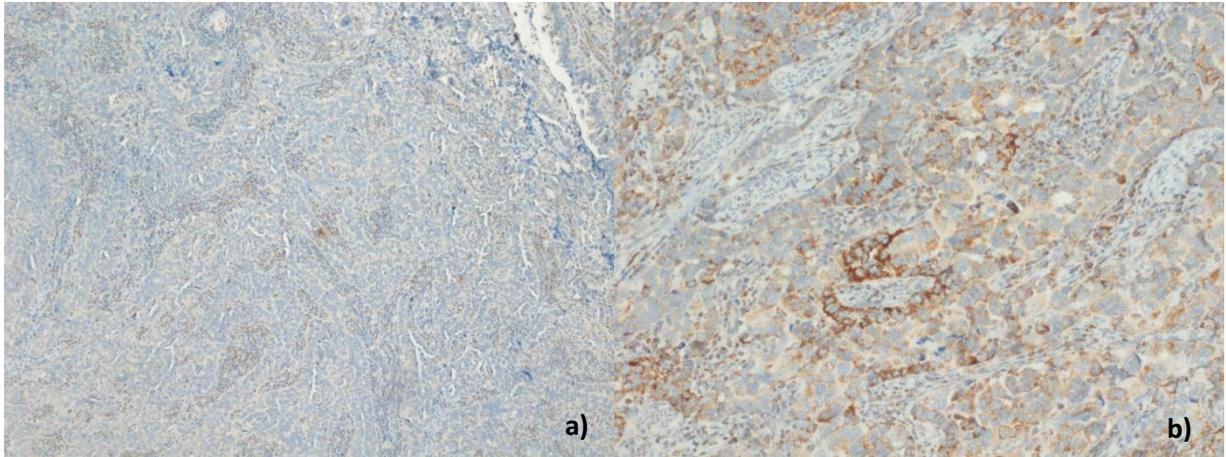
**Figura 8** – Padronização do anticorpo anti-TREX1 comparando os anticorpos ab52947 e GR57779-4 em lâminas de adenocarcinoma de colo uterino. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



**a)** Adenocarcinoma de colo uterino, testado com o anticorpo ab52947 anti-TREX1, diluição 1:50 – Ausência de marcação específica; **b)** Adenocarcinoma de colo uterino, testado com o anticorpo GR57779-4 anti-TREX1, diluição 1:100 – Immunorreação fortemente positiva em citoplasmas de células malignas

Sendo assim, um novo anticorpo anti-TREX1 foi adquirido (ab83890 Anti-TREX1 antibody, Nova Analítica Imp. Exp. Ltda) e testado de acordo com o protocolo realizado pelo ICESP e, a marcação não foi obtida (**Figura 9**).

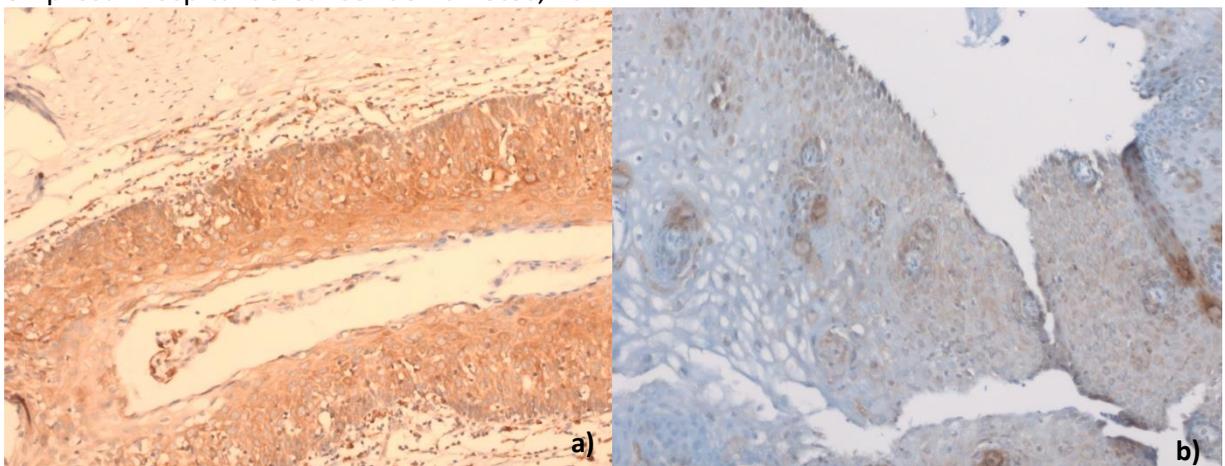
**Figura 9** – Padronização do anticorpo anti-TREX1 comparando os anticorpos ab83890 e GR57779-4 em lâminas de adenocarcinoma de colo uterino. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



**a)** Adenocarcinoma de colo uterino, testado com o anticorpo ab83890 anti-TREX1, diluição 1:50 - Ausência de marcação específica; **b)** Adenocarcinoma de colo uterino, testado com o anticorpo GR57779-4 anti-TREX1, diluição 1:100 - Immunorreação fortemente positiva em citoplasmas de células malignas.

O contato com a empresa permitiu a obtenção de um novo anticorpo anti-TREX1 (ab185228 Anti-TREX1 antibody, lote EPR14985, Nova Analítica Imp. Exp. Ltda), que foi submetido às mesmas condições utilizadas no ICESP (**Figura 10**).

**Figura 10** – Padronização do anticorpo ab185228 anti-TREX1, após realização de troca pela empresa. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



**a)** Adenocarcinoma de colo uterino, testado com anticorpo ab185228 anti-TREX1, diluição 1:100 – Presença de marcação; **b)** CEC de esôfago, testado com anticorpo ab185228 anti-TREX1, diluição 1:100 – Reação positiva focal e em pequenos aglomerados de células malignas.

Desta vez, a marcação positiva em lâminas de adenocarcinoma de colo uterino foi obtida, com padrão semelhante ao encontrado quando o anticorpo do grupo de São Paulo (GR57779-4) foi utilizado (**Figura 10**).

### 5.6 Análise da expressão de TREX1

Após padronização das reações de imunohistoquímica para detecção de TREX1, nesta análise foram incluídos retrospectivamente amostras de 57 indivíduos do grupo caso 1 e 29 indivíduos do grupo controle 2, que possuíam material disponível (biópsias parafinadas) para a realização das imunohistoquímicas. Inicialmente, foi realizada a caracterização da população de ambos os grupos do estudo (caso e controle) analisados para a expressão de TREX1 e as informações estão detalhadas na **Tabela 26**.

**Tabela 26** - Caracterização da população de estudo. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável * / Categoria	Casos		Controles		p
	n	(%)	n	(%)	
<b>Idade – Média (desvio padrão)</b>	60 (9,6)		57 (8,4)		0,157
<b>Sexo</b>					
Masculino	44	77,2	27	93,1	0,066
Feminino	13	22,8	2	6,9	
<b>Raça</b>					
Branco	36	64,3	19	70,4	0,583
Não branco	20	35,7	8	29,6	
<b>Estado civil</b>					
Não casado	18	31,6	5	17,2	0,156
Casado	39	68,4	24	82,8	
<b>Escolaridade</b>					
Analfabeto/Analf. Funcional	7	12,3	1	3,4	0,370
Ensino fundamental/médio	43	75,4	23	79,3	
Ensino superior	7	12,3	5	17,2	
<b>Onde mora / morou</b>					
Somente zona urbana	7	12,3	8	27,6	<b>0,036</b>
Somente zona rural	8	14,0	0	0,00	
Ambas	42	73,7	21	72,4	

(continua na próxima página)

**Tabela 26 (continuação)** - Caracterização da população de estudo. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável * / Categoria	Casos		Controles		p
	n	(%)	n	(%)	
<b>Álcool</b>					
Não	5	8,8	4	13,8	0,478
Sim	52	92,2	25	86,2	
<b>Tabaco</b>					
Não	9	15,8	7	24,1	0,347
Sim	48	84,2	22	75,9	
<b>Exposição a pesticida ou inseticida</b>					
Não	27	48,2	14	50,0	0,877
Sim	29	51,8	14	50,0	
<b>Pratica atividade física</b>					
Não	45	78,9	18	62,1	0,095
Sim	12	21,1	11	37,9	
<b>HPV</b>					
Negativo	30	71,4	12	50,0	0,082
Positivo	12	28,6	12	50,0	

A população do estudo foi composta, em sua maioria, por homens com idade média de 60 anos para o grupo caso e 57 anos para o grupo controle. Dentre as variáveis analisadas, foi encontrada diferença estatística ( $p=0,036$ ) para “local onde morou”, com predomínio de indivíduos do grupo caso que residiram apenas na zona rural, quando comparado aos indivíduos do grupo controle.

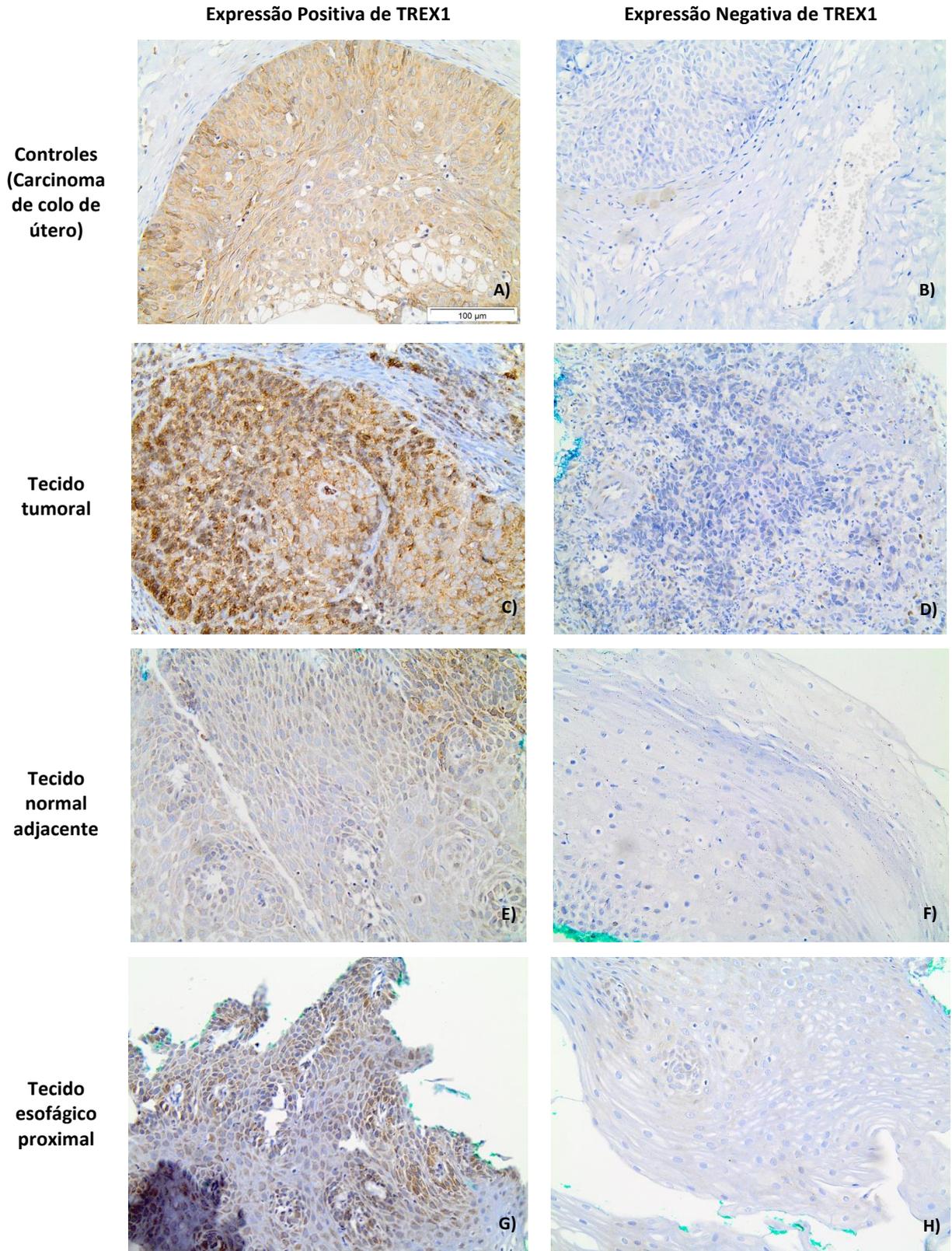
Em seguida, foi realizada a caracterização do tecido tumoral esofágico, mostrando que o grau de diferenciação frequentemente encontrado foi o moderado, com predomínio de tumores localizados no terço médio do esôfago e estadiamento TNM avançado (III e IV). Além disso, a revisão de prontuários forneceu a informação de que 86,0% dos pacientes incluídos no estudo foram a óbito devido à doença e somente 14,0% permaneceram vivos no momento da conferência (data) (**Tabela 27**).

**Tabela 27** - Caracterização do tecido tumoral. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável	Categoria	n	%
<b>Grau de diferenciação</b>	Bem	6	12,0
	Moderado	29	58,0
	Pouco	15	30,0
<b>Topografia</b>	Terço superior	2	3,9
	Terço médio	28	54,9
	Terço inferior	6	11,8
	Mais de uma localização	15	29,4
<b>Estadiamento TNM</b>	I e II	12	23,1
	III e IV	40	76,9
<b>Status do paciente</b>	Vivo	8	14,0
	Óbito	49	86,0

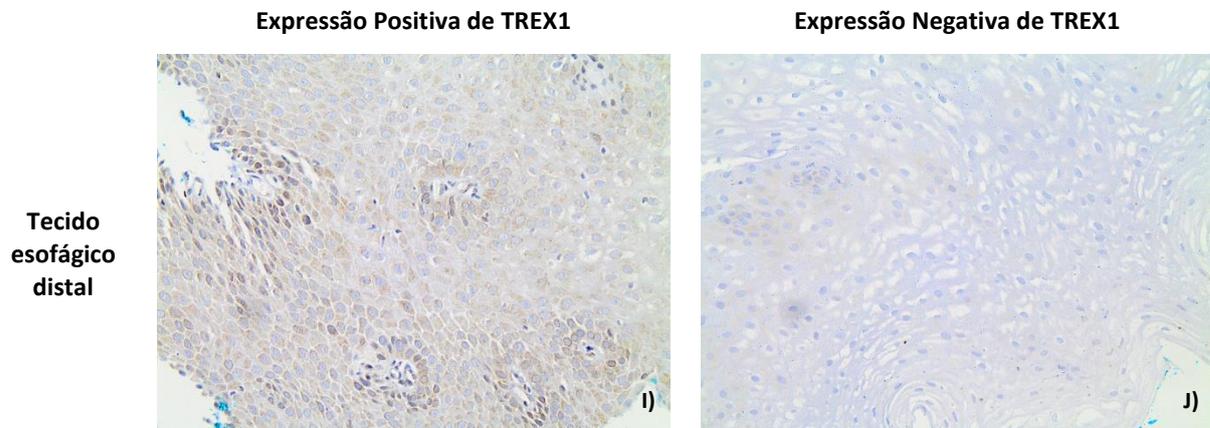
Para a avaliação da expressão de TREX1, foi feita a imunohistoquímica nos tecidos, tumoral e normal adjacente ao tumor, pertencentes ao grupo caso e tecidos das regiões proximal e distal do esôfago do grupo controle, e o padrão de marcação apresentou-se com padrão citoplasmático, comparando com os controles positivo (tecido de carcinoma de colo de útero com expressão citoplasmática positiva de TREX1) e negativo (tecido de carcinoma de colo de útero sem expressão de TREX1) e está representado na **Figura 11**.

**Figura 11** – Imunohistoquímica para detecção de TREX1 em tecidos esofágicos. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



(continua na próxima página)

**Figura 11 (continuação)** – Imunohistoquímica para detecção de TREX1 em tecidos esofágicos. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



Visualização ao microscópio óptico de marcação IHC de TREX1 em tecidos esofágicos: **(A)** Controle positivo: tecido de carcinoma de colo de útero com expressão citoplasmática positiva de TREX1 (magnificação original = 400 vezes). **(B)** Controle negativo: tecido de carcinoma de colo de útero sem expressão citoplasmática de TREX1 (magnificação original = 400 vezes). **(C)** Tecido de carcinoma de células escamosas de esôfago com expressão de TREX1 (magnificação original = 400 vezes). **(D)** Tecido de carcinoma de células escamosas de esôfago sem expressão de TREX1 (magnificação original = 400 vezes). **(E)** Tecido esofágico normal adjacente ao tumor com expressão de TREX1 (magnificação original = 400 vezes). **(F)** Tecido esofágico normal adjacente ao tumor sem expressão de TREX1 (magnificação original = 400 vezes). **(G)** Tecido esofágico proximal proveniente de paciente sem câncer de esôfago com expressão de TREX1 (magnificação original = 400 vezes). **(H)** Tecido esofágico proximal proveniente de paciente sem câncer de esôfago sem expressão de TREX1 (magnificação original = 400 vezes). **(I)** Tecido esofágico distal proveniente de paciente sem câncer de esôfago com expressão de TREX1 (magnificação original = 400 vezes). **(J)** Tecido esofágico distal proveniente de paciente sem câncer de esôfago sem expressão de TREX1 (magnificação original = 400 vezes).

Em relação às imunorreações para o grupo caso, foi observado que 62,5% dos tecidos tumorais foram considerados positivos para a expressão de TREX1, enquanto apenas 22,2% dos tecidos normais adjacentes apresentaram positividade para o marcador. Entretanto, para os tecidos do grupo controle foi observado um perfil de marcação bem semelhante para ambos tecidos, com 50% de positividade para TREX1 nos tecidos esofágicos proximais e 48,1% nos tecidos esofágicos distais (**Tabela 28**). Sendo assim, os tecidos proximal e distal do grupo controle foram unificados para as análises posteriores e considerado positivo aquele indivíduo que apresentou marcação positiva de TREX1 em pelo menos uma das regiões esofágicas, proximal ou distal, o que representou 65,5% dessas amostras (**Tabela 28**).

**Tabela 28** - Descrição da expressão de TREX1 nos tecidos obtidos de casos e controles. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável	Categoria	n	%
<b>Tecido tumoral</b>	Negativo	18	37,5
	Positivo	30	62,5
<b>Tecido normal adjacente</b>	Negativo	42	77,8
	Positivo	12	22,2
<b>Esôfago proximal</b>	Negativo	11	50
	Positivo	11	50
<b>Esôfago distal</b>	Negativo	14	51,9
	Positivo	13	48,1
<b>Controles</b>	Negativo	10	34,5
	Positivo	19	65,5

Diante desses resultados, a expressão de TREX1 foi comparada entre os grupos caso e controle e não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 29).

**Tabela 29** - Expressão de TREX1 entre os grupos caso e controle. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável * / Categoria	Grupo				p
	Caso*		Controle**		
	n	(%)	n	(%)	
<b>TREX1</b>					
Negativo	18	37,5	10	34,5	0,790
Positivo	30	62,5	19	65,5	

\*Para o grupo caso foi considerado apenas o tecido tumoral.

\*\*Para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positivo aquele indivíduo com expressão da proteína em pelo menos uma das regiões anatômicas (proximal ou distal).

p<0,05

Teste utilizado: Qui-quadrado

Posteriormente, foi realizada a caracterização das amostras tumorais em relação à expressão de TREX1, variáveis sociais, clinicopatológicas e presença de HPV (Tabela 30).

**Tabela 30** - Caracterização das amostras tumorais em relação à expressão de TREX1 e variáveis sociais, clínicopatológicas e presença de HPV. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	Tumor				p
	TREX1 negativo		TREX1 positivo		
	n	(%)	n	(%)	
<b>Status</b>					
Vivo	5	71,4	2	28,6	0,086*
Óbito	13	31,7	28	68,3	
<b>Sexo</b>					
Feminino	4	33,3	8	66,7	1,000*
Masculino	14	38,9	22	61,7	
<b>Idade</b>					
≤ 60 anos	12	46,2	14	53,8	0,178
>60 anos	6	27,3	16	72,7	
<b>Raça</b>					
Branco	9	31,0	20	69,0	0,352
Não branco	8	44,4	10	55,6	
<b>Álcool</b>					
Nunca	0	0,00	4	100,0	0,080*
Presente	6	28,6	15	71,4	
Passado (parou + de 1 ano)	12	52,2	11	47,8	
<b>Tabaco</b>					
Nunca	2	28,6	5	71,4	0,591*
Presente	9	33,3	18	66,7	
Passado (parou + de 1 ano)	7	50,0	7	50,0	
<b>Grau de diferenciação</b>					
Bem	1	25,0	3	75,0	0,209*
Moderado	13	52,0	12	48,0	
Pouco	3	23,1	10	76,9	
<b>Estadiamento TNM</b>					
I e II	6	54,5	5	45,5	0,314*
III e IV	12	36,4	21	63,6	
<b>HPV alto risco (Luminex)</b>					
Negativo	12	52,2	11	47,8	0,288
Positivo	4	33,3	8	66,7	

p<0,05

Testes utilizados: Qui-quadrado ou \*Fisher

Como pode ser visto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos com expressão positiva e negativa de TREG1 para variáveis analisadas.

Na sequência, os tecidos normal adjacente e controle foram caracterizados quanto à expressão de TREG1 em relação às variáveis sociais e ao status de HPV (**Tabela 31**). Como pode ser observado, dentre as amostras de tecido normal adjacente com expressão positiva de TREG1, houve predomínio (37,5%) estatisticamente significativo ( $p=0,016$ ) de pacientes mais velhos (idade >60 anos), enquanto para o grupo de tecido normal adjacente com expressão negativa de TREG1, houve predomínio (90,0%) de pacientes mais jovens ( $\leq 60$  anos) (**Tabela 31**).

Em relação ao grupo controle, não houve diferença significativamente estatística das variáveis sociodemográficas analisadas entre as populações negativa e positiva para expressão de TREG1 (**Tabela 31**). Quando o status de HPV foi analisado, não foi possível constatar diferença estatisticamente significativa em relação à expressão de TREG1 nos tecidos normal adjacente e controle (**Tabela 31**). A informação sobre a presença ou não de HPV nos indivíduos estudados foi obtida a partir de resultados de estudo prévio do nosso grupo.

**Tabela 31** - Caracterização da expressão de TREX1 em tecidos normal adjacente e controle em relação às variáveis sociais e status de HPV. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	Normal adjacente				p	Controle**				
	TREX1 negativo		TREX1 positivo			TREX1 negativo		TREX1 positivo		p
	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
<b>Sexo</b>										
Feminino	9	75,0	3	25,0	1,000*	0	0,00	2	100,0	0,532*
Masculino	33	78,06	9	21,4		10	37,0	17	63,0	
<b>Idade</b>										
≤ 60 anos	27	90,0	3	10,0	<b>0,016</b>	5	27,8	13	72,2	0,432*
>60 anos	15	62,5	9	37,5		5	45,5	6	54,5	
<b>Raça</b>										
Branco	25	71,4	10	28,6	0,185*	7	36,8	12	63,2	0,676*
Não branco	16	88,9	2	11,1		2	25,0	6	75,0	
<b>Álcool</b>										
Nunca	4	80,0	1	20,0	0,174*	2	50,0	2	50,0	0,646*
Presente	16	66,7	8	33,3		4	26,7	11	73,3	
Passado (parou + de 1 ano)	22	88,0	3	12,0		4	40,0	6	60,0	
<b>Tabaco</b>										
Nunca	8	88,9	1	11,1	0,656*	2	28,6	5	71,4	1,000*
Presente	24	72,7	9	27,3		4	40,0	6	60,0	
Passado (parou + de 1 ano)	10	83,3	2	16,7		4	33,3	8	66,7	
<b>HPV alto risco (Luminex)</b>										
Negativo	24	80,0	6	20,0	0,651*	4	33,3	8	66,7	1,000*
Positivo	10	90,9	1	9,1		3	25,0	9	75,0	

p<0,05

Testes utilizados: Teste de Fisher ou \*Qui-quadrado

\*\*Para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positivo aquele indivíduo com expressão da proteína em pelo menos uma das regiões anatômicas (proximal e distal).

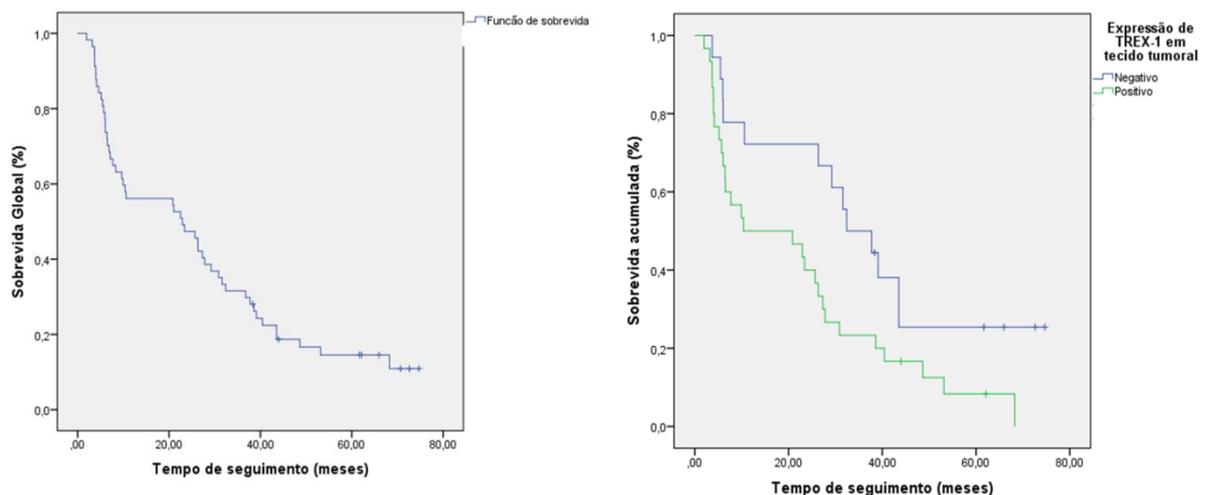
Finalmente, foi realizada a análise de sobrevida global, tempo da data do diagnóstico até o óbito, dos pacientes com CEC de esôfago cujos tecidos foram avaliados em relação à expressão de TREX1. As taxas de sobrevida global em 12, 36 e 60 meses foram 56,1%, 31,6%

e 14,6% respectivamente para os indivíduos com CEC de esôfago com amostras analisadas para a expressão de TREX1. Em relação à expressão de TREX1 e a sobrevida desses pacientes, observa-se que pacientes com expressão positiva de TREX1 tiveram uma sobrevida estatisticamente pior ( $p=0,029$ ) em 12, 36 e 60 meses em relação àqueles pacientes com expressão negativa de TREX1 (**Tabela 32, Figura 12**).

**Tabela 32** - Estimativa de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier em relação à expressão de TREX1 no grupo caso. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

Variável / Categoria	n casos (n eventos)	% Probabilidade de sobrevivência			P
		12 meses	36 meses	60 meses	
<b>Global</b>	57 (49)	56,1	31,6	14,6	
<b>TREX1</b>					
Negativo	18 (13)	72,2	50,0	25,4	<b>0,029</b>
Positivo	30 (28)	50,0	23,3	0,80	

**Figura 12** – Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global e correlacionada com expressão de TREX1 em pacientes com câncer de esôfago. Hospital de Câncer de Barretos, 2021.



**a)** Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global dos indivíduos com câncer de esôfago e **b)** Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global correlacionada com a expressão de TREX1 em tecidos tumorais de pacientes com CEC de esôfago.

### **Etapa com modelo animal**

Nossos dados com amostras de humanos sugerem que IL-8 é um importante fator de risco para CCEE. IL-8 (CXCL-8) foi originalmente descrito como um quimioatraente de leucócitos polimorfonucleares por atuar em CXCR1/2<sup>58</sup>, mas dados recentes mostram que esta quimiocina pode exercer funções pró-tumorais, incluindo angiogênese, sinalização de sobrevivência para células-tronco de câncer e atração de células mieloides imunossupressoras<sup>58</sup>. Portanto, para testar a correlação da agressividade do câncer de esôfago com IL-8, foi desenvolvido um modelo animal de CE usando as linhagens celulares de câncer de esôfago, Kyse-30 e Kyse-410. Como nenhum homólogo verdadeiro para IL-8 humano foi identificado em camundongos, o homólogo do receptor de IL-8 de camundongo CXCR2 medeia a quimiotaxia de neutrófilos em resposta à IL-8 humana e ao CXCL1, CXCL2 e CXC (LIX) induzido por GCP-2 / lipossacarídeo<sup>59, 60</sup>. Como os ortólogos murinos de GRO- $\alpha$  humana (CXCL1) e de GRO- $\beta$  humana (CXCL2) são frequentemente estudados em vez de IL-8, a expressão dessas quimiocinas em camundongos com tumores de CCEE foi determinada.

### **5.7 Injeção de células tumorais em animais B6**

Para este fim, as linhagens esofágicas Kyse-30 e Kyse-410 foram cultivadas em meio RPMI e injetadas por via subcutânea em 7 camundongos B6 (3 com a Kyse-30 e 4 com a Kyse-410) e acompanhamos o crescimento do tumor ao longo de um período de 20 dias. Essas duas linhagens celulares de CCEE foram selecionadas porque exibem agressividades diferentes em camundongos. A linhagem Kyse-410 é considerada menos agressiva do que a Kyse-30 porque tem maior expressão de miR-644a, previamente demonstrada por inibir o crescimento, migração e invasão celular de CCEE *in vitro* e suprimiu o crescimento tumoral e metástase *in vivo*<sup>61</sup>.

No 7º dia após a infecção foi possível observar crescimento tumoral nos animais inoculados com a linhagem Kyse-30 e o tamanho destes tumores estão descritos na **Tabela 33**.

Entretanto, no 11º dia foi observado que os tumores regrediram, não sendo possível a mensuração dos mesmos. Nos animais injetados com a linhagem Kyse-410 não foi observado crescimento tumoral (**Tabela 33**).

**Tabela 33** – Tamanhos dos tumores (cm) desenvolvidos nos animais B6 injetados com a linhagem Kyse-30. Universidade do Minho, Portugal, 2021.

Dia da inoculação	7	11
<b>Animal (linhagem)</b>		
<b>Kyse-30</b>		
1	0,4x0,4	-
2	0,35x0,35	-
3	0,4x0,35	-

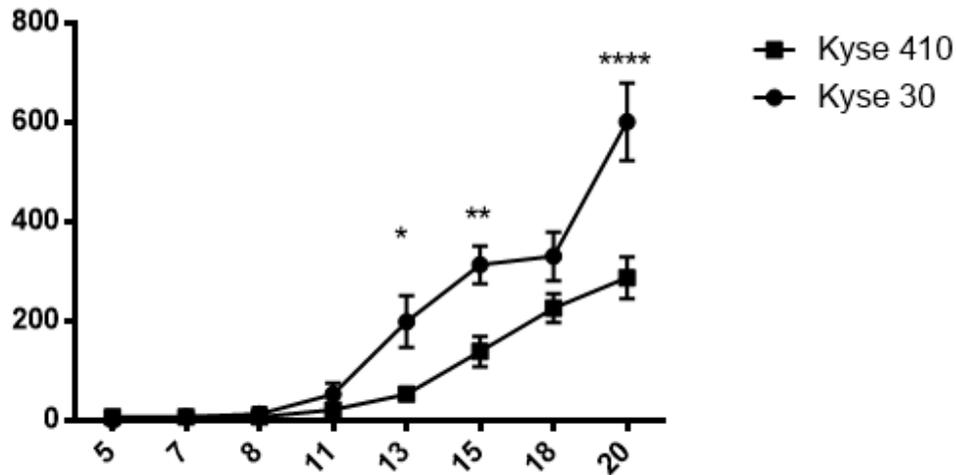
### 5.8 Injeção de células tumorais em animais NOD scid gamma (NSG)

Diante dos resultados encontrados com o experimento anterior, decidiu-se por inocular as linhagens celulares em animais imunocomprometidos NOD scid gamma (NSG). As linhagens Kyse 30 e Kyse 410 foram inoculadas em 10 animais (5 com cada linhagem). Ao 10º dia após a inoculação das células, foi possível observar crescimento tumoral em todos os animais injetados com ambas as linhagens. A **Tabela 34** mostra a mensuração dos tumores e a **Figura 13 representa** a curva de crescimento tumoral nos animais.

**Tabela 34** – Tamanhos dos tumores (cm) desenvolvidos nos camundongos NSG injetados com as linhagens Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.

Dia da injeção	5	7	8	11	13	15	18	20
<b>Animal (linhagem)</b>								
<b>Kyse 410</b>								
1	-	-	-	0,5x0,4	0,5x0,5	0,8x0,7	1,0x0,8	1,0x0,9
2	-	-	-	0,4 x0,4	0,4x0,4	0,7x0,7	0,8x0,7	0,8x0,7
3	-	-	-	-	0,5x0,5	0,5x0,5	0,7x0,7	0,8x0,8
4	0,4 x0,4	0,4 x0,4	0,4 x0,4	0,4 x0,4	0,5x0,5	0,7x0,7	0,9x0,7	1,0x0,8
5	-	-	-	-	0,4x0,4	0,5x0,5	0,7x0,7	0,8x0,7
<b>Kyse 30</b>								
1	-	-	-	0,5x0,5	0,8x0,9	1,0x0,9	1,0x0,9	1,2x1,1
2	-	-	-	-	0,6x0,6	0,8x0,7	0,9x0,7	1,0x0,8
3	-	-	-	0,4x0,4	0,5x0,5	0,9x0,8	0,9x0,8	1,1x1,0
4	-	-	-	0,4x0,4	0,7x0,7	0,8x0,8	0,9x0,7	1,1x1,0
5	-	0,4x0,4	0,5x0,5	0,7x0,6	1,0x0,8	1,1x0,8	1,1x0,9	1,2x1,1

**Figura 13** – Curva de crescimento dos tumores nos camundongos NSG inoculados com as linhagens Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.



Curva de crescimento dos tumores nos camundongos NSG inoculados com as linhagens Kyse 30 e Kyse 410. Os dados representam 10 animais (5 por grupo) do mesmo experimento; Cada ponto representa um animal. Os pontos redondos representam cada animal inoculado com a linhagem Kyse-30 e os pontos quadrados representam cada animal inoculado com a linhagem Kyse-410. O eixo y representa o volume tumoral e o eixo x os dias após inoculação das células. Análises estatísticas foram calculadas usando o teste Anova (\* $p=0,024$ ; \*\* $p=0,007$ ; \*\*\*\* $p=0,0001$ ).

Como pode ser observado, as linhagens tumorais cresceram a partir do 10º dia em todos os animais. Apesar de haver indução de tumor pelas duas linhagens, os animais inoculados com a linhagem Kyse-30 obtiveram uma curva de crescimento superior à dos animais inoculados com a Kyse-410, especialmente no 13º, 15º e 20º dias após a inoculação das células tumorais.

### 5.9 Processamento dos materiais biológicos coletados dos animais

Após validar o desenvolvimento de modelo animal de CE com as linhagens Kyse-30 e Kyse-410, desenhou-se protocolo suficiente para a coleta de amostras biológicas que permitissem a detecção de células imunológicas nos tumores desenvolvidos nesses animais.

A fase de observação e mensuração do crescimento tumoral nos animais NSG aconteceu até o 21º dia após a injeção das células tumorais nos animais. Após, os animais foram sacrificados para a retirada do tumor e coleta das amostras necessárias para análise de infiltrado inflamatório. O tumor foi então pesado e fragmentado para permitir a realização dos diversos experimentos (**Figura 14**).

**Figura 14** – Procedimento de coleta, pesagem e fragmentação dos tumores nos animais NSG, induzidos pelas linhagens Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.



a) Tumores desenvolvidos nos animais na região dos flancos; b) Procedimento de retirada dos tumores; c) Pesagem dos tumores retirados dos animais; d) Fragmentação dos tumores.

Os pesos dos tumores desenvolvidos com a inoculação das duas linhagens estão descritos na **Tabela 35**.

**Tabela 35** – Pesos dos tumores (g) desenvolvidos nos animais NSG injetados com as linhagens Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.

Animal (Linhagem)	Peso tumoral (g)
<b>Kyse 410</b>	
1	0,29
2	0,19
3	0,13
4	0,28
5	0,07
<b>Kyse 30</b>	
1	0,41
2	0,46
3	0,42
4	0,39

### 5.10 Avaliação da expressão de mRNA por PCR em tempo real

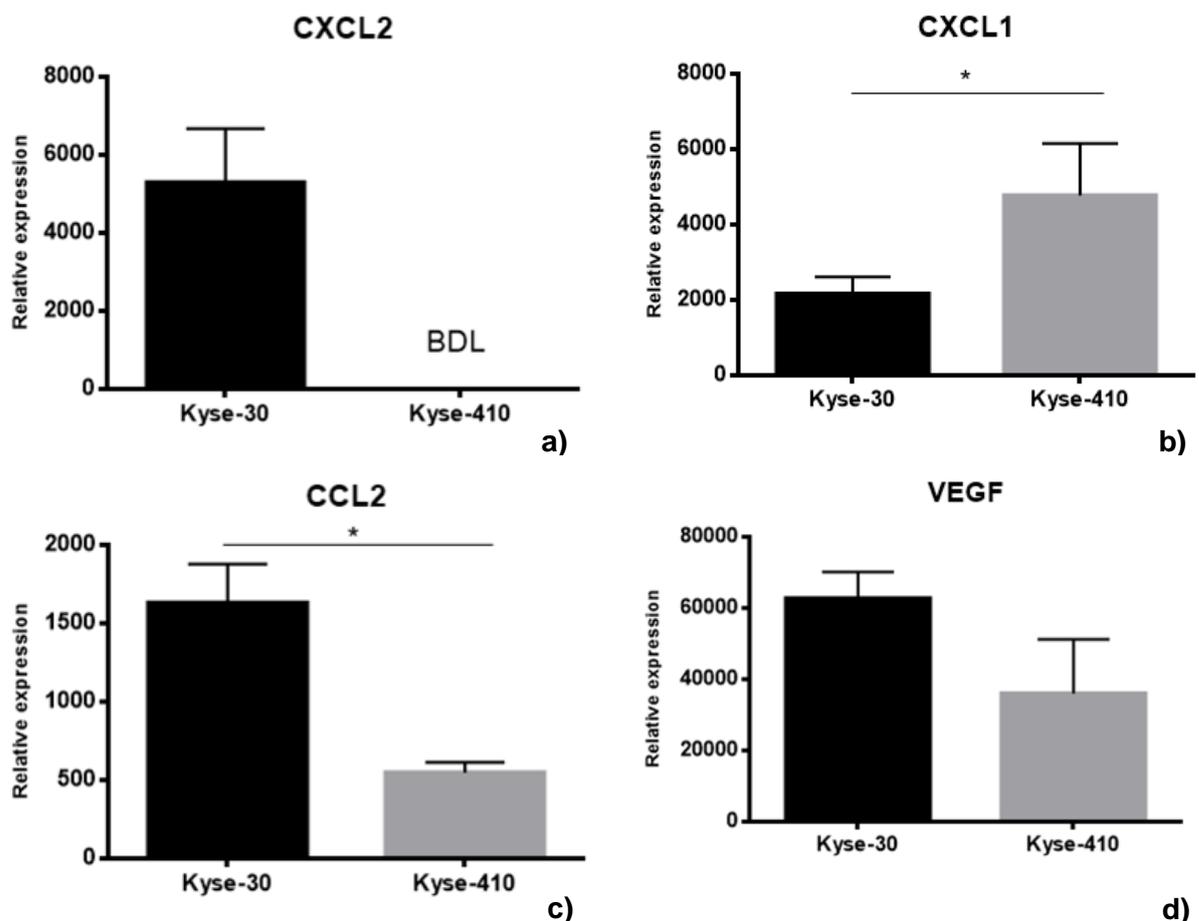
Com o intuito de desvendar o microambiente tumoral responsável pela produção elevada das citocinas plasmáticas encontrada nos pacientes com CE, fez-se a análise da expressão de CXCL-1 e CXCL-2 no tecido tumoral por análise de extração de RNA e PCR em tempo real e encontrou-se que a expressão relativa de CXCL2, um atrator de neutrófilos e homólogo da citocina IL-8, foi maior nos tumores induzidos pela linhagem Kyse 30 (**Figuras 15a e 16a, Tabela 36**).

**Tabela 36** – Expressão relativa de mRNA em tecido tumorais de CE de animais induzidos pelas linhagens celulares Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.

Gene	Tumores Kyse 30	Tumores Kyse 410	p
CXCL1	2163 ± 455,1 (n=9)	4775 ± 1380 (n=6)	<b>0,0253</b>
VEGF	62759 ± 7422 (n=5)	36033 ± 15172 (n=3)	0,3938
CCL2	1631 ± 247,1 (n=5)	547,5 ± 64,52 (n=3)	0,0794
CXCL2	Não detectado	Não detectado	

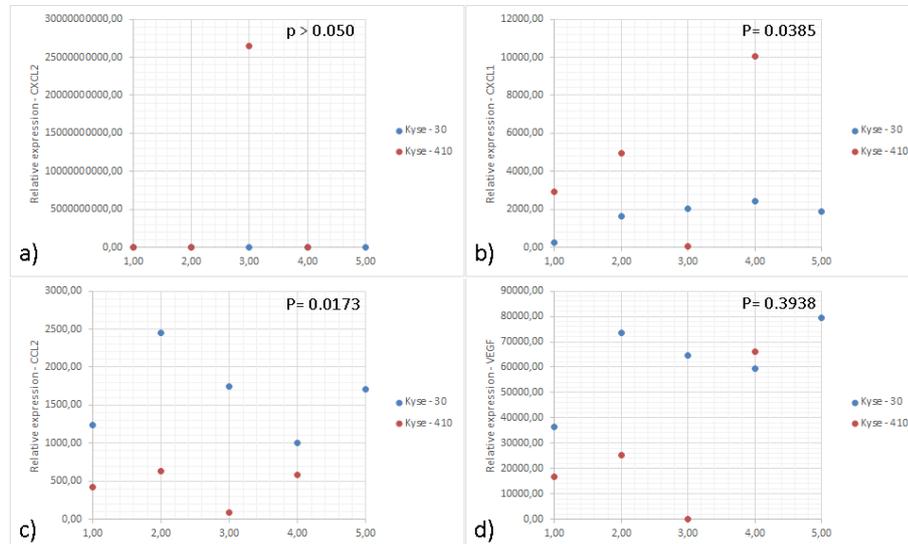
A quantificação dos níveis de mRNA dos genes por qPCR foram calculados utilizando o método 2- $\Delta$ CT.  $\Delta$ CT foi calculado pela subtração do CT (controle: ubiquitina) do CT (gene alvo).

**Figura 15** – Gráficos de barras da expressão relativa dos genes de interesse realizados por PCR em tempo real. Universidade do Minho, Portugal, 2021.



Gráficos representando a expressão relativa dos genes a) CXCL2; b) CXCL1; c) CCL2; e d) VEGF nos tumores induzidos pelas linhagens Kyse 30 e Kyse 410.

**Figura 16** - Gráficos de expressão relativa dos genes de interesse realizados por PCR em tempo real. Universidade do Minho, Portugal, 2021.



Gráficos representando a expressão relativa dos genes a) CXCL-2; b) CXCL-1; c) CCL2; e d) VEGF nos tumores induzidos pelas linhagens celulares Kyse-30 e Kyse-410. “BDL: Abaixo dos níveis de detecção”. Os dados representam 10 animais (5 por grupo) da mesma experiência. Cada ponto representa um animal; os pontos azuis indicam a expressão relativa dos diferentes genes de cada animal inoculado com Kyse-30 e os pontos vermelhos de cada animal inoculado com Kyse-410. Todos os experimentos foram realizados apenas uma vez. A significância estatística foi calculada usando o teste t não pareado e os valores de p são mostrados na figura.

É importante ressaltar que os níveis de detecção do gene CXCL2 ficaram abaixo dos níveis de detecção nos tumores induzidos pela linhagem Kyse-410 e, portanto, não foi possível calcular o valor de p. Entretanto, e curiosamente, a expressão relativa de CXCL1, que também é um atrator de neutrófilos foi significativamente maior nos tumores induzidos pela linhagem Kyse-410 ( $p = 0,02$ ) (**Figuras 15b e 16b**). Os resultados sugerem que essa atração por neutrófilos pode ser mediada por diversos outros fatores, que não os tumorais.

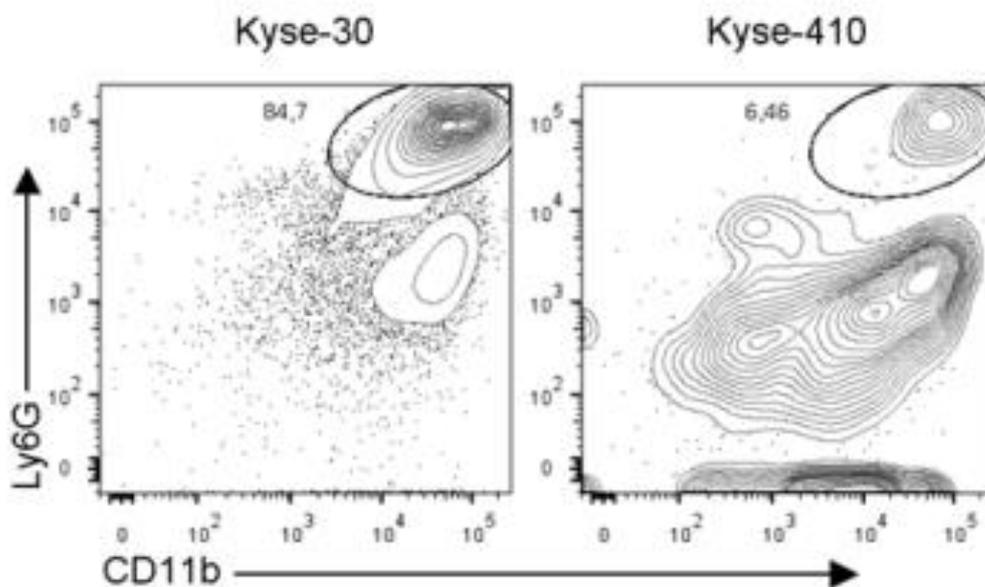
Adicionalmente, foi observado que a expressão relativa de CCL2, um atrator de monócitos e macrófagos, embora não tenha sido estatisticamente diferente ( $p = 0,08$ ), foi maior nos tumores induzidos pela linhagem Kyse-30, quando comparado aos tumores induzidos pela linhagem Kyse-410, suportando novamente, o predomínio de células imunológicas nesses tumores (**Figuras 15c e 16c**).

Também foi constatada a expressão de VEGF, um marcador de angiogênese, nos tumores induzidos por ambas as linhagens, demonstrando o potencial de crescimento e metastatização desses tumores. Entretanto, apesar de não ser estatisticamente significativo ( $p=0,39$ ), há tendência de maior expressão de VEGF nos tumores induzidos pela linhagem Kyse-30, em comparação àqueles induzidos pela Kyse-410 (**Figuras 15d e 16d**).

### 5.11 Determinação das células imunológicas predominantes nos tumores induzidos em animais com o uso de Citometria de fluxo (FACS)

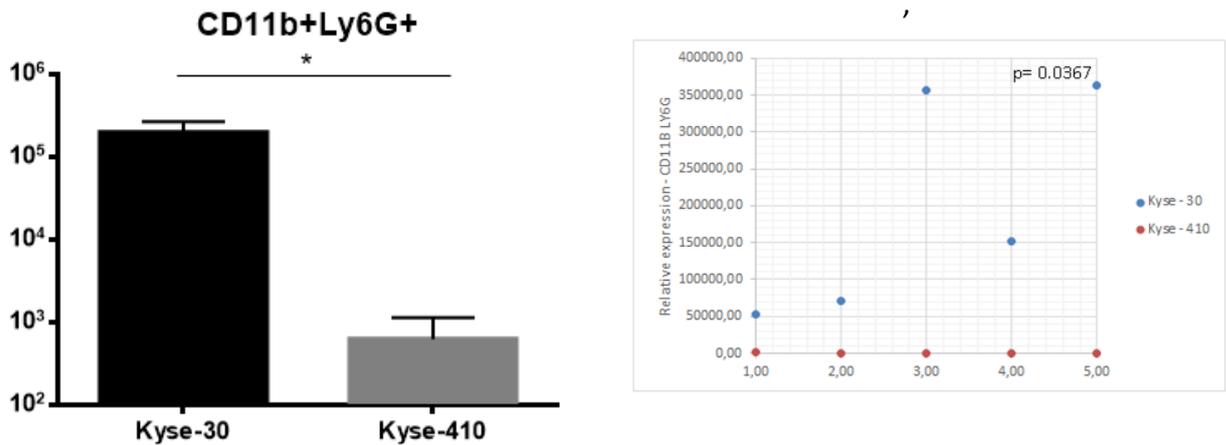
Como CXCL-1 desempenha um papel importante no recrutamento de leucócitos polimorfonucleares para locais inflamatórios, foi avaliado o acúmulo dessas células em ambos os tumores por citometria de fluxo e os dados representativos de leucócitos polimorfonucleares intratumorais (CD11b + Ly6G +) em camundongos com tumores induzidos por Kyse-30 ou Kyse-410 está fornecido na **Figura 17**.

**Figura 17** - Dados de citometria de fluxo representativos de leucócitos polimorfonucleares intratumorais (CD11b + Ly6G +) em camundongos com tumor Kyse-30 ou Kyse-410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.



Como pode ser observado, houve aumento significativo do acúmulo intratumoral de leucócitos polimorfonucleares, representado pelos marcadores CD11b+Ly6G+, em tumores Kyse-30 quando comparados aos tumores Kyse-410 ( $p = 0,0367$ ) (**Figura 18**).

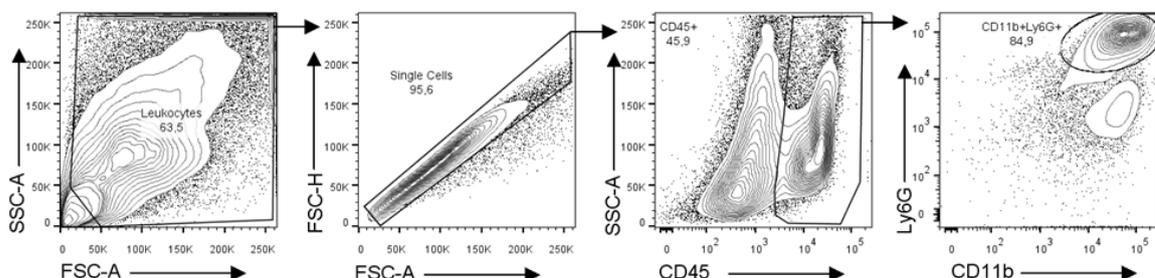
**Figura 18** – Avaliação do infiltrado intratumoral de células imunes nos tumores induzidos pelas linhagens Kyse 30 e Kyse 410, por citometria de fluxo. Universidade do Minho, Portugal, 2021.



Os dados representam 10 animais (5 por grupo) do mesmo experimento. Cada ponto representa um animal; os pontos azuis indicam expressão de CD11b + Ly6G + de cada animal

Na sequência, foi realizada uma estratégia de bloqueio de citometria de fluxo usada para a análise de leucócitos polimorfonucleares intratumorais (CD11b + Ly6G +) em camundongos com tumores Kyse-30 ou Kyse-410 (**Figura 19**).

**Figura 19** - Estratégia usada para a análise de leucócitos polimorfonucleares intratumorais (CD11b + Ly6G +) em camundongos com tumor Kyse-30 ou Kyse-410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.



Em conjunto, estes dados sugerem que o aumento do crescimento de linhagens celulares de CCEE em modelo de camundongo está associado com recrutamento / acúmulo

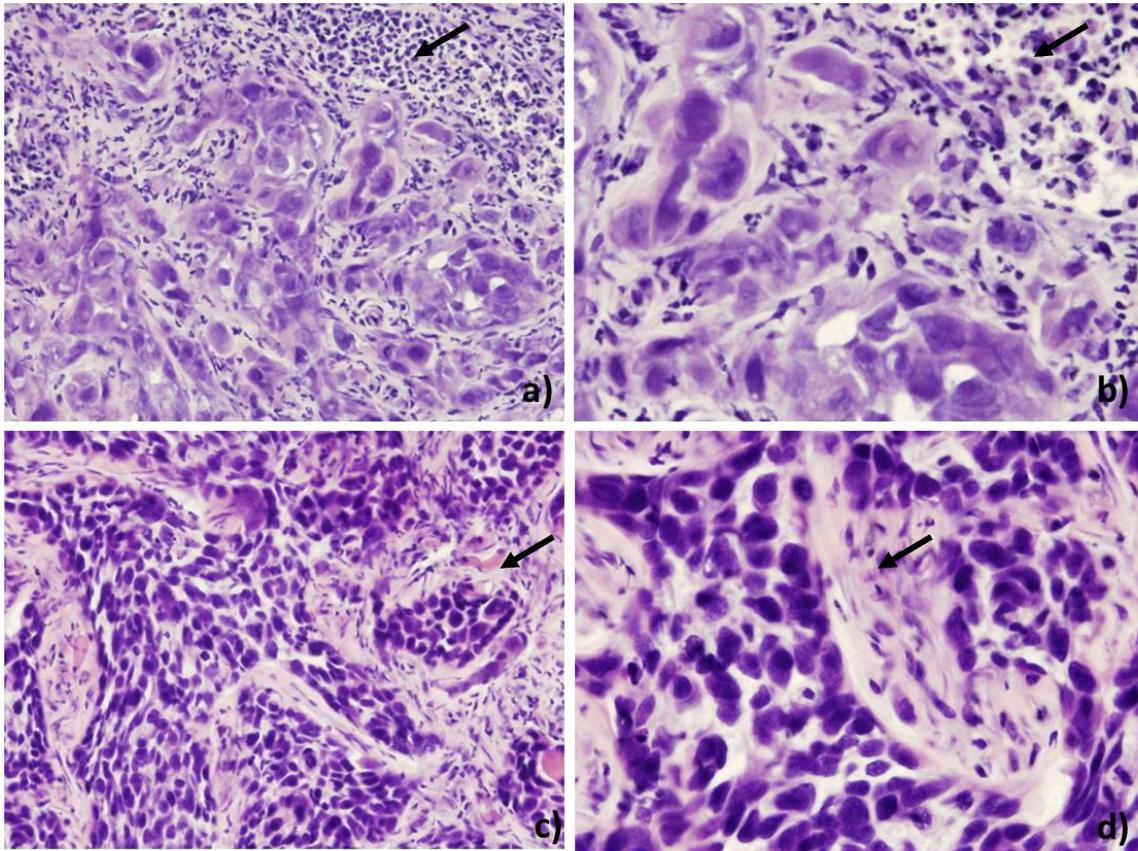
de leucócitos polimorfonucleares intratumorais. Os tumores induzidos pela linhagem Kyse-30 apresentaram quantidade significativamente maior ( $p= 0,04$ ) de células neutrofílicas, representadas pelos marcadores CD11b+Ly6G+, quando comparados aos tumores induzidos pela linhagem Kyse-410 (**Figura 18**).

#### **5.12 Análise do infiltrado tumoral em lâminas histológicas**

Após detecção, por citometria de fluxo, de que o crescimento tumoral estava associado com a presença de neutrófilos, optou-se por analisar o perfil dos neutrófilos em histologia dos tumores.

Como pode ser observado na **Figura 20**, há um maior infiltrado de neutrófilos nos tecidos tumorais derivados da linhagem Kyse-30, quando comparado aos tumores induzidos pela Kyse 410.

**Figura 20** – Lâminas histológicas de cortes de 5µm dos tumores induzidos pelas linhagens Kyse 30 e Kyse 410. Universidade do Minho, Portugal, 2021.



Avaliação do infiltrado imune intra-tumoral em tumores induzidos pelas linhagens celulares Kyse-30 e Kyse-410. **a)** Hematoxilina e eosina (HE) representativos de cortes histológicos de tumores induzidos por Kyse-30 (magnificação original 20x); **b)** Hematoxilina e eosina (HE) representativos de cortes histológicos de tumores induzidos por Kyse-30 (magnificação original 40x); **c)** Hematoxilina e eosina (HE) representativos de cortes histológicos de tumores induzidos por Kyse-410 (magnificação original 20x); **d)** Hematoxilina e eosina (HE) representativos de cortes histológicos de tumores induzidos por Kyse-410 (magnificação original 40x).

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram, globalmente, que a expressão das citocinas representam uma promissora ferramenta para estudos de potencial terapêutico no câncer, pois, muitas delas, apresentam significativos aumentos na vigência do desenvolvimento neoplásico, o que traduz, de alguma forma, a participação das citocinas na carcinogênese, seja como protagonistas ou elementos associados a progressão dos carcinomas<sup>62</sup>. Nos últimos anos, diversas proteínas incluindo citocinas e quimiocinas tem sido pospostas como marcadores para diagnóstico de câncer de esôfago. Entretanto, o papel da rede de citocinas/quimiocinas no contexto de câncer é complexo, o que exige que sua interpretação seja cuidadosa. Embora essas pequenas moléculas desempenhem papéis cruciais na orquestração da resposta imune antitumoral, evidências emergentes sugerem que a rede de citocinas e quimiocinas pode ser cooptada para promover o crescimento e a agressividade tumoral. As elevadas taxas de mortalidade causadas pelo CE são associadas com sua rápida progressão e diagnósticos em estágio tardio<sup>14</sup>. Mais da metade dos casos de CE reportados no mundo são localmente avançados, já que a falta de sintomas específicos dessa doença retarda a realização de procedimentos que atualmente são padrão para a detecção da doença, que são ultrassonografia endoscópica ou tomografia computadorizada<sup>63</sup>. Assim, isso contribui para a presença de metástases regional ou à distância e consequentemente com um pior prognóstico. Como previsto, a identificação de novos biomarcadores que podem ajudar no diagnóstico de estágio iniciais da doença é crucial para conter a mortalidade por este câncer<sup>64</sup>.

No presente trabalho, um painel de citocinas e quimiocinas, em pacientes com CCEE e modelo animal, foi analisado a fim de verificar sua potencial utilidade como biomarcador para diagnóstico e progressão dessa doença. Os dados encontrados destacam evidências importantes relacionadas à resposta imunológica e ao controle do desenvolvimento do CEC de esôfago. Por exemplo, vale destacar que os níveis elevados de IL-8 foram positivamente correlacionados ao desenvolvimento do carcinoma de esôfago, e claramente associado ao maior risco de morte quando comparado àqueles com menores níveis das citocinas avaliadas; e, mais significativamente, a expressão elevada de IL-8 pode ser assumida, pelo nosso entendimento, como um fator de risco para câncer de esôfago. Estes dados estão em

concordância com o já descrito para câncer urotelial e, neste caso, o câncer não é responsivo a imunoterapia.

Também foi demonstrado que, em modelo animal, apesar das duas linhagens celulares testadas induzirem CEC de esôfago, os animais implantados com a linhagem celular Kyse-30 apresentaram tumores maiores quando comparados aos animais implantados com a linhagem Kyse-410, sugerindo, por um lado, que Kyse-30 apresenta um comportamento mais agressivo como deduzido pela análise de citometria de fluxo; enquanto que na análise histológica, observou-se maior concentração de neutrófilos infiltrando os tumores Kyse-30, o que é reconhecidamente relacionado à agressividade do câncer<sup>65</sup>. Curiosamente, quando se testou a hipótese de que o aumento dos neutrófilos estava associado à expressão de IL-8, obteve-se que a expressão dessa quimiocina em ambas as linhagens de CEC de esôfago foi semelhante à concentração encontrada no sangue humano. Além disso, a expressão de CXCL2 foi maior nos tumores Kyse-30 quando comparados aos tumores Kyse-410.

Inicialmente, quando apenas o grupo caso 1 (amostras retrospectivas) foi considerado, teve-se que os níveis de IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8 estavam significativamente aumentados no plasma de pacientes com CEC de esôfago. Entretanto, quando o tamanho amostral incluiu as amostras coletadas de modo prospectivo, unindo os grupos caso 1 e 2, apenas as citocinas IL-6 e IL-8 se mantiveram significativamente aumentadas no plasma dos pacientes portadores de CCEE, o que de alguma forma já era esperado, pois dados recentes demonstraram que citocinas pró-inflamatórias podem contribuir de maneira importante para a progressão tumoral, estimulando a angiogênese, invasão e metástase<sup>66-68</sup>. Em diversos tipos de carcinomas, incluindo os cânceres colorretal, gástrico, pulmão, prostático e mamário, a expressão elevada de citocinas inflamatórias no tecido tumoral e na circulação sistêmica foi correlacionada com a progressão da doença e mau prognóstico; sendo assim, altos níveis séricos dessas citocinas podem representar inflamação sistêmica e potencial malignidade das células<sup>68</sup>.

Outra citocina detectada com altos níveis plasmáticos em pacientes com CE foi a IL-6, uma citocina inflamatória pleiotrópica que influencia a resposta imune específica ao antígeno, hematopoiese e reações inflamatórias. Dado que o estado inflamatório persistente é um fator importante no desenvolvimento e progressão das neoplasias malignas em resposta à estimulação por citocinas, a IL-6 representa não apenas uma citocina pró-inflamatória, mas também um dos principais moduladores do crescimento autócrino<sup>68</sup>. Ela

pode iniciar a resposta imune inata, induzindo a fase aguda da inflamação<sup>69</sup> e parece estar envolvida na transformação maligna, progressão tumoral e caquexia associada a diversos tumores malignos<sup>70</sup>. Assim, muitos estudos indicaram uma correlação significativa entre a superexpressão de IL-6 e o desenvolvimento de vários tipos de câncer, incluindo CE, sugerindo o possível uso de IL-6 como marcador tumoral para o diagnóstico de câncer, corroborando parte de nossos achados<sup>69, 71, 72</sup>. Níveis elevados de IL-6 no momento pré-operatório de pacientes com CEC de esôfago também foram significativamente associados à menor sobrevida livre de recidiva e sobrevida global após a esofagectomia, além de apresentarem uma fraca resposta à quimioterapia ou quimiorradioterapia, sugerindo sua utilização como possível marcador prognóstico independente para esses pacientes<sup>73</sup>.

A citocina anti-inflamatória IL-10 também estava aumentada no sangue dos pacientes com CE e isto pode estar correlacionado com a agressividade de muitos de muitos casos porque ela exerce atividade imunossupressora e promove a inibição de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e baixa regulação da resposta imune<sup>74</sup>. Recentemente, foi demonstrado que o aumento da concentração de IL-10 e dos polimorfismos genéticos de IL-10 podem ter efeito no desenvolvimento e progressão de alguns tipos de câncer, incluindo CE<sup>74-76</sup>. Os resultados de Li e colaboradores sustentam que os polimorfismos genéticos da IL-10 podem desempenhar um papel essencial na identificação do CE em estágio inicial<sup>74</sup>. Complementado esses achados, Yang e Fa, 2015 concluíram que polimorfismos na IL-10 (variação genética de IL-10-1082G/A rs1800896) podem ser empregados como biomarcadores candidatos para a previsão de suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de esôfago<sup>77</sup>. Sun et al., 2013 também demonstraram que o polimorfismo da IL-10 estava associado a um risco aumentado de CEC de esôfago, indicando suscetibilidade<sup>76</sup>. Também, Li e Zuo reportaram que a concentração de IL-10 no microambiente tumoral aumentava com o avanço do estágio do tumor em pacientes com CE<sup>75</sup>.

A interleucina IL-1 também foi encontrada no soro de nossos pacientes com CE. No entanto, poucos estudos até o momento analisaram a relação entre essa citocina e o carcinoma de esôfago. É sabido que os polimorfismos do gene da citocina IL-1 aumentam o risco de câncer gástrico e seus precursores, e que a citocina IL-1 é vital para o controle local do crescimento tumoral, particularmente na regulação de atividades "pro- tumorigênicas" no microambiente tumoral, e contribui para angiogênese, proliferação tumoral e invasão tumoral<sup>78</sup>. A análise funcional da IL-1 $\beta$  mostrou que essa citocina foi capaz de promover a

migração e invasão de células de CEC de esôfago, melhorando a transição epitelial-mesenquimal e ativando a via NF- $\kappa$ B<sup>79</sup>. Conseqüentemente, a alta expressão de IL-1 no CEC de esôfago é uma peça importante e intrigante de um quebra-cabeça que faz sentido no contexto do conhecimento atual do papel da interleucina no desenvolvimento do câncer.

Após análise multivariada, tanto considerando apenas o grupo caso 1 ou unindo os grupos caso 1 e 2, identificou-se que a IL-8 foi a única interleucina cuja expressão representa uma robusta evidência causal, sugerindo que sua expressão pode estar associada significativamente associada com o desenvolvimento e progressão do CEC de esôfago, corroborando com estudos anteriores<sup>80-85</sup>. Entretanto, o mecanismo acionado pela IL-8 em CE ainda não está bem estabelecido, apesar de evidências indicarem que IL-8 pode estar envolvida em muitas etapas da progressão tumoral<sup>82-85</sup>, uma vez que é pró-inflamatória, pró-angiogênica, favorece a invasão e metástase<sup>73</sup>, e é produzida por várias células para coordenar o recrutamento de células inflamatórias, especificamente neutrófilos e células supressoras mielóides, para locais de infecção ou lesão<sup>58</sup>. De acordo com esses dados, nosso modelo de camundongo de CEC de esôfago revelou que a agressividade do tumor esofágico também estava associada à expressão de CXCL2 e ao aumento do acúmulo de células mielóides granulocíticas. Como não foi detectada a expressão alterada de VEGF nesse cenário, os dados indicam que o acúmulo de granulócitos no microambiente tumoral é o provável mecanismo pelo qual a IL-8 promove o crescimento excessivo de tumores. Esse resultado está de acordo com os parâmetros imunológicos que postulam que os neutrófilos se infiltram nos tecidos, respondendo a quimiocinas específicas como CXCL1 e CXCL2 e são recrutados ativamente para o microambiente tumoral ao longo de um gradiente quimiotático envolvendo vários fatores secretados pelo tumor<sup>86</sup>. IL-8 tem sido descrita como o quimioatratador de neutrófilo mais potente para tumores em cânceres humanos<sup>86, 87</sup> e aparentemente, múltiplos mecanismos estão envolvidos na ação de IL-8, incluindo efeitos diretos na proliferação, angiogênese e migração de células tumorais e efeitos indiretos através da atração de células de infiltração no hospedeiro, como neutrófilos e macrófagos, que por sua vez podem produzir numerosos fatores que promovem angiogênese e crescimento tumoral<sup>87</sup>. Recentemente, níveis séricos elevados de IL-8 foram correlacionados com metástase linfonodal e à distância, particularmente em estágios avançados de carcinoma de esôfago, e também à uma menor sobrevida livre de recorrência<sup>73</sup>.

Foi também revelada a associação entre os níveis de IL-6 e IL-8 com a sobrevida global de pacientes com CCEE, tanto considerando apenas o grupo caso 1 ou unindo os grupos caso 1 e 2. Pacientes com CCEE que possuíam altos níveis plasmáticos de IL-6 ou IL-8 também exibiram sobrevida reduzida quando comparado com pacientes com baixos níveis dessas citocinas. Essa sobrevida reduzida também foi observada para pacientes diagnosticados com TNM III e IV e pacientes que não foram submetidos à cirurgia ou não realizaram radioterapia. Esses resultados podem ser explicados pelas funções que essas citocinas desempenham no microambiente tumoral, regulando inflamação e respostas imunes e contribuindo importantemente para a progressão tumoral por estimular angiogênese, invasão e metástase<sup>81-83</sup>. IL-6 está intimamente associada a tumores, sendo capaz de induzir a fase aguda da inflamação por iniciar a resposta imune inata<sup>69</sup>, além do aparente envolvimento na transformação maligna, progressão tumoral e associação com caquexia em diversos tipos tumorais<sup>70</sup>. IL-6 pode ainda afetar diretamente a expressão de fatores angiogênicos, tais como VEGF, e promover recrutamento de metaloproteinases (MMPs), que desempenham papel fundamental na invasão tumoral e diferenciação de matriz extracelular<sup>71</sup>. Resultados similares relatados previamente, demonstraram que níveis elevados de IL-6 são associados com progressão tumoral, pior prognóstico e menor sobrevida global quando comparado com pacientes IL-6 negativos<sup>71, 88</sup>. IL-8, como já referido, é uma quimiocina pró-inflamatória que coordena um número de funções, recrutando neutrófilos e células supressoras derivadas de mielócitos, incluindo angiogênese, promovendo transição epitélio-mesenquimal, inibindo apoptose e promovendo crescimento de células tumorais<sup>71, 86</sup>. IL-8 circulante esteve aumentada em pacientes com CCEE e positivamente correlacionado com presença de metástase linfonodal, bem como com *status* inflamatório de pacientes com câncer<sup>81</sup>, indicando a IL-8 como um biomarcador para CCEE<sup>80, 89</sup>. Apesar da significativa diferença nos níveis de diversas citocinas identificadas em pacientes com CCEE, a sensibilidade e especificidade dessas moléculas (incluindo IL-8) foi relativamente baixa.

Ainda no sentido de encontrar moléculas que pudessem servir como prognóstico de CE, a expressão IHQ de Three Prime Repair Exonuclease 1 (TREX1) foi avaliada e demonstrou um importante potencial prognóstico, ao se associar mais significativamente aos casos de CE de pior prognóstico, com uma sobrevida global bastante reduzida para os pacientes com casos positivos. Entretanto, não foi encontrado nenhuma correlação da expressão do TREX-1

em relação ao estadiamento ou às análises de diferenciação tumoral. Recentemente, Bruni e colaboradores identificaram, em carcinomas de células escamosas do colo uterino, regulação positiva de TREX1 como um importante parâmetro para o crescimento das células malignas podendo contribuir com o estabelecimento e progressão do tumor; entretanto, não foi encontrada nenhuma associação entre a presença ou ausência do TREX1 e a presença de HPV<sup>48</sup>. De forma semelhante, Feng et al avaliaram a potencial utilidade da análise da expressão de TREX1 na progressão de osteosarcomas, indicando seu uso para esse fim<sup>90</sup>. Curiosamente, esse mesmo grupo sugeriu que TREX1 pode estar implicado como um regulador negativo da formação de células estaminais cancerosas do osteosarcoma enfatizando que vale a pena outros estudos para entender mais adequadamente o papel do TREX1 como potencial protagonista no desenvolvimento de novos tratamentos em terapias para osteosarcomas<sup>90</sup>.

A perspectiva de se usar o TREX-1 como ferramenta terapêutica tem sido elaborada cada vez mais firmemente. Em algumas propostas, ao invés de se direcionar as terapias diretamente às células tumorais, os elementos celulares do microambiente tumoral tem sido postulados para sensibilizar os tumores aos efeitos terapêuticos. Um mecanismo proposto por Wilson et al<sup>91</sup>, investigou o papel do microRNA-103 em estimular células endoteliais associadas ao tumor para aumentar a capacidade de induzir a morte de células malignas. Usando abordagens de ganho e perda de função, foi demonstrado que o miR-103 exacerba o dano ao DNA e inibe a angiogênese *in vitro* e *in vivo*. Globalmente, a distribuição local, sistêmica ou com alvo vascular de miR-103 em camundongos com tumor diminuiu a angiogênese e o crescimento do tumor. Mecanicamente, a regulação miR-103 de seu gene alvo TREX1 em células endoteliais induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias no microambiente tumoral o que sugere que este meio inflamatório pode potencializar a morte de células tumorais, apoiando a ativação imunológica e induzindo a expressão tumoral de receptores Fas e TRAIL<sup>91</sup>. Semelhante potencial como alvo terapêutico foi recentemente encontrado por Krushkal e colaboradores<sup>92</sup> que encontraram várias correlações significativas entre metilação do DNA e quimiossensibilidade, com especial destaque para a associação com TREX1. De acordo com esses autores, a metilação aumentada e a baixa expressão de TREX1 foram associadas com a sensibilidade para inibidores da cinase Aurora que é um quinase pertence à família serina / treonina quinase que controla a divisão celular. A inibição

terapêutica da quinase Aurora tem se mostrado muito promissora como provável regime terapêutico anticâncer devido ao seu importante papel durante a divisão celular<sup>93</sup>.

Apesar de sua natureza exploratória e imparcial, nosso estudo apresenta limitações. Especificamente, enquanto nossos dados reforçam o envolvimento de IL-8 no desenvolvimento / progressão do CCEE, eles são incapazes de determinar o papel dos níveis de citocinas na progressão tumoral. Além disso, a abordagem não permite determinar o papel temporal da IL-8 no desenvolvimento / progressão do CCEE. Uma outra limitação do estudo é o pequeno número de amostras. Estudos futuros com um maior tamanho amostras podem ajudar a esclarecer o real papel das citocinas, especialmente IL-8, no desenvolvimento do câncer de esôfago, o comportamento das citocinas em outros tipos de tumores esofágicos também não foram avaliados. Adicionalmente, o papel do TREX-1 como elemento prognóstico e alvo terapêutico também poderá enriquecer nosso entendimento sobre a progressão neoplásico do carcinoma esofágico, e minimizar os efeitos perniciosos da sua progressão.

## **7 CONCLUSÃO**

A IL-8 plasmática é um fator prognóstico valioso e potencial biomarcador para CCEE. Porém, falta avaliar em humanos, o mecanismo responsável pelos altos níveis de IL-8 nos pacientes com CCEE. TREX1 é um potencial marcador de sobrevida para CCEE.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. **CA Cancer J Clin**. 2021.
2. 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.
3. Shen ZY, Xu LY, Chen MH, Li EM, Li JT, Wu XY, et al. *Upregulated expression of Ezrin and invasive phenotype in malignantly transformed esophageal epithelial cells*. **World J Gastroenterol**. 2003;9(6):1182-6.
4. Shen ZY, Xu LY, Li EM, Shen J, Zheng RM, Cai WJ, et al. *Immortal phenotype of the esophageal epithelial cells in the process of immortalization*. **Int J Mol Med**. 2002;10(5):641-6.
5. Cervantes J. *Update on the pathogenesis and immunotherapy of esophageal squamous cell carcinoma*. **Rev Gastroenterol Peru**. 2004;24(2):165-70.
6. Aversa J, Song M, Shimazu T, Inoue M, Charvat H, Yamaji T, et al. *Prediagnostic circulating inflammation biomarkers and esophageal squamous cell carcinoma: A case-cohort study in Japan*. **Int J Cancer**. 2019.
7. Zhang H, Xia J, Wang K, Zhang J. *Serum autoantibodies in the early detection of esophageal cancer: a systematic review*. **Tumour Biol**. 2014.
8. INCA. *"Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil"*. [Internet] 2020 [cited 05/04/2021].
9. Lin EW, Karakasheva TA, Hicks PD, Bass AJ, Rustgi AK. *The tumor microenvironment in esophageal cancer*. **Oncogene**. 2016.
10. K. S. *HPV and esophageal cancer. Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond*. **Norwich, UK**2006. p. 229-53.
11. K. S. *Human papillomavirus (HPV) involvement on esophageal carcinogenesis* In: Publishing NS, editor. **New York, USA**2010.
12. INCA. *"INCA. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil."*

[Internet] 2018 [cited 28.07.2019].

13. Xu W, Liu Z, Bao Q, Qian Z. *Viruses, Other Pathogenic Microorganisms and Esophageal Cancer*. **Gastrointest Tumors**. 2015;2(1):2-13.
14. Graham L, Wikman A. *Toward improved survivorship: supportive care needs of esophageal cancer patients, a literature review*. **Dis Esophagus**. 2015.
15. Klempner SJ. *How is Immunotherapy for Esophageal Cancer Changing the Outlook for Patients?* [Internet] 2020 [cited 05/04/2021]; Available from: <https://www.cancerresearch.org/immunotherapy/cancer-types/esophageal>.
16. Huang TX, Fu L. *The immune landscape of esophageal cancer*. **Cancer Commun (Lond)**. 2019;39(1):79.
17. Tao CJ, Lin G, Xu YP, Mao WM. *Predicting the Response of Neoadjuvant Therapy for Patients with Esophageal Carcinoma: an In-depth Literature Review*. **J Cancer**. 2015;6(11):1179-86.
18. Makuuchi Y, Honda K, Osaka Y, Kato K, Kojima T, Daiko H, et al. *Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy*. **Cancer Sci**. 2013;104(8):1045-51.
19. Wu J, Gao FX, Wang C, Qin M, Han F, Xu T, et al. *IL-6 and IL-8 secreted by tumour cells impair the function of NK cells via the STAT3 pathway in oesophageal squamous cell carcinoma*. **J Exp Clin Cancer Res**. 2019;38(1):321.
20. Lukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Szmitkowski M. *Chemokines and their receptors in esophageal cancer--the systematic review and future perspectives*. **Tumour Biol**. 2015;36(8):5707-14.
21. Bhat AA, Nisar S, Maacha S, Carneiro-Lobo TC, Akhtar S, Siveen KS, et al. *Cytokine-chemokine network driven metastasis in esophageal cancer; promising avenue for targeted therapy*. **Mol Cancer**. 2021;20(1):2.
22. Shigeoka M, Urakawa N, Nakamura T, Nishio M, Watajima T, Kuroda D, et al. *Tumor associated macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma*. **Cancer Sci**. 2013;104(8):1112-9.
23. Diakowska D. *Cytokines association with clinical and pathological changes in esophageal squamous cell carcinoma*. **Dis Markers**. 2013;35(6):883-93.

24. Mack CL. *Serum cytokines as biomarkers of disease and clues to pathogenesis. Hepatology.* 2007;46(1):6-8.
25. Chen MF, Lu MS, Chen PT, Chen WC, Lin PY, Lee KD. *Role of interleukin 1 beta in esophageal squamous cell carcinoma. J Mol Med (Berl).* 2012;90(1):89-100.
26. Chen D, Jin L, Zhu L, Mou X, Wang S, Mao C. *[Expressions and correlations of let-7a and IL-6 in esophageal squamous cell carcinoma]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2013;29(11):1181-4.
27. Chen MF, Chen PT, Lu MS, Lin PY, Chen WC, Lee KD. *IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus. Mol Cancer.* 2013;12:26.
28. Umar M, Upadhyay R, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. *Association of common polymorphisms in TNFA, NFkB1 and NFKBIA with risk and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. PLoS One.* 2013;8(12):e81999.
29. Hsing CH, Kwok FA, Cheng HC, Li CF, Chang MS. *Inhibiting interleukin-19 activity ameliorates esophageal squamous cell carcinoma progression. PLoS One.* 2013;8(10):e75254.
30. Lukaszewicz-Zajac M, Paczek S, Muszynski P, Kozlowski M, Mroczko B. *Comparison between clinical significance of serum CXCL-8 and classical tumor markers in oesophageal cancer (OC) patients. Clin Exp Med.* 2019;19(2):191-9.
31. Liang B, Zhao H, Che JB, Wang HJ, Shi GN. *Overexpression of interleukin-8 receptor 2 (IL-8R2) indicates better prognosis in esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma procession. Med Oncol.* 2014;31(8):89.
32. Wang N, Zhou R, Wang C, Guo X, Chen Z, Yang S, et al. *-251 T/A polymorphism of the interleukin-8 gene and cancer risk: a HuGE review and meta-analysis based on 42 case-control studies. Mol Biol Rep.* 2012;39(3):2831-41.
33. Zhang X, Weng W, Xu W, Wang Y, Yu W, Tang X, et al. *Prognostic significance of interleukin 17 in cancer: a meta-analysis. Int J Clin Exp Med.* 2014;7(10):3258-69.
34. Yao M, Brummer G, Acevedo D, Cheng N. *Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity. Adv Cancer Res.* 2016;132:265-367.

35. Tao YP, Wang WL, Li SY, Zhang J, Shi QZ, Zhao F, et al. *Associations between polymorphisms in IL-12A, IL-12B, IL-12Rbeta1, IL-27 gene and serum levels of IL-12p40, IL-27p28 with esophageal cancer.* **J Cancer Res Clin Oncol.** 2012;138(11):1891-900.
36. Savage SA, Abnet CC, Mark SD, Qiao YL, Dong ZW, Dawsey SM, et al. *Variants of the IL8 and IL8RB genes and risk for gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma.* **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2004;13(12):2251-7.
37. Moghimi M, Dastgheib SA, Heiranizadeh N, Zare M, Sheikhpour E, Neamatzadeh H. *Association of IL-8 -251t>a (Rs4073) Polymorphism with Susceptibility to Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on 33 Case-Control Studies.* **Arq Gastroenterol.** 2020;57(1):91-9.
38. Demaria S, Vanpouille-Box C. *TREX1 is a checkpoint for innate immune sensing of DNA damage that fosters cancer immune resistance.* **Emerg Top Life Sci.** 2017;1(5):509-15.
39. Tomicic MT, Aasland D, Nikolova T, Kaina B, Christmann M. *Human three prime exonuclease TREX1 is induced by genotoxic stress and involved in protection of glioma and melanoma cells to anticancer drugs.* **Biochim Biophys Acta.** 2013;1833(8):1832-43.
40. Atianand MK, Fitzgerald KA. *Molecular basis of DNA recognition in the immune system.* **J Immunol.** 2013;190(5):1911-8.
41. Tao SS, Wu GC, Zhang Q, Zhang TP, Leng RX, Pan HF, et al. *TREX1 as a potential therapeutic target for autoimmune and inflammatory diseases.* **Curr Pharm Des.** 2019.
42. Morita M, Stamp G, Robins P, Dulic A, Rosewell I, Hrivnak G, et al. *Gene-targeted mice lacking the Trex1 (DNase III) 3'-->5' DNA exonuclease develop inflammatory myocarditis.* **Mol Cell Biol.** 2004;24(15):6719-27.
43. Lamphier M, Zheng W, Latz E, Spyvee M, Hansen H, Rose J, et al. *Novel small molecule inhibitors of TLR7 and TLR9: mechanism of action and efficacy in vivo.* **Mol Pharmacol.** 2014;85(3):429-40.
44. Hasan M, Koch J, Rakheja D, Pattnaik AK, Brugarolas J, Dozmorov I, et al. *Trex1 regulates lysosomal biogenesis and interferon-independent activation of antiviral genes.* **Nat Immunol.** 2013;14(1):61-71.
45. Yan N, Regalado-Magdos AD, Stiggelbout B, Lee-Kirsch MA, Lieberman J. *The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1.* **Nat Immunol.** 2010;11(11):1005-13.

46. Han G, Tian Y, Duan B, Sheng H, Gao H, Huang J. Association of nuclear annexin A1 with prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(2):751-9.
47. Dong X, Li Y, Hess KR, Abbruzzese JL, Li D. DNA mismatch repair gene polymorphisms affect survival in pancreatic cancer. *Oncologist*. 2011;16(1):61-70.
48. Prati B, da Silva Abjaude W, Termini L, Morale M, Herbster S, Longatto-Filho A, et al. Three Prime Repair Exonuclease 1 (TREX1) expression correlates with cervical cancer cells growth in vitro and disease progression in vivo. *Sci Rep*. 2019;9(1):351.
49. Tetreault MP. Esophageal Cancer: Insights From Mouse Models. *Cancer Growth Metastasis*. 2015;8(Suppl 1):37-46.
50. Nair DV, Reddy AG. Laboratory animal models for esophageal cancer. *Vet World*. 2016;9(11):1229-32.
51. Tung LN, Song S, Chan KT, Choi MY, Lam HY, Chan CM, et al. Preclinical Study of Novel Curcumin Analogue SSC-5 Using Orthotopic Tumor Xenograft Model for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res Treat*. 2018.
52. Liu DS, Duong CP, Phillips WA, Clemons NJ. Preclinical models of esophageal adenocarcinoma for drug development. *Discov Med*. 2016;22(123):371-9.
53. Tarnok A, Hamsch J, Chen R, Varro R. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clin Chem*. 2003;49(6 Pt 1):1000-2.
54. *Kyse-30 Cell Line Description*.
55. *Kyse-410 Cell Line Description*. [Internet] [cited 09/10/2020]; Available from: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb\\_94072023?lang=pt&region=BR&gclid=CjwKCAjwnef6BRAGeiwAgv8mQQv8h8lf4K4zvhNFBqEJH5Qt30G74-HEHow54IoM93MjDSJJ2-imWxoC580QAvD BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_94072023?lang=pt&region=BR&gclid=CjwKCAjwnef6BRAGeiwAgv8mQQv8h8lf4K4zvhNFBqEJH5Qt30G74-HEHow54IoM93MjDSJJ2-imWxoC580QAvD BwE).
56. Wallner G, Ciechanski A, Dabrowski A, Kozlowski M, Rolinski J, Laudanski J, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with squamous cell oesophageal cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 2001;39 Suppl 2:122-3.
57. Valter T. Motta PFdOF. SPSS - Análise de Dados Biomédicos. Ltda M-EC eRdJ-R.

58. Alfaro C, Sanmamed MF, Rodriguez-Ruiz ME, Teijeira A, Onate C, Gonzalez A, et al. *Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up*. **Cancer Treat Rev**. 2017;60:24-31.
59. Bozic CR, Gerard NP, von Uexkull-Guldenband C, Kolakowski LF, Jr., Conklyn MJ, Breslow R, et al. *The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization*. **J Biol Chem**. 1994;269(47):29355-8.
60. Lee J, Cacalano G, Camerato T, Toy K, Moore MW, Wood WI. *Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor*. **J Immunol**. 1995;155(4):2158-64.
61. Zhang JX, Chen ZH, Xu Y, Chen JW, Weng HW, Yun M, et al. *Downregulation of MicroRNA-644a Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Aggressiveness and Stem Cell-like Phenotype via Dysregulation of PITX2*. **Clin Cancer Res**. 2017;23(1):298-310.
62. Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, Etxeberria I, Aznar MA, Perez-Gracia JL, et al. *Cytokines in clinical cancer immunotherapy*. **Br J Cancer**. 2019;120(1):6-15.
63. Short MW, Burgers KG, Fry VT. *Esophageal Cancer*. **Am Fam Physician**. 2017;95(1):22-8.
64. Huang FL, Yu SJ. *Esophageal cancer: Risk factors, genetic association, and treatment*. **Asian J Surg**. 2018;41(3):210-5.
65. Shaul ME, Fridlender ZG. *Tumour-associated neutrophils in patients with cancer*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2019.
66. Dvorak K, Dvorak B. *Role of interleukin-6 in Barrett's esophagus pathogenesis*. **World J Gastroenterol**. 2013;19(15):2307-12.
67. Yang PW, Huang PM, Yong LS, Chang YH, Wu CW, Hua KT, et al. *Circulating Interleukin-6 is Associated with Prognosis and Genetic Polymorphisms of MIR608 in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. **Ann Surg Oncol**. 2018;25(8):2449-56.
68. Maeda Y, Takeuchi H, Matsuda S, Okamura A, Fukuda K, Miyasho T, et al. *Clinical significance of preoperative serum concentrations of interleukin-6 as a prognostic marker in patients with esophageal cancer*. **Esophagus**. 2020;17(3):279-88.
69. Vinocha A, Grover RK, Deepak R. *Clinical significance of interleukin-6 in diagnosis of lung, oral, esophageal, and gall bladder carcinomas*. **J Cancer Res Ther**. 2018;14(Supplement):S758-S60.

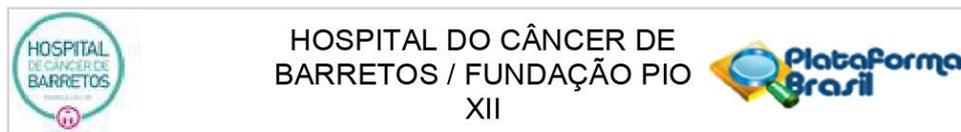
70. Nikiteas NI, Tzanakis N, Gazouli M, Rallis G, Daniilidis K, Theodoropoulos G, et al. *Serum IL-6, TNF $\alpha$  and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: prognostic implications.* **World J Gastroenterol.** 2005;11(11):1639-43.
71. Tong Q, Wang XL, Li SB, Yang GL, Jin S, Gao ZY, et al. *Combined detection of IL-6 and IL-8 is beneficial to the diagnosis of early stage esophageal squamous cell cancer: a preliminary study based on the screening of serum markers using protein chips.* **Onco Targets Ther.** 2018;11:5777-87.
72. Aydin Y, Kaplan I, Bilen Y, Bulut Ç, Genc F, Türkyilmaz A, et al. *Plasma levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in patients with esophageal cancer*2012.
73. Maeda Y, Takeuchi H, Matsuda S, Okamura A, Fukuda K, Miyasho T, et al. *Clinical significance of preoperative serum concentrations of interleukin-6 as a prognostic marker in patients with esophageal cancer.* **Esophagus.** 2019.
74. Li YF, Yang PZ, Li HF. *Functional polymorphisms in the IL-10 gene with susceptibility to esophageal, nasopharyngeal, and oral cancers.* **Cancer Biomark.** 2016;16(4):641-51.
75. Li C, Zuo W. *IL-10 in vitro could enhance IFN $\gamma$  expression and suppress PD-1 expression in CD8 T cells from esophageal cancer patients.* **Exp Cell Res.** 2019;379(2):159-65.
76. Sun JM, Li Q, Gu HY, Chen YJ, Wei JS, Zhu Q, et al. *Interleukin 10 rs1800872 T>G polymorphism was associated with an increased risk of esophageal cancer in a Chinese population.* **Asian Pac J Cancer Prev.** 2013;14(6):3443-7.
77. Yang Y, Fa X. *Role of IL-10 gene polymorphisms on the susceptibility for esophageal cancer and its association with environmental factors.* **Int J Clin Exp Pathol.** 2015;8(8):9580-5.
78. Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. *Potential influence of interleukin-1 haplotype IL-1 beta-511\*T-IL-1RN\*1 in conferring low risk to middle third location of esophageal cancer: a case-control study.* **Hum Immunol.** 2008;69(3):179-86.
79. Zhou J, Zheng S, Liu T, Liu Q, Chen Y, Tan D, et al. *IL-1beta from M2 macrophages promotes migration and invasion of ESCC cells enhancing epithelial-mesenchymal transition and activating NF-kappaB signaling pathway.* **J Cell Biochem.** 2018;119(8):7040-52.
80. Ogura M, Takeuchi H, Kawakubo H, Nishi T, Fukuda K, Nakamura R, et al. *Clinical significance of CXCL-8/CXCR-2 network in esophageal squamous cell carcinoma.* **Surgery.** 2013;154(3):512-20.

81. Krzystek-Korpacka M, Matusiewicz M, Diakowska D, Grabowski K, Blachut K, Konieczny D, et al. *Elevation of circulating interleukin-8 is related to lymph node and distant metastases in esophageal squamous cell carcinomas--implication for clinical evaluation of cancer patient.* **Cytokine.** 2008;41(3):232-9.
82. Sethi G, Shanmugam MK, Ramachandran L, Kumar AP, Tergaonkar V. *Multifaceted link between cancer and inflammation.* **Biosci Rep.** 2012;32(1):1-15.
83. Lazennec G, Richmond A. *Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation.* **Trends Mol Med.** 2010;16(3):133-44.
84. Kruizinga RC, Bestebroer J, Berghuis P, de Haas CJ, Links TP, de Vries EG, et al. *Role of chemokines and their receptors in cancer.* **Curr Pharm Des.** 2009;15(29):3396-416.
85. Konno H, Ohta M, Baba M, Suzuki S, Nakamura S. *The role of circulating IL-8 and VEGF protein in the progression of gastric cancer.* **Cancer Sci.** 2003;94(8):735-40.
86. Shaul ME, Fridlender ZG. *Cancer-related circulating and tumor-associated neutrophils - subtypes, sources and function.* **FEBS J.** 2018;285(23):4316-42.
87. Xie K. *Interleukin-8 and human cancer biology.* **Cytokine Growth Factor Rev.** 2001;12(4):375-91.
88. Yoneda M, Fujiwara H, Furutani A, Ikai A, Tada H, Shiozaki A, et al. *Prognostic impact of tumor IL-6 expression after preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma.* **Anticancer Res.** 2013;33(6):2699-705.
89. Lukaszewicz-Zajac M, Paczek S, Muszynski P, Kozlowski M, Mroczko B. *Comparison between clinical significance of serum CXCL-8 and classical tumor markers in oesophageal cancer (OC) patients.* **Clin Exp Med.** 2019.
90. Feng J, Lan R, Cai G, Lin J, Wang X, Lin J, et al. *Verification of TREX1 as a promising indicator of judging the prognosis of osteosarcoma.* **J Orthop Surg Res.** 2016;11(1):150.
91. Wilson R, Espinosa-Diez C, Kanner N, Chatterjee N, Ruhl R, Hipfinger C, et al. *MicroRNA regulation of endothelial TREX1 reprograms the tumour microenvironment.* **Nat Commun.** 2016;7:13597.

92. Krushkal J, Silvers T, Reinhold WC, Sonkin D, Vural S, Connelly J, et al. *Epigenome-wide DNA methylation analysis of small cell lung cancer cell lines suggests potential chemotherapy targets.* **Clin Epigenetics.** 2020;12(1):93.
93. Borisa AC, Bhatt HG. *A comprehensive review on Aurora kinase: Small molecule inhibitors and clinical trial studies.* **Eur J Med Chem.** 2017;140:1-19.

## ANEXOS

### Anexo A - Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Caracterização do perfil imunológico de portadores do carcinoma de células escamosas do esôfago e relação com Papilomavírus Humano

**Pesquisador:** Vânia Sammartino Mariano

**Área Temática:**

**Versão:** 8

**CAAE:** 51741415.5.0000.5437

**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

**Patrocinador Principal:** Fundação Pio XII

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.747.961

##### Apresentação do Projeto:

O câncer esofágico (CE), oitavo tipo de câncer mais incidente e sexto mais letal no mundo, é geralmente diagnosticado em estágio avançado, apresenta progressão rápida e prognóstico extremamente ruim, com sobrevida global em 5 anos abaixo de 20%. No Brasil, o CE está entre os dez tipos de cânceres com maior incidência, ocupando a sexta posição entre os homens e a décima quarta entre as mulheres, com destaque para as regiões sul e sudeste. Dentre os principais fatores de risco para essa doença, destacam-se o consumo de álcool e cigarro, principalmente quando usados concomitantemente e, há mais de 30 anos, foi sugerido que o Papilomavírus humano (HPV) seria possível fator de risco para o desenvolvimento do CE. Recentemente, nosso grupo identificou DNA de HPV em amostras de tumor esofágico, mas o vírus não

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.747.961

correlacionou com a doença e marcadores indiretos de infecção. Por ser uma doença de diagnóstico tardio, mais da metade dos casos de CE relatados no mundo encontram-se localmente avançados e apenas um quarto dos indivíduos com a doença são candidatos a um tratamento curativo, que geralmente são cirurgia, quimio e radioterapia (CRT) em concomitância de forma definitiva ou neoadjuvância. Entretanto, aqueles pacientes refratários ao tratamento CRT apresentam redução da qualidade de vida, recorrência da doença e prognóstico desfavorável, levando a uma intensa busca por marcadores confiáveis que indiquem a melhor modalidade de tratamento e a resposta do paciente. Um amplo espectro de biomarcadores relacionados com alterações genômicas do DNA, expressão de RNA mensageiro (mRNA), micro-RNA (miRNA) e expressão de proteínas têm sido identificados e analisados com objetivo de utilização para prever resposta à terapia, sendo em sua maioria, analisados a partir de biópsias. Entretanto, métodos menos invasivos para obtenção de amostras biológicas para pesquisa de marcadores moleculares podem ser mais aplicáveis e úteis na prática clínica. Além disso, atualmente, os componentes imunológicos como as citocinas, têm ganhado notoriedade na área oncológica porque são produzidas inicialmente, atuam modulando a atividade de tipos celulares frequentemente encontrados no microambiente tumoral e ainda podem ser detectadas sistemicamente. Além disso, proteínas que têm expressão diferencial durante carcinogênese e relacionada com inflamação são alvos de pesquisas que visam o desenvolvimento de terapia alvo. Assim, atenção deve ser dada também a exonuclease TREX1, associada à inflamação e resposta contra HIV, potencialmente elevada em neoplasias malignas e MTA1, uma proteína associada a metástase, ambas pouco avaliadas em esôfago.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **Geral**

Avaliar o perfil imunológico, a expressão de TREX1 e MTA1, elaborar o perfil de mutações somáticas envolvidas com a carcinogênese esofágica, associadas ou não com infecção por HPV, em pacientes com carcinoma de células escamosas de esôfago além de associar com os dados clinicopatológicos.

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.747.961

#### Específicos

- Avaliar a expressão de mRNA E6/E7 de HPV e possíveis mutações que possam estar relacionadas com a infecção viral em amostras casos e controles.
- Avaliar o perfil plasmático de citocinas, antes e após o tratamento em pacientes com CEC de esôfago e comparar com controles.
- Avaliar a relação do perfil de citocinas com o CEC de esôfago.
- Avaliar a expressão de TREX1 e MTA1 em tecidos parafinados de casos e controles por imunohistoquímica (IHQ).
- Investigar o perfil mutacional das amostras esofágicas tumorais congeladas, disponíveis no biobanco.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Trata-se de um estudo misto, com coleta retrospectiva e prospectiva. Quanto à coleta retrospectiva, apresenta risco mínimo aos participantes, por contemplar a coleta de dados de prontuários médicos e uso de amostras biológicas previamente coletadas e estocadas nos setores de Patologia e Biobanco da instituição. Com relação à coleta prospectiva, será realizada somente coleta de sangue periférico, procedimento que envolve risco mínimo à saúde e somente um possível desconforto. O principal risco envolvido no projeto como um todo está relacionado à possibilidade de quebra de sigilo acidental, mas os pesquisadores citam no projeto que irão tomar medidas para evitar a quebra de sigilo ocorra.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os pesquisadores submetem a emenda com o objetivo de incluir, prospectivamente, um novo grupo de indivíduos no estudo, que consiste de pacientes com câncer de esôfago recém admitidos no Hospital de Câncer de Barretos que serão acompanhados desde o diagnóstico até a alta clínica, para coleta de amostras sanguíneas em cada consulta clínica para acompanhamento, a fim de comparar o seu perfil imunológico ao longo do tratamento. No projeto anteriormente aprovado (CAAE: 51741415.5.0000.5437 / Número do Parecer: 1.615.581) não havia esse grupo de pacientes. As amostras sanguíneas seriam coletadas apenas daqueles pacientes incluídos em

<b>Endereço:</b> Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	<b>CEP:</b> 14.784-400
<b>Bairro:</b> Dr. Paulo Prata	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BARRETOS
<b>Telefone:</b> (17)3321-0347	<b>Fax:</b> (17)3321-6600
	<b>E-mail:</b> cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.747.961

estudo prévio realizado por nosso grupo de estudo. Entretanto, devido ao reduzido número de pacientes vivos elegíveis para esta análise e aos diferentes esquemas de tratamento que foram realizados, decidimos começar a coleta prospectiva de pacientes para viabilidade das análises estatísticas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os documentos obrigatórios foram apresentados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

De acordo com os pesquisadores, o número de pacientes vivos com CEC de esôfago incluídos em estudo prévio e que seriam avaliados neste projeto, através de uma nova coleta de sangue periférico, é abaixo do esperado. Dessa forma, solicitam a inclusão de uma coleta prospectiva de 87 pacientes recém admitidos no Hospital de Câncer de Barretos, os quais coletariam amostras de sangue periférico no momento de suas consultas de acompanhamento e retorno, já previstas no tratamento.

O TCLE foi adequadamente ajustado para essa nova inclusão. Os riscos e benefícios permanecem os mesmos do estudo original e estão devidamente descritos no TCLE. Dessa forma, considera-se a emenda aprovada.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 1057/2015, e:

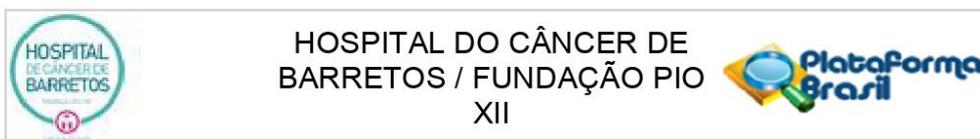
- Aprovou a emenda ao estudo, submetido em 05/09/2016;

Após análise do(s) documento(s) supracitado(s), o Comitê faz a seguinte recomendação:

- O Estudo deve Continuar;
- O Estudo dever ser Interrompido;
- O Estudo está Finalizado;
- Solicita-se Esclarecimento;

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

<b>Endereço:</b> Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	<b>CEP:</b> 14.784-400
<b>Bairro:</b> Dr. Paulo Prata	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BARRETOS
<b>Telefone:</b> (17)3321-0347	<b>Fax:</b> (17)3321-6600
	<b>E-mail:</b> cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE  
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO  
XII

Continuação do Parecer: 1.747.961

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_780756E3.pdf	05/09/2016 10:46:30		Aceito
Outros	Formulario_para_apresentacao_de_Emenda_EMENDA_COLETA_PROSPECTIVA.docx	05/09/2016 10:36:03	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
Outros	Formulario_para_apresentacao_de_emenda_COLETA_PROSPECTIVA.pdf	05/09/2016 10:34:50	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
Outros	Cadastro_Projeto_de_Pesquisa.pdf	05/09/2016 10:33:24	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
Outros	MABIM.pdf	05/09/2016 10:32:09	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ProjetoDoutorado_Paula_AdendoColetaProspectiva.pdf	05/09/2016 10:31:31	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_PaulaRAPastrez_ADENDO_ColetaProspectiva.pdf	05/09/2016 10:29:48	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	02/09/2016 11:00:40	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_Pendencias_Adendo.docx	23/05/2016 16:50:08	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
Outros	CartadeRespostaPendencias.pdf	23/05/2016 16:46:30	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	relatorio_disponibilidade_amstras.pdf	27/01/2016 08:52:55	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
Outros	Declaracao_de_ciencia_e_autorizacao_de_estudo.pdf	08/12/2015 09:28:59	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
Outros	Declaracao_de_fonte_de_financiamento.pdf	08/12/2015 09:28:26	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_responsabilidade_do_pesquisador.pdf	08/12/2015 09:27:44	Paula Roberta Aguiar Pastrez	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancelbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.747.961

BARRETOS, 27 de Setembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Thiago Buosi Silva**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata      **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP      **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347      **Fax:** (17)3321-6600      **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

**Anexo B - Carta de aprovação do estudo pela Subcomissão de Ética para as Ciências da Vida e da Saúde da Universidade do Minho, Braga, Portugal**



Universidade do Minho

SECVS

**Subcomissão de Ética para as Ciências da Vida e da Saúde**

Identificação do documento: SECVS 074/2016

Título do Projeto: *Regulação da resposta inflamatória pulmonar: implicação para o desenvolvimento de novas imunoterapias*

Investigador Principal: Egidio Torrado

Investigador responsável pela experimentação animal: Egidio Torrado

Subunidade orgânica: Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde (ICVS)

**PARECER**

A Subcomissão de Ética para as Ciências da Vida e da Saúde (SECVS) analisou o processo relativo ao seu projeto de investigação com recurso a modelos animais intitulado *Regulação da resposta inflamatória pulmonar: implicação para o desenvolvimento de novas imunoterapias*.

Os documentos apresentados revelam que o projeto obedece aos requisitos exigidos para as boas práticas na experimentação com recurso à utilização de modelos animais, considerando a aplicação dos 3 Rs de Russel e Burch e a aplicação de limites críticos de sofrimento - *humane endpoints*.

Face ao exposto, a SECVS não tem nada a opor à realização do projeto, emitindo o seu parecer favorável, salientando no entanto que:

- a autorização legal de projetos de investigação/ experimentação animal é feita pela DGAV a quem deverá submeter o respetivo formulário do projeto (através da sua Subunidade Orgânica da UMinho).

Braga, 05 de janeiro de 2017.

A Presidente

MARIA CECÍLIA  
DE LEMOS PINTO  
ESTRELA LEÃO

Assinado de forma digital  
por MARIA CECÍLIA DE  
LEMOS PINTO ESTRELA  
LEÃO  
Dados: 2017.01.05  
14:23:04 Z

(Maria Cecilia de Lemos Pinto Estrela Leão)

**Anexo C - Instrumento de coleta de dados (Grupos Caso 1 e Controle 1)**

1	Identificação	
2	Nome	
3	Registro hospitalar	
4	Grupo	1- Caso; 2- Controle
<b>INFORMAÇÕES GERAIS</b>		
5	Data de nascimento	DD-MM-AAAA
6	Sexo	1- Feminino; 2- Masculino
7	Qual a sua raça (cor da pele)?	1- Branco; 2- Negro; 3- Pardo ou Mulato; 4- Amarelo (Asiático); 5- Indígena
8	Estado civil	1- Solteiro; 2- Casado / Amasiado; 3- Separado / Divorciado; 4- Viúvo
9	Escolaridade	0- Analfabeto; 1- Sabe ler e escrever; 2- Ensino fundamental incompleto; 3- Ensino fundamental completo; 4- Ensino médio incompleto; 5- Ensino médio completo; 6- Ensino superior incompleto; 7- Ensino superior completo
10	Ocupação / Profissão exercida por mais tempo	ESPECIFICAR
11	Ocupação / Profissão - Tempo	ANOS
12	Morou/Mora em zona rural	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
13	Se sim, por quanto tempo?	ANOS
14	Exposição a pesticidas e inseticidas	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
15	Morou/Mora em zona urbana	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
16	Se sim, por quanto tempo?	ANOS
<b>ESTILO DE VIDA</b>		
17	<u>Álcool</u>	0- Nunca; 1- Sim, ainda bebe (se parou nos últimos 12 meses); 3- Só no passado
18	<u>Cerveja</u>	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
19	Idade de início	ANOS
20	Idade que parou	ANOS
21	Unidade	1- Copo pequeno – 50 ml; 2- Copo médio – 100 ml; 3- Copo grande – 250 ml½ ou garrafa pequena – 330 ml; 4- Garrafa – 700-750 ml; 5- Garrafa – 1 L
22	Quantas unidades consome	
23	Por	1- Dia; 2- Semana; 3- Mês; 4- Ano
24	<u>Vinho</u>	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
25	Idade de início	ANOS
26	Idade que parou	ANOS
27	Unidade	1- Copo pequeno – 50 ml; 2- Copo médio – 100 ml; 3- Copo grande – 250 ml½ ou garrafa pequena – 330 ml; 4- Garrafa – 700-750 ml; 5- Garrafa – 1 L
28	Quantas unidades consome	
29	Por	1- Dia; 2- Semana; 3- Mês; 4- Ano

30	<b>Cachaça</b>	0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado
31	Idade de início	ANOS
32	Idade que parou	ANOS
33	Unidade	1- Copo pequeno – 50 ml; 2- Copo médio – 100 ml; 3- Copo grande – 250 ml½ ou garrafa pequena – 330 ml;4- Garrafa – 700-750 ml; 5- Garrafa – 1 L
34	Quantas unidades consome	
35	Por	1- Dia; 2- Semana; 3-Mês; 4-Ano
36	<b>Tabaco</b>	0- Não; 1- Sim, atualmente, 2- Sim, passado
37	<b>Cigarro de filtro</b>	0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado
38	Número por dia	NÚMERO
39	Idade de início	ANOS
40	Idade que parou	ANOS
41	<b>Cigarro de palha</b>	0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado
42	Número por dia	NÚMERO
43	Idade de início	ANOS
44	Idade que parou	ANOS
45	<b>Cachimbo</b>	0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado
46	Número por dia	NÚMERO
47	Idade de início	ANOS
48	Idade que parou	ANOS
49	<b>Charuto</b>	0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado
50	Número por dia	NÚMERO
51	Idade de início	ANOS
52	Idade que parou	ANOS
<b>EXPOSIÇÃO PASSIVA À FUMAÇA DE CIGARRO</b>		
53	Você esteve casado (ou vivendo junto) com um fumante?	0- Não; 1- Sim; 2- Não lembra; 99-Ignorado
54	Idade quando cônjuge iniciou	
55	Idade quando o cônjuge parou	
56	Número de horas que estava exposto durante a semana	
57	Número de horas que estava exposto aos fins de semanas	
58	Você trabalhou em um lugar fechado onde as pessoas fumassem?	0- Não; 1- Sim; 2- Não lembra; 99-Ignorado
59	Idade quando iniciou o trabalho com fumantes	
60	Idade quando parou de trabalhar com fumantes	
61	Número de horas/dia que estava exposto	
62	Número de horas que fumava em sua presença	

63	Quando criança, seu pai ou sua mãe fumavam? 0- Não; 1- Sim; 2- Não lembra; 99-Ignorado	
64	Por quanto tempo foi exposto? ANOS	
65	<b>Pratica atividade física?</b> 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
66	Se sim, qual a frequência por semana? 1 - 7	
67	Quanto tempo por dia? 0- Menos de 30'; 1- pelo menos 30'; 2- pelo menos 60'; 3- não lembra; 99-Ignorado	
68	<b>Faz exposição ao sol entre 10 da manhã e 16 h?</b> 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
69	Se sim, usa roupa apropriada e protetor solar? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
<b>HÁBITOS ALIMENTARES E MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS</b> De maneira geral, com qual frequência você ingere...		
70	Legumes e verduras? 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
71	Folhas e vegetais? 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
72	Frutas frescas? 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
73	Carne vermelha, ovo e leite 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
74	Enlatados? 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
75	Congelados? 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
76	Grãos? (ex. milho) 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
77	Bebidas quentes (Ex. Chimarrão, Café, Chá) 0- Nunca; 1- Sim, atualmente; 2- Sim, passado	
78	Peso KILOS	
79	Altura METROS	
<b>HISTÓRICO DE HÁBITOS SEXUAIS</b>		
80	Você já teve alguma doença sexualmente transmissível, diagnosticada por um médico ou profissional de saúde? 0- Não; 1- Sim; 2- Não sabe; 3- Não quer responder; 99-Ignorado	
81	Verrugas genitais? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
82	Herpes genital? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
83	Hepatite B? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
84	Hepatite C? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
85	HIV? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
86	HPV? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
87	Em toda a sua vida, você já teve relação sexual (vaginal, ou oral, ou anal) com alguém? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
88	Qual a idade da sua primeira relação sexual? ANOS	
89	Em toda a sua vida, com quantas pessoas você teve relação sexual? 1- 2-5; 2- 6-10; 3- 11-20; 4- 21-50; 5- 51-100; 6- Mais de 100; 99-Ignorado	

90	Você já fez sexo colocando sua boca nos genitais do(a) parceiro(a) (sexo oral ativo)? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
91	Quantos anos você tinha quando fez sexo oral em alguém pela primeira vez? ANOS	
92	Com que frequência você faz ou fazia sexo oral no(a) parceiro(a)? 0- Nunca; 1- Raramente; 2- Frequentemente; 3- Sempre; 99-Ignorado	
93	Qual era o sexo das pessoas em quem você fez sexo oral? 1- Mulheres; 2- Homens; 3- Homens e Mulheres; 88- Não se aplica; 99-Ignorado	
94	Você já fez sexo colocando sua boca no ânus do parceiro? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
95	Você já fez sexo colocando seus genitais na boca do parceiro (sexo oral passivo)? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
<b>HISTÓRICO DE CÂNCER NA FAMÍLIA</b>		
96	História de câncer de esôfago em familiares de 1º Grau (Pais, Irmãos e Filhos) 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
97	História de câncer cabeça e pescoço na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
98	História de câncer de esôfago na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
99	História de câncer de colo de útero na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
100	História de câncer de vulva na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
101	História de câncer de pênis na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
102	História de câncer anal na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
<b>COMORBIDADES</b>		
103	Chagas 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
104	Se sim, megaesôfago chagásico 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
105	Refluxo gastresofágico 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
106	Esôfago de Barret 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	

**Anexo D - Instrumento de coleta de dados clínicos (Grupo Caso 1)**

DADOS CLÍNICOS		
1	Data do diagnóstico	DD-MM-AAAA
2	Grau histológico 1- Bem diferenciado; 2- Moderadamente diferenciado; 3- Pouco diferenciado; 99- Ignorado	
3	Estadiamento T	0- T0; 1- T1; 2- T2; 3- T3; 4- T4; 99- Tx
4	Estadiamento N	0- N0; 1- N1; 99- Nx
5	Estadiamento M	0- M0; 1- M1; 2- M1a; 3- M1b; 99- Mx
6	Estadiamento TNM agrupado	0- 0; 1- I; 2- IIA; 3- IIB; 4- III; 5- IV; 6- IVA; 7- IVB; 99- Ignorado



---

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)  
PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

**TÍTULO DO ESTUDO:** Caracterização do perfil imunológico de portadores do carcinoma de células escamosas do esôfago e relação com Papilomavírus Humano.

**PESQUISADORES:**

Vânia Sammartino Mariano, Paula Roberta Aguiar Pastrez, Estela Maria Silva, Denise Peixoto Guimarães, Allini Mafrá da Costa, Adhemar Longatto Filho

**O QUE É ESTE DOCUMENTO?**

Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo que será realizado no Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII. Este documento é chamado de “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e explica este estudo e qual será a sua participação, caso você aceite o convite. Este documento também fala os possíveis riscos e benefícios se você quiser participar, além de dizer os seus direitos como participante de pesquisa. Após analisar as informações deste Termo de Consentimento e esclarecer todas as suas dúvidas, você terá o conhecimento necessário para tomar uma decisão sobre sua participação ou não neste estudo. Não tenha pressa para decidir. Se for preciso, leve para a casa e leia este documento com os seus familiares ou outras pessoas que são de sua confiança.

**POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO FEITO?**

O câncer de esôfago (CE) é um tipo de câncer que atinge muitas pessoas no mundo e o consumo de álcool e cigarro, principalmente quando utilizados em associação são as principais causas do surgimento dessa doença. Além disso, há mais de 30 anos, foi sugerido que o Papilomavírus humano (HPV) seria possível fator de risco para o desenvolvimento do CE, porém esse papel ainda não está bem esclarecido. Apesar do avanço nos tratamentos dos casos de CE, pouca alteração foi observada na sobrevivência dos pacientes, o que leva à necessidade de pesquisas de marcadores moleculares que ajudem no diagnóstico antecipado, menos agressivo e controle de acompanhamento dos portadores deste tumor. Além disso, a grande ocorrência de câncer em indivíduos com sistema imunológico comprometido demonstra a importância da resposta contra o tumor e justifica seu estudo. A possibilidade de se fazer tratamento personalizado exige a realização de testes moleculares que são feitos à partir de pequenas partes da lesão colhidos durante a biópsia (procedimento cirúrgico no qual se colhe células ou uma pequena parte de tecido orgânico para serem posteriormente submetidos a estudo em laboratório, visando determinar a natureza e o grau da lesão estudada) que exige espaço adequado e profissionais capacitados. Além da coleta de material biológico, é

importante obter informações de questão social e referentes a doença e dados clínicos dos participantes da pesquisa para relacionar com os achados biológicos. Para o desenvolvimento do estudo com estes objetivos, será necessário coletar sangue de indivíduos com câncer de esôfago, ao longo do tratamento, em cada consulta de acompanhamento e, assim, serão comparadas as informações do mesmo paciente antes e pós realização do tratamento.

#### **O QUE ESTE ESTUDO QUER SABER?**

O objetivo deste estudo é avaliar o perfil imunológico e a expressão de marcadores moleculares em pacientes com carcinoma de células escamosas de esôfago, ao longo do tratamento, e associá-los com os dados informados pelo médico além de verificar a contribuição de HPV para o desenvolvimento da doença.

#### **O QUE ACONTECERÁ COMIGO DURANTE O ESTUDO?**

O (A) Senhor (a) será submetido a coletas de sangue nos seguintes momentos: antes do início da realização do tratamento até a alta clínica, em toda consulta, a qual não trará riscos físicos extras a sua saúde além daqueles já existentes quando há doação de sangue. Após esclarecimento e explicação dos objetivos do estudo, uma agulha será usada para coletar uma pequena quantidade de sangue de uma veia do seu braço (volume de 5 mL) em tubo de coleta de sangue (BD Vacutainer, BD Biosciences, EUA) por profissional treinado e habilitado e armazenado a -80°C até momento de sua utilização. O objetivo é avaliar a quantidade e o tipo de substância produzida pelo sistema de defesa do organismo após tratamento e comparar com os níveis no momento do diagnóstico da doença, ou seja, antes da realização do tratamento. As amostras serão identificadas com números para que sua identidade seja mantida em sigilo pelos pesquisadores.

#### **HAVERÁ ALGUM RISCO OU DESCONFORTO SE EU PARTICIPAR DO ESTUDO?**

As informações que puderem identificar os participantes de pesquisa serão mantidas em sigilo e codificadas para garantir a confidencialidade dos dados e a privacidade dos mesmos. Entretanto, há risco de quebra de sigilo das informações, já que as pessoas diretamente relacionadas ao estudo terão acesso direto ao banco de dados. Além disso, pode haver possível desconforto durante a coleta de sangue.

#### **HAVERÁ ALGUM BENEFÍCIO PARA MIM SE EU PARTICIPAR DO ESTUDO?**

É possível que este estudo não traga benefícios diretos a você nesse instante, mas ao final do estudo, as informações obtidas de todos os casos estudados poderão contribuir para a prevenção e até para o tratamento mais eficiente de outros pacientes com câncer de esôfago.

#### **QUAIS SÃO AS OUTRAS OPÇÕES SE EU NÃO PARTICIPAR DO ESTUDO?**

A outra opção é não participar do estudo.

#### **QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS SE EU QUISER PARTICIPAR DO ESTUDO?**

Você tem direito a:

1. Receber as informações do estudo de forma clara;
2. Ter oportunidade de esclarecer todas as suas dúvidas;
3. Ter o tempo que for necessário para decidir se quer ou não participar do estudo;
4. Ter liberdade para recusar a participação no estudo, e isto não trará qualquer de problema para você;
5. Ter liberdade para desistir e se retirar do estudo a qualquer momento;
6. Ter assistência a tudo o que for necessário se ocorrer algum dano por causa do estudo, de forma gratuita, pelo tempo que for preciso;
7. Ter direito a reclamar indenização se ocorrer algum dano por causa do estudo;
8. Ser ressarcido pelos gastos que você e seu acompanhante tiverem por causa da participação na pesquisa, como por exemplo, transporte e alimentação;
9. Ter acesso aos resultados dos exames realizados durante o estudo;
10. Ter respeitado o seu anonimato (confidencialidade);
11. Ter respeitada a sua vida privada (privacidade);
12. Receber uma via deste documento, assinada e rubricada em todas as páginas por você e pelo pesquisador;
13. Ter liberdade para não responder perguntas que incomodem você;
14. Ter liberdade para retirar o consentimento para que usem ou guardem o guarda material biológico que foi removido de você.

#### **O QUE ACONTECERÁ COM O MATERIAL QUE FOR COLETADO DE MIM?**

Todo o material biológico coletado durante este estudo (sangue periférico) e os dados gerados não serão utilizados para outros fins além daqueles explicados neste Termo de Consentimento. Esses materiais não terão os seus dados pessoais, apenas códigos de identificação, para manter o seu sigilo. Depois de todas as análises terem sido realizadas, o material biológico que restar será adequadamente armazenado no Hospital de Câncer de Barretos. Se houver necessidade de fazer novas análises com seu material e/ou outras pesquisas, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (CEP-HCB) avaliará esse novo uso. Sem a autorização deste comitê, novas pesquisas com o seu material não poderão ser realizadas. Apesar deste material biológico ficar guardado no Hospital de Câncer de Barretos, ele pertence a você. A qualquer momento, durante ou após este estudo, você poderá retirar este material do hospital ou pedir que seja destruído. Isto não tirará nenhum direito do seu tratamento neste hospital. No final do estudo, se sobrar algum material, ele será armazenado no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos, conforme Termo de Consentimento específico. Se tiver dúvidas sobre este Biobanco, pergunte ao pesquisador do estudo ou, então, entre em contato com o setor: (tel: (17) 3321-6600 - ramal 6963)

#### **SE EU TIVER DÚVIDAS SOBRE OS MEUS DIREITOS OU QUISER FAZER UMA RECLAMAÇÃO, COM QUEM EU FALO?**

Fale diretamente com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos. Este comitê é formado por pessoas que analisam a parte ética dos estudos e autorizam ele acontecer ou não. Você pode entrar em contato com este Comitê por telefone (tel: (17) 3321-0347 ou (17) 3321-6600 - ramal 6647), email (cep@hcancerbarretos.com.br) carta (Rua Antenor Duarte Vilela, 1331, Instituto de Ensino e Pesquisa, 14784-057) ou pessoalmente. O horário de atendimento é de 2ª a 5ª feira, das 8h00 às 17h00, e 6ª feira, da 8h00 às 16h00. O horário de almoço é de 12h00 às 13h00.

**SE EU TIVER DÚVIDAS SOBRE O ESTUDO, COM QUEM EU FALO?**

Fale diretamente com o pesquisador responsável. As formas de contato estão abaixo:

Nome do pesquisador: Vânia Sammartino Mariano

Formas de contato: Telefone: (17) 3321-6600, ramal 7093/7094; email: vaniasmariano@gmail.com

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

Eu entendi o estudo. Tive a oportunidade de ler o Termo de Consentimento ou alguém leu para mim. Tive o tempo necessário para pensar, fazer perguntas e falar a respeito do estudo com outras pessoas. Autorizo a minha participação na pesquisa. Ao assinar este Termo de Consentimento, não abro mão de nenhum dos meus direitos. Este documento será assinado por mim e pelo pesquisador, sendo todas as páginas rubricadas por nós dois. Uma via ficará comigo, e outra com o pesquisador.

**CAMPO DE ASSINATURAS**

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso do participante de pesquisa ou do representante legal

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso da testemunha imparcial (para casos de analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência visual)

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura