

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS*
DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

MARIANE OKAMOTO FERREIRA

**IMPACTO DO TABAGISMO NO PERFIL INFLAMATÓRIO
SISTÊMICO DE PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE
PULMÃO**

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(MARÇO-2022)

MARIANE OKAMOTO FERREIRA

**IMPACTO DO TABAGISMO NO PERFIL INFLAMATÓRIO SISTÊMICO DE
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Dr^a Carolina Panis

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(MARÇO-2022)

Ferreira, Mariane Okamoto

Impacto do tabagismo no perfil inflamatório sistêmico de pacientes portadores de câncer de pulmão / Mariane Okamoto Ferreira; orientadora Carolina Panis. -- Francisco Beltrão, 2022.

59 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Francisco Beltrão) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2022.

1. tabagismo. 2. estresse oxidativo. 3. inflamação. 4. câncer de pulmão. I. Panis, Carolina, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANE OKAMOTO FERREIRA

**IMPACTO DO TABAGISMO NO PERFIL INFLAMATÓRIO SISTÊMICO DE
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE PULMÃO**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pela Orientadora e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Carolina Panis
UNIOESTE

Membro da banca: Prof^a Dr^a Aedra Carla Bufalo Kawassaki
UNIOESTE

Membro da banca: Prof^o Dr^o Leonardo Garcia Velasquez
UNIPAR

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(MARÇO-2022)

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação, exigiu bem mais do que desenvoltura acadêmica, e tenho muitas pessoas que se faz necessário expressar minha gratidão e apreço.

Inicialmente, gostaria de manifestar minha admiração e agradecer à minha orientadora, professora Carolina Panis, cuja sabedoria foi inestimável na condução dos trabalhos realizados, no planejamento, execução do curso e sucesso da pesquisa. Seu profissionalismo visionário, me conduziu a lapidar minhas competências como pesquisadora e elevou meu trabalho sublimemente.

Eu não poderia ter concluído esta dissertação sem o apoio profissional do Dr^o Daniel Rech e Dr^o Odirlei João Titon, obrigada por fornecerem todas as ferramentas, materiais e estrutura necessárias para a realização desta pesquisa. Continuando, quero agradecer ao meu coorientador do projeto de pesquisa inicial, Dr^o Carlos Frederico de Almeida Rodrigues, por fornecer a inspiração que eu precisava para escolher a direção certa e concluir com sucesso esta jornada.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Biologia de Tumores - LBT por sua maravilhosa contribuição, particularmente minha colega de mestrado Janaína Carla da Silva. Aos meus amigos Suzana Botão Ayres Pereira, Sayoko Olga Miyagusuku Miranda, Matheus Iago Oliveira Coletto, Matheus Ricardo Garbim e Rodrigo Kern, agradeço-lhes por seu apoio paciente e por todas as colaborações que foram dadas para prosseguir com as pesquisas.

Finalmente, eu não poderia ter concluído esta dissertação sem a minha família, Luiz, Sauria, Valéria, Arthur e Lana, agradeço infinitamente por seus sábios conselhos, apoio incondicional e ouvidos compreensivos.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a todos os professores da instituição, sob cuja orientação constante concluí esta dissertação, eles não apenas esclareceram as dúvidas com seu conhecimento acadêmico, como também deram conselhos valiosos sempre que eu precisei.

Dedico com estima este trabalho a todos os voluntários e pacientes que doaram um pouco do seu tempo, atenção a si mesmos para que a pesquisa fosse realizada.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Taxas de mortalidade das 5 localizações primárias dos tumores mais frequentes por 100.000 homens e mulheres entre 1970 e 2019.....	20
Figura 2: Diagrama de indicações terapêuticas em caso de CP de pequenas células.	22
Figura 3: Diagrama de indicações terapêuticas em caso de CP de não pequenas células.	23
Figura 4: Papel dicotômico das moléculas relacionadas à inflamação na fisiopatologia do câncer.....	26
Figura 5: Organograma hierárquico da classificação dos participantes da pesquisa durante o estudo.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAB – 2,2'-Azobis(2-amidinopropane)
BCA-1 / CXCL13 – Quimiocina 1 que Atrai Células B
CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEONC – Hospital do Câncer de Francisco Beltrão
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CID – Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde
(Classificação Internacional de Doenças – CID 10)
COX-2 – Ciclooxygenase-2
CP – Câncer Primário de Pulmão
CPCNP – Carcinomas Pulmonares de Células Não-Pequenas
CPCP – Carcinomas Pulmonares de Células Pequenas
CX – Cirurgia
DM – Diabetes Mellitus
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ENA 78 / CXCL5 – Peptídeo Ativador De Neutrófilos Epitelial 78
EROS – Espécies Reativas de Oxigênio
FCR – Força Centrífuga Relativa
HAPs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
IFN – Interferon
IFN- γ – Interferon Gama
IL – Interleucinas
IL-1 – Interleucina-1
IL-1 β – Interleucina-1 Beta
IL-10 – Interleucina-10
IL-12 – Interleucina-12
IL-17 – Interleucina-17
IL-1RA – Antagonista do Receptor de Interleucina 1
IL-2 – Interleucina-2

IL-23 – Interleucina-23
IL-4 – Interleucina-4
IL-6 – Interleucina-6
IL-7 – Interleucina-7
IL-8 – Interleucina-8
LBT – Laboratório de Biologia de Tumores
LPO – lipoperóxidos
MDC / CCL22 – Quimiocina Derivada de Macrófago
MDSCs – Células Supressoras Derivadas de Mieloide
MIG / CXCL9 – Monocina Induzida por Interferon Gama
NF κ B – Fator Nuclear κ B
NF κ B – Fator Nuclear Kappa B
NK – Célula Natural Killer
NO – Óxido Nítrico
NOx – Metabólitos de Óxido Nítrico
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCR – Proteína C Reativa
PGE2 – Prostaglandina E2
QL – Quimiluminescência
QX – Quimioterapia
RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio
RX – Radioterapia
SAA – Soro Amiloide A
T CD8+ – Linfócitos T CD8+
TAM – Macrófagos Associados a Tumor
TARC / CCL17 – Quimiocina Regulada Pela Ativação Do Timo
t-butil – Tert-butil Peróxido
TCD4+ – Linfócitos T CD8+
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- α – Fator De Crescimento Transformador Alfa
TGF- β – Fator De Crescimento Transformador Beta
Th – Linfócito T auxiliar ou Linfócito TCD4+
Th1 – Padrão de resposta do Linfócito T auxiliar 1
Th17 – Padrão de resposta do Linfócito T auxiliar 17
Th2 – Padrão de resposta do Linfócito T auxiliar 2

Th6 – Padrão de resposta do Linfócito T auxiliar 6

Th9 – Padrão de resposta do Linfócito T auxiliar 9

TME – Microambiente Tumoral

TNFRII – Receptor De Fator De Necrose Tumoral Solúvel 2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral-Alfa

TRAP – Capacidade Antioxidante Total do Plasma

Treg – Células T reguladoras

Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

VEGF – Fator De Crescimento Endotelial Vascular

Impacto do tabagismo no perfil inflamatório sistêmico de pacientes portadores de câncer de pulmão

Resumo

O câncer primário de pulmão (CP) é o câncer mais incidente e de maior mortalidade mundial desde 1985 e o tabagismo é o principal fator carcinogênico modificável para o CP. Sabe-se que o câncer, bem como a fumaça do cigarro e outros derivados do tabaco, são geradores de inflamação, produtores de mediadores imunológicos, fontes de radicais livres e outros componentes que desregulam o equilíbrio redox. Contudo, suas interrelações são complexas e a contribuição específica do tabagismo na neoplasia primária de pulmão ainda precisa ser esclarecidas. O câncer de pulmão é consideravelmente afetado pela resposta imune, isso implica a participação de sinalizadores inflamatórios como as citocinas interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são os principais reguladores dos padrões de resposta imune dos linfócitos TCD4+. Baixos níveis de IL-12 e TNF- α têm sido relacionados às respostas anti-inflamatórias (Th2), o que implica em respostas associadas à proliferação, metástase e quimiorresistência neoplásica. Neste contexto, este estudo investigou o impacto do tabagismo nos níveis sistêmicos circulantes de mediadores do estresse oxidativo (lipoperóxidos – LPO, metabólitos do óxido nítrico – NOx e níveis antioxidantes – TRAP) e das citocinas TNF- α e IL-12, entre indivíduos tabagistas ou não, com câncer de pulmão e indivíduos sem câncer. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Unioeste– Francisco Beltrão. Trata-se de um estudo exploratório e descritivo de coorte, realizado no Hospital do Câncer Francisco Beltrão, entre novembro de 2019 e agosto de 2021. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 7.0 e um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. No grupo câncer de pulmão ($n=20$), idade média 54,2 anos; homens (68%), tabagistas ou ex-tabagistas (77%), etilistas ou ex-etilista (50%). O grupo controle ($n=54$), idade média 60,5 anos, homens (54%), tabagistas ou ex-tabagistas (54%), nunca haviam bebido (54%). As dosagens de citocinas mostram aumento significativo da IL-12 circulante apenas nos indivíduos controles tabagistas em relação aos controles não-tabagistas sem alteração dos níveis de TNF- α . Sobre o perfil de estresse oxidativo, os fumantes sem câncer apresentaram níveis mais altos de estresse oxidativo comparados aos controles não tabagistas. Não foram observadas diferenças nos demais grupos. Estes

resultados indicam que, nos indivíduos sem câncer, o tabagismo tem um impacto significativo sobre a inflamação, produzindo níveis mais elevados de LPO, NOx e IL-12. Nos pacientes com câncer de pulmão, os níveis inflamatórios observados foram similares independente do fator tabagismo, indicando que o fumo em si não provocou impacto adicional sobre as citocinas ou perfis de estresse oxidativo já produzidos pela doença.

Palavras-chave: tabaco, fumantes, estresse oxidativo, inflamação, neoplasias pulmonares.

Systemic effects of smoking on oxidative stress and pro-inflammatory cytokine profiles in patients with primary lung cancer

Abstract

Primary cancer (PC) is the cancer with the highest incidence and mortality worldwide in 1985 and smoking is the main modifiable carcinogenic factor for CP. It is known that cancer, as well as cigarette smoke and other tobacco derivatives, are generators of inflammation, producers of immune mediators, sources of free radicals and other components that deregulate the redox balance. However, their interrelationships are complex and the specific contribution of smoking to primary lung cancer remains to be clarified. Lung cancer is considerably affected by the immune response, which implies the participation of inflammatory signals such as the cytokines interleukin 12 (IL-12) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). These cytokines are the main regulators of response patterns immune and response of CD4+ T lymphocytes. Low levels of IL-12 and TNF- α have been related to anti-inflammatory responses (Th2), which implies responses associated with proliferation, metastasis and neoplastic chemoresistance. In this context, this study investigated the impact of smoking on the systemic circulating levels of oxidative stress mediators (lipoperoxides – LPO, nitric oxide metabolites – NOx and total antioxidant potential – TRAP), the cytokines TNF- α and IL-12, among smokers or non-smokers, in lung cancer and control individuals. The project was approved by the Ethics Committee in Research with Human Beings of Unioeste– Francisco Beltrão. This is an exploratory and descriptive cohort study, carried out at Hospital do Câncer Francisco Beltrão, between November 2019 and August 2021. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 7.0 software and a p-value <0.05 was considered significant. In the lung cancer group (n=20), mean age 54.2 years; men (68%), smokers or ex-smokers (77%), alcoholics or ex-alcoholics (50%). The control group (n=54), mean age 60.5 years, men (54%), smokers or former smokers (54%), had never drunk (54%). Cytokine measurements show a significant increase in circulating IL-12 only in healthy smokers (mean 57.81 pg/ml, min. 38.26 pg/ml, max. 70.71 pg/ml) compared to healthy non-smokers. smokers (mean 54.61 pg/ml, min. 48.16 pg/ml, max. 65.49 pg/ml - Mann-Whitney U test: Z=1.98; CI=97.64%) without change of TNF- α levels. Regarding the oxidative stress profile, smokers without cancer (mean NOx levels 28.75 μ M; min. 33.5 μ M; max. 23.93 μ M and mean lipid peroxidation 671,877.4 μ M; min. 267,360 μ M;

max. 963,159 .5 μM) had higher levels of oxidative stress compared to non-smoking controls (mean NOx levels 29.73 μM ; min. 23.5 μM ; max. 38.07 μM - Mann-Whitney U test: $Z=0.04$; $CI=51.49\%$ and mean lipid peroxidation 335,659.5 μM ; min 290,520 μM ; max 957,903.5 μM - Mann-Whitney U test: $Z=3.01$; $CI=99.87\%$). No differences were observed in the other groups. These results indicate that, in cancer-free individuals, smoking has a significant impact on inflammation, producing higher levels of LPO, NOx, and IL-12. In lung cancer patients, the inflammatory levels observed were similar regardless of the smoking factor, indicating that smoking itself did not have an additional impact on cytokines or oxidative stress profiles already produced by the disease.

keywords: Tobacco, Smokers, Oxidative Stress, Inflammation, Lung Neoplasm.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
DEDICATÓRIA	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
Resumo	11
Título do Abstract	Erro! Indicador não definido.
Abstract	13
SUMÁRIO	15
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 Câncer de pulmão: epidemiologia e perfil clinicopatológico	20
1.2 Tabaco, o estresse oxidativo e implicações no perfil inflamatório do tabagista: mecanismos imunológicos	24
1.3 Perfil inflamatório e o paciente com câncer de pulmão	27
2. OBJETIVOS	31
2.1 Geral.....	31
2.2 Específicos	31
3. METODOLOGIA	32
3.1 População de estudo	34
3.2 Obtenção das amostras e determinação do perfil inflamatório sistêmico	35
3.3 Análises estatísticas.....	37
4. REFERÊNCIAS	38
5. ARTIGO CIENTÍFICO 1	41
6. ANEXOS	55

<i>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....</i>	<i>55</i>
<i>ANEXO B – Termo De Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)</i>	<i>58</i>

1. INTRODUÇÃO GERAL

Desde meados de 1950, sabe-se que o tabagismo é o principal fator carcinogênico modificável para o câncer primário de pulmão (CP); entretanto, a contribuição específica do tabagismo e os mecanismos que desencadeiam e/ou agravam esse cenário ainda não é clara. (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2021; AZAD; ROJANASAKUL; VALLYATHAN, 2008; HUA et al., 2019; WALSER et al., 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995).

O tabaco e seus derivados, promovem o estresse oxidativo (EO) que é o desequilíbrio do status redox; isso ocorre quando a quantidade de átomos e moléculas com radicais livres, como por exemplo, espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROS/NOx) excedem a capacidade de redução dos sistemas antioxidantes. As EROS são as principais espécies reativas produzidas frente a insultos ao organismo, e atuam induzindo respostas inflamatórias que resultam na liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Essas moléculas, quando em desequilíbrio podem desencadear a inflamação crônica, lesão tecidual e carcinogênese. Portanto, a exposição direta às EROS e aos outros componentes tóxicos no tabagista, causam o EO e a inflamação crônica sistêmica, o que predispõem os indivíduos tabagistas ao câncer de pulmão e ao câncer em outras topografias (AZAD; ROJANASAKUL; VALLYATHAN, 2008; BARBOSA et al., 2010; PANIS et al., 2012).

Além disso, a inflamação tecidual pulmonar crônica do tabagista induz a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor, resultando em instabilidade genômica e formação de células neoplásicas. Outro agravo indireto do tabagismo é que a inflamação crônica altera a capacidade dos leucócitos em controlar a produção de moléculas como citocinas, fatores de crescimento, deflagradores de angiogênese e quimiocinas. Estes são componentes envolvidos em múltiplos “*hallmarks of cancer*”; que são as etapas necessárias para que uma célula se transforme em câncer (AZAD; ROJANASAKUL; VALLYATHAN, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011; HUA et al., 2019; WALSER et al., 2008).

A inflamação crônica determina um perfil molecular específico, que configurado pela produção de proteínas que modulam a função de outras células ou da própria célula do sistema imunológico, induz direta ou indiretamente a ativação ou supressão da resposta imune. Os principais reguladores da resposta imune são as citocinas.

Estas proteínas, secretadas por diversas células imunológicas, estão divididas em mediadores pró ou anti-inflamatórios, modulando o perfil imunológico predominante das células TCD4+ ou T *helper* (Th) (ABBAS, 2019).

Assim, temos os padrões predominantes divididos em Th1, que é pró-inflamatório e mediado por citocinas como a IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α , e o padrão Th2, que é predominantemente anti-inflamatório e caracterizado pelas citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β , dentre outras. Existem outros padrões como Th6, Th9 e Th17, mas seu papel em patologias como o câncer ainda é pouco discutido (ABBAS, 2019).

Considera-se que baixos níveis de IL-12 e TNF- α estão relacionados às respostas Th2, que no câncer predispõe a proliferação, metástase e quimiorresistência. A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória que induz a ativação da imunidade mediada por células e a diferenciação de T helper 1, que inibe a imunossupressão induzida por macrófagos do tecido tumoral (BENT et al., 2018; LASEK; ZAGOŹDŹON; JAKOBISIAK, 2014; NGUYEN et al., 2020) .

O TNF- α , por sua vez, tem sido descrito como uma citocina de duas vias de atuação, uma pró-tumoral estimulada pelo NF κ B, e outra pró-apoptótica, de modo que sua relação com o desenvolvimento do tecido tumoral depende do desequilíbrio entre as duas vias decorrentes de suas regulações. A ativação de NF κ B é o principal mecanismo responsável pela geração de radicais livres, e conseqüentemente desequilíbrio redox. Esta geração de espécies reativas é responsável por danos celulares importantes em lipídeos, proteínas e DNA, e está bem estabelecida como uma condição necessária, na inflamação crônica, para ocorrência da instabilidade genômica tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Da mesma forma, o consumo do cigarro é um conhecido fator gerador de espécies reativas, de citocinas pró-inflamatórias e outros produtos tóxicos, potencialmente contribuindo para a sustentação deste cenário inflamatório (LUKOSEVICIENE et al., 2018; WANG et al., 2019; WANG; LIN, 2008; ZHAO; CHEN; HERJAN; et al., 2019; Zhu et al., 2021).

Neste contexto, não se sabe exatamente qual o encargo do tabagismo no paciente oncológico, bem como se existe sinergismo das duas condições sobre o status redox e perfil inflamatório. Neste trabalho investigou-se a variação sistêmica dos níveis de LPO, NOx e TRAP; e das citocinas TNF- α e IL-12 em pacientes diagnosticados com câncer primário de pulmão, tabagistas ou não. Além disso, foram

incluídos voluntários sem diagnóstico de câncer, visando entender a contribuição da condição câncer versus o tabagismo neste cenário.

1.1 Câncer de pulmão: epidemiologia, classificação e perfil clinicopatológico

O câncer primário de pulmão é o câncer com maior incidência e mortalidade, entre homens e mulheres, mundial desde 1985. No Brasil, é o segundo câncer mais incidente (o mais frequente é o câncer de pele não melanoma) e o líder como causa da mortalidade por neoplasia entre homens e mulheres desde 1988. Em 2020, a GLOBOCAN estimou 2,21 milhões de novos casos, o que corresponde a 11,4% de todos os cânceres diagnosticados, e cerca de 1,80 milhões de mortes, o que corresponde – por sua vez a 18% de todas as mortes decorrentes de neoplasias no mundo (“Atlas On-line de Mortalidade,” [s.d.]; “WHO REPORT ON THE GLOBAL TOBACCO EPIDEMIC, 2021 Addressing new and emerging products fresh and alive,” [s.d.]

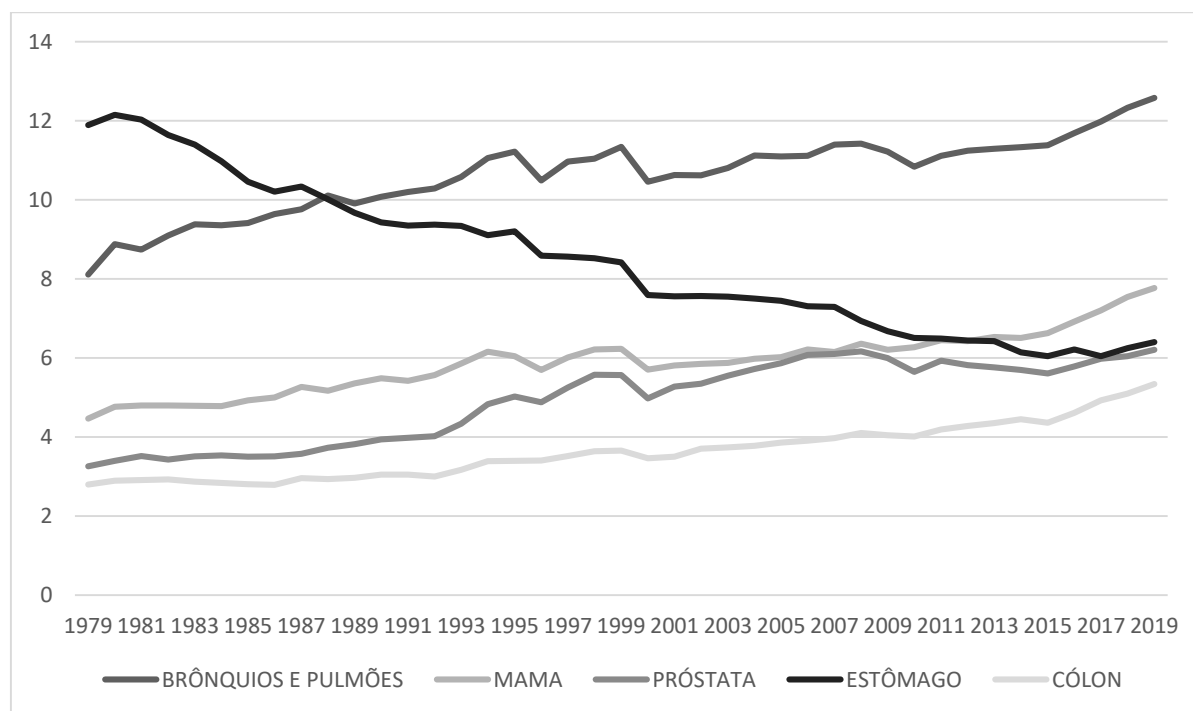


Figura 1: Taxas de mortalidade das 5 localizações primárias dos tumores mais frequentes por 100.000 homens e mulheres entre 1970 e 2019.

Fonte: INCA - Ministério da Saúde

Há uma distribuição bastante heterogênea da incidência de CP, quanto ao sexo, idade ao diagnóstico e classificação histológica do CP; essas discrepâncias são diretamente correlacionadas à prevalência do tabagismo e ao desenvolvimento econômico de cada região. Cerca de 80% dos fumantes vivem em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, e cerca de 50% das mortes por CP

ocorrem nessas regiões menos desenvolvidas economicamente. Em contraste a essas pesquisas, observa-se um decréscimo da incidência de CP (real ou estimada) em países não apenas desenvolvidos economicamente, como também nos que adotaram políticas antitabaco precoces e efetivas.

As principais campanhas de combate ao tabagismo, visam monitorar o uso do tabaco e as políticas de prevenção, proteger as pessoas da fumaça do tabaco, oferecer ajuda para parar de fumar, esclarecer sobre os perigos do tabaco e tabagismo, restringir publicidade de produtos de tabaco e derivados, aumentar os impostos sobre o tabaco. Os países que mais investem em campanhas antitabagismo e obtiveram bons resultados epidemiológicos na prevalência de tabagismo, incidência e mortalidade de CP foram: Estados Unidos, Inglaterra, países Nórdicos, Austrália, Nova Zelândia, Singapura, Alemanha e Uruguai (BADE; DELA CRUZ, 2020).

O CP pode ser classificado quanto ao tipo histológico, no caso do CP maligno, este pode ser classificado em dois grandes grupos histológicos: carcinomas pulmonares de células pequenas (CPCP) e os carcinomas pulmonares de células não-pequenas (CPCNP). Dentre os CPCNP existem os subtipos adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermoide e carcinoma de grandes células (KUMAR et al., 2015).

O tipo histológico mais agressivo é o CPCP, cuja incidência está diretamente ligada ao tabagismo e corresponde a cerca de 20% dos cânceres primários de pulmão. Os outros principais tipos de CP associados ao tabagismo são o carcinoma de pequenas células (um CPCP) e o carcinoma de células escamosas (CPCNP). Cerca de 90% dos pacientes com CP são tabagistas, e a o risco de neoplasias relacionadas ao tabaco é proporcional a quantidade e período de tabagismo ou carga tabágica (KUMAR et al., 2015; SAAB, et al., 2020).

Quanto aos aspectos clinicopatológicos, pacientes diagnosticados com CPCNP tendem a apresentar melhores prognósticos quando ocorre o diagnóstico precoce, nestes casos o tratamento cirúrgico pode ser curativo. Entretanto o CPCNP apresenta alta ocorrência de metástases ao diagnóstico e nestes casos e o tratamento inclui quimioterapia (QX) associado ou não a radioterapia (KUMAR et al., 2015).

Dados epidemiológicos apontam que 10 a 20% dos casos CP são diagnosticados em pacientes sem história de tabagismo. Nesse perfil clínico o adenocarcinoma é o mais incidente, e caracterizado pela alta prevalência em mulheres, em não fumantes e pessoas com menos de 45 anos. Seu curso clínico

tende a ser melhor que os carcinomas e o tratamento cirúrgico pode ser curativo. (KUMAR et al., 2015; SAAB, et al., 2020).

Compreende-se que houve uma melhora significativa da sobrevida em cinco anos de 15,6% em 2011 para 19,4% em 2019, o que pode ser atribuído em resposta a combinação de fatores clínicos e adjacentes como a redução do tabagismo; avanços nos métodos diagnósticos como aumento da toracoscopia e da RX em estágios iniciais da doença, bem como a melhoria dos tratamentos em caso de doença avançada (RECK; RABE, 2017; BADE; DELA CRUZ, 2020).

No Brasil, o diagnóstico de CP tende a ser tardio, pois a maioria dos pacientes só apresenta sinais e sintomas em fases mais avançadas da doença e não há recomendações atuais para rastreamento do câncer de pulmão na população, embora existam algumas tentativas em análise tais como o *Lung Cancer Screening* e o *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening* (BADE; DELA CRUZ, 2020).

Guidelines internacionais e sociedades brasileiras de especialistas recomendam a todos os fumantes, mesmo os pacientes com câncer, que cessem o tabagismo, para tanto devem ser oferecidos programas de cessação do tabagismo. O protocolo terapêutico depende da classificação histopatológica e para o CPCP, foi estabelecido pelo *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), revisado em 9 de agosto de 2021, e está ilustrado a seguir.

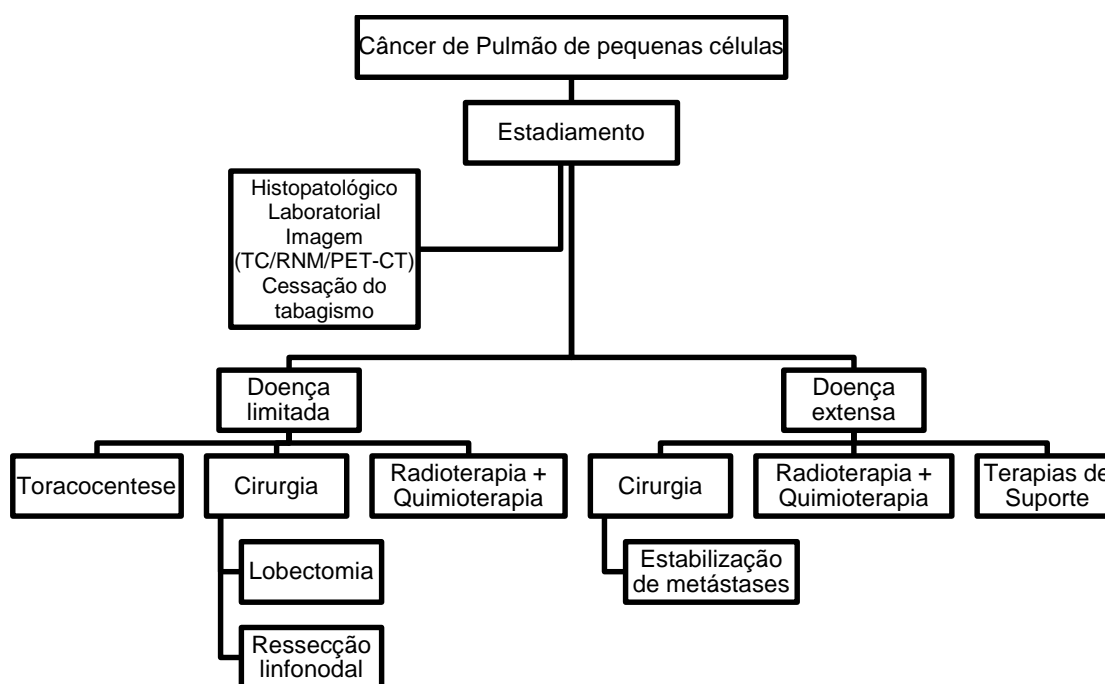


Figura 2: Diagrama de indicações terapêuticas em caso de CP de pequenas células.

Fonte: NCCN, 2021

Os pacientes que mais se beneficiam das terapêuticas cirúrgicas devem ser diagnosticados em estadiamento precoce da doença, o que corresponde a apenas 5% dos casos, quando ainda não há metástases.

A radioterapia é indicada em consonância à quimioterapia. Os principais quimioterápicos indicados em caso de doença limitada são a cisplatina ou a carboplatina, as quais podem ser associadas a outros quimioterápicos em caso de doença extensa, de acordo com a avaliação clínica personalizada de um profissional especializado. A eficácia terapêutica é avaliada por exames de imagem periódicos.

Já para o CP de não pequenas células, o NCCN publicou em 30 de setembro de 2021 a seguinte indicação terapêutica:

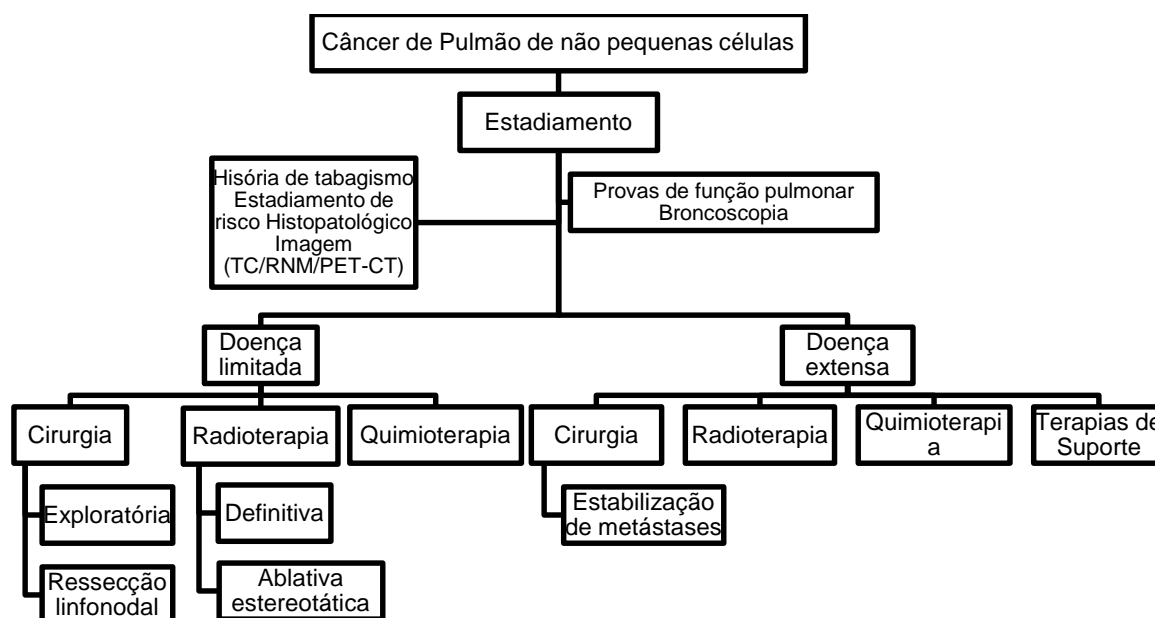


Figura 3 :Diagrama de indicações terapêuticas em caso de CP de não pequenas células.

Fonte: NCCN, 2021

A avaliação subsequente para a determinação da melhor terapêutica a ser instituída depende da análise imuno-histoquímica do tecido tumoral, em que há identificação da mutação específica que passa a indicar o melhor alvo terapêutico na neoplasia diagnosticada. Como esta é uma classe muito heterogênea de tumores e com grande diversidade de alvos e estratificação de fases terapêuticas, a avaliação deve ser realizada por profissional especializado e a combinação da melhor

terapêutica deve considerar não apenas o estágio ao diagnóstico, como as condições clínicas do paciente e o subtipo molecular diagnosticado (NCCN, 2021).

1.2 Tabaco, o estresse oxidativo e implicações no perfil inflamatório do tabagista: mecanismos imunológicos

O cigarro é composto por uma mistura de tabaco, açúcares, adesivos, agentes aglutinantes, agentes de combustão, melhorantes, auxiliar de processo, preservantes, umectantes, tinta e papel. A nicotina é a substância psicoativa responsável pela dependência química causada pelo cigarro, está presente na folha de tabaco e em todos os seus derivados (cigarro, charuto, cachimbo, fumo, rapé, narguilé, entre outros). (INCA, 2021; Cigarro [rótulo], 2021 SHIELS et al., 2013, 2015; WELLS et al., 2011; “WHO REPORT ON THE GLOBAL TOBACCO EPIDEMIC, 2021 Addressing new and emerging products fresh and alive,” [s.d.]).

O tabagismo ou dependência à nicotina é incluída na Classificação Internacional de Doenças (CID 10) da Organização Mundial de Saúde (OMS). As implicações à saúde provenientes do tabagismo são decorrentes da dependência à nicotina, sua ação imunossupressora e das consequências diretas e indiretas da exposição crônica às substâncias tóxicas liberadas na fumaça durante a combustão do tabaco (INCA, 2021; Cigarro [rótulo], 2021 SHIELS et al., 2013, 2015; WELLS et al., 2011; “WHO REPORT ON THE GLOBAL TOBACCO EPIDEMIC, 2021 Addressing new and emerging products fresh and alive,” [s.d.]).

É na combustão do cigarro que ocorre a liberação de calor e das 4.700 substâncias tóxicas, entre elas os agentes carcinogênicos que incluem: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), nitrosaminas, aminas aromáticas, N-nitrosodimetilamina; monóxido de carbono, cianeto, xileno, Níquel, Arsênio, Cádmio, Polônio 210, que causam hipóxia e altos níveis de EROS. As EROS e NOx potencialmente podem causar lesão direta ao epitélio e endotélio pulmonar, oxidar proteínas e lipídios, e assim, induzir indiretamente a mutagênese por meio da formação de subprodutos genotóxicos, danos em DNA polimerase ou inibição das enzimas de reparo do DNA, e podem estar relacionadas a promoção da invasão e metástase. Além disso, EROS e NOx podem regular quinases, fatores de transcrição e proteínas reguladoras de apoptose, também atuam como segundos mensageiros nas vias de transdução de sinal intracelular; atuando por essas vias na modulação

inflamatória (AZAD; ROJANASAKUL; VALLYATHAN, 2008; MILARA; CORTIJO, 2012; PEEBLES et al., 2007; WALSER et al., 2008).

As EROS e NOx podem ser de origem exógena ou endógena, estão intrinsecamente vinculadas aos processos inflamatórios (fisiológicos e patológicos) e carcinogênicos. As respostas inflamatórias observadas nos pulmões de tabagistas são potentes, e são consideradas promotoras de tumor por meio da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que contribuem para danos ao DNA e indução de mutações oncogênicas (AZAD; ROJANASAKUL; VALLYATHAN, 2008; MILARA; CORTIJO, 2012; WANNAMETHEE et al., 2005).

A inflamação pode estimular citocinas que regulam positivamente a resposta imunológica e podem estimular diretamente genes pró-apoptóticos, resultando na morte direta das células tumorais; contudo as citocinas também aumentam as moléculas de adesão vascular, VEGF e outros fatores de crescimento, que causam angiogênese e metástase. Os marcadores inflamatórios liberados na resposta provocada pelo tabagismo podem ser evidentes sistemicamente e algumas proteínas associadas ao risco de câncer de pulmão já foram descritas. Os principais marcadores inflamatórios relacionados ao maior risco de câncer de pulmão estão representados na figura 1 (GOMES et al., 2014; SEREFOGLOU et al., 2008).

Alguns dos marcadores de inflamação associados ao risco potencial de CP recentemente descritos na literatura foram: Proteína C reativa (PCR), soro amiloide A (SAA), receptor de fator de necrose tumoral solúvel 2 (sTNFRII), antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1RA), interleucina 7 (IL-7), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), interleucina 17 (IL-17) fator de crescimento transformador alfa (TGF- α) e peptídeo ativador de neutrófilos epitelial 78 (ENA 78 / CXCL5), monocina induzida por interferon gama (MIG / CXCL9), quimiocina 1 que atrai células B (BCA-1 / CXCL13), quimiocina regulada pela ativação do timo (TARC / CCL17), quimiocina derivada de macrófago (MDC / CCL22), ciclo-oxigenase-2 (COX-2), maior quantidade sérica de leucócitos e fibrinogênio (BRENNER et al., 2017; LEE, J. M., YANAGAWA, J., PEEBLES, K. A., SHARMA, S., MAO, J. T., & DUBINETT, 2008; PINE et al., 2011; SHIELS et al., 2013, 2015; WANNAMETHEE et al., 2005).

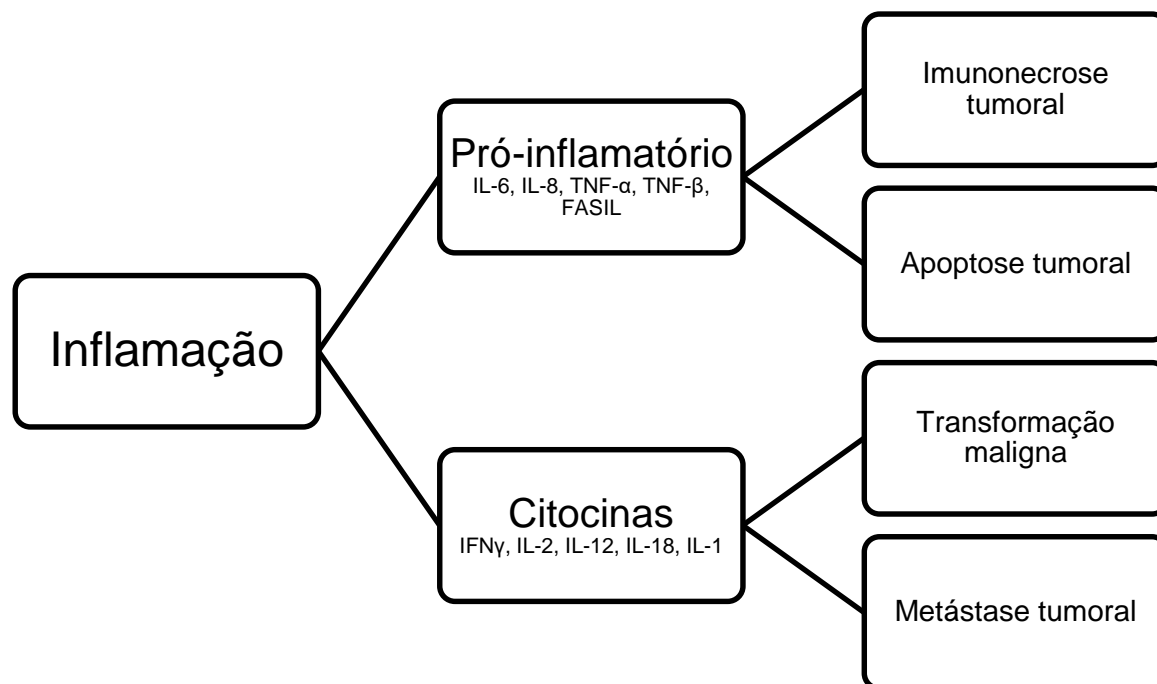


Figura 4: Papel dicotômico das moléculas relacionadas à inflamação na fisiopatologia do câncer. Adaptado de: SEREFOGLOU et al., 2008.

Quando a homeostase do tecido é perturbada de forma persistente, como na inflamação crônica, exposição tecidual aos produtos tóxicos e carcinogênicos; as interações entre as células imunes inatas e adaptativas, bem como a composição das células e moléculas sinalizadoras mudam nesses casos. Ocorre aumento significativo de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos bem como diminuição das células dendríticas nas vias aéreas e dá início em nível sistêmico, à leucocitose neutrofílica. Isso pode gerar desregulação do sistema imune inato e adaptativo, e assim resultar em: remodelação excessiva do tecido, perda da arquitetura do tecido devido à destruição, mudanças de proteínas e danos genotóxicos no DNA devido ao estresse oxidativo e, posteriormente, aumento do risco de câncer (GOMES et al., 2014; REPETTO et al., 1996).

Os macrófagos são células imunes inatas, que não apenas desempenham um papel crítico na resposta imune a células estranhas, bactérias e vírus, mas também medeiam o reparo do tecido após a lesão. Existem pelo menos dois tipos de macrófagos associados a tumores (TAMs) (GOMES et al., 2014). Os macrófagos M1 clássicos possuem as seguintes características: função de apresentação de antígeno; secreção maciça de IL-12 e IL-23; e capacidade de ativar a resposta imune Th1:

eliminar microrganismos infecciosos e matar células tumorais. Este fenótipo é caracterizado por altos níveis de IL-12 e IL-23, e baixos níveis de IL-10 (ABBAS, 2019). Os macrófagos M2 mutantes, por sua vez, são promotores de tumor e participam da formação do estroma tumoral, promovem o crescimento do tumor, metástase e angiogênese do tumor; e levam à imunossupressão. O fenótipo é caracterizado por IL-12 e IL-23 baixos e IL-10 alto (ABBAS, 2019).

Os macrófagos mudam suas funções e a expressão dos marcadores de superfície de acordo com a modulação inflamatória e a polarização do fenótipo M1 ou M2 depende da combinação dos sinais no microambiente local. Os macrófagos associados a tumores tendem a apresentar o fenótipo M2, que promove a sobrevivência, desenvolvimento e disseminação de tumores, promovendo angiogênese, microambiente tumoral (TME) e imunossupressão (TAN et al., 2021; TONG et al., 2017).

Em suma, a fumaça do cigarro é tóxica, fonte de calor, causa hipóxia e atua como corpo estranho no parênquima pulmonar. Nesse contexto, o tabagismo promove o estresse oxidativo, a inflamação crônica e a imunossupressão, fatores que podem levar à formação e ao desenvolvimento do tumor por meio da alteração epigenética e subsequente expressão gênica anormal, além de anormalidades vasculares e neovascularização e promoção da proliferação celular, inibindo a apoptose, ajustando a estabilidade genômica e promovendo metástases e outros mecanismos (CONWAY et al., 2016; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

1.3 Perfil inflamatório e o paciente com câncer de pulmão

A inflamação é um processo fisiológico essencial de controle de infecção e cicatrização de feridas, mas quando não é resolvido e se torna crônico, o dano ao tecido resultante pode ser extenso e desastroso. Doenças crônicas incluindo tabagismo, obesidade, infecções, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus I e II (DM); são condições de que promovem a inflamação sistema crônica (BUDISAN et al., 2021; ENGELS, 2008; GONZÁLEZ-REIMERS et al., 2014; LEE, J. M., YANAGAWA, J., PEEBLES, K. A., SHARMA, S., MAO, J. T., & DUBINETT, 2008)

A HAS e a DM são doenças de alta prevalência no mundo todo e a complicações relacionadas a essas doenças são responsáveis pelo aumento da

morbidade e da mortalidade, o que acarreta enormes gastos com saúde em todo o mundo. Outro fator em comum é a sua relação com a inflamação crônica. Os mecanismos desencadeadores da inflamação na DM e HAS e/ou a inflamação como fator de iniciação ou piora das doenças inflamatórias ainda são mal compreendidos. As vias inflamatórias, portanto, podem potencialmente ser um componente das estratégias de prevenção e controle de DM, HAS e outras doenças crônicas, e suas complicações relacionadas (TONG et al., 2017).

O consumo excessivo de etanol tem repercussões sistêmicas, tanto por mecanismos indiretos quanto diretos, através de dano oxidativo e da ação pró-inflamatória. As EROS são gredas no metabolismo do etanol e pela ativação das células de Kupffer; as citocinas derivam principalmente de células Kupffer ativadas expostas a bactérias intestinais gram-negativas, que chegam ao fígado em quantidades supra fisiológicas devido ao aumento da permeabilidade intestinal mediada por etanol. Neste cenário, o etilismo pode ser considerado uma condição inflamatória (GONZÁLEZ-REIMERS et al., 2014).

A inflamação, especialmente a inflamação crônica, está relacionada à ocorrência e ao desenvolvimento de vários tumores. A inflamação pode também levar à formação e ao desenvolvimento do tumor por meio da epigenética e da expressão gênica anormal subsequente, anormalidades vasculares e neovascularização do tumor e pela promoção da proliferação celular, inibição da apoptose, ajuste da estabilidade genômica e promoção da metástase e outros mecanismos. Além disso, as células inflamatórias podem liberar substâncias químicas oxidativas que promovem a evolução carcinogênica, e muitos fatores liberados pelas células inflamatórias podem direta ou indiretamente levar à inibição significativa da resposta imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011; TAN et al., 2021; TONG et al., 2017).

O sistema imune humano é organizado de forma que rastreia, identifica e elimina células com comportamentos pró-tumorais, e essa resposta antitumoral é denominada imunoeedição e dividida em três fases: eliminação, equilíbrio e escape. A eliminação decorre da ação das células Natural Killers (NK) e das células T que reconhecem citocinas inflamatórias como a IL-12 e o TNF- α e induzem à apoptose por mecanismos citotóxicos. Já a fase de equilíbrio, decorre da resistência das células tumorais à fase de eliminação, em que há dormência tumoral, em que há dominância do sistema imunológico sobre o crescimento do tecido tumoral desenvolvido, sem no entanto, eliminá-lo. No momento em que ocorre a perda dessa dominância, inicia a

fase de escape, em que há prosseguimento do crescimento do tecido tumoral, com evolução ao consumo do suprimento de nutrientes como glicose e oxigênio pelo próprio processo de divisão e o desenvolvimento do estresse oxidativo e a inflamação local. Esse processo tem como consequência a modificação da matriz extracelular com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, com a atração de macrófagos e a liberação de fatores como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; TAN et al., 2021; TONG et al., 2017).

Desta forma, compreende-se que não só a inflamação pode levar à carcinogênese pela liberação de EROS e outros fatores mutagênicos, como a neoplasia também desencadeia o processo inflamatório. O contexto imunológico é um quadro de importante análise para este estudo em específico devido ao cruzamento do perfil inflamatório do paciente tabagista e sua influência no desenvolvimento da fisiopatologia carcinogênica (HANAHAN; WEINBERG, 2011; TAN et al., 2021; TONG et al., 2017).

As neoplasias, de modo geral, são resultado da reprodução de células malignas de maneira autônoma e não responsiva aos mecanismos reguladores orgânicos cuja expansão pode atingir outros tecidos e órgãos que não a sua origem. A malignização das células denomina-se também carcinogênese, a perda das características biológicas celulares é tida como anaplasia e decorre de modificações no material genético fundamental, o ácido desoxirribonucleico (DNA). As células resultantes desse processo contam com algumas características genéricas: indiferenciação, rápida divisão celular, não responsividade aos mecanismos reguladores do crescimento, evasão do sistema imunológico. Essa última característica é fundamental para este trabalho, uma vez que a leitura imunológica das neoplasias é responsável pelo vínculo entre a inflamação e a carcinogênese (COTRAN; KUMAR; et al., 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011; TAN et al., 2021; TONG et al., 2017).

As células neoplásicas também podem alterar a composição do TME, através da produção de citocinas e EROS e NOx, no intuito de estabelecer um meio imunossupressor caracterizado por uma abundância de moléculas inibidoras, como TGF- β , IL-6, prostaglandina E2 (PGE2) e VEGF, e um acúmulo de células imunossupressoras, como células T reguladoras (Treg) e células supressoras derivadas de mielóide (MDSCs) (GOMES et al., 2014; HUA et al., 2019; REPETTO et al., 1996).

Outros fatores que alteram o status redox dos pacientes oncológicos são os tratamentos quimioterápicos, radioterápicos e em relação ao aumento do estresse oxidativo e seu possível envolvimento no agravamento da anemia crônica. Todos esses fatores determinam o perfil inflamatório do paciente com câncer de pulmão, bem como a sua progressão, resposta a tratamento e recorrências (GOMES et al., 2014; HUA et al., 2019; REPETTO et al., 1996).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar o impacto do tabagismo no perfil inflamatório sistêmico de indivíduos sem câncer e em pacientes portadores de câncer primário de pulmão.

2.2 Específicos

1. Caracterizar os aspectos clinicopatológicos e epidemiológicos dos grupos de indivíduos com câncer primário de pulmão e controles sem câncer, fumantes ou não.

2. Mensurar os níveis inflamatórios sistêmicos em amostras de plasma de indivíduos de todos os grupos, através da determinação dos níveis de estresse oxidativo através das medidas de lipoperóxidos, metabólitos do óxido nítrico e capacidade antioxidante total plasmática; e da dosagem das citocinas IL-12 e TNF- α .

3. Correlacionar os achados laboratoriais encontrados nos diferentes grupos frente aos hábitos de tabagismo (tabagistas, ex-tabagistas versus não tabagistas), em relação as informações clínicas e patológicas.

3. METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa exploratória, descritiva de coorte e prospectiva realizada com pacientes com neoplasia primária de pulmão atendidos no Hospital do Câncer Francisco Beltrão-PR (CEONC, n=20) e com indivíduos da comunidade de Francisco Beltrão-PR (n =34), no período de novembro de 2019 a agosto 2021. Os participantes foram informados da pesquisa e a participação foi voluntária, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sendo excluídos da pesquisa grávidas, pessoas com incapacidade intelectual para entender o TCLE e os objetivos da pesquisa, e pessoas com menos de 18 anos. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Unioeste – Francisco Beltrão, Paraná, sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

(CAAE): 22943019.1.0000.0107, em 14 de novembro de 2019.

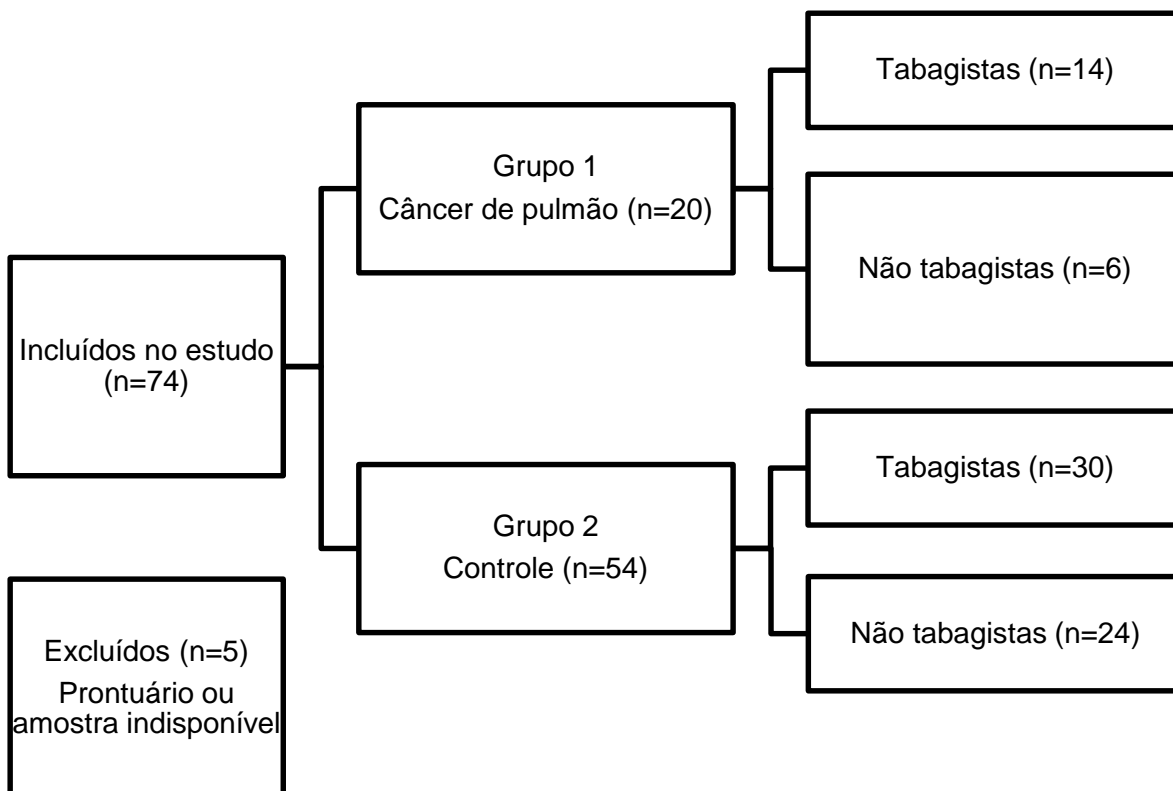


Figura 5: Organograma hierárquico da classificação dos participantes da pesquisa durante o estudo.

Referências: os autores

3.1 População de estudo

A amostra de pacientes com CP foi selecionada a partir da comunidade de pacientes atendidos no CEONC de Francisco Beltrão-PR, no período de 2019 a 2021, que atenderam aos critérios de inclusão: diagnóstico de câncer primário de pulmão, em quimioterapia, adultos. Foram selecionados 20 pacientes, de ambos os sexos. Os dados clínicos e laboratoriais dos prontuários médicos foram coletados retrospectivamente e incluíam: sexo, idade ao diagnóstico, profissão, hábitos de tabagismo, hábitos de etilismo, peso, altura, diagnóstico por imuno-histoquímica, diagnóstico histopatológico, grau histopatológico, locais de metástases e tratamento oncológico realizado, cirurgia (CX), radioterapia (RX) ou quimioterapia (QX).

O grupo controle foi formado a partir de convite de pessoas vinculadas a comunidade de Francisco Beltrão. Foram inclusas todas as pessoas que responderam ao convite e que atenderam aos critérios de inclusão: homens e mulheres, 40 a 60 anos, sem diagnóstico de câncer prévio ou atual. No momento da pesquisa foram requisitados a assinatura Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), coleta de amostra de sangue e informações sobre sexo, idade, tabagismo, etilismo e comorbidades. Foram selecionados 54 voluntários a partir dessa convocação.

Para todos os grupos, foram coletadas informações sobre o hábito atual e progresso de uso de tabaco. Os participantes foram questionados quanto ao hábito de fumar, quantidade de cigarros, ou similar, consumidos por dia, tempo de tabagismo e, em caso de ex-fumante, foi questionado período de tabagismo.

Quanto a classificação em tabagista ou não tabagista e foram utilizados os critérios das diretrizes para o controle e monitoramento da epidemia do tabaco da World Health Organization, 1998. Os participantes classificados em fumantes foram aqueles que declararam fumar qualquer produto do tabaco diariamente. Os participantes do grupo não tabagista foram aqueles que declararam não fumar diariamente ou ocasionalmente no momento da pesquisa. Sendo incluídos nesse grupo os ex-tabagistas e nunca-tabagistas. Sendo que os participantes que declararam ter fumado pelo menos um cigarro por dia, por pelo menos 3 meses, mas não fumam mais, foram classificados como ex-fumantes. Os participantes que declaram nunca ter fumado ou fumaram menos de 100 cigarros durante toda a vida foram classificados em nunca-tabagistas.

Para a classificação em etilistas, todos os participantes que declaram que ingeriam bebida alcoólica foram considerados etilistas ou, no caso dos pacientes, os dados foram coletados dos prontuários.

Na categoria comorbidades, os participantes foram questionados quanto a diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e outras doenças.

3.2 Obtenção das amostras e determinação do perfil inflamatório sistêmico

Amostras de sangue venoso periférico anticoagulado com heparina foram coletadas (5 ml) via punção em antebraço, e em seguida centrifugadas por 5 min a 358 FCR para obtenção do plasma. As amostras foram armazenadas em -20°C até a análise.

Nestas amostras, as seguintes análises foram realizadas:

a) Quantificação dos níveis de lipoperóxidos (LPO): Os níveis de peroxidação lipídica ou lipoperóxidos totais das amostras foram obtidos através da medida da quimiluminescência (QL) induzida pelo hidroperóxido tert-Butil. Esta abordagem permite a avaliação do conteúdo de lipoperóxidos como estimativa do perfil pró-oxidante das amostras. A técnica consiste em: colocar uma alíquota de 125 µl plasma em um microtubo contendo 865 µl de tampão fosfato monobásico dissódico 10 mM e pH 7,4 em NaCl 0,9%, e após homogeneização, adiciona-se 20 µl de solução de tert-Butil (3 mM) para disparar a reação de oxidação. A reação é monitorada durante 40 minutos em um luminômetro GloMax® 20/20 (Promega, USA), o qual realizava 1 leitura/segundo em modo cinético. Os resultados da emissão de fótons mensurados em unidades relativas de luz (URL) geram uma curva cuja integral é utilizada como indicador qualitativo de lipoperoxidação. O cálculo da integração da área sob curva foi obtido usando o software Origin Lab 7.5. (GONZALEZ-FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991).

b) Estimativa dos metabólitos do óxido nítrico (NOx): Os níveis de óxido nítrico das amostras foram determinados pela estimativa de seus metabólitos. O método utilizado avalia a redução de nitrato a nitrito por reações de oxirredução mediadas pelo sistema cádmio-cobre; o que permite a avaliação do conteúdo NOx e seus metabólitos durante sua redução a NO (Óxido

Nítrico) livre, que pode ser detectado por espectrofotometria. Alíquotas de 60 µl do plasma de cada amostra foram desproteinizadas pela adição de ZnSO₄ 475 mM, centrifugados a 1120 FCR por 2 min a 25 °C, seguido pela adição de 55 mM de NaOH (Merck) e centrifugação a 1120 FCR por 5 min a 25 °C. O sobrenadante foi recuperado e diluído em tampão glicina-NaOH (45g/L pH 9,7) na proporção de 5:1. Grânulos de cádmio (Fluka) foram ativados em solução CuSO₄ 5 mM, e essa solução foi posteriormente adicionada ao sobrenadante por 10 min. Alíquotas foram recuperadas e o mesmo volume de reagente Griess (0,4 g de sulfanilamida em 20 ml de ácido fosfórico 5% - protegido da luz; NEED: 40mg em 20ml H₂O destilada). Por fim, a placa foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos e sua absorbância foi medida em 550 nm em leitor de microplaca – POLARIS (CELER BIOTECNOLOGIA S/A). Os resultados foram expressos em µM de nitrito com base em uma curva padrão (PANIS et al., 2011).

c) A Capacidade antioxidante total do plasma (TRAP), foi determinada de acordo com o método de Repetto e colaboradores (REPETTO et al., 1996). Para tanto, foi utilizado APAB (2,2'-Azobis[2-amidinopropane]) como gerador de radicais livres; luminol para amplificar a detecção de fótons e emissão de luz por QL e a vitamina E solúvel (6µl da solução de Trolox em 600 µl de tampão de glicina [0,1 M, pH 8,6] a 37 °C) como parâmetro de comparação. Para estimar a TRAP das amostras, 3 µl de cada amostra de plasma foi diluída em 90 µl de tampão glicina (0,1 M, pH 8,6) a 37 °C. Em seguida, 70 µl da amostra diluída a 1:30 foi adicionada a 50 µl da solução 2,2'azobis (ABAP; 27,2 mg de ABAP em 500 µl de água destilada) e homogeneizada. A isto foi adicionado 50 µl de solução de luminol (4 mg de luminol em 250µl de KOH). Em seguida, a reação foi monitorada durante 20 minutos, enquanto 5 leituras por segundo em um luminômetro GloMax® 20/20 (Promega, USA) foram realizadas. O resultado foi expresso por equivalência na unidade µM de Trolox, já que a curva de redução de radicais livres do Trolox (6-hydroxy-2,5,7-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid) foi usada como referência da TRAP.

d) Dosagem de citocinas: A dosagem das citocinas IL-12 e TNF- α foi realizada nas amostras de plasma através do kit de imunoensaio enzima comercial Human Uncoated ELISA Kit (REF 88-7126-22, Invitrogen) e TNF-alpha Human ELISA Kit (REF 88-7346-22, Invitrogen) com limite de detecção de 2 pg/ml. Foram seguidas todas as instruções do fabricante. A concentração na amostra foi determinada a partir de padrões destas citocinas fornecidos pelo kit.

3.3 Análises estatísticas

As variáveis foram analisadas quanto aos pressupostos estatísticos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade (teste de Levene). Todas as análises foram realizadas em duplicata, sendo os dados expressos em mediana (para dados não paramétricos) e valores mínimo e máximo ou média (para dados paramétricos) \pm erro padrão da média. Os dados foram submetidos ao teste de Grubbs para a detecção de outliers, e nenhum outliers foi detectado. Os resultados foram comparados pelo teste t de Student, teste de Mann-Whitney ou análise de variâncias (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni ou de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição das variâncias e do número de grupos comparados, considerando $p < 0,05$ como significativo. Análises de correlação de Spearman foram realizadas e expressas no formato de heatmap. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o pacote de software GraphPad Prism 7.0.

4. REFERÊNCIAS

Atlas On-line de Mortalidade. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo04/consultar.xhtml#panelResultado>>. Acesso em: 29 jan. 2022.

AZAD, N.; ROJANASAKUL, Y.; VALLYATHAN, V. Inflammation and lung cancer: Roles of reactive oxygen/nitrogen species. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2008.

BADE, B. C.; DELA CRUZ, C. S. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. **Clinics in Chest Medicine**, v. 41, n. 1, p. 1–24, 2020.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BENT, R. et al. Interleukin-1 beta—A friend or foe in malignancies? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 2018.

BRENNER, D. R. et al. Inflammatory Cytokines and Lung Cancer Risk in 3 Prospective Studies. **American Journal of Epidemiology**, v. 185, n. 2, p. 86–95, 2017.

BUDISAN, L. et al. Links between infections, lung cancer, and the immune system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, 2021.

CONWAY, E. M. et al. Macrophages, inflammation, and lung cancer. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 2, p. 116–130, 2016.

ENGELS, E. A. Inflammation in the development of lung cancer: Epidemiological evidence. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 8, n. 4, p. 605–615, 2008.

GOMES, M. et al. The role of inflammation in lung cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 816, p. 1–23, 2014.

GONZÁLEZ-REIMERS, E. et al. Alcoholism: A systemic proinflammatory condition. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 40, p. 14660–14671, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HUA, X. et al. Prognostic role of the advanced lung cancer inflammation index in cancer patients: A meta-analysis. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2019.

LASEK, W.; ZAGOŹDŹON, R.; JAKOBISIAK, M. Interleukin 12: Still a promising candidate for tumor immunotherapy? **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 63, n. 5, p. 419–435, 2014.

LEE, J. M., YANAGAWA, J., PEEBLES, K. A., SHARMA, S., MAO, J. T., & DUBINETT, S. M. Inflammation in Lung Carcinogenesis: New Targets for Lung Cancer Chemoprevention and Treatment. **Bone**, v. 66, n. 3, p. 208–217, 2008.

LI, Z.; CHEN, L.; QIN, Z. Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 6, n. 6, p. 415–422, 2009.

LUKOSEVICIENE, V. et al. Surgery for triple-negative breast cancer: Does the type of anesthesia have an influence on oxidative stress, inflammation, molecular regulators, and outcomes of disease? **Journal of B.U.ON.**, v. 23, n. 2, p. 290–295, 2018.

KUMAR, VINAY ET AL. ROBBINS AND COTRAN. Pathologic Basis of Disease. Ninth edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2015. Print.

MILARA, J.; CORTIJO, J. Tobacco, Inflammation, and Respiratory Tract Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 26, p. 3901–3938, 2012.

NGUYEN, K. G. et al. Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. October, p. 1–36, 2020.

PANIS, C. et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 1, p. 89–97, 2012.

PEEBLES, K. A. et al. Inflammation and lung carcinogenesis: Applying findings in prevention and treatment. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 7, n. 10, p. 1405–1421, 2007.

PINE, S. R. et al. Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, c-reactive protein, and risk of lung cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 14, p. 1112–1122, 2011.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 255, n. 2, p. 107–117, 1996.

SEREOFLOU, Z. et al. **Genetic association of cytokine DNA polymorphisms with head and neck cancer** **Oral Oncology**, dez. 2008.

SHIELS, M. S. et al. Circulating inflammation markers and prospective risk for lung cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 24, p. 1871–1880, 2013.

SHIELS, M. S. et al. Circulating Inflammation Markers, Risk of Lung Cancer, and Utility for Risk Stratification. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 10, p. 1–9, 2015.

TAN, Z. et al. The Role of Tumor Inflammatory Microenvironment in Lung Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. May, p. 1–13, 2021.

TONG, Y. S. et al. Systemic immune-inflammation index predicting chemoradiation resistance and poor outcome in patients with stage III non-small cell lung cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2017.

WALSER, T. et al. Smoking and lung cancer: The role of inflammation. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 5, n. 8, p. 811–815, 2008.

WANG, D. et al. The predictive effect of the systemic immune-inflammation index for patients with small-cell lung cancer. **Future Oncology**, v. 15, n. 29, p. 3367–3379, 2019.

WANG, X.; LIN, Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 11, p. 1275–1288, 2008.

WANNAMETHEE, S. G. et al. Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. **European Heart Journal**, v. 26, n. 17, p. 1765–1773, 2005.

WHO REPORT ON THE GLOBAL TOBACCO EPIDEMIC, 2021 Addressing new and emerging products fresh and alive. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for controlling and monitoring the tobacco epidemic.** World Health Organization. [s.l: s.n.].

5. ARTIGO CIENTÍFICO 1

Manuscripts submitted to Nicotine & Tobacco Research



**SYSTEMIC EFFECTS OF SMOKING ON OXIDATIVE STRESS
AND PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE PROFILES IN
PATIENTS WITH PRIMARY LUNG CANCER: A PILOT STUDY.**

Journal:	<i>Nicotine & Tobacco Research</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Brief Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ferreira, Mariane; State University of West Parana, Health Sciences Coletto, Matheus; State University of West Parana, Health Sciences Garbim, Matheus; State University of West Parana, Health Sciences Scandolaro, Thalita; Federal University of Rio de Janeiro Oliveira, Janoario; State University of West Parana, Health Sciences Titon, Odirlei; State University of West Parana, Health Sciences Rech, Daniel; State University of West Parana, Health Sciences PANIS, CAROLINA; State University of West Parana, Health Sciences; State University of West Parana,
Keywords:	Smoking, lung cancer, inflammation, oxidative stress

SCHOLARONE™
Manuscripts

<http://mc.manuscriptcentral.com/ntr>

BRIEF REPORT**SYSTEMIC EFFECTS OF SMOKING ON OXIDATIVE STRESS AND PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE PROFILES IN PATIENTS WITH PRIMARY LUNG CANCER: A PILOT STUDY.**

Mariane Okamoto Ferreira^{1,2}, Matheus Iago Oliveira Coletto¹, Matheus Ricardo Garbim¹, Thalita Basso Scandolaro^{1,3}, Janoario Athanzio de Oliveira¹, Odirlei João Titon¹, Daniel Rech¹ and Carolina Panis^{1,2*}.

1 Laboratory of Tumor Biology (LBT), State University of West Paraná (UNIOESTE), Francisco Beltrão Campus, Paraná, Brazil.

2 Post-Graduation Program of Health-Applied Sciences (PPGCAS), State University of West Paraná (UNIOESTE), Francisco Beltrão Campus, Paraná, Brazil.

3 Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil.

*Correspondence: Laboratory of Tumor Biology (LBT), State University of West Paraná (UNIOESTE), Francisco Beltrão Campus, Paraná, Brazil.
carolpanis@hotmail.com

The authors have no conflicts to declare.

Abstract:

Introduction: Despite epidemiological evidence showing worst lung cancer prognostic in smokers than those in non-smokers, it is not clear the specific contribution of smoking in the oxidative stress (OS) generation, and systemic inflammation of lung cancer patients, as well as is the impact of the synergism of the two conditions on this profile. Methods: To understand this scenario, we evaluated the comparative systemic OS (lipid peroxidation as pro-oxidant, NO_x and the total radical antioxidant content, and TRAP) and inflammatory profile by measuring circulating cytokines of lung cancer patients and non-cancer individuals, smokers or not. Results: Increased LPO was detected in non-smokers lung cancer patients compared to the smokers' cancer patients ($p = 0.0186$). TRAP was depleted in the smoker cancer patients about the non-smokers with cancer ($p = 0,0015$). In the non-cancer individuals, there was no significant difference between smokers and not smokers. LPO levels were augmented compared to non-smokers without cancer ($p = 0.0420$). No differences were observed on NO_x, IL-12, or TNF- α analysis for any comparison.

Spearman's correlation on heatmap reveals a significant correlation among OS and L-12 and TNF- α levels on CS groups. Conclusions: These findings corroborate that, in cancer-free individuals, smoking has a significant impact on OS and inflammation, producing a chronic inflammatory status in smokers. While in the CNS group, higher OS levels implicate lower levels of TNF- α , furthermore, higher TRAP.

Keywords: smoking, lung cancer, inflammation, oxidative stress.

INTRODUCTION

Tobacco smoke releases 4,700 toxic substances yielding high levels of reactive oxygen species (ROS) and inflammatory mediators linked to lung carcinogenesis and cancer progression^{1,2}. Both cancer and smoking are sources of components that generate and sustain inflammation^{3,4}, but the specific contribution of smoking or lung cancer to the systemic inflammatory profile observed in such patients is unclear.

There is an extensive range of oxidative damage markers produced under either cancer or smoking conditions such as lipid peroxidation-related components, nitric oxide metabolites (NOx), and protein carbonyls that affect antioxidant mechanisms like superoxide dismutase, glutathione, ascorbic acid, tocopherol, urate, and thiols, among others^{2,4-6}.

The imbalance between pro-oxidant metabolites production and its neutralization by the antioxidant components results in oxidative stress (OS) generation². OS is a component of the chronic inflammation a hallmark of cancer. Inflammation can lead to tumor formation and development through epigenetics and subsequent abnormal gene expression, vascular abnormalities, and tumor neovascularization, and by promoting cell proliferation, inhibiting apoptosis, adjusting genomic stability, and metastasis⁷⁻⁹. Furthermore, inflammatory cells can release oxidative species that promote carcinogenesis and inhibit the anti-tumor effects of the immune response¹⁰.

Therefore, direct exposure to ROS and other toxic components in tobacco causes oxidative stress and chronic systemic inflammation, which predispose smokers to cancer^{4,11}. Epidemiological evidence shows the worst lung cancer prognostic in smokers than in non-smokers¹², and cigarette consumption is a known

factor that generates both reactive species and pro-inflammatory cytokines, contributing to a sustained pro-inflammatory scenario¹³.

Despite this, the specific contribution of smoking in the systemic inflammatory profile of both non-cancer individuals and lung cancer patients is not clear, as well the concomitant impact of both cancer and smoking on this profile. To understand this picture, we evaluated the comparative systemic inflammatory profile of lung cancer patients and non-cancer individuals, smokers or not, by measuring oxidative stress mediators and cytokines levels and investigated its clinicopathological correlations.

METHODS

This study was approved by the Ethics Committee in Human Research of Unioeste-Francisco Beltrão under the number CAAE: 22943019.1.0000.0107.

An exploratory and descriptive study was carried out at the Francisco Beltrão Cancer Hospital (Ceonc) between November 2021 and August 2021. A total of 20 patients were included in the study, and the clinicopathological data are presented in Table 1. Patients were divided into the following groups, based on the diagnosis (cancer or not cancer) and their smoking habits (smoker or not): Lung cancer smoker (LCS), lung cancer non-smoker (LCNS), control smoker (CS), control non-smoker (CNS). The number of cigarettes smoked per day is divided by 20 (the number of cigarettes in a pack), and the result is multiplied by the number of years of tobacco use (pack-years) to calculate their smoking history. Patients' characteristics are described in Table 1.

Heparinized blood samples were collected by peripheral venous puncture, 5 mL into a tube containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and then centrifuged for 5 min at 400 g to obtain plasma, and samples stored at -20°C until analysis.

Clinical and laboratory data of patients were obtained from medical records as follows: sex, birth date, body mass index (BMI), symptoms at diagnosis, diagnosis by immunohistochemistry, histopathological classification, histopathological grade, treatment, and load-smoking.

The quantification of the plasmatic levels of hydroperoxides (LPO) was measured by a chemiluminescence-based method induced by tert-butyl hydroperoxides¹⁴. The estimative of nitric oxide metabolites (NOx) was performed as previously described by Panis et al., 2011¹⁵. The determination of antioxidant capacity (TRAP) was made according to Herrera et al. 2014¹⁶ and the cytokines interleukin 12 (IL-12) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were measured by using the commercial enzyme immunoassay kit Human Uncoated ELISA Kit (Invitrogen).

For statistical analyses, the variables were analyzed for statistical assumptions of normality (Shapiro-Wilk's test) and homoscedasticity (Levene's test). All analyzes were performed in duplicate, with data expressed as median (for non-parametric data) and minimum and maximum values or mean (for parametric data) \pm standard error of the mean. The data were subjected to the Grubbs' test to detect outliers, and no outliers were detected. Results were compared by Student's t-test (CS versus CNS or LCS versus LCNS), Mann-Whitney test (CS versus CNS or LCS versus LCNS), or analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's or Mann-Whitney's test (comparisons among all groups), according to the distribution of variances and the number of groups compared, considering $p < 0.05$ as significant. Spearman correlation analyzes were performed and expressed as heatmaps. All statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism 7.0 software package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and the R software version 4.1.2 (2021-11-01). In the results section, data is shown as minimum-maximum (median) for each parameter.

RESULTS

Regarding oxidative stress profile (Figure 1), NOx (Figure 1B), IL-12 (Figure 1D) and TNF- α (Figure 1E) systemic levels from both LC and control groups, smokers or not, were not significantly different.

Significantly increased LPO was found in CS in relation to CNS (Figure 1A, $p=0.042$) associated with a TRAP depletion (Figure 1C, $p=0.0015$). Also, LPO was significantly augmented in LCNS patients compared to LCS patients ($p = 0.002$).

The results for LCS were: LPO ($\times 10^5$) range 2.3–22.2 RLU, (mean 7.9 RLU); NOx 27.1–38.5 μM , (31.5 μM); TRAP 82.2–344.7 nM Trolox, (148.9 nM of Trolox); IL-12 48.7–100 pg/mL, (57.3 pg/mL); TNF- α 28.8–244.9 pg/mL, (101.7 pg/mL). The results for LCNS were: LPO ($\times 10^5$) range 4.8–14.5 RLU, (mean 9.1 RLU); NOx 22.6–33.3 μM , (27.6 μM); TRAP 67–160.6 nM of Trolox, (101.5 nM of Trolox); IL-12 51.1–63.8 pg/mL, (54.6 pg/mL); TNF- α 62.2–124.2 pg/mL, (101.6 pg/mL). The results for CS were: LPO ($\times 10^5$) 2.6–17.8 RLU, (6.8 RLU); NOx 25–41.3 μM , (32.2 μM); TRAP 82.6–80.9 nM of Trolox, (127.7 nM of Trolox); IL-12 48.9–67.3 pg/mL, (56.7 pg/mL); TNF- α 3.1–44.5 pg/mL, (78.4 pg/mL). The results for CNS were: LPO ($\times 10^5$) 2.8–9.3 RLU, (5.2 RLU); NOx 24.8–40.9 μM , (31.7 μM); TRAP 82.6–315.6 nM of Trolox, (266.5 nM of Trolox); IL-12 38.3–63.7 pg/mL, (50.8 pg/mL); TNF- α 22.47–150.4 pg/mL, (76 pg/mL).

Additionally, we investigated if there was any correlation among all inflammatory biomarkers. Regarding LCS (Figure 1F) and LCNS (Figure 1G) group, there was no significant correlation. Regarding CS group (Figure 1H), moderate-positive correlation was found between LPO and IL-12 ($R = 0.62$, $p= 0.01$), and moderate-negative correlation between LPO and TNF- α levels ($R= -0.59$, $p= 0.02$). As for our CNS group, we found a moderate-negative correlation between LPO and NOx levels ($R= -0.51$, $p = 0.01$); we also found a significant moderate-positive correlation between LPO and

TRAP ($R= 0.64$, $p = 0.000$), and a significantly strong-negative correlation between LPO and TNF- α ($R= -0.67$, $p = 0.00$)

DISCUSSION

The present study comparatively investigates the systemic impact of smoking on oxidative stress and inflammation profiles from lung cancer patients and non-cancer individuals. We found that most of the investigated parameters did not vary, but substantial differences were detected in LPO levels between smokers and non-smokers from both cancer and non-cancer groups.

Our findings also indicate that lung cancer patients who smoke significantly deplete antioxidant defenses, which was not observed in non-cancer individuals under the same condition. These findings point out that cancer-induced inflammatory changes combined with smoking-driven changes deplete systemic antioxidants and highlight the role of smoking on LPO generation in both cancer and non-cancer individuals. As far as we know, despite the modest sample size, this is the first study that addresses this question.

LPO occurs when reactive species damage lipids from cellular or organelle membranes and subsequently produces reactive intermediates that can trigger further reactions, such as cell death signal, inflammation, and proinflammatory profile⁷. Based on our results, this event could be caused indirectly by either smoking or lung cancer.

The high LPO levels found in the smoker control group corroborate with the vast literature about elevated oxidative stress and smoking^{2,5,9,17}. Our results show significant high levels of LPO in cancer-free smoking individuals when compared to non-cancer not smokers, corroborating that tobacco is a source of systemic oxidative stress.

Studies highlight that oxidative stress is a possible etiologic smoking-induced mechanism for carcinogenesis¹⁸, and our findings add information to this scenario. We found lower LPO levels in lung cancer smokers compared lung cancer non-smokers, on contrary to some previous reports^{3,5,6}. Despite this, increased LPO is associated with a better overall survival in Crohn's et al. reports⁵. Similar results were related by Nowak¹⁹, that reported decrease in products of lipid peroxidation in non-responders with progressive disease occurring before the 2nd chemotherapy cycle and shortest survival^{5,20}.

Our findings suggest that cancer-induced inflammatory changes overlap putative smoking-driven changes and highlight the role of smoking on LPO generation in both cancer and non-cancer individuals. As far as we know, despite the limited sample size, this is the first study that addresses this question.

The heatmap of correlation analysis showed that control individuals have a totally distinct profile from lung cancer patients, as tobacco seems to impact each group in different ways. In cancer groups, there was no Spearman's moderate or strong significant correlation. These results corroborate that, in cancer-free individuals, smoking has a significant impact on OS and inflammation, producing a chronic inflammatory status in smokers.

Conclusions

These results implicate LPO as the main mechanism of OS generation in non-cancer smoking individuals, in association with antioxidants depletion. Also, highlights that cancer-induced LPO overlaps smoking effects in cancer patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was granted for Fundação Araucária e Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq). The authors have no conflicts of interest.

The data underlying this article are available under a reasonable request.

REFERENCES

1. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–130 – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Accessed February 7, 2022. <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>
2. Seet RCS, Lee CYJ, Loke WM, et al. Biomarkers of oxidative damage in cigarette smokers: Which biomarkers might reflect acute versus chronic oxidative stress? *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;50(12):1787-1793. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.019
3. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013;12(12):931-947. doi:10.1038/nrd4002
4. Panis C, Herrera ACSA, Victorino VJ, et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012;133(1):89-97. doi:10.1007/s10549-011-1693-x
5. Crohns M, Liippo K, Erhola M, et al. Concurrent decline of several antioxidants and markers of oxidative stress during combination chemotherapy for small cell lung cancer. *Clinical Biochemistry*. 2009;42(12):1236-1245. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.05.003
6. Srivastava AN, Gupta A, Srivastava S, et al. *Smoking Intensity, Oxidative Stress and Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Correlated Prognostic Study*. Vol 3.; 2009. www.biosciencetrends.com
7. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/5080843
8. Abbas A, Litchman AH, Pillai S. *Basic Immunology - 6th Edition*. Published online 2019:336.
9. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: Respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms.

- International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013;10(9):3886-3907. doi:10.3390/ijerph10093886
10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
 11. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: Roles of reactive oxygen/nitrogen species. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*. 2008;11(1):1-15. doi:10.1080/10937400701436460
 12. Ettinger DS, Wood DE, Chair V, et al. NCCN Guidelines Version 1.2022 Non-Small Cell Lung Cancer NCCN Evidence Blocks TM Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures. Published online 2021. Accessed February 11, 2022. www.nccn.org/patents
 13. Zhu X, Zhan Y, Gu Y, et al. Cigarette Smoke Promotes Interleukin-8 Production in Alveolar Macrophages Through the Reactive Oxygen Species/Stromal Interaction Molecule 1/Ca²⁺ Axis. *Frontiers in Physiology*. 2021;12:1778. doi:10.3389/FPHYS.2021.733650/BIBTEX
 14. Lemos LGT, Victorino VJ, Herrera ACSA, et al. Trastuzumab-based chemotherapy modulates systemic redox homeostasis in women with HER2-positive breast cancer. *International Immunopharmacology*. 2015;27(1):8-14. doi:10.1016/J.INTIMP.2015.04.037
 15. Panis C, Lemos LGT, Victorino VJ, et al. Immunological effects of Taxol and Adryamicin in breast cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2011 61:4. 2011;61(4):481-488. doi:10.1007/S00262-011-1117-0
 16. Herrera ACS, Victorino VJ, Campos FC, et al. Impact of Tumor Removal on the Systemic Oxidative Profile of Patients With Breast Cancer Discloses Lipid Peroxidation at Diagnosis as a Putative Marker of Disease Recurrence. *Clinical Breast Cancer*. 2014;14(6):451-459. doi:10.1016/J.CLBC.2014.05.002
 17. Shiels MS, Katki HA, Freedman ND, et al. Article cigarette Smoking and Variations in Systemic immune and inflammation Markers. Published online 2014. doi:10.1093/jnci/dju294
 18. Srivastava AN, Gupta A, Srivastava S, et al. *Smoking Intensity, Oxidative Stress and Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Correlated Prognostic Study*. Vol 3.; 2009. www.biosciencetrends.com

19. Nowak D, Janczak M. Effect of chemotherapy on serum end-products of lipid peroxidation in patients with small cell lung cancer: Association with treatment results. *Respiratory Medicine*. 2006;100(1):157-166. doi:10.1016/j.rmed.2005.04.002
20. Diksha D, Gupta P, Malik PS, Mohan A. A pilot study to assess oxidative and inflammatory markers as early indicator for response to chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2020;45(1):179-184. doi:10.1111/jcpt.13053

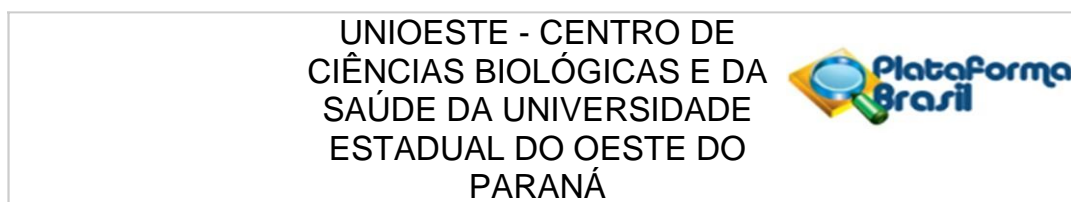
Table 1: Clinicopathological characteristics of lung cancer patients.

Variable	LC group (n = 20)		LCS group (n = 14)		LCNS group (n = 6)	
	N	%	N	%	N	%
Smoking status						
Smoker	14	70	14	100	0	0
Non-smoker	6	30	0	0	6	100
Age at diagnosis (years)						
< 50	2	10	0	0	3	33
50-59	4	20	4	14	3	33
60-69	10	50	10	64	2	17
> 70	4	20	0	21	1	17
Gender						
Male	13	65	10	71	3	50
Female	7	35	4	29	3	50
BMI (kg/m²)						
< 18.5	2	10	2	14	0	0
18.5-24.9	7	35	4	21	5	80
>24.9	6	30	6	36	1	20
NC	5	25	1	29	0	0
Histological subtype						
Adenocarcinoma	4	20	2	7	3	32
Large cell carcinoma	2	10	2	7	1	17
Small cell carcinoma	2	10	2	7	1	17
Squamous cell carcinoma	8	40	6	50	1	17
Undifferentiated carcinoma	4	20	2	29	1	17
Histopathological grade						
G2	3	15	2	14	0	0
G3	7	35	6	36	3	50
G4	2	10	2	7	1	17
GX	8	40	4	43	3	33
UICC staging						
2	2	10	2	7	0	0
3	6	30	6	43	0	0
4	12	60	6	50	6	100
Treatment						
Chemotherapy	11	55	7	50	4	67
Radiotherapy	2	10	2	14	0	0
Chemotherapy and radiotherapy	7	35	5	36	2	33
Smoking load (pack-years)						
25	2	10	2	2	0	—
25 to 75	8	40	4	8	0	—
75	1	5	1	1	0	—
No information	3	15	3	3	0	—
Non-smoker	6	30	0	—	6	6

Abbreviations: lung cancer smokers (LCS) and non-smokers (LCNS), body mass index (BMI).

6. ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de potenciais marcadores do prognóstico do câncer de pulmão: genômica, proteômica e vias de sinalização associadas.

Pesquisador: CAROLINA PANIS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22943019.1.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.705.625

Apresentação do Projeto:

Despacho saneador de pendências da pesquisa: Identificação de potenciais marcadores do prognóstico do câncer de pulmão: genômica, proteômica e vias de sinalização associadas.

Pesquisador Responsável: CAROLINA PANIS

CAAE: 22943019.1.0000.0107

Submetido em: 13/11/2019

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Objetivo da Pesquisa:

Despacho saneador de pendências da pesquisa: Identificação de potenciais marcadores do prognóstico do câncer de pulmão: genômica, proteômica e vias de sinalização associadas.

Pesquisador Responsável: CAROLINA PANIS

CAAE: 22943019.1.0000.0107

Submetido em: 13/11/2019

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já descrito anteriormente.

Endereço: RUA UNIVERSITARIA 2069

Bairro: UNIVERSITARIO

UF: PR

Município: CASCAVEL

CEP: 85.819-110

Telefone: (45)3220-3092

E-mail: cep.prppg@unioeste.br

**UNIOESTE - CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO OESTE DO
PARANÁ**



Continuação do Parecer: 3.705.625

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já descrito anteriormente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Já descrito anteriormente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Agora, está explícito que a amostra envolverá somente recrutados com 18 anos ou mais de idade, dispensando o Termo de Assentimento. A assistência às intercorrências serão repassadas ao CEONC, de modo imediato, integral e gratuita. A Instituição coparticipante (CEONC) declarou que " Os pesquisadores acima identificados estão autorizados a realizar a pesquisa e a coleta dados, os quais serão utilizados exclusivamente para fins científicos, assegurando sua confidencialidade e o anonimato dos sujeitos participantes da pesquisa segundo as normas da Resolução 466/2012 CNS/MS e suas complementares". Desse modo, parece claro a possibilidade dos eventos adversos serem assistidos de modo eficiente. Acrescenta-se que, não sendo possível o atendimento dos eventos adverso no CEONC, a pesquisadora continuará responsável pela assistência aos eventos adversos aos participantes desta pesquisa, desde que causados pela pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Apresentar o Relatório final até 30 dias após o término desta pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1434192.pdf	13/11/2019 16:22:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	13/11/2019 16:22:04	CAROLINA PANIS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_pesquisador.pdf	13/11/2019 16:21:50	CAROLINA PANIS	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	12/09/2019 15:14:28	CAROLINA PANIS	Aceito
Outros	Termo_para_uso_de_dados_em_arquivo.pdf	12/09/2019 10:27:33	CAROLINA PANIS	Aceito

Endereço: RUA UNIVERSITARIA 2069

Bairro: UNIVERSITARIO

CEP: 85.819-110

UF: PR **Município:** CASCAVEL

Telefone: (45)3220-3092

E-mail: cep.prppg@unioeste.br

UNIOESTE - CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO OESTE DO
PARANÁ



Continuação do Parecer: 3.705.625

Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Responsavel_pelo_Campo_ assinado.pdf	12/09/2019 10:25:48	CAROLINA PANIS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao.pdf	12/09/2019 10:24:11	CAROLINA PANIS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CASCADEL, 14 de Novembro de 2019

Assinado por:
Dartel Ferrari de Lima
(Coordenador(a))

Endereço: RUA UNIVERSITARIA 2069

Bairro: UNIVERSITARIO

UF: PR

Município: CASCADEL

CEP: 85.819-110

Telefone: (45)3220-3092

E-mail: cep.prppg@unioeste.br

ANEXO B – Termo De Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a):

Estamos realizando um estudo com o objetivo de avaliar que tipo de alteração sanguínea pode ajudar a explicar a agressividade do câncer de pulmão em pacientes atendidos no Ceonc. Sua participação é muito importante pois nos trará informações que nos ajudarão a entender como este câncer evolui e se espalha pelo corpo, e futuramente, podem servir de referência para o desenvolvimento de novos exames e tratamentos.

Para isso, quando você estiver realizando o procedimento de biópsia, ou após este, a equipe de enfermagem do Ceonc realizará a coleta de um tubo de sangue de 10 ml, já no acesso (veia) onde eles estarão fazendo as suas medicações.

A coleta de sangue periférico envolve poucos riscos, mas eventualmente podem ocorrer pequenos sangramentos e hematomas no local da coleta. Caso haja alguma intercorrência durante o processo, a pesquisadora presente no momento da coleta acionará a equipe de enfermagem no local, que solicitará imediatamente a presença do médico plantonista do Ceonc para prestar o atendimento necessário para sua segurança.

Também serão utilizados dados de seu prontuário. As informações obtidas serão utilizadas exclusivamente para os fins desta pesquisa, os dados serão mantidos sob sigilo e sua identidade, sob nenhuma hipótese, será revelada.

A sua participação será acordada em conjunto com os pesquisadores, sem trazer qualquer prejuízo à sua pessoa ou familiar, não alterará, sob nenhuma hipótese, o seu tratamento. Sua participação será voluntária e você poderá deixar de participar a qualquer momento, bastando, para isso, comunicar a sua decisão, por qualquer meio, ao pesquisador responsável. Você poderá desistir da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo para você. Esclarecemos também que não haverá remuneração financeira por sua participação, e não haverá custo ou despesa financeira que você deva pagar.

Os resultados desta pesquisa lhe serão comunicados, caso os solicite. Os dados ficarão armazenados em local seguro, sob responsabilidade do investigador principal e terão acesso a eles somente os investigadores deste protocolo. Esta pesquisa obedecerá a legislação médica, no que se refere aos termos de sigilo.

Quaisquer informações adicionais sobre a pesquisa, em qualquer momento, poderão ser obtidas com a Prof^a Dr^a Carolina Panis, coordenadora deste estudo na Unioeste, pelo telefone (46) 35200712. Caso esteja de acordo em participar, pedimos sua assinatura em duas cópias deste documento: uma ficará com você e outra com a equipe da pesquisa.

Desde já agradecemos a sua valiosa colaboração neste trabalho.

Francisco Beltrão, Data:

Assinatura do participante da pesquisa:

Documento de identidade:

Assinatura do pesquisador:

Documento de identidade: