

DOUTORAMENTO

CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Estudo molecular de um perfil de mediadores inflamatórios associados ao desenvolvimento e comportamento de cancro do pulmão: epidemiologia molecular e farmacogenómica

Mónica Silva Gomes

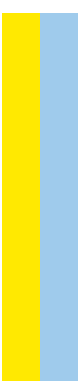
D

2017

Mónica Silva Gomes. Estudo molecular de um perfil de mediadores inflamatórios associados ao desenvolvimento e comportamento de cancro do pulmão: epidemiologia molecular e farmacogenómica



Estudo molecular de um perfil de mediadores inflamatórios associados ao desenvolvimento e comportamento de cancro do pulmão: epidemiologia molecular e farmacogenómica
Mónica Patricia Silva Gomes



MÓNICA PATRÍCIA SILVA GOMES

Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral

Centro de Investigação, Instituto Português de Oncologia do Porto FG, EPE

**ESTUDO MOLECULAR DE UM PERFIL DE MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO E
COMPORTAMENTO DE CANCRO DO PULMÃO: EPIDEMIOLOGIA
MOLECULAR E FARMACOGENÓMICA**

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Silva

Categoria – Professor Associado com Agregação

Afiliação – Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

Coorientador- Professor Doutor António Manuel Ferreira Araújo

Categoria – Professor Auxiliar Convidado

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

INFORMAÇÃO TÉCNICA

TÍTULO:

Estudo molecular de um perfil de mediadores inflamatórios associados ao desenvolvimento e comportamento de cancro do pulmão: epidemiologia molecular e farmacogenómica

Tese de Candidatura ao Grau de Doutor em Ciências Biomédicas Submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

AUTOR/EDITOR:

Mónica Patrícia Silva Gomes

e-mail: monicagomes26@gmail.com

Abril 2017

A todos os que acreditam em mim...

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

Friedrich Nietzsche

De acordo com o disposto na alínea a) do nº 2 do artigo 31.º do Decreto-lei n.º 63/2016, publicado em Diário da República n.º 176/2016, Série I de 13 de setembro, foram utilizados neste trabalho resultados já publicados ou submetidos a publicação que a seguir se discriminam:

- Inflammation and Cancer;
Chapter I- The role of inflammation in lung cancer (Gomes, M., Teixeira, AL., Coelho, A., Araújo, A., Medeiros, R.) Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 816 Edited by Aggarwal, Bharat B., Sung, Bokyoung, Gupta, Subash Chandra 2014, XII, 490 p. 24 illus., 19 illus. in color. ISBN: 978-3-0348-0836-1
- **Gomes, M.**, Coelho, A., Araújo, A., Azevedo, A., Teixeira, AL., Catarino, R., Medeiros, R.; *IL-6 polymorphism in non-small cell lung cancer: a prognostic value?*; Tumor Bio, 2015, 9 Jan .
- **Gomes, M.**, Teixeira, AL., Coelho, A., Medeiros, R., Araújo, A.; *The Role of Biobanks in Oncology Research – A Portuguese Perspective*; Intellect. Disabl. Diagn. J., 2015, 8 Aug.
- Reactive Oxygen Species in Biology and Human Health;
Chapter 16- Inflammation and Lung Cancer: Oxidative Stress, ROS, and DNA Damage (Gomes, M., Teixeira, AL., Coelho, A., Araújo, A., Medeiros, R.) Edited by Shamin I. Ahmad, CRC Press 2016 Pages-215-223; ISBN 978-1-4987-3545-2

Agradecimentos

Ao estar próximo de completar mais esta etapa da minha vida académica e profissional, que me irá conduzir ao Doutoramento em Ciências Biomédicas, gostaria de agradecer a pessoas indispensáveis neste percurso,

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, meu orientador, que me acompanha nas azáfamas da investigação desde que ingressei no seu grupo para realizar o meu estágio de licenciatura, agradeço toda a compreensão, incentivo, palavras de calma nos momentos mais complicados que já passamos ao longo dos últimos anos e por me ter dado a oportunidade de crescer do ponto de vista profissional, mas também pessoal.... Obrigada “chefe”!

Ao Professor Doutor António Araújo, meu coorientador, agradeço por ter sempre uma palavra de estímulo, incentivo e de esperança, por acreditar que a investigação é realmente importante e que será uma mais-valia para os doentes e principalmente por confiar em mim e no meu trabalho. Agradeço também por ter sempre um tempinho para mim, apesar da sua vida extra-ocupada... Obrigado!

À Doutora Ana Coelho, agradeço por tudo o que ensinou e por me fazer ver as coisas de outro prisma, agradeço a amizade e a confiança que deposita em mim... Obrigada!

À Liga Portuguesa Contra o Cancro- Núcleo Regional do Norte, na pessoa do Dr. Vitor Veloso, gostaria de agradecer a Bolsa de Investigação que me foi concedida, a qual foi indispensável para a realização deste trabalho. Obrigado Dr. Vitor, por acreditar que a investigação pode fazer a diferença

À Doutora Ana Luísa Teixeira, gostaria de agradecer de uma maneira muito especial... a verdade é que nos últimos anos, passamos por muitas alegrias, tristezas, frustrações, injustiças e mais sentimentos impossíveis de descrever, no entanto estivemos sempre juntas, de cabeça erguida a aguentar tudo e todos...Obrigada por todos os momentos de apoio, de conversa e de conforto! Obrigada também por todo o apoio técnico ao longo dos últimos tempos... Nunca te esqueças... “Isto é para os duros!”

Aos colegas do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, em especial ao Dr. Augusto Nogueira, Dr^a Joana Assis, Dr^a Francisca Dias e Dr^a Mara Fernandes, agradeço pelas conversas de hora do almoço, por todas as gargalhadas e por todo o apoio ao longo destes anos. À Dr^a Mara e Dr^a Francisca, agradeço por estarem sempre disponíveis para as minhas calinadas informáticas! Obrigada!

Aos meus amigos que sempre me têm apoiado e são sempre um porto de abrigo e têm sempre uma palavra de conforto e compreensão nos momentos mais complicados... Obrigada a todos!

Aos meus avós, que apesar de já não estarem entre nós, tenho a certeza que estão sempre a olhar por mim, dando-me muito alento e segurança nos momentos mais complicados da minha vida. Tenho a certeza que ficariam muito orgulhosos com mais este passo na minha formação.

Ao meu companheiro, Hugo, muito obrigada por aturares o meu mau feitio, por compreenderes a minha falta de tempo, principalmente nos últimos meses. Obrigada, porque apesar de tudo existe sempre uma palavra de compreensão e de esperança no nosso futuro! Obrigada por estares ao meu lado...

Por fim, gostaria de deixar o último agradecimento para as pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais. Gostaria de lhes agradecer por todo o apoio, confiança, disponibilidade, entrega, carinho e amor... por me terem ensinado a lutar e a acreditar nos meus sonhos, por valorizarem as minhas escolhas, por estarem sempre ao meu lado, por me terem educado da forma como o fizeram. Por serem os meus pais... OBRIGADO!!!

Índice

Lista de abreviaturas	15
Resumo	19
<i>Abstract</i>	23
Capítulo I	
1. Introdução	31
1.1 Cancro: Conceitos Gerais	31
1.1.1 Biologia do Cancro	32
1.2 Variabilidade Genética	34
1.3 Cancro do Pulmão	36
1.4 Microambiente Tumoral	41
1.5 Inflamação, Invasão e Metastização	42
1.5.1 Citocinas: Interleucina - 6	45
1.5.2 Metaloproteinases da Matriz - MMPs	46
1.5.3 Inibidores Teciduais de Metaloproteinases - TIMPs	52
1.6 Linhas Celulares Linfoblásticas (LCLs) como modelo preditivo de resposta à terapia	54
Capítulo II	
2. Objetivos	59
2.1 Objetivo Geral	59
2.2 Objetivos Específicos	59
Capítulo III	
3.1 Polimorfismos genéticos nos genes codificantes dos mediadores inflamatórios e a sua influência no desenvolvimento e progressão de CPNPC	63
3.2 Material e Métodos	64

3.3 Resultados	69
3.3.1 Influência dos polimorfismos genéticos nos genes <i>MMP-2</i> , <i>MMP-7</i> , <i>MMP-9</i> , <i>TIMP-2</i> e <i>TIMP-4</i> na suscetibilidade para o desenvolvimento de CPNPC	69
3.3.2 Influência dos polimorfismos genéticos nos genes <i>IL-6</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-7</i> , <i>MMP-9</i> , <i>TIMP-2</i> e <i>TIMP-4</i> na sobrevivência global dos doentes com CPNPC	78
3.4 Discussão	82
Capítulo IV	
4.1 Quantificação dos níveis de expressão de mRNA de <i>MMP-7</i> , <i>MMP-9</i> , <i>TIMP-2</i> e <i>TIMP-4</i> e a sua relevância em CPNPC	91
4.2 Material e Métodos	92
4.3 Resultados	95
4.3.1 Influência dos níveis de expressão de mRNA de <i>MMP-7</i> , <i>MMP-9</i> , <i>TIMP-2</i> e <i>TIMP-4</i> na capacidade de deteção de indivíduos com CPNPC	95
4.3.2 Influência dos polimorfismos genéticos nos níveis de expressão de mRNA	98
4.3.3 Influência dos níveis de expressão de mRNA de <i>MMP-7</i> , <i>MMP-9</i> , <i>TIMP-2</i> e <i>TIMP-4</i> na sobrevivência global dos doentes com CPNPC	100
4.4 Discussão	104
Capítulo V	
5.1 Doseamento dos níveis séricos de <i>MMP-2</i> e <i>MMP-9</i> : influência no desenvolvimento de CPNPC	113
5.2 Material e Métodos	114
5.3 Resultados	117
5.3.1 Influência dos níveis séricos de <i>MMP-2</i> e <i>MMP-9</i> na capacidade de deteção de indivíduos com CPNPC	117
5.3.2 Influência de polimorfismo genético -174G/C no gene <i>IL-6</i> nos níveis séricos de <i>MMP-2</i> e <i>MMP-9</i>	120
5.3.3 Influência dos níveis séricos de <i>MMP-2</i> e <i>MMP-9</i> na sobrevivência global dos doentes com CPNPC	121

5.4 Discussão	123
Capítulo VI	
6.1 Linhas celulares linfoblastóides humanas como potencial modelo <i>in vitro</i> preditivo de resposta à terapia	129
6.2 Material e Métodos	130
6.3 Resultados	134
6.3.1 Níveis de expressão: PBMCs vs LCLs	134
6.3.2 Resposta das LCLs à gencitabina e a sua associação com níveis de MMP-9 e TIMP-4	135
6.4 Discussão	137
Capítulo VII	
7. Conclusão e Perspetivas Futuras	143
Capítulo VIII	
8. Referências	149
ANEXOS	165

Lista de Abreviaturas

A	Adenina
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
Arg	Arginina
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
CPNPC	Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células
CPPC	Cancro do Pulmão de Pequenas Células
CPT	<i>Cell Preparation Tubes</i>
COX-2	Ciclooxigenase-2
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FGFR-1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
G	Guanina
GUSB	Beta Glucuronidase
HB-EGF	<i>Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor</i>
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HR	<i>Hazard Ratio</i>
IC 50	<i>Inhibitory Concentration 50%</i>
IC 95%	Intervalo de Confiança 95%

IGF's	<i>Insulin-Like Growth Factors</i>
IL	Interleucinas
LCL	Linhas Celulares Linfoblásticas
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mL	Millilitros
MMPs	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
ng	Nanograma
nm	Nanómetros
NK	<i>Natural killer</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
pb	Pares de bases
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotações por minuto
SDF-1	<i>Stromal Cell-Derived Factor 1</i>
SHP-1	<i>Tyrosine Phosphatase-1</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
T	Timina
TAM	<i>Tumour-Associated Macrophage</i>

TBE	<i>Tris-Borate-EDTA</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TKIs	<i>Tyrosine Kinase Inhibitor</i>
TNF- α	<i>Tumour Necrosis Factor- alfa</i>
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-A</i>
μ L	<i>Microlitros</i>
URGCP	<i>Up-Regulator of Cell Proliferation</i>
χ^2	<i>Qui-quadrado</i>

Resumo

O cancro do pulmão é a neoplasia mais comum no mundo, sendo que, atualmente, apresenta também a mais elevada taxa de mortalidade de entre todos os tipos de cancro. Atendendo ao tipo histológico, o CPNPC é o mais frequente, representando cerca de 85% de todos os casos de cancro do pulmão, com a grande maioria dos doentes a apresentar, no momento do diagnóstico, doença localmente avançada ou metastização à distância.

O conhecimento do comportamento de MMPs, TIMPs e ILs associados ao desenvolvimento e progressão de CPNPC e a sua repercussão farmacogenómica, é bastante relevante para uma definição de estratégias de controlo deste modelo tumoral.

No presente estudo, foram avaliadas variações genéticas ao nível de MMPs, TIMPs e ILs e a sua influência na suscetibilidade para o desenvolvimento de CPNPC, assim como na sobrevivência global dos doentes. De acordo com os resultados, observou-se que os polimorfismos genéticos -1306 C/T no gene *MMP-2* e -181A/G no gene *MMP-7*, estavam associados com o risco para o desenvolvimento desta neoplasia. Adicionalmente, o polimorfismo genético -153C/T no gene *MMP-7*, encontrava-se associado ao risco para metastização à distância. No que diz respeito à influência das variantes genéticas estudadas na sobrevivência global dos doentes, observa-se que os indivíduos portadores dos genótipos GC/GG do polimorfismo genético -174 G/C no gene *IL-6*, apresentavam uma sobrevivência global inferior, quando comparados com os indivíduos portadores do genótipo CC. A influência deste polimorfismo genético, continua a verificar-se mesmo quando se realiza uma regressão multivariada para excluir possíveis variáveis com impacto no prognóstico. De acordo com os resultados, é possível inferir que as variações genéticas podem ser ferramentas importantes para a definição de grupos de risco associados ao desenvolvimento de CPNPC e também podem ser importantes como fatores de prognóstico, associados à sobrevivência dos doentes. Contudo, estes polimorfismos genéticos podem também ser importantes como moduladores dos níveis de expressão de mRNA, pelo que foram quantificados estes mesmos níveis de expressão e avaliada a sua influência em vários parâmetros. De acordo com o trabalho efetuado, verificou-se que os níveis de expressão de mRNA de *MMP-7* e

MMP-9 encontravam-se mais elevados nos doentes com CPNPC do que nos indivíduos sem patologia oncológica. Pelo contrário os níveis de expressão de mRNA de *TIMP-2* e *TIMP-4*, encontravam-se mais baixos nos indivíduos com CPNPC, quando comparados com os níveis observados nos indivíduos saudáveis. Estes resultados vêm realçar a importância do balanço entre MMPs/TIMPs e reforçar a noção de que a sua desregulação pode ser bastante comprometedora em processos como a iniciação tumoral.

Assim, os níveis de expressão de mRNA de *MMPs* podem ser encarados como possíveis biomarcadores de diagnóstico, uma vez que se encontram associados com a probabilidade de deteção de indivíduos com CPNPC. Adicionalmente, e de acordo com as funções desempenhadas pelas *MMPs*, observou-se que é no estadio IV que os níveis de expressão de mRNA de *MMP-7* e *MMP-9* são mais elevados, quando comparados com os restantes estadios, o que demonstra a importância destas moléculas no processo de metastização. No entanto, observou-se também que o polimorfismo genético -174G/C no gene *IL-6* pode afetar os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9*. Assim, os indivíduos portadores do genótipo GC/GG do referido polimorfismo, apresentam níveis mais elevados de expressão de mRNA de *MMP-9*, o que pode favorecer a progressão do tumor, aumentando a capacidade de invasão e de metastização.

Relativamente à associação dos níveis de expressão de mRNA de *MMPs* e *TIMPs*, com a sobrevivência global dos indivíduos, observa-se que os indivíduos que possuem níveis mais elevados de expressão de *MMP-9* e mais baixos de *TIMP-4*, sobrevivem em média menos tempo do que os restantes indivíduos. Mais uma vez, este resultado vem dar realce à importância da regulação *MMPs/TIMPs* na progressão tumoral, levando a supor que os portadores de um perfil de altos níveis de *MMPs* e baixos de *TIMPs*, apresentem um pior prognóstico. Relativamente ao estudo dos níveis séricos de *MMP-2* e *MMP-9*, observa-se também que nos indivíduos com CPNPC, estes são mais elevados do que nos indivíduos do grupo controlo. Relativamente à associação dos níveis séricos de *MMP-9* com a sobrevivência global, verifica-se que níveis séricos mais elevados se encontram correlacionados com um pior prognóstico, o que vem de encontro com aos resultados relativos à influência dos níveis de expressão de mRNA de *MMP-9*.

De facto, a *MMP-9* é uma proteína extremamente importante e fortemente associada a processos importantes relacionados com a progressão tumoral, sendo

que níveis elevados de expressão de mRNA ou níveis proteicos de MMP-9, desencadeiam e potenciam inúmeros processos como a promoção da angiogénese, da invasão e metastização, que apresentaram como consequência uma menor sobrevivência dos doentes.

As LCLs são consideradas um bom modelo *in vitro* para ensaios funcionais relacionados com a imunologia e a biologia molecular. Neste estudo, os resultados *in vitro*, vieram de alguma forma validar o que foi verificado *in vivo*. Efetivamente, quer nos doentes com CPNPC, quer nas LCLs, os níveis mais elevados de MMP-9 e mais baixos de TIMP-4 encontram-se associados com um pior prognóstico, a uma menor sobrevivência dos doentes ou a uma menor viabilidade celular no caso das LCLs.

Os resultados decorrentes deste trabalho reforçam a importância das MMPs, TIMPS e ILs, no desenvolvimento e progressão tumoral, seja através de variações genéticas presentes nos seus genes codificantes, seja através dos seus níveis de expressão de mRNA e/ou proteicos alterados. Assim é possível admitir que os marcadores estudados neste trabalho, possam ser considerados como possíveis marcadores de diagnóstico, de prognóstico e mesmo de resposta às terapias administradas aos doentes com CPNPC.

Abstract

Lung cancer is the most common cancer in the world since 1985, and it is currently the cancer with the highest incidence and mortality rates. Concerning the histological type, NSCLC is the most frequent one, as about 85% of all cases of lung cancer present this histology. NSCLC is a tumor model where the vast majority of patients present locally advanced disease or distant metastasis at the time of diagnosis. Knowledge of the behavior of MMPs, TIMPs and ILs associated with the development and progression of NSCLC and its pharmacogenomic repercussion is very relevant for the definition of control strategies of this tumor model.

In the present study genetic variations were evaluated in MMPs, TIMPs and ILs genes and their influence on susceptibility to the development of NSCLC, as well as overall survival of the patients with NSCLC. According to the results, the -1306C/T genetic polymorphism in the *MMP-2* gene and -181A/G genetic polymorphism in the *MMP-7* gene were found to be associated with the risk for the development of NSCLC. In addition, the -153C/T genetic polymorphism in the *MMP-7* gene was associated with the risk for distant metastasis. Relatively, the influence of the genetic variants studied on the overall survival of the patients, showed that individuals with the GC/GG genotypes -174G/C genetic polymorphism in the *IL-6*, has a lower overall survival, when compared with individuals with the CC genotype. The influence of this genetic polymorphism continues even when a multivariate regression is performed for the possible variables with an impact on the prognosis. According to the results, it is possible to infer that genetic variations may be important tools for the definition of risk groups associated with the development of NSCLC and may also be important as prognostic factors associated with overall survival of the patients. However, these genetic polymorphisms may also be important as modulators of mRNA expression levels, so these same levels of expression were quantified and their influence on several parameters was evaluated. According to this study, *MMP-7* and *MMP-9* mRNA expression levels were found to be higher in patients with NSCLC than in individuals without oncological pathology, on the opposite, *TIMP-2* and *TIMP-4* mRNA expression levels, were found to be lower in individuals with NSCLC compared to healthy subjects. These results highlight the importance of the balance

between MMPs/TIMPs and validate that their deregulation can be very compromising in processes such as tumor initiation.

MMPs mRNA expression levels may thus be viewed as possible diagnostic biomarkers, since their expression levels are associated with the likelihood of detection of individuals with NSCLC. In addition, according to the functions performed by the MMPs, it was observed that in stage IV, the *MMP-7* and *MMP-9* mRNA expression levels are higher when compared to other remaining stages, which demonstrates the importance of these molecules in the metastization process. However, it has also been observed that the -174G/C polymorphism in the *IL-6* gene may affect the *MMP-9* mRNA expression levels. Therefore, individuals carrying the GC/GG genotype of said polymorphism have higher *MMP-9* mRNA expression levels, which may favor tumor progression, increasing invasiveness and metastasis.

Regarding the association of MMPs and TIMPs mRNA expression levels with the overall survival of patients, the results show that individuals with higher *MMP-9* mRNA expression levels and lower *TIMP-4* mRNA expression levels survive on average less than the rest of the patients. Again, this result underscores the importance of MMPs/TIMPs regulation in tumor progression, leading to a worse prognosis for those with a high MMPs and low TIMPs profiles.

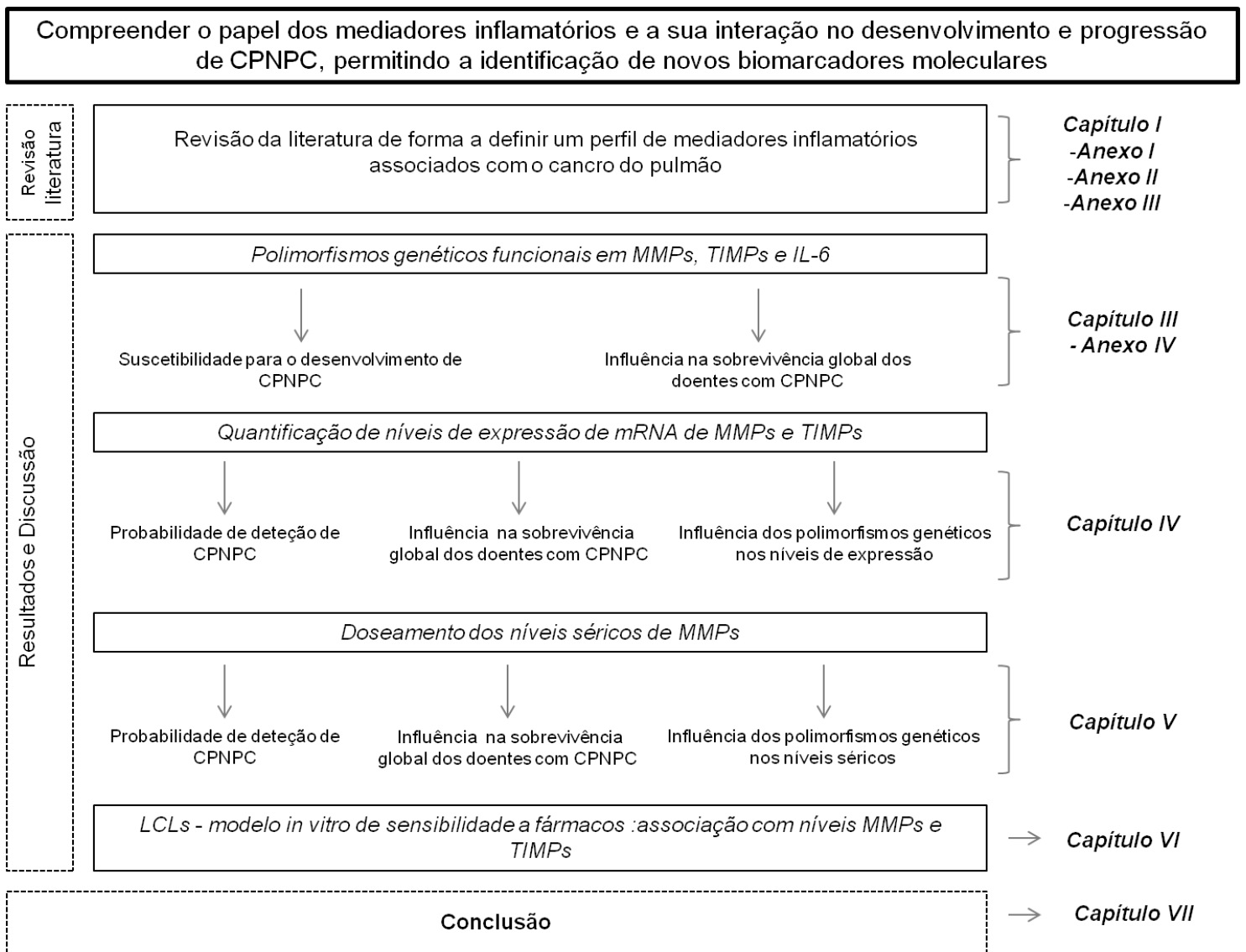
Concerning the study of serum levels of MMP-2 and MMP-9, it is also observed that individuals with NSCLC have higher serum levels than individuals in the control group. About the association of MMP-9 serum levels with overall survival, it is found that higher serum levels are correlated with a worse prognosis, which is in agreement with the results regarding the influence of MMP-9 mRNA expression levels. In fact, MMP-9 is an extremely important protein and strongly associated with important processes related to tumor progression, high mRNA levels or protein levels of MMP-9 trigger and potentiate numerous processes such as the promotion of angiogenesis, invasion and metastasis, which resulted in lower survival of patients

LCLS are considered a good in vitro model for functional assays related to immunology and molecular biology. In this study, in vitro results somehow consolidated what was verified in vivo. Effectively, in patients with NSCLC and in LCLs, verified that higher MMP-9 levels and lower TIMP-4 are associated with poorer prognosis, less survival of patients or less cellular viability of LCLs.

The results of this study reinforce the importance of MMPs, TIMPS and ILs in tumor development and progression, whether through genetic variations present in

their coding genes, through their altered mRNA and/or protein expression levels. Consequently, it is possible to admit that the markers studied in this study could be considered as possible markers of diagnosis, prognosis and even response to therapies administered to patients with NSCLC.

Esta tese está dividida em oito capítulos. Assim, o capítulo I será a introdução e estado da arte sobre a temática da tese e no capítulo II serão descritos os objetivos. Os capítulos III, IV, V e VI, dizem respeito aos vários estudos efetuados, onde serão descritos os materiais e métodos dos mesmos, assim como os resultados e respetiva discussão. No capítulo VII será efetuada uma conclusão integrativa de todo o trabalho apresentado ao longo da tese. Em anexo, seguem os artigos publicados decorrentes deste trabalho.



Capítulo I

1. Introdução

1.1 Cancro: Conceitos Gerais

O cancro, grave problema de saúde pública no século XXI, é uma doença associada a diversos fatores de risco e etiológicos, sendo também considerada uma doença multifásica. O cancro é uma doença heterogénea, com diferentes etiologias e história natural, que se desenvolve através da interação entre fatores ambientais e genéticos. Esta doença é bastante complexa, apresentando um processo de desenvolvimento lento que envolve a ocorrência de múltiplos eventos sequenciais. O cancro constitui assim, um desafio clínico e molecular para todos os envolvidos na elucidação dos mecanismos que conduzem ao desenvolvimento tumoral. Atualmente, estima-se que o cancro seja responsável por mais mortes do que as doenças cardíacas e os acidentes cerebrais vasculares (Siegel et al. 2016). No ano de 2012, foram registados 14,1 milhões de novos casos de cancro e 8,2 milhões de pessoas morreram devido a esta doença, em todo o mundo (Ferlay et al. 2015). Ainda no ano de 2012, o cancro do pulmão foi o mais frequente a nível mundial, quer em termos de novos casos (1,8 milhões de novos casos), quer em termos de mortalidade (1,6 milhões de mortes). Ainda em 2012, mas no que diz respeito à Europa, as taxas de incidência indicam que foram descritos cerca de 3,8 milhões de novos casos e aproximadamente 1,9 milhões de mortes são devidas a esta doença (Ferlay et al. 2015). Sendo que em termos de incidência, o cancro de mama é o mais incidente (494,076 mil novos casos), seguido do cancro colo-retal (471,240 mil novos casos) e pelo cancro do pulmão (448,618 mil novos casos). No entanto, quando são avaliadas as taxas de mortalidade observa-se que o cancro do pulmão lidera o *ranking* (338,203 mil mortes) seguido pelo cancro colo-retal (228,275 mil mortes) e pelo cancro da mama (142,979 mil mortes) (Ferlay et al. 2015; Siegel et al. 2016). Em Portugal, as tendências são relativamente diferentes, sendo as neoplasias mais incidentes o cancro colo-retal, o cancro da próstata e o cancro da mama, e em termos de mortalidade, a neoplasia mais mortal é o cancro colo-retal, seguido pelo cancro do pulmão e pelo cancro do estômago (Ferlay et al. 2015).

As últimas décadas têm sido acompanhadas de imensas mudanças e grandes evoluções, que permitiram ao Homem adquirir um maior conhecimento de si mesmo

e do que o rodeia, proporcionando-lhe uma melhor qualidade de vida, melhores hábitos alimentares e de higiene, melhores cuidados de saúde e também uma maior esperança média de vida. No entanto no que diz respeito ao cancro, e apesar de todo o progresso no que concerne aos meios de diagnóstico, tratamento e cuidados de saúde em geral, este permanece um grande flagelo na sociedade atual. De acordo com a evolução demográfica e com os sinais epidemiológicos, é expectável que o número de casos de cancro continue a aumentar e, usando como referência a população mundial do ano 2012, estima-se que em 2030 haja um aumento significativo da taxa de incidência e prevê-se que o número de novos casos ronde os 21,6 milhões (Ferlay et al. 2015). No entanto, e de acordo com todo o progresso que tem ocorrido em torno desta doença, quer em melhores cuidados de saúde primários, quer em tratamentos mais direcionados e individualizados, é expectável que em 2030 a taxa de mortalidade por cancro seja de aproximadamente 13,0 milhões (Ferlay et al. 2015).

1.1.1 *Biologia do Cancro*

Atualmente encontra-se bem estabelecido que o processo de desenvolvimento de um cancro, designado por carcinogénese, é o resultado da interação de múltiplas e complexas alterações morfológicas, moleculares e genéticas, culminando numa massa celular tumoral, que poderá terminar na aquisição de um fenótipo maligno, com capacidade de metastização, designado de cancro (Hanahan and Weinberg 2011). No processo de carcinogénese, a acumulação de múltiplas transformações moleculares e genéticas, resulta num desequilíbrio entre genes supressores tumorais e oncogenes, dotando a célula de um elevado potencial oncogénico (Davidson et al. 2013).

Desde o ano 2000 que foram estabelecidos os eventos fundamentais para o desenvolvimento de um cancro, que correspondem a seis processos designados por *hallmarks* do cancro: potencial proliferativo ilimitado, capacidade de evasão à apoptose, auto-suficiência em fatores de crescimento, insensibilidade a sinais de inibidores de crescimento, capacidade de promover a angiogénese, capacidade de invasão tecidual e metastização à distância (Hanahan and Weinberg 2000). Estas características foram definidas como capacidades funcionais adquiridas pelas

células tumorais para que consigam sobreviver, proliferar e disseminar-se. As capacidades funcionais podem ser adquiridas de formas diferentes em diferentes tipos de cancro e também podem ser adquiridas recorrendo a diversas vias e em momentos temporais diferentes durante o processo de carcinogénese (Hanahan and Weinberg 2011). No entanto, e com a evolução do conhecimento científico, os *hallmarks* descritos no passado foram alargados. Atualmente, foram também incluídos a instabilidade genómica, a inflamação como indutora de tumores, a capacidade das células tumorais evadirem à destruição pelo sistema imunológico e a desregulação do metabolismo energético (Hanahan and Weinberg 2011) (Figura 1).

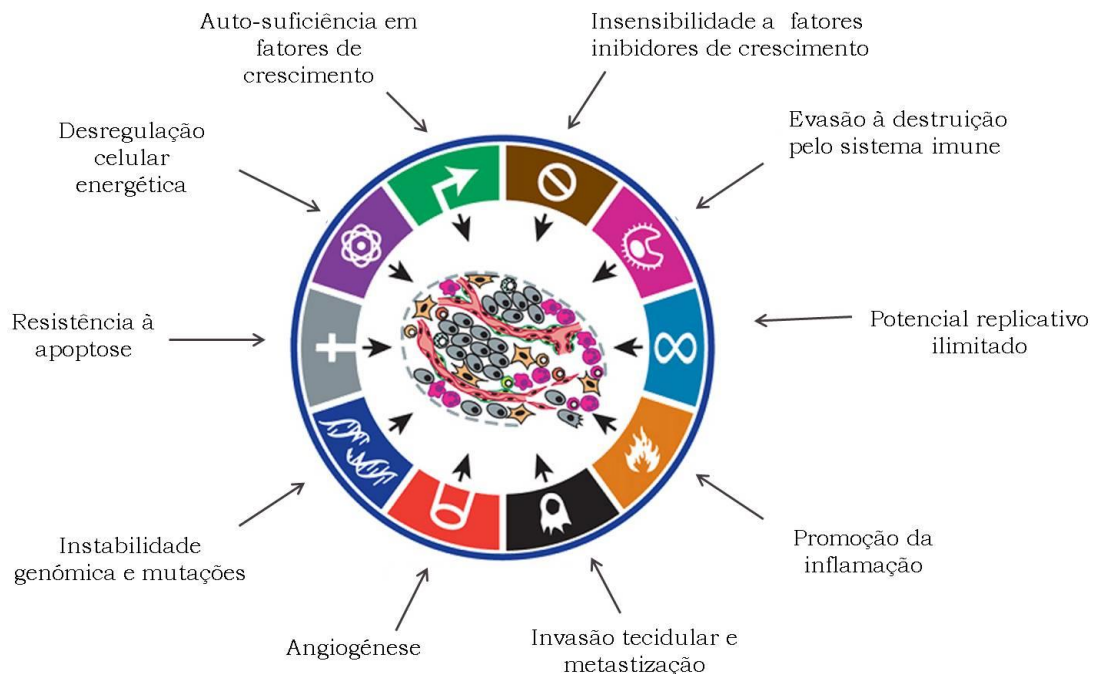


Figura 1: Os eventos associados ao desenvolvimento de cancro, adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011

A evolução da definição dos *hallmarks* do cancro, realçou a questão de esta doença se desenvolver por uma interação de vários processos e de várias desregulações celulares. Estes marcos permitiram também perceber melhor determinados mecanismos que podem ser alvo de terapias dirigidas, de que são exemplo, os inibidores da enzima telomerase, relacionada com o potencial replicativo ilimitado (Hanahan and Weinberg 2011).

A aquisição de mutações somáticas em oncogenes relevantes tem sido descrita como um potencial evento *driver* na carcinogénese, originando o conceito de *oncogene addiction* (Pao and Girard 2011). Considerando a importância das mutações *driver*, a identificação e caracterização destas mutações, tem contribuído para o desenvolvimento de terapias alvo, ou seja, terapias específicas para determinado gene que se encontre com uma alteração oncogénica (Davidson et al. 2013). Contudo, e apesar das células estarem constantemente sujeitas a agressões do meio ambiente, passíveis de causar mutações no ácido desoxirribonucleico (*DNA: deoxyribonucleic acid*) existem mecanismos de defesa, nomeadamente os genes de reparação celular que podem reparar os danos induzidos pelos agentes exógenos e endógenos. No entanto, algumas alterações genéticas podem ser transmitidas de geração em geração, através da linhagem germinativa do indivíduo, originando os cancros familiares, que são raros (entre 5 e 10%), ao passo que a maioria das neoplasias surgem de um modo esporádico, na linhagem somática de tipos específicos de células, originando os cancros esporádicos (Hanahan and Weinberg 2000).

Contudo, em relação ao cancro, muitas questões continuam por esclarecer, continuando a ser um desafio de todos os que estão envolvidos à volta desta doença. Assim, torna-se cada vez mais pertinente estudar e caracterizar os mecanismos biológicos subjacentes ao seu desenvolvimento de modo a definir tratamentos mais inovadores e eficazes.

1.2 Variabilidade Genética

Admitindo que o desenvolvimento tumoral é resultante da interação entre fatores ambientais e fatores genéticos intrínsecos ao próprio indivíduo, torna-se relevante estudar e compreender a influência da variabilidade genética individual, uma vez que esta será relevante para se compreender alguns mecanismos inerentes ao processo de desenvolvimento neoplásico.

A descodificação do genoma humano permitiu constatar que diferenças nas sequências de DNA podem explicar diferentes suscetibilidades e diferentes padrões de desenvolvimento tumoral, tendo esta variabilidade implicações ao nível do desenvolvimento, tratamento e prognóstico do cancro. Esta variabilidade é

consequência de polimorfismos genéticos, sendo definidos como variações no DNA dos indivíduos de uma população, cuja variante menos frequente está presente em pelo menos 1% da mesma (Knudsen et al. 2001). Embora a maioria destas alterações tenha pouco impacto para a saúde humana, existem várias evidências que demonstram que certas variantes genéticas provocam alguns efeitos fenotípicos, num determinado contexto (Chorley et al. 2008).

Os polimorfismos genéticos podem ser classificados como *variable number tandem repeats* (VNTRs), *copy number variations* (CNVs), inserções, deleções, duplicações e *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), dependendo do tipo de alteração genética (Chorley et al. 2008). Os SNPs são os polimorfismos genéticos mais comuns do genoma humano e é estimado que ocorram a cada 100 a 300 pares de bases, perfazendo cerca de 10 milhões de SNPs em todo o genoma humano (Engle et al. 2006; Chorley et al. 2008). Cada indivíduo apresenta um perfil de SNPs único e individual, sendo estes considerados a principal fonte de variabilidade individual na população e podem ocorrer em qualquer região do genoma. Dependendo da zona do genoma que ocorrem podem ter repercussões diferentes, ou seja, podem alterar a expressão do gene, a conformação da proteína ou não ter qualquer efeito funcional (Monzo et al. 2008). Dado que o risco para o desenvolvimento de cancro parece poder ser influenciado pelos padrões de SNPs, que cada indivíduo é portador em determinados genes chave associados à suscetibilidade, o estudo de polimorfismos genéticos em genes com elevada relevância clínica poderá ajudar a definir grupos de risco para o desenvolvimento neoplásico e avaliar o potencial de serem utilizados como fatores de prognóstico (Brookes 1999; Engle et al. 2006).

Adicionalmente, o estudo de perfis de SNPs reveste-se de especial importância como ferramenta molecular útil no progresso da medicina personalizada, pois permitirá a reorganização terapêutica, definindo subgrupos de indivíduos com maior benefício terapêutico para determinado esquema de tratamento (Monzo et al. 2008). O principal objetivo da investigação em farmacogenómica é o conhecimento da influência de génotipos ou transcriptomas como fatores preditivos de eficácia e/ou sensibilidade a fármacos e sua toxicidade (Gurwitz and Pirmohamed 2010; Medeiros et al. 2003; Medeiros et al. 2002).

Assim, poderá ser possível definir biomarcadores moleculares com base na variabilidade genética, nomeadamente em polimorfismos genéticos funcionais,

germinativas, úteis na definição de grupos de risco para o desenvolvimento neoplásico e de grupos com significado prognóstico.

1.3 Cancro do Pulmão

No início do século XX, o cancro do pulmão era considerado uma doença rara, no contexto de saúde pública. Contudo, desde 1950, quando Richard Doll e Bradford Hill descreveram pela primeira vez a evidência de que o tabaco estava associado a cancro do pulmão, esta neoplasia ganhou um maior destaque (Ferlay et al. 2015; Siegel et al. 2016). O cancro do pulmão pode ser considerado como o cancro do “homem moderno”, uma vez que eram descritos poucos casos antes do século XX e após esta altura as taxas de incidência aumentarem consideravelmente, assim como as taxas de mortalidade, sendo que a maioria das mortes por cancro do pulmão, 80% a 85%, estão diretamente relacionadas com o consumo de tabaco (Ferlay et al. 2015; Torre et al. 2016).

O cancro do pulmão, no ano de 2012, era o tipo de cancro mais frequente a nível mundial, quer no que diz respeito a novos casos (1,8 milhões de novos casos, 12,9% do total de casos), quer em termos de mortalidade (1,6 milhões de mortes, 19,4% do total de mortes) (Ferlay et al. 2015; Siegel et al. 2016). Se estes números forem estratificados por género, o cancro do pulmão é o cancro mais comum no género masculino (1,2 milhões de novos casos, correspondendo a 16,7% do total de novos casos).

No género feminino, a incidência é geralmente mais baixa, refletindo as variações no consumo de tabaco. Contudo, as taxas de incidência são mais altas na região do Norte da América e Norte da Europa com taxas de 33,8 e 23,7 por 100.000 habitantes, respetivamente, comparativamente com as restantes regiões (Ferlay et al. 2015; Ahmad and Gadgeel 2016) (Figura 2).

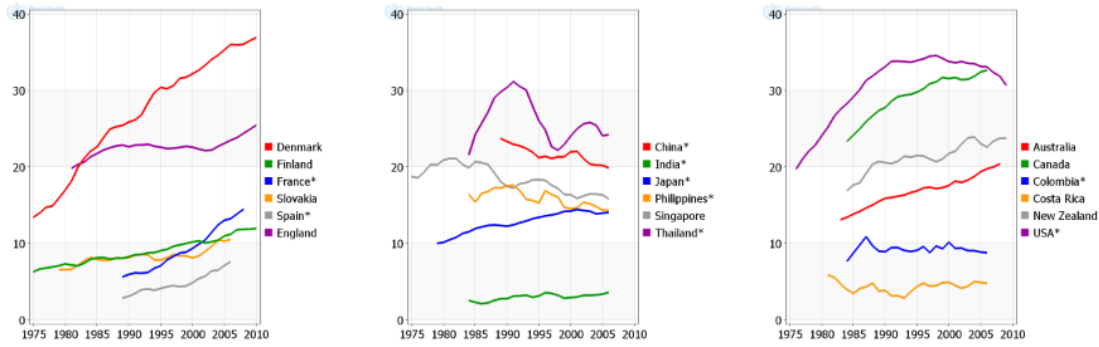


Figura 2: Taxas de incidência de cancro do pulmão, em vários países, no género feminino ao longo dos últimos anos

No entanto, no género masculino observa-se uma diminuição das taxas de incidência nesta neoplasia, na maioria dos países, com algumas exceções, nomeadamente Brasil, Portugal e Bulgária (Hashim et al. 2016). Esta diminuição nas taxas de incidência tem-se verificado nos últimos anos e é expectável que persista num futuro próximo (Malvezzi et al. 2013) (Figura 3).

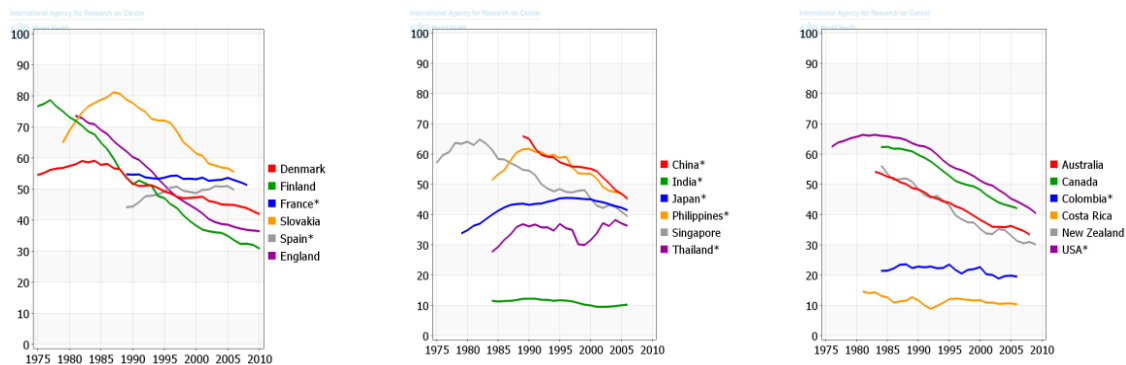


Figura 3: Taxas de incidência de cancro do pulmão, em vários países, no género masculino ao longo dos últimos anos

Na Europa em 2012, o cancro do pulmão apresentou uma taxa de incidência de 410 220 mil novos casos, o que representa 16% de totalidade de casos, e em termos de mortalidade os números foram bastante próximos, 343 848 mil mortes correspondendo a 20,1% do total de mortes devidas a cancro (Ferlay et al. 2015). Em Portugal, no mesmo ano, foram diagnosticados cerca de 4192 indivíduos com cancro do pulmão (8,5%) e em termos de mortalidade foram registados 3441 óbitos devido a esta neoplasia (Ferlay et al. 2015).

O cancro do pulmão está associado a fatores de risco bem estabelecidos, nomeadamente, os hábitos tabágicos, a dieta alimentar e o consumo de álcool, a inflamação crónica derivada de outras condições clínicas, a radiação ionizante, a exposição ocupacional (asbestos, metais, sílica, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)) e a poluição ambiental (Ridge et al. 2013; Malhotra et al. 2016; Ahmad and Gadgeel 2016).

Atualmente é indiscutível que o principal fator de risco para cancro do pulmão é o consumo de tabaco (Malhotra et al. 2016). Este fator de risco é responsável pela maioria dos casos desta neoplasia, sendo que a diferença de risco para o desenvolvimento desta doença, quando são comparados os fumadores vs não fumadores, é na ordem de 20 a 50 vezes mais nos indivíduos fumadores. Outro fator a ter em consideração é a duração do consumo de tabaco, que é bastante determinante para o risco dos fumadores desenvolverem cancro do pulmão (Malhotra et al. 2016; Didkowska et al. 2016). O fumo do tabaco contém mais de 4000 substâncias químicas, sendo que cerca de 60 são conhecidas como apresentando propriedades carcinogénicas (de Groot and Munden 2012). As moléculas mais importantes implicadas no desenvolvimento de cancro do pulmão são os HPA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), e dentro destes os mais significantes são os benzo[a]pyrene (B[a]P); nitratos e N-nitrosaminas específicas do tabaco (de Groot and Munden 2012; Didkowska et al. 2016). Atualmente, outro aspeto importante que se coloca quando se trata de tabaco é o fumo passivo ou fumo involuntário, sendo considerado outra forma de exposição ao tabaco, tendo sido reconhecido como um contributo importante para a morbilidade e mortalidade da população (de Groot and Munden 2012). Outro fator de risco é a instabilidade genómica, os tumores exibem mutações genéticas e amplificações adquiridas, que requerem a quebra de alguns pontos de controlo e de defesa nos diversos processos celulares, nomeadamente na replicação e apoptose, que contribuem para o desenvolvimento e progressão tumorais (Ahmad and Gadgeel 2016). Relativamente a outras doenças que possam aumentar o risco para o desenvolvimento de cancro do pulmão, a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) é um exemplo, e sugere-se que esta condição clínica é um fator independente dos hábitos tabágicos (Wu et al. 1995). Por último, a exposição ocupacional, apresenta um papel fundamental na etiologia do cancro do pulmão, sendo que o risco para o desenvolvimento desta neoplasia é aumentado em

peessoas que trabalhem em indústrias com potenciais produtos considerados como carcinogénicos. Os mais importantes carcinogénicos ocupacionais são os asbestos, a sílica, o radão, os metais pesados e os HPAs (IARC 2012).

Relativamente ao diagnóstico, a maioria dos doentes com cancro do pulmão é diagnosticada em estadios mais avançados da doença (Popper 2016). Tal acontece em consequência de não haver um diagnóstico precoce ou mesmo um teste de rastreio, para este tipo de neoplasia. Por conseguinte, a maioria dos doentes apresenta doença localmente avançada ou doença metastática, sem indicação para cirurgia, sendo que o tratamento preferencial, em 75% dos casos, é a realização de quimioterapia (Perlikos et al. 2013; Shackelford et al. 2014; Devarakonda et al. 2015; Popper 2016). As idades ao diagnóstico, no cancro do pulmão, são maioritariamente idades avançadas, sendo que aproximadamente 6% dos doentes tem menos de 50 anos de idade, 29% dos doentes tem entre 60-69 anos de idade e 44% dos doentes tem mais de 70 anos de idade (Domagala-Kulawik et al. 2014).

Em termos histológicos, o cancro do pulmão pode ser dividido em dois grandes grupos: cancro do pulmão de pequenas células (CPPC), que corresponde a 10-15% da totalidade dos casos e o cancro do pulmão de não pequenas células (CPNPC) que corresponde a cerca de 80-85% da totalidade dos casos de cancro do pulmão (Molina et al. 2008; Santarpia et al. 2016). No CPNPC, sob o ponto de vista histológico podem ser encontrados adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas (ou carcinoma epidermóide) e carcinoma de grandes células (Davidson et al. 2013). O subtipo histológico adenocarcinoma é atualmente o mais representativo (\pm 50%) de todos os tipos de cancro do pulmão, e é caracteristicamente encontrado em zonas mais periféricas do pulmão (Chen et al. 2014). O carcinoma de células escamosas é predominantemente encontrado em zonas mais centrais do pulmão e tem uma predominância de cerca de 40% da totalidade de todos os casos (Chen et al. 2014). O carcinoma de grandes células tem uma representatividade muito mais reduzida, cerca de 3% da totalidade de casos e, por norma, o seu diagnóstico é realizado por exclusão, quando os tumores não apresentam características morfológicas de adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas ou cancro do pulmão de não pequenas células indiferenciado (Davidson et al. 2013; Chen et al. 2014). Relativamente ao CPPC, é um tumor neuroendócrino, fortemente associado a hábitos tabágicos, com uma morfologia e histologia completamente distintas do CPNPC, apresentando caracteristicamente

boa resposta à quimioterapia, mas rápida progressão e disseminação, o que o torna extremamente agressivo. (Santarpia et al. 2016).

O tratamento do cancro do pulmão constitui um exemplo relativamente aos avanços que se têm observado na terapia dos doentes oncológicos. No passado, os planos de tratamento eram prescritos baseados em critérios clinicopatológicos. Atualmente, os novos tratamentos têm em conta a histologia e as características genéticas e moleculares dos tumores. O tratamento de eleição para cancro do pulmão em fases iniciais é a cirurgia, no entanto, apenas cerca de 50% de todos os doentes ficam tratados com esta opção terapêutica. A recidiva pode ocorrer localmente, em cerca de 30% dos casos, ou mais frequentemente em locais à distância, indicando doença sistémica (Serke 2010). Até há poucos anos atrás, o tratamento de cancro do pulmão avançado era limitado à radioterapia, quimioterapia ou a combinação de ambos, dependendo do estadio do tumor e do estado geral do doente (Kerr and Nicolson 2016). Nos últimos anos, com o desenvolvimento das terapias moleculares alvo, estas têm-se apresentado como uma alternativa terapêutica mais individualizada, nos tumores que apresentem alterações moleculares específicas (Velcheti et al. 2014; Swanton and Govindan 2016). Na prática, a caracterização molecular é realizada pela análise de mutações ativadoras no *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*), especificamente nos exões 19 e 21, e na deteção de rearranjos no gene *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*) (Thunnissen et al. 2014). Nos cancros com mutações ativadoras do *EGFR*, a primeira linha de tratamento indicado são inibidores de tirosina cínase (EGFR-TKI) como o caso do gefitinib, erlotinib e afatinib (Thunnissen et al. 2014; Domagala-Kulawik 2015; Swanton and Govindan 2016). O tratamento com crizotinib é aconselhado para casos de cancro do pulmão com rearranjos no gene *ALK* (Thunnissen et al. 2014; Domagala-Kulawik et al. 2014). No entanto, embora o aparecimento de terapias alvo tenha revolucionado o tratamento desta doença, estas apenas se revelaram relativamente eficazes para um subgrupo de doentes selecionados, ou seja, em doentes com subtipos de cancro do pulmão bastante específicos (Perlikos et al. 2013; Leventakos and Mansfield 2014; Swanton and Govindan 2016). Atualmente, as novas terapêuticas seguem noutra direção, e assiste-se a um novo paradigma, o da imuno-oncologia, onde se tenta dotar o sistema imunológico de ferramentas eficazes para combater o cancro (Domagala-Kulawik 2015). A abordagem da imuno-oncologia permitiu novas opções para o cancro do pulmão avançado, com o uso de

anticorpos contra os imuno-*checkpoints* (Soria et al. 2015; Yang et al. 2016). O conhecimento da importância do PD-1 (*programmed cell death protein 1*) e do seu ligando PD-L1 (*programmed death-ligand 1*), assim como o desenvolvimento de terapêuticas direcionadas para estes alvos moleculares, resultou numa terapia que pode ser designada de terceira dimensão para o tratamento de cancro do pulmão avançado (Kerr and Nicolson 2016; Sukari et al. 2016). Apesar de todos os avanços, o prognóstico dos doentes diagnosticados com cancro do pulmão continua bastante preocupante, uma vez que a sobrevivência aos 5 anos é de cerca de 15% (Davidson et al. 2013).

1.4 Microambiente Tumoral

Nas últimas décadas, a investigação em oncologia incidiu sobre a identificação de alterações genéticas e fenotípicas nas células tumorais, admitindo-se que seria suficiente para explicar a natureza da doença (Hanahan and Weinberg 2000).

No entanto, mais recentemente tornou-se claro que o microambiente tumoral apresenta um papel fundamental para um preciso esclarecimento sobre o desenvolvimento tumoral (Hanahan and Weinberg 2011). Durante a progressão tumoral, as células neoplásicas têm a capacidade de modular as células que compõem o tecido “residente” e são capazes de induzir uma resposta inflamatória de forma a recrutarem células do estroma, as quais são essenciais para a progressão tumoral (Blankenstein 2005). O estroma tumoral é uma mistura de células essenciais para o crescimento e sustentação do tecido, é também fulcral para o fornecimento de fatores de crescimento, sustentação para o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, crescimento da matriz extracelular e para a limpeza dos resíduos e células mortas (Bremnes et al. 2011). A componente inflamatória da neoplasia em desenvolvimento inclui uma população leucocitária muito diversificada, da qual se destacam macrófagos (abundantes em vários tipos de tumores), linfócitos, células NK (*natural killer*), neutrófilos e células dendríticas (Bremnes et al. 2011). Estes componentes inflamatórios do tumor são considerados fatores chave na promoção da progressão tumoral devido à sua capacidade para libertar uma grande variedade de citocinas, quimiocinas, mediadores citotóxicos como ROS (*reactive oxygen species*), metaloproteinases da matriz (MMP's: *matrix metalloproteinases*) e

mediadores solúveis de morte celular, como o TNF- α (*tumour necrosis factor- α*) (Coussens and Werb 2002; Bremnes et al. 2011). Muitos dos mediadores libertados durante o processo de inflamação crónica desregulada promovem a proliferação celular e invasão, induzem a mutagénese e aumentam a angiogénese (Ben-Baruch 2006). Devido a estas características, os mediadores inflamatórios promovem a transformação e a iniciação de um fenótipo maligno e se a sua expressão for sustentada, promovem também a progressão tumoral. Para além disto, muitos dos fatores libertados pelas células inflamatórias conduzem, direta ou indiretamente, a uma supressão marcada da resposta imunológica, que de outra forma poderia ter um papel importante no controlo do tumor (Ben-Baruch 2006). O cancro do pulmão é um modelo neoplásico em que a inflamação crónica e o microambiente tumoral se revestem de especial importância, pelo que a modulação de mediadores imunológicos pode ser encarada como alvo de estratégias terapêuticas inovadoras contra a progressão tumoral.

1.5 Inflamação, Invasão e Metastização

A inflamação crónica tem sido postulada como um evento central em processos relacionados com a progressão tumoral e com a sobrevivência em vários tipos de cancro (Peebles et al. 2007; Mantovani et al. 2008). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a inflamação crónica está implicada na predisposição para vários tipos de cancro, sendo estimado que infeções e uma resposta inflamatória estão relacionadas em cerca de 15-20% com o total de mortes atribuíveis a cancro (Mantovani et al. 2008; Colotta et al. 2009; Aggarwal et al. 2009). Por outro lado, o infiltrado leucocitário tem também a capacidade de reprimir e controlar o crescimento tumoral, nomeadamente através do processo de imuno-vigilância. O aumento de células inflamatórias no tecido tumoral pode atuar como promotor do desenvolvimento tumoral, surgindo o conceito de inflamação relacionada com cancro (Coussens and Werb 2002; Colotta et al. 2009; Mantovani et al. 2008).

As células tumorais têm a capacidade de produzir mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, que atraem células do sistema imunológico, facilitando desta forma o desenvolvimento tumoral (Lin and Pollard 2004; Yang et al. 2016). O escape das células tumorais ao sistema imunológico é essencial para a

progressão tumoral e são vários os mecanismos propostos para esse escape: resistência à lise das células tumorais por deficiência de expressão do complexo *major* de histocompatibilidade, expressão deficitária dos epítetos imunogénicos, libertação de citocinas imunossupressoras e apoptose de células T (Sukari et al. 2016). De forma alternativa, o escape imunológico pode ocorrer pelo estabelecimento de um estado imunossupressivo por parte do microambiente tumoral (Ben-Baruch 2006)

As características “chave” associadas à inflamação relacionada com cancro incluem um infiltrado leucocitário, predominantemente macrófagos associados a tumores (TAM: *tumour-associated macrophages*), a presença de mediadores inflamatórios como interleucinas (IL-1, IL-6) e quimiocinas (CCL2 e CXCL8), sendo que estes respondem de forma bastante rápida e eficaz aos estímulos provenientes das células tumorais (Mantovani et al. 2008; Colotta et al. 2009). A inflamação relacionada com cancro afeta vários aspetos associados às características de malignidade, nomeadamente a proliferação, a sobrevivência das células tumorais, a angiogénese e a metastização tumoral (Orozco-Morales et al. 2016). As citocinas imunoreguladoras secretadas num ambiente pro-inflamatório, também contribuem para o crescimento tumoral e metastização (Orozco-Morales et al. 2016).

Do ponto de vista clínico, a metastização é o processo mais crítico da carcinogénese, uma vez que cerca de 90% da mortalidade relacionada com cancro está associada à metastização (Perlikos et al. 2013). Estudos recentes demonstraram que a ocorrência do processo de metastização requer a colaboração estreita entre células tumorais, células inflamatórias e células do estroma (Grivennikov et al. 2010; Fidler and Kripke 2015; Popper 2016). O processo de metastização pode ser dividido em quatro grandes etapas. Num primeiro passo em que ocorre a transição epitelial-mesenquimal, as células tumorais adquirem características fibroblastóides que aumentam a sua motilidade e permite que estas invadam os revestimentos epiteliais/membranas basais e assim alcancem os vasos sanguíneos ou linfáticos (Kalluri and Weinberg 2009; Grivennikov et al. 2010; El-Badrawy et al. 2014; Popper 2016). No segundo passo, as células tumorais intravasam para os vasos sanguíneos e linfáticos. A inflamação pode promover este passo através da produção de mediadores que aumentem a permeabilidade vascular. Segue-se o terceiro passo no qual as células que iniciaram o processo de metastização sobrevivem e circulam através da circulação sanguínea ou linfática

(Perlikos et al. 2013). É estimado que apenas cerca de 0,01% das células tumorais que entram em circulação tenham a capacidade de sobreviver e dar origem a micro-metástases (Joyce and Pollard 2009; Grivennikov et al. 2010; Fidler and Kripke 2015). No passo seguinte, ocorre o extravasamento das células tumorais, e este é conseguido através das integrinas. Finalmente, as células tumorais que vão originar as metástases, interagem com as células inflamatórias e células do estroma e começam a sua proliferação e crescimento (Polyak and Weinberg 2009; Perlikos et al. 2013). Algumas das células tumorais que vão dar origem a metástases, podem já ser direcionadas para o nicho pré-metastático, em resposta a sinais inflamatórios gerados pelo tumor (Grivennikov et al. 2010; Fidler and Kripke 2015). A invasão das células tumorais requer uma extensa proteólise da matriz extracelular na frente de invasão, e mais uma vez, as células inflamatórias desempenham um papel fundamental, sendo estas uma importante fonte de proteases capazes de degradar a matriz extracelular, nomeadamente secretando MMPs. As citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α promovem também a expressão de MMPs, invasão e metastização via NF- κ B e STAT3 (*signal transducers and activators of transcription 3*) (Grivennikov et al. 2010). Quando as células tumorais metastáticas entram em circulação estas necessitam de sobreviver em suspensão e resistir à morte celular induzida pelo desprendimento- *anoikis*. A sobrevivência das células tumorais em circulação é afetada por mediadores inflamatórios libertados pelas células inflamatórias. A variedade de citocinas presentes no microambiente tumoral inclui TNF- α e IL-6 que por sua vez têm a capacidade de promover a sobrevivência das células metastáticas em circulação (Grivennikov et al. 2010). Relativamente ao processo de intravasação, este é regulado por prostaglandinas, citocinas e MMPs. Alguns estudos indicam que existem várias citocinas pró-inflamatórias que estão presentes em níveis elevados em circulação, em doentes com cancro e que regulam a expressão de moléculas de adesão no endotélio ou em órgãos alvo, desta forma aumentam a probabilidade de fixação das células metastáticas nesses locais (Mantovani et al. 2008). Assim, os mediadores inflamatórios são considerados de extrema importância para o desenvolvimento e progressão tumoral, mediando processos chave dos mesmos.

1.5.1 Citocinas: Interleucina - 6

Uma vez que a inflamação crónica pode promover um microambiente que favoreça um estado de desenvolvimento tumoral e que uma resposta inflamatória é regulada por citocinas, torna-se cada vez mais clara a importância destas moléculas no desenvolvimento de cancro (Enewold et al. 2009). As citocinas são polipéptidos ou glicoproteínas que medeiam várias respostas de linfócitos B e/ou T, como proliferação, produção de anticorpos e interação com imunoglobulinas. As concentrações em circulação de citocinas podem ser consideradas importantes como biomarcadores de inflamação, de uma resposta imune desregulada, assim como do desenvolvimento de cancro (Hofmann et al. 2011) .

As citocinas são uma vasta família de proteínas que incluem interleucinas, fatores de crescimento e fatores de diferenciação (fatores de estimulação de colónias). Estas são moléculas secretadas ou ligadas à membrana que desempenham um papel regulador no crescimento, diferenciação e na ativação do sistema imunológico (Dranoff 2004; Lu et al. 2006; Hofmann et al. 2011). A atividade destas moléculas pode ser autócrina, parácrina ou endócrina, apesar de algumas terem a capacidade de produzir uma variedade de respostas biológicas em tecidos-alvo (Enewold et al. 2009). As citocinas são normalmente classificadas com base na sua influência na iniciação ou promoção da inflamação, assim podem ser consideradas citocinas pró-inflamatórias, secretadas por linfócitos Th-1, ou pelo contrário podem ser citocinas que inibam a inflamação, anti-inflamatórias, secretadas por linfócitos Th-2 (Enewold et al. 2009).

Uma das interleucinas mais importantes em cancro do pulmão, é a IL-6, uma vez que a sua sobre-expressão se encontra associada a um pior prognóstico nestas neoplasias (Wojcik et al. 2010). Na literatura encontra-se descrito que em indivíduos diagnosticados com CPNPC, os níveis desta interleucina no soro estão aumentados em cerca de 39% de casos, enquanto que em indivíduos saudáveis ou com lesões benignas ao nível do pulmão, este aumento não é observado (Yanagawa et al. 1995; Chang et al. 2005). A IL-6 é considerada uma interleucina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos, é também considerada um fator-chave na promoção do crescimento tumoral e como fator anti-apoptótico. Vários estudos indicam que níveis elevados em circulação desta proteína estarão associados por um pior prognóstico

em vários tipos de cancro (Lin and Karin 2007; Enewold et al. 2009; Wang et al. 2013).

Os efeitos biológicos da IL-6, estão associados à regulação da resposta imune, a hematopoiese, inflamação e com processos relacionados com a carcinogénese. A IL-6 pode ser produzida por vários tipos de células, nomeadamente células do sistema imunológico (monócitos, linfócitos, macrófagos), células endoteliais e mesmo pelas células tumorais (Chang et al. 2005; Sugimoto et al. 2010).

O gene da *IL-6* localiza-se no cromossoma 7p21 e encontram-se descritos vários polimorfismos genéticos neste gene. No entanto de acordo com a literatura, destaca-se um polimorfismo genético (-174G/C; rs1800795) localizado na região promotora do gene, em que ocorre a transição de uma guanina (G) para uma citosina (C), na posição -174 do gene. Estudos funcionais verificaram que este polimorfismo genético, nomeadamente o alelo G, encontra-se associado a níveis mais elevados de IL-6, alelo que por sua vez se encontra correlacionado a um pior prognóstico, em vários tipos de neoplasias (Fishman et al. 1998; Liu et al. 2012).

1.5.2 Metaloproteinases da Matriz - MMPs

As MMP's são uma classe de moléculas estudadas há cerca de 40 anos e compreendem uma família cada vez maior de endopeptidases dependentes de zinco, que são capazes de degradar quase todos os componentes proteicos que compõem a matriz extracelular (Chetty et al. 2011; Hadler-Olsen et al. 2013).

Atualmente, são conhecidos cerca de 30 membros da família de metaloproteinases em vertebrados e cerca de 23 membros são conhecidos em humanos (Hadler-Olsen et al. 2013). Os membros da família de MMPs têm várias similaridades na sua estrutura, todas as MMPs têm um motivo de ligação ao zinco num domínio catalítico, um domínio N-terminal denominado o pré-domínio, seguido pelos domínios propeptídicos (Chetty et al. 2011; Hadler-Olsen et al. 2013; Cathcart et al. 2015). No entanto, a maioria das MMPs tem também um domínio adicional, como o domínio de hemopexina, que é importante no reconhecimento do substrato e na ligação aos inibidores (Hadler-Olsen et al. 2013). Baseado nos seus substratos específicos e na organização dos seus domínios, as MMPs podem ser classificadas

como: colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e MMPs-tipo membrana (Page-McCaw et al. 2007; Nissinen and Kahari 2014; Cathcart et al. 2015).

A maioria das MMPs é sintetizada na sua forma latente, sendo que precisam ser ativadas após a sua secreção, esta ativação usualmente envolve a remoção proteolítica do pró-domínio ou a auto-ativação induzida pela ligação a compostos como ROS e agentes caotrópicos (Hadler-Olsen et al. 2013). A atividade das MMPs é também controlada pelos inibidores presentes na matriz extracelular e em circulação, como os inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs: *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*) e ainda pela α 2-macroglobulina (Hadler-Olsen et al. 2013).

As MMPs são de uma importância fulcral, não só para controlar o volume da matriz extracelular, mas também para as interações entre as células e o ambiente circundante, uma vez que conseguem quebrar ligações célula-célula e célula-componentes da matriz extracelular, pela clivagem de moléculas de adesão como a E-caderina e CD44 (Kessenbrock et al. 2010; Hadler-Olsen et al. 2013; Perlikos et al. 2013). As MMPs são os principais moduladores responsáveis pelas alterações observadas no microambiente celular durante o desenvolvimento e a progressão tumoral, uma vez que apresentam a capacidade de clivar os componentes da matriz extracelular e assim promover o desenvolvimento tumoral (Visse and Nagase 2003; Deryugina and Quigley 2006; Langers et al. 2012).

Estas moléculas são também importantes ao nível da inflamação, uma vez que são capazes de regular a migração das células inflamatórias dos vasos sanguíneos para o seu local de ação (Nissinen and Kahari 2014). Assim como estão também envolvidas no processo de transição epitelial-mesenquimal, um dos marcos essenciais para a promoção da metastização (Roy et al. 2009).

Admite-se que as MMPs estejam intensamente envolvidas numa grande variedade de processos fisiológicos, como a proliferação celular, a migração e adesão, remodelação dos tecidos, angiogénese, desenvolvimento ósseo e cicatrização (Figura 4) (Mossbock et al. 2010; Langers et al. 2011; Chetty et al. 2011; El-Badrawy et al. 2014).

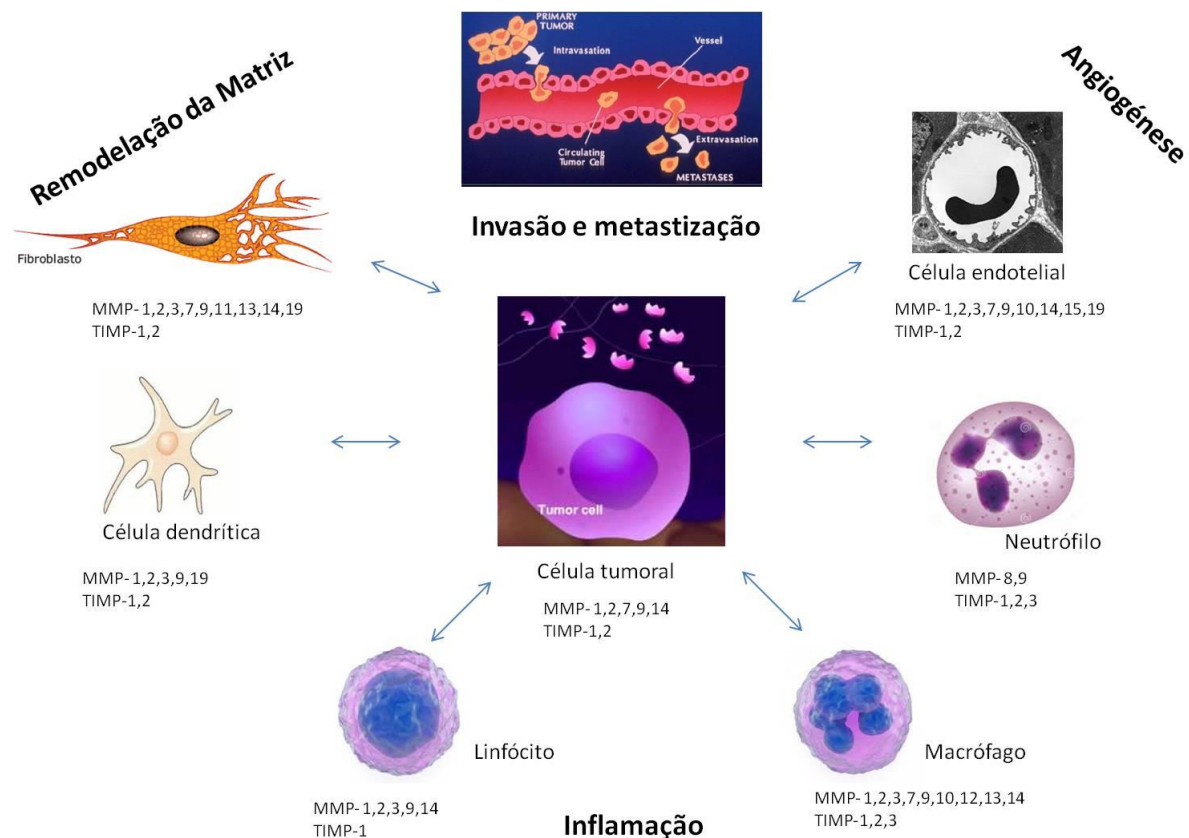


Figura 4: Visão esquemática de várias células que produzem MMP's e o seu envolvimento com os diferentes processos que ocorrem durante a carcinogênese, adaptado de Langers et al., 2011

A expressão de MMPs, apesar de baixa ou indetetável na maioria dos tecidos normais, é substancialmente aumentada na maioria dos tecidos malignos (Hidalgo and Eckhardt 2001). A sobre-expressão de MMPs no microambiente tumoral depende não só das células tumorais, mas também das células adjacentes, como as células do estroma. As células tumorais sobre-expressam protéases e/ou induzem a expressão destas enzimas em células do estroma que sejam próximas, de forma a conseguirem degradar a membrana e invadir os tecidos adjacentes (Roy et al. 2009). As células tumorais estimulam as células “residentes”, como os fibroblastos que constituem uma importante fonte de MMPs, através da secreção de interleucinas, fatores de crescimento e sinalização direta através de indutores de MMPs (Gialeli et al. 2011). A expressão diferencial de MMPs tem sido associada com vários tipos de cancro e em diferentes fases de desenvolvimento da doença, uma vez que estas proteínas são essenciais para a degradação da membrana basal endotelial e invasão das células tumorais durante o processo de metastização.

Atendendo aos dados apresentados na literatura admite-se que nos tecidos tumorais a expressão de MMPs, é induzida quer por células tumorais, quer por células do microambiente celular (Chetty et al. 2011; Hadler-Olsen et al. 2013). Na cascata de eventos associados à metastização, as MMPs são fatores facilitadores da proliferação celular, uma vez que devido ao seu efeito proteolítico estas proteínas são capazes de degradar a matriz extracelular e a membrana basal e assim sustentar a invasão das células tumorais na área circundante (Safranek et al. 2007; Gialeli et al. 2011). Por outro lado, as MMPs também têm um papel importante no processo de angiogénese, uma vez que conseguem criar espaços para vasos recém-formados e também sustentam a mobilidade dos endotélios e a invasão de células tumorais (Safranek et al. 2007; Gialeli et al. 2011). Relativamente à proliferação celular, são vários os mecanismos que contribuem para este processo, sendo de realçar a capacidade das MMPs de modular a biodisponibilidade de fatores de crescimento e a ativação de recetores da membrana celular.

Vários estudos têm demonstrado que de acordo com a fase da carcinogénese, estarão envolvidas diferentes MMPs, consoante as suas capacidade e funções (Figura 4). Por outro lado, as mesmas MMPs podem estar envolvidas em diferentes processos, e podem ter efeitos contraditórios, dependendo do substrato sobre o qual estão a atuar (Hadler-Olsen et al. 2013).

A MMP-2 é uma gelatinase A, com 72 kDa, e é inicialmente secretada na sua forma inactiva - pro-MMP-2, sendo o complexo pro-MMP-2-TIMP-2 é essencial para a ativação da MMP-2. Tal demonstra o importante papel da TIMP-2 na modulação da MMP-2 (Hadler-Olsen et al. 2013). Na sua forma activa a MMP-2 pode degradar colagénios do tipo IV e V, a laminina e a elastina (Foda and Zucker 2001). A MMP-2 é a MMP mais amplamente secretada e é expressa de forma constitutiva pela maioria das células, incluindo células endoteliais e epiteliais (Foda and Zucker 2001). Esta MMP tem ainda a capacidade de quebrar a proteína de ligação ao IGF, que é conhecido como tendo um forte efeito na estimulação da proliferação celular e inibição da apoptose (Zhou et al. 2005). A sobre-expressão de MMP-2 tem sido detetada em lesões pré-malignas e em estadios iniciais de cancro, o que poderá indicar que a MMP-2 poderá associada a eventos iniciais da carcinogénese (Zhou et al. 2005). Em cancro do pulmão têm sido descritos níveis aumentados de MMP-2 tanto nas células tumorais como também no tecido estromal (Qian et al. 2010).

A MMP-7 é um membro da família das MMPs (matrilisina) com apenas 28kDa, e ao contrário de outras MMPs esta é expressa por células tumorais e não por células do estroma, o que pode indicar que a MMP-7 poderá ser um útil biomarcador tumoral ou mesmo uma molécula-alvo para uma futura intervenção terapêutica (Wilson and Matrisian 1996; Liu et al. 2007). A MMP-7 tem uma ampla especificidade para substratos de componentes da matriz extracelular, incluindo a elastina, o colagénio do tipo IV, a fibronectina, a vitronectina e os proteoglicanos (Liang et al. 2014). Por outro lado, um estudo *in vitro* de Noe e colaboradores, demonstrou, que a MMP-7 pode clivar a proteína E-caderina, promovendo a invasão por parte das células tumorais (Noe et al. 2001). Alguns estudos têm indicado que a sobre-expressão de MMP-7 poderá estar correlacionada com um mau prognóstico em vários tipos de tumores, incluindo o cancro colo-retal, o cancro gástrico, o cancro da próstata e o cancro da bexiga (Szarvas et al. 2011a; Szarvas et al. 2011b; Yang et al. 2012). No entanto, em cancro do pulmão esta associação ainda permanece por esclarecer.

A MMP-9, (gelatinase B) é importante na degradação do colagénio tipo IV, V, VII, IX, elastina, fibrina, fibrinogénio e plasminogénio, facilitando a invasão e metastização das células tumorais (Roeb et al. 2002; Vandooren et al. 2013; Gong et al. 2016). Esta MMP é sintetizada por vários tipos de células, desde células tumorais, células do estroma, células inflamatórias e células endoteliais (Schveigert et al. 2013). A sua forma inativa é um propéptido com 10 kDa, que pode ser ativada por outras MMPs (MMP-3 é a mais eficiente) ou pelo sistema ativador de plasminogénio tecidual (tPA)- plasmina, que devido à sua função biológica de clivagem de gelatina, promove a motilidade das células tumorais (Shi et al. 2015; Gong et al. 2016). A deteção da expressão por imunohistoquímica e o aumento dos níveis de MMP-9 no plasma, têm sido observados em doentes com CPNPC e noutros tipos de tumores, como no cancro da mama (Schveigert et al. 2013; El-Badrawy et al. 2014). A MMP-9 pode promover a migração de células endoteliais e o recrutamento de pericitos, elementos necessários para a estabilização dos vasos sanguíneos (Hadler-Olsen et al. 2013).

Relativamente à regulação da atividade das MMPs, existem pelo menos três mecanismos envolvidos, sendo estes: a regulação da transcrição, a ativação de pro-MMPs e a inibição da função das MMPs pelos TIMPs (Chetty et al. 2011). No entanto, o mecanismo mais importante talvez seja a regulação ao nível da

transcrição, uma vez que a maioria dos genes codificantes de MMPs só é expresso quando ocorre a remodelação de tecidos de forma fisiológica ou patológica (Chetty et al. 2011). Várias evidências indicam que variações na sequência de DNA na região promotora ou noutra localização dos genes de MMPs, pode resultar em diferente expressão de MMPs em diferentes indivíduos (Chetty et al. 2011).

Nos últimos anos, com o evoluir das técnicas de biologia molecular, em particular a sequenciação genómica, tornou-se possível conhecer as variações na sequência de DNA e as suas implicações. Diversos estudos foram desenvolvidos no sentido de se compreender e avaliar as implicações destas variações genéticas na população. A expressão de MMPs pode ser alterada pela presença de polimorfismos genéticos, nomeadamente SNPs (Chetty et al. 2011). Na literatura, tem sido descrito que SNPs na região promotora dos genes de MMPs, podem influenciar os níveis de transcrição e expressão destes em várias doenças, nomeadamente no cancro (Ye 2000).

Na região promotora do gene *MMP-2* (cromossoma: 16q12.2) foram identificados e caracterizados do ponto de vista funcional, dois polimorfismos genéticos: o -1306 C/T (rs 243865) e o -735 C/T (rs 2285053) (Price et al. 2001; Yu et al. 2004). Nas posições -1306 e -735 da região promotora do gene *MMP-2*, ocorre uma transição de uma citosina (C) por uma timina (T), o que faz com que o local de ligação do fator de transcrição *Sp-1*, seja abolido em ambos, e conseqüentemente, a expressão proteica seja diminuída. Assim, a atividade do promotor é mais elevada na presença do haplótipo -1306C/-735C comparativamente ao haplótipo -1306T/-735T (Yu et al. 2004).

No gene *MMP-7* (cromossoma: 11q22.2) foram também identificados dois SNPs na região promotora do gene, na posição -181 ocorre uma transição A/G (rs 11568818) e na posição -153 ocorre a transição C/T (rs 11568819) (Jormsjo et al. 2001). Na literatura encontra-se descrito que ambos os SNPs podem modular a transcrição do gene, uma vez que influenciam a ligação de proteínas nucleares (Jormsjo et al. 2001). Ambos os polimorfismos genéticos na região promotora do gene *MMP-7*, têm sido associados com o aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento de CPNPC (Zhang et al. 2005).

Relativamente ao gene *MMP-9* (cromossoma:20q13.12), o polimorfismo localizado na posição -1562 da região promotora do gene, caracterizado por uma substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) (rs 3918242), tem sido associado

com diferente capacidade de regulação do promotor, sendo que o alelo T está associado com a diminuição da capacidade de ligação de uma proteína supressora de transcrição, levando a um conseqüente aumento da expressão do gene (Zhang et al. 1999b). Na região codificante do gene *MMP-9*, nomeadamente no exão 6, na posição +855, encontra-se descrito outro SNP que se caracteriza por uma substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A), (855 G/A, rs 17576) tendo como consequência funcional a substituição de aminoácidos no codão 279, de uma arginina (Arg) por uma glutamina (Gln) (Zhang et al. 1999a; Hu et al. 2005). Este polimorfismo, é caracterizado por afetar o domínio de ligação ao substrato da enzima MMP-9. Esta transição leva a que haja uma alteração da conformação da proteína, que conduz a uma alteração na ligação ao seu substrato e na capacidade enzimática (Zhang et al. 1999a; Hu et al. 2005).

1.5.3 Inibidores Teciduais de Metaloproteinases - TIMPs

Os TIMPs são uma família de 4 proteínas, TIMP-1, -2-, -3, -4, com aproximadamente 21 kDa de peso molecular e cerca de 184-194 aminoácidos (Jackson et al. 2017). Os TIMPs atuam como antagonistas do efeito proteolítico das MMPs, residindo o seu efeito na estabilização da membrana basal que se torna imune ao efeito das enzimas proteolíticas, quando estão sob influência dos TIMPs. Este facto faz com que a invasão do endotélio pelas células tumorais seja dificultada (Safranek et al. 2007; Shimoda et al. 2016). Os TIMPs são predominantemente sintetizados pelo tecido estromal, no entanto a ligação TIMPs-MMPs na interface células tumorais-células estromais ainda não se encontra completamente esclarecida (Shimoda et al. 2016).

A ativação de MMPs é regulada por vários fatores, como os TIMPs, sendo que o equilíbrio entre as MMPs e os TIMPs, determina a renovação da matriz. Assim o excesso de MMPs ou o défice de TIMPs pode resultar numa excessiva degradação da matriz extracelular (El-Badrawy et al. 2014; Jackson et al. 2016).

Os TIMPs interagem com as pró-formas das MMPs, mas não de uma forma inibitória: TIMP1 ou TIMP3 interagem com a pro-MMP-9 e a TIMP-2 ou TIMP-4 interagem com a pro-MMP-2. Nestes casos, só a parte C- terminal é que é envolvida, deixando o N-terminal para uma ligação com outra MMP (Jackson et al.

2017). A TIMP-2 é a única da família TIMP que interage especificamente na superfície celular quer com a MT1-MMP, quer com a pro-MMP-2 de forma a permitir a ativação da pró-MMP-2 (Bourbouli and Stetler-Stevenson 2010). No entanto, o papel das MMPs e TIMPs no desenvolvimento tumoral parece ser bem mais complexo do que inicialmente se sugeria e os níveis de expressão de alguns TIMPs têm sido associados com o pior prognóstico em cancro (Singh et al. 2010; Ben Nejima et al. 2016). Este fato poderá refletir que algumas das propriedades dos TIMPs ainda são desconhecidas (Foda and Zucker 2001).

Relativamente à TIMP-1, mais de 35 estudos têm associado os níveis mais elevados desta proteína com um pior prognóstico em cancro do pulmão, próstata, mama e outros tipos de cancro (Jackson et al. 2017). Em contraste com o TIMP-1, a TIMP-3 encontra-se silenciada em vários tipos de cancro, sendo que a perda de expressão de TIMP-3 está correlacionada com estadios mais avançados da doença e pior prognóstico em cancro colo-retal, mama e em particular em cancro de cabeça e pescoço (Jackson et al. 2017). Relativamente à TIMP-2 e TIMP-4, existe alguma controvérsia nos estudos efetuados. Contudo, encontra-se demonstrado que a TIMP-2 pode ser epigeneticamente silenciada por hipermetilação do promotor em linhas celulares de cancro da próstata (Pulukuri et al. 2007). De forma contrária, os níveis aumentados de TIMP-2 encontram-se associados com um pior prognóstico em cancro da bexiga (Grignon et al. 1996). Em relação à TIMP-4, encontra-se descrito na literatura que este TIMP tem a capacidade de inibir MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 e MMP-9 (Liu et al. 1997). Por outro lado, estudos de cancro de mama e próstata mostraram um aumento nos níveis proteicos em fase iniciais, mas uma diminuição em fases mais avançadas e em doença mais agressiva (Zhao et al. 2004; Liss et al. 2009). Deste modo, torna-se claro que existe uma grande controvérsia, quanto ao papel que desempenham estas proteínas no desenvolvimento tumoral, podendo existir diferenças consoante o modelo neoplásico em causa (Jackson et al. 2017).

Relativamente aos *TIMPs*, vários polimorfismos genéticos têm sido descritos, como importantes na regulação da expressão destas moléculas, uma vez que podem aumentar ou diminuir a sua atividade, levando a um possível desequilíbrio na razão TIMP/MMP e conseqüentemente influenciar o desenvolvimento e progressão tumoral (Peterson et al. 2009).

No gene *TIMP-2* (cromossoma: 17q25.3) encontra-se descrito na região promotora do gene na posição -2806 uma transição de Timina (T) para uma Citosina (C) (rs4789932), no entanto, pouco se sabe sobre o efeito funcional deste polimorfismo (Rodriguez-Perez et al. 2014).

No gene *TIMP-4* (cromossoma: 3q25.2) encontra-se na região promotora do gene na posição -55 uma transição de Timina (T) para uma Citosina (C) (rs3755724), que pode afetar a produção ou a estabilização funcional da proteína e assim influenciar a suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro (Tsai et al. 2014).

O equilíbrio dos níveis de MMPs/TIMPs é fundamental para a manutenção dos tecidos e para a homeostasia de funções importantes no organismo. Contudo, a desregulação deste balanço poderá indicar situações patológicas, nomeadamente o desenvolvimento tumoral. Assim, levanta-se a questão de poder ser definido um perfil de MMPs/TIMPs em fluidos biológicos que possa ser usado como marcador de diagnóstico de CPNPC ou como fator de prognóstico.

1.6 Linhas Celulares Linfoblásticas (LCLs) como modelo preditivo de resposta à terapia

No CPNPC em estadios avançados, as terapias convencionais são baseadas em quimioterapia e radioterapia, no entanto os resultados não muito promissores. Na última década, existiram vários avanços no estudo das vias moleculares inerentes ao desenvolvimento tumoral, levando ao crescimento de terapias dirigidas, como os inibidores de tirosina cinase (TKis) e anticorpos monoclonais direcionados a moléculas-alvo. Mais recentemente, assiste-se ao desenvolvimento de imunoterapias, com o anti-PD1 e anti-PDL1 (Orozco-Morales et al. 2016; Sukari et al. 2016). No entanto, muitos doentes não respondem a estas terapias dirigidas ou adquirem resistência ao longo do tratamento, existindo sempre algum grau de toxicidade associado, que culminando na progressão rápida da doença ou na obrigatoriedade de alterar o esquema para um melhor tolerado.

Na Era da genómica, tem-se verificado uma mudança de paradigma na genética humana e nas ciências da saúde após a descodificação do genoma humano (Jeon 2014). A capacidade de prever como um doente responderá a um

tratamento específico é o objetivo ambicioso da medicina personalizada, revestindo-se de especial importância numa doença como o cancro do pulmão. Vários estudos demonstram que a constituição genética de um indivíduo desempenha um papel importante na resposta a determinado fármaco (Kasaian and Jones 2011; Lunshof and Gurwitz 2012).

Na última década, as linhas celulares linfoblastóides humanas (LCL's) revelaram-se um modelo *in vitro* muito relevante e útil na procura de marcadores genéticos subjacentes às variações interindividuais na resposta à sensibilidade a fármacos (Sie et al. 2009). Para estudos farmacogenómicos, estas linhas constituem um modelo adequado para a identificação de variantes genéticas associadas com fenótipos farmacológicos (Wheeler and Dolan 2012). As LCLs são células B linfoblastóides transformadas por ação do vírus *Epstein-Barr* (EBV), que podem ser estabelecidas de forma relativamente fácil por infeção pelo EBV, sendo derivadas de linfócitos B recolhidos do sangue periférico dos indivíduos (Hussain et al. 2012). Uma das grandes vantagens da aplicabilidade das LCL ao nível genético, farmacogenómico e em estudos imunológicos é a preservação da informação genética e das características biológicas das células B primárias, durante a geração e manutenção das LCLs (Londin et al. 2011). Vários estudos têm demonstrado que existe uma grande concordância nas sequências de DNA dos linfócitos B e das LCLs, cerca de 99,82%, existindo apenas 0,18% de novas alterações nas sequências de DNA (Londin et al. 2011). Estas células são também importantes para avaliar os níveis de transcrição dos genes, podendo ser úteis para identificar potenciais genes alvo associados a determinados *outcomes* clínicos (Jeon 2014).

O principal objetivo da investigação em farmacogenómica é o conhecimento de genótipos ou transcriptomas baseados em testes preditivos de eficácia/sensibilidade a fármacos e sua toxicidade (Medeiros et al. 2002; Medeiros et al. 2003; Gurwitz and Pirmohamed 2010). Assim têm sido desenvolvidos vários estudos que tentam associar a sensibilidade a determinadas drogas com variantes genéticas e com a expressão de determinados genes nas LCLs. Os ensaios de citotoxicidade nas LCLs representam um bom modelo *in vitro*, para se encontrar variantes genéticas e genes-alvo associados com a resposta a fármacos. A utilização de LCL's, derivadas de doentes submetidos a diferentes regimes terapêuticos, poderá ser um bom modelo preditivo de resposta ao tratamento, permitindo posteriormente testar a sensibilidade de determinado doente à terapia indicada, e evitando perdas de tempo precioso com

terapias que não serão eficazes. Mais ainda, conseguiria também obviar-se a necessidade de tecido tumoral de muito difícil obtenção no cancro do pulmão, para avaliação de marcadores moleculares preditivos de resposta.

A avaliação destes fatores poderá ser uma estratégia promissora na definição de perfis preditivos de resposta aos diferentes agentes quimioterápicos e terapias dirigidas existentes e na aquisição de fenótipos de resistência com impacto quer no intervalo livre de doença, quer na sobrevivência global dos doentes com CPNPC (Catarino et al. 2012). Adicionalmente, permitirá ainda a definição de esquemas de quimioterapia mais adequados e eficazes em doentes específicos, escolhendo aqueles mais propensos a responder, permitindo adequar doses de forma a reduzir os efeitos adversos e estabelecer perfis de segurança com base na genética individual.

Capítulo II

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Compreender o papel dos mediadores inflamatórios e a sua interação na definição de perfis de biomarcadores moleculares associados ao desenvolvimento do CPNPC, e sua repercussão farmacogenómica, de modo a futuramente serem integrados em modelos preditivos de resposta em doentes com CPNPC.

2.2 Objetivos Específicos

1. Realizar uma revisão da literatura de forma a identificar e definir um perfil de mediadores inflamatórios relacionados com o CPNPC a serem alvos de estudo;
2. Avaliar a influência de polimorfismos genéticos nos genes codificantes dos mediadores inflamatórios no desenvolvimento e progressão de CPNPC e a sua influência nos níveis de expressão de mRNA;
3. Quantificar os níveis de expressão de mRNA circulantes dos mediadores inflamatórios no grupo de indivíduos saudáveis e no grupo de doentes com CPNPC;
4. Avaliar a influência dos níveis de expressão de mRNA, quer na capacidade de deteção de indivíduos com CPNPC, quer na sobrevivência dos doentes;
5. Dosear os níveis séricos dos mediadores inflamatórios, no grupo de indivíduos saudáveis e no grupo de CPNPC;
6. Avaliar a influência dos níveis séricos, quer na capacidade de deteção de indivíduos com CPNPC, quer na sobrevivência global no grupo de CPNPC;
7. Realizar testes *in vitro* de sensibilidade, recorrendo a linhas celulares LCL's derivadas de doentes com CPNPC e estabelecer a associação com os níveis de MMPs e TIMPs.

Capítulo III

3.1 Polimorfismos genéticos nos genes codificantes dos mediadores inflamatórios e a sua influência no desenvolvimento e progressão de CPNPC

Após a descodificação do genoma humano foi possível perceber que alterações na sequência de DNA podem ser capazes de explicar diferentes suscetibilidades e diferentes modelos de desenvolvimento tumoral, assim estas variações genéticas poderão ter impacto ao nível da suscetibilidade, do tratamento e do prognóstico. Atendendo à importância que o microambiente tumoral e os mediadores inflamatórios libertados no processo de inflamação desregulada assumem no desenvolvimento e progressão de CPNPC, torna-se essencial compreender de que forma estes mediadores podem estar relacionados com o desenvolvimento e progressão deste modelo neoplásico (Peebles et al. 2007). Acresce, ainda, o facto dos polimorfismos genéticos poderem ser ferramentas biológicas importantes, uma vez que têm a capacidade de condicionar a expressão dos genes em causa, podendo assim alterar a função da proteína.

Desta forma, este capítulo tem por objetivo analisar a influência de polimorfismos genéticos nos genes codificantes dos mediadores inflamatórios IL-6, MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 e TIMP-4 quer na suscetibilidade para o desenvolvimento de CPNPC, quer a sua associação com a sobrevivência global dos doentes com este tipo de neoplasia. Após revisão da literatura foram selecionados nove polimorfismos genéticos: -174G/C (rs1800795) no gene da *IL-6*; -1306C/T (rs243865) e -735C/T (rs2285053) no gene da *MMP-2*; -181A/G (rs11568818) e -153C/T (rs11568819) no gene *MMP-7*; -1562C/T (rs3918242) e R279Q (rs17476) no gene *MMP-9*; -2803T/C (rs4789932) no gene *TIMP-2* e -55T/C (rs3755724) no gene *TIMP-4* (Chetty et al. 2011).

3.2 Material e Métodos

Caracterização da população em estudo

No presente trabalho, foi realizado um estudo do tipo caso- controlo de base hospitalar (CES 352/2012), para o qual foram recrutados 431 indivíduos do norte de Portugal e que eram seguidos no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto). Todos os indivíduos recrutados eram caucasianos e apresentavam um diagnóstico histopatológico de cancro do pulmão, tendo sido considerado fator de exclusão indivíduos com qualquer tipo de doença inflamatória associada ou antecedentes de cancro. Neste grupo de indivíduos foram avaliados vários parâmetros clínico-patológicos, tais como: estadió e tipo histológico do tumor, como descrito na tabela 1. Este grupo apresentava uma média de idade de $63 \pm 10,2$ anos, sendo que o indivíduo mais jovem incluído no estudo teria 30 anos no momento do diagnóstico e o mais velho 87 anos.

Relativamente ao grupo controlo, foram recrutados 203 indivíduos a partir do banco de dadores de sangue do IPO-Porto, sem doença oncológica conhecida e também todos residentes na região norte de Portugal. De forma similar foi considerado fator de exclusão qualquer doença inflamatória associada ou história familiar de cancro. Neste grupo, foram recrutados indivíduos com idades superiores a 40 anos até ao máximo de idade de 65 anos, perfazendo uma média de idades do grupo controlo de $52 \pm 6,1$ anos (Tabela 1).

A todos os indivíduos participantes no estudo foi explicado o objetivo do mesmo e a todos foi pedido o preenchimento e assinatura do consentimento informado, de acordo com os princípios da declaração de Helsínquia. A todos os participantes foi recolhida uma amostra de sangue periférico (8mL) por uma técnica padronizada de colheita intravenosa. A fração de células nucleadas presentes no sangue periférico foi utilizada para a extração de DNA genómico. O isolamento de DNA genómico foi efetuado segundo o *Kit* de extracção de DNA da *Qiagen*[®], *QIAmp*[®] *DNA Blood Mini Kit*, (*Qiagen*[®] 51106) de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante.

Tabela 1: Descrição das características clinicopatológicas do grupo de casos com CPNPC e características gerais do grupo controle.

	Casos (n=431) n (%)	Controlos (n=203) n (%)
Género		
Masculino	338 (78,4)	139 (68,5)
Feminino	93 (21,6)	64 (31,5)
Idade (média±SD)		
	63±10,2 anos	52±6,1 anos
Hábitos tabágicos		
Fumadores/Ex-fumadores	313 (72,6)	88 (43,4)
Não fumadores	114 (26,5)	110 (54,2)
Sem informação	4 (0,9)	5 (2,4)
Histologia		
Epidermóides	165 (38,3)	
Adenocarcinoma	207 (48,0)	
CPNPC	40 (9,3)	
Grandes células	14 (3,2)	
Outros	5 (1,2)	
Estadio		
I	47 (10,9)	
II	30 (7,0)	
III	192 (44,5)	
IV	162 (37,6)	

Genotipagem de polimorfismos genéticos nos genes codificantes de MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2, TIMP-4 e IL-6

Os polimorfismos genéticos nos genes *MMP-2* (-1306C/T e -735C/T), *MMP-7* (-181A/G e -153C/T), *MMP-9* R279Q, *TIMP-2* (-2803T/C) e *TIMP-4* (-55T/C) foram analisados por discriminação alélica, com recurso a PCR em tempo real, usando para essa técnica o sistema *7300 real-time PCR-System (Applied Biosystems®)*. Esta técnica foi realizada utilizando 6 µL de mistura de reação, contendo 1X *master mix (Applied Biosystems®)*, 1X sondas específicas (*Taqman® Genotyping Assay: C__3225943_10* (-1306C/T); *C__26734093_20* (-735C/T); *C__27852953_10* (-181

A/G); C__32018637_10 (-153 C/T); C__11655953_10 (R279Q); C__30364786_10 (-2083 T/C) e C__1417863_10 (-55 C/T) *Applied Biosystems*[®]) e aproximadamente 20 ng de DNA por caso. As condições de amplificação foram as seguintes: 10 minutos a 95°C, seguindo-se 45 ciclos de 92°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para emparelhamento dos *primers* e extensão. A amplificação foi detetada e analisada com recurso ao *software 7300 System Sequence Detection* (versão 1.2.3 *Applied Biosystems*[®]).

Relativamente ao polimorfismo genético -1562C/T no gene *MMP-9*, este foi avaliado pela técnica de PCR-RFLP (*polymorphism chain reaction- restriction fragment length polymorphism*), seguindo o protocolo previamente descrito por *Kubben* e colaboradores (*Kubben et al. 2006*). A técnica consiste em amplificar um fragmento de DNA com 352 pb, que contém a região do polimorfismo em estudo. A reação é realizada num volume de 50 µl e a mistura contém: 5 µL de tampão de reacção de PCR (1x), 1U de Taq DNA Polimerase, (*DreamTaq Green DNA Polymerase (5 U/µL) Thermo Fisher Scientific*[®]), 0,2 mM de dNTPs (dinucleosídeos trifosfato) (*Fermentas, #R0192*) e 0,3 µM de cada um dos *primers* (Forward:ATGGCTCATGCCCGTAATC; Reverse: TCACCTTCTTCAAAGCCCTATT). Nesta mistura de reação, foram submetidos a PCR cerca de 20 ng de DNA de cada caso, o que corresponde a aproximadamente 2 µL de cada amostra.

As condições de amplificação utilizadas foram: pré-desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguida de 38 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 60°C (emparelhamento) e 30 segundos a 72°C (extensão) aos quais se seguiu um passo final de extensão a 72°C durante 10 minutos. A reação foi efetuada num termociclador programável *BioRad*[®].

Para confirmar a correta amplificação dos fragmentos de DNA obtidos e o seu respetivo peso molecular (352 pb), analisaram-se 15 µL do produto de PCR por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com brometo de etídeo (10 µg/mL). Os géis foram preparados em tampão TBE, sendo este também utilizado como tampão de eletroforese. As amostras foram aplicadas no gel e foi utilizado um marcador molecular de 100 pb (*Fermentas #SM0243*). A visualização dos géis foi efetuada recorrendo a um transiluminador *Gel DocXR* (*Biorad*[®]).

Para a análise dos genótipos do polimorfismo genético -1562C/T foram utilizados 10 µL de produto de PCR de cada amostra para a restrição enzimática com 5 unidades da endonuclease *Sph1* (*NewEngland Biolabs*[®], *R0572L*) num

volume final de reação de 15 µL. As amostras foram incubadas a 37 °C, durante 2 horas. O resultado da digestão do fragmento amplificado do gene *MMP-9* contendo o *locus* de interesse foi observado por eletroforese em gel de agarose a 2 % (p/v), corado com brometo de etídeo (10 µg/mL). A digestão do fragmento do gene *MMP-9* resulta em três padrões de bandas, permitindo identificar os diferentes genótipos do polimorfismo: 352 pb, que corresponde ao genótipo CC, três fragmentos de 352, 208 e 144 pb que correspondem ao genótipo CT e dois fragmentos 208 e 144 pb que correspondem ao genótipo TT (Kubben et al. 2006).

Relativamente ao polimorfismo genético -174G/C no gene *IL-6*, este também foi caracterizado por PCR-RFLP, seguindo o protocolo de previamente descrito por Kristiansen e colaboradores (Kristiansen et al. 2003). Foi amplificado um fragmento de 164 pb, que continha a região do polimorfismo a ser estudado. A reação foi realizada nas mesmas condições das descritas anteriores, sendo que os *primers* usados foram (Forward: GCCTCAATGACGACCTAAG; Reverse: TCATGGGAAAATCCCACATT).

As condições de amplificação utilizadas foram: pré-desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C (desnaturação), 45 segundos a 54°C (emparelhamento) e 45 segundos a 72°C (extensão) aos quais se seguiu um passo final de extensão a 72°C durante 7 minutos. A reação foi efectuada num termociclador programável BioRad®. Para confirmar a correta amplificação dos fragmentos de DNA obtidos e o seu respetivo peso molecular (164 pb), analisaram-se 15 µL do produto de PCR por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com brometo de etídeo (10 µg/mL). Os géis foram preparados em tampão TBE, sendo este também utilizado como tampão de eletroforese. As amostras foram aplicadas no gel e foi utilizado um marcador molecular de 100 pb (*Fermentas #SM0243*). A visualização dos géis foi efetuada recorrendo a um transiluminador Gel DocXR (Biorad®).

Para a análise dos genótipos do polimorfismo foram utilizados 10 µL de produto de PCR de cada amostra para a restrição com 5 unidades da endonuclease *NLAIII* (*New England, Biolabs R0125S*) num volume final de reação de 15 µL. As amostras foram incubadas a 37°C, durante 4 horas. O resultado da digestão do fragmento amplificado do gene *IL-6* contendo o *locus* de interesse foi observado por eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v), corado com brometo de etídeo (10 µg/mL). A digestão do fragmento amplificado resulta em três padrões de bandas,

permitindo identificar os diferentes genótipos do polimorfismo -174G/C no gene *IL-6*: 164 pb, que corresponde ao genótipo GG, três fragmentos de 164, 111 e 53 pb que correspondem ao genótipo GC e dois fragmentos 111 e 53 pb que correspondem ao genótipo GG (Kristiansen et al. 2003).

De forma a garantir controlo de qualidade nas metodologias acima descritas foram implementados procedimentos de qualidade como a genotipagem em duplicado em 10% das amostras para ser possível avaliar a confiabilidade da técnica e também foram utilizados controlos negativos para ser possível eliminar falsos positivos. Os resultados foram confirmados por dois investigadores de forma independente.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS (versão 19.0, IBM SPSS Statistics). A análise pelo teste Qui-Quadrado (χ^2) foi utilizada para comparação das diferentes variáveis categóricas. O valor de p foi obtido pelo teste de χ^2 e considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) foi calculado através do teste qui-quadrado de *Pearson* (X^2), por comparação das frequências genóticas observadas vs esperadas. O valor de *Odds Ratio* (OR) indica o risco relativo para determinado acontecimento num estudo do tipo caso-controlo e foi calculado, juntamente com o intervalo de confiança de 95% (IC 95%), para medir a associação entre os diferentes genótipos dos polimorfismos em estudo e o risco para o desenvolvimento de CPNPC. A duração da sobrevivência global foi definida como o intervalo de tempo entre a data de diagnóstico e a data de morte. A sobrevivência global mediana foi estimada pelo método *Kaplan-Meier* e comparada pelo teste de *Log Rank*. Recorreu-se ao modelo de risco proporcional de Cox, de forma a realizar regressões multivariadas, para avaliar a capacidade preditiva independente dos polimorfismos genéticos.

3.3 Resultados

3.3.1 Influência dos polimorfismos genéticos nos genes *MMP-2*, *MMP-7*, *MMP-9*, *TIMP-2* e *TIMP-4* na suscetibilidade para o desenvolvimento de CPNPC

Relativamente aos polimorfismos genéticos no gene *MMP-2*, verifica-se que as frequências genóticas referentes ao polimorfismo -1306C/T, no grupo controlo, são de 67,19% (CC), 28,12% (CT) e 4,69% (TT). No grupo de CPNPC são 52,74%, 35,32% e 11,94%, quanto aos genótipos CC, CT e TT, respetivamente. Foram calculadas as frequências genóticas observadas vs esperadas e os resultados mostram que no grupo de CPNPC existe um desvio ao equilíbrio de HWE (grupo de CPNPC: $p=0,002$; grupo controlo: $p=0,290$).

Quanto ao polimorfismo genético -735C/T as frequências genóticas são de 73,19%, 25,26% e 1,55%, respetivamente para os genótipos CC, CT e TT, no grupo controlo, e 75,43%, 22,11% e 2,46%, respetivamente quanto aos genótipos CC, CT e TT, no grupo de CPNPC. Em relação a este polimorfismo, foram calculadas as frequências genóticas observadas vs esperadas e não se verifica qualquer desvio ao equilíbrio de HWE, sendo que no grupo de CPNPC: $p=0,270$ e no grupo controlo: $p=0,590$. Para ambos os polimorfismos, foram associados os genótipos CT/TT vs CC e os resultados foram analisados de acordo com esta associação. Quanto ao polimorfismo genético -1306C/T, os indivíduos portadores dos genótipos CT/TT apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de CPNPC, quando comparados com os indivíduos portadores do genótipo CC (OR=1,84, IC 95%=1,29-2,62, $p=0,001$). Relativamente ao polimorfismo -735C/T não se verificou nenhuma associação estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos e o risco para o desenvolvimento de CPNPC (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição das frequências genotípicas e a análise de OR no grupo de CPNPC e no grupo controle de acordo com os polimorfismos genéticos -1306 C/T e -735 C/T do gene *MMP-2*

	Grupo Controle n (%)	Grupo de CPNPC n (%)	OR	IC 95%	<i>p</i>
MMP-2 -1306C/T					
CC	129 (67,2)	222 (52,7)	1	referência	
CT/TT	63 (32,8)	199 (47,3)	1,84	1,29-2,62	0,001
MMP-2 -735C/T					
CC	142 (73,2)	307 (75,4)	1	referência	
CT/TT	52 (26,8)	100 (24,6)	0,89	0,60-1,31	0,556

p- valor de *p* obtido pelo teste de χ^2 ; OR- *odds ratio*; IC 95%- intervalo de confiança a 95%

De forma a ser possível avaliar a influência dos polimorfismos genéticos -1306C/T e -735C/T no risco para o desenvolvimento dos diferentes subtipos histológicos, foi realizada uma análise estatística estratificada atendendo ao subtipo histológico: carcinoma epidermóide e adenocarcinoma. De acordo com a estratificação por tipo histológico, observa-se quanto ao polimorfismo genético -1306C/T, os indivíduos portadores dos genótipos CT/TT apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de CPNPC do tipo histológico adenocarcinoma e carcinoma epidermóide, quando comparados com os indivíduos portadores do genótipo CC (OR=1,82, IC 95%=1,21-2,37; *p*=0,004; OR=1,74, IC 95%=1,13-2,68; *p*=0,012, respetivamente) (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição das frequências genótípicas e a análise de OR no grupo de CPNPC e no grupo controle de acordo com os polimorfismos genéticos -1306 C/T e -735 C/T do gene *MMP-2*, atendendo ao tipo histológico

	Grupo Controlo n (%)	Adenocarcinoma n (%)	OR	IC 95%	<i>p</i>
MMP-2 -1306C/T					
CC	129 (67,2)	108 (52,9)	1	referência	
CT/TT	63 (32,8)	96 (47,1)	1,82	1,21-2,37	0,004
MMP-2 -735C/T					
CC	142 (73,2)	146 (73,7)	1	referência	
CT/TT	52 (26,8)	52 (26,3)	0,97	0,62-1,52	0,903
	Grupo Controlo n (%)	Carcinoma Epidermóide n (%)	OR	IC 95%	<i>p</i>
MMP-2 -1306C/T					
CC	129 (67,2)	87 (54,0)	1	referência	
CT/TT	63 (32,8)	74 (46,0)	1,74	1,13-2,68	0,012
MMP-2 -735C/T					
CC	142 (73,2)	117 (75,0)	1	referência	
CT/TT	52 (26,8)	39 (25,0)	0,91	0,56-1,47	0,702

p- valor de *p* obtido pelo teste de χ^2 ; OR- *odds ratio*; IC 95%- intervalo de confiança a 95%

Em relação ao gene *MMP-7*, os polimorfismos genéticos analisados foram o -181A/G e -153C/T. Relativamente ao -181A/G, as frequências genótípicas foram de 39,60%, 40,10% e 20,30%, respetivamente quanto aos genótipos AA, AG e GG, no grupo controle. No grupo de CPNPC as frequências genótípicas observadas foram de 30,53%, 47,84% e 21,63%, respetivamente para os genótipos AA, AG e GG. Foram calculadas as frequências genótípicas observadas vs esperadas e existe um desvio ao equilíbrio de HWE no grupo controle (grupo de CPNPC: $p=0,530$; grupo controle: $p=0,020$).

No que diz respeito às frequências genótípicas do polimorfismo -153A/G, verifica-se que no grupo controle estas são: 87,56% (CC), 11,92% (CT) e 0,52% (TT). No grupo de CPNPC as frequências genótípicas foram de 90,21%, 8,76% e 1,03%, respetivamente para os genótipos CC, CT e TT. Quanto a este polimorfismo verifica-se um desvio ao equilíbrio de HWE no grupo de casos (grupo de CPNPC:

$p=0,004$; grupo controle: $p=0,820$). Para ambos os polimorfismos foi realizada a análise estatística, agrupando os genótipos da seguinte forma: para o polimorfismo genético -181 A/G (AA vs AG/GG) e relativamente ao polimorfismo genético -153C/T análise foi realizado tendo em conta a divisão CC vs CT/TT (Tabela 4). Atendendo os resultados obtidos, verifica-se que os indivíduos portadores dos genótipos AG/GG do polimorfismo genético -181A/G, apresentam um risco aumentado de desenvolverem CPNPC, quando comparados com os indivíduos portadores do genótipo AA (OR=1,50, IC 95%=1,06-2,13; $p=0,022$). Relativamente ao polimorfismo genético -153C/T, não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição das frequências genótípicas e a análise de OR no grupo de CPNPC e no grupo controle de acordo com os polimorfismos genéticos -181 A/G e -153 C/T do gene *MMP-7*

	Grupo Controle n (%)	Grupo de CPNPC n (%)	OR	IC 95%	p
MMP-7 -181A/G					
AA	80 (39,6)	127 (30,4)	1	referência	
AG/GG	122 (60,4)	291 (69,6)	1,50	1,06-2,13	0,022
MMP-7 -153C/T					
CC	169 (87,6)	352 (90,3)	1	referência	
CT/TT	24 (12,4)	38 (9,7)	0,76	0,44-1,31	0,321

p - valor de p obtido pelo teste de χ^2 ; OR- *odds ratio*; IC 95%- intervalo de confiança a 95%

De forma a ser possível avaliar a influência dos polimorfismos genéticos -181A/G e -153C/T no risco para o desenvolvimento dos diferentes subtipos histológicos, foi realizada uma análise estratificada atendendo a estes subtipos. De acordo com os resultados, verifica-se que os indivíduos portadores do genótipo AG/GG do polimorfismo genético -181A/G, apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de CPNPC, do tipo histológico adenocarcinoma (OR=1,64, IC 95%=1,08-2,48; $p=0,019$). No entanto, este risco aumentado não se verifica para o subtipo histológico carcinoma epidermóide (OR=1,20, IC 95%=0,78-1,85; $p=0,393$) (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição das frequências genotípicas e a análise de OR no grupo de CPNPC e no grupo controle de acordo com os polimorfismos genéticos -181 A/G e -153 C/T do gene *MMP-7*, de acordo com o tipo histológico

	Grupo Controle n (%)	Adenocarcinoma n (%)	OR	IC 95%	<i>p</i>
MMP-7 -181A/G					
AA	80 (39,6)	58 (28,6)	1	referência	
AG/GG	122 (60,4)	145 (71,4)	1,64	1,08-2,48	0,019
MMP-7 -153C/T					
CC	169 (87,6)	171 (88,6)	1	referência	
CT/TT	24 (12,4)	22 (11,4)	0,90	0,49-1,68	0,754
	Grupo Controle n (%)	Carcinoma Epidermóide n (%)	OR	IC 95%	<i>p</i>
MMP-7 -181A/G					
AA	80 (39,6)	56 (35,2)	1	referência	
AG/GG	122 (60,4)	103 (64,8)	1,20	0,78-1,85	0,393
MMP-7 -153C/T					
CC	169 (87,6)	137 (92,6)	1	referência	
CT/TT	24 (12,4)	11 (7,4)	0,56	0,27-1,20	0,131

p- valor de *p* obtido pelo teste de χ^2 ; OR- *odds ratio*; IC 95%- intervalo de confiança a 95%

Relativamente aos polimorfismos genéticos estudados no gene *MMP-9* (-1562C/T e R279Q), estes não apresentam desvios ao equilíbrio de HWE (-1562C/T: grupo controle $p=0,710$ e grupo de CPNPC $p=0,530$; R279Q: grupo controle $p=0,060$ e grupo de CPNPC $p=0,400$). As frequências genotípicas observadas para o polimorfismo -1562C/T foram no grupo controle de 77,60%, 21,31% e 1,09%, respectivamente para os genótipos CC, CT e TT. No grupo de casos as frequências foram 74,57% (CC), 23,96% (CT) e 1,47% (TT). Para o polimorfismo R279Q, as frequências foram de 32,99%, 55,15% e 11,86% respectivamente para os genótipos AA, AG e GG, no grupo controle. No grupo de CPNPC, as frequências foram de 39,10%, 48,62% e 12,28%, respectivamente para os genótipos AA, AG e GG. A distribuição das frequências genotípicas e a sua associação com o risco para o desenvolvimento de CPNPC encontra-se descrita na Tabela 6. Segundo a análise estatística efetuada, verifica-se que nenhum dos polimorfismos genéticos está

estatisticamente associado a um risco aumentado para o desenvolvimento de CPNPC (-1562C/T: OR=1,19, IC 95%=0,79-1,80; $p=0,411$; R279Q: OR=0,77, IC 95%=0,53-1,10; $p=0,145$) (Tabela 6). Assim, atendendo aos resultados obtidos para estes polimorfismos não foi realizada a análise estratificada por tipo histológico.

Tabela 6: Distribuição das frequências genóticas e a análise de OR no grupo de CPNPC e no grupo controle de acordo com os polimorfismos genéticos -1562C/T e R279Q do gene *MMP-9*

	Grupo Controle n (%)	Grupo de CPNPC n (%)	OR	IC 95%	p
MMP-9 -1562C/T					
CC	142 (77,6)	306 (74,5)	1	referência	
CT/TT	41 (22,4)	105 (25,5)	1,19	0,79-1,80	0,411
MMP-9 R279Q					
AA	64 (33,0)	157 (39,2)	1	referência	
AG/GG	130 (67,0)	244 (60,8)	0,77	0,53-1,10	0,145

p - valor de p obtido pelo teste de χ^2 ; OR- *odds ratio*; IC 95%- intervalo de confiança a 95%

Relativamente aos genes *TIMP-2* e *TIMP-4*, foram estudados os seguintes polimorfismos genéticos: -2803T/C e -55T/C, respetivamente. As frequências genóticas para o polimorfismo -2803T/C no gene *TIMP-2*, foram de 37,50%, 40,76% e 21,74% respetivamente para os genótipos TT, CT e CC, no grupo controle. No grupo de CPNPC, para os mesmos genótipos as frequências genóticas observadas foram, 35,70%, 48,56% e 15,74%. As frequências observadas vs frequências esperadas foram analisadas e os resultados mostram um desvio ao equilíbrio de HWE no grupo de controle ($p=0,030$), no grupo de CPNPC não se observa qualquer desvio ($p=0,820$).

Para o polimorfismo -55T/C no gene *TIMP-4*, observa-se um desvio ao equilíbrio de HWE no grupo de CPNPC (grupo controle: $p=0,160$; grupo de CPNPC: $p=0,002$). Relativamente às frequências genóticas, para o grupo controle observa-se que para os genótipos TT, CT e CC as seguintes frequências genóticas são as seguintes: 17,65%, 42,78% e 39,57%, respetivamente. Para o grupo de CPNPC, observa-se 16,54%, 39,10% e 44,36%, respetivamente para os genótipos TT, CT e

CC. As frequências genóticas dos polimorfismos em estudo e a sua associação com o risco para o desenvolvimento de CPNPC encontram-se descritas na tabela 7.

Os resultados obtidos indicam que não existe nenhuma associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos -2803T/C e -55T/C nos genes *TIMP-2* e *TIMP-4*, na suscetibilidade para o desenvolvimento de CPNPC (-2803 T/C: OR=1,09, IC 95%=0,75-1,56, $p=0,676$; -55 T/C: OR=1,08, IC 95%=0,68-1,71, $p=0,740$). Desta forma, não foi considerada a análise estatística de acordo com os tipos histológicos, uma vez que não se verificou nenhuma associação de uma forma global (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição das frequências genóticas e a análise de OR no grupo de CPNPC e no grupo controle de acordo com os polimorfismos genéticos -2803T/C do gene *TIMP-2* e -55T/C do gene *TIMP-4*

	Grupo Controle n (%)	Grupo de CPNPC n (%)	OR	IC 95%	p
TIMP-2 -2803T/C					
TT	69 (37,5)	136 (35,7)	1	referência	
CT/CC	115 (62,5)	245 (64,3)	1,09	0,75-1,56	0,676
TIMP-4 -55T/C					
TT	33 (17,7)	66 (16,5)	1	referência	
CT/CC	154 (82,3)	333 (83,5)	1,08	0,68-1,71	0,739

p - valor de p obtido pelo teste de χ^2 ; OR- *odds ratio*; IC 95%- intervalo de confiança a 95%

Por último, e atendendo às funções biológicas das MMPs e TIMPs nos processos de invasão e metastização, foi analisada a associação dos polimorfismos genéticos anteriormente referidos, no risco para metastização à distância. De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que apenas o polimorfismo -153C/T do gene *MMP-7* se encontra associado com o risco de metastização à distância. Assim, os indivíduos portadores dos genótipos CT/TT apresentam um risco de cerca de 2 vezes mais para o desenvolvimento de metástases, em comparação com os indivíduos portadores do genótipo CC (OR= 2,19, IC 95%=1,11-4,30, $p=0,021$) (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição das frequências genóticas e a análise de OR nos estadios I, II, III vs IV grupo de CPNPC de acordo com os polimorfismos genéticos – 1306C/T, -735C/T, -181A/G, -153C/T, -1562C/T, R279Q -2803T/C, -55T/C

	Estadio		OR	IC 95%	p
	I, II,III n (%)	IV n (%)			
MMP-2 -1306C/T					
CC	133 (51,0)	89 (55,6)	1	referência	
CT/TT	128 (49,0)	71 (44,4)	0,83	0,56-1,23	0,352
MMP-2 -735C/T					
CC	188 (74,6)	119 (76,8)	1	referência	
CT/TT	64 (25,4)	36 (23,2)	0,89	0,56-1,42	0,621
MMP-7 -181A/G					
AA	82 (31,5)	45 (28,5)	1	referência	
AG/GG	178 (68,5)	113 (71,5)	1,16	0,75-1,78	0,510
MMP-7 -153C/T					
CC	225 (93,0)	127 (85,2)	1	referência	
CT/TT	17 (7,0)	21 (14,8)	2,19	1,11-4,30	0,021
MMP-9 -1562C/T					
CC	190 (74,2)	116 (74,8)	1	referência	
CT/TT	66 (25,8)	39 (25,2)	0,97	0,61-1,53	0,889
MMP-9 R279Q					
AA	96 (39,2)	61 (39,1)	1	referência	
AG/GG	149 (60,8)	95 (60,9)	1,03	0,66-1,51	0,987
TIMP-2 -2803T/C					
TT	76 (32,6)	60 (40,5)	1	referência	
CT/CC	157 (67,4)	88 (59,5)	0,71	0,46-1,09	0,116
TIMP-4 -55T/C					
TT	42(16,8)	24 (16,1)	1	referência	
CT/CC	208 (83,2)	125 (83,9)	1,05	0,61-1,82	0,857

p- valor de p obtido pelo teste de χ^2 ; OR- odds ratio; IC 95%- intervalo de confiança a 95%

De acordo com o resultado obtido na tabela anterior, foi analisada a influência do polimorfismo genético -153C/T do gene *MMP-7* no risco para metastização à distância, atendendo ao tipo histológico.

Assim, verifica-se que os indivíduos diagnosticados com adenocarcinoma e portadores dos genótipos CT/TT do referido polimorfismo apresentam um risco aumentado de aproximadamente 3 vezes para o desenvolvimento de metástases à distância, quando comparados com os indivíduos portadores do genótipo CC (OR= 2,68, IC 95%=1,15-6,24, $p=0,019$). Quando é analisado o tipo histológico carcinoma epidermóide não se verifica nenhuma associação entre o polimorfismo genético e o risco para o desenvolvimento de CPNPC deste tipo histológico (OR=0,90; IC 95%=0,28-4,35; $p=0,900$) (Tabela 9).

Tabela 9: Distribuição das frequências genotípicas e a análise de OR nos estadios I, II, III vs IV grupo de CPNPC de acordo com os polimorfismos genéticos -153C/T do gene MMP-9, atendendo ao tipo histológico

	Estadio		OR	IC 95%	p
	I, II,III n (%)	IV n (%)			
Adenocarcinoma					
MMP-7 -153C/T					
CC	129 (93,1)	91 (83,5)	1	referência	
CT/TT	9 (6,9)	18 (16,5)	2,68	1,15-6,24	0,019
Carcinoma Epidermóide					
MMP-7 -153C/T					
CC	102 (92,7)	35 (92,1)	1	referência	
CT/TT	8 (7,3)	3 (7,9)	0,90	0,28-4,35	0,900

p - valor de p obtido pelo teste de χ^2 ; OR- *odds ratio*; IC 95%- intervalo de confiança a 95%

3.3.2 Influência dos polimorfismos genéticos nos genes *IL-6*, *MMP-2*, *MMP-7*, *MMP-9*, *TIMP-2* e *TIMP-4* na sobrevivência global dos doentes com CPNPC

De forma a avaliar a influência dos polimorfismos genéticos estudados nos genes *IL-6*, *MMP-2*, *MMP-7*, *MMP-9*, *TIMP-2* e *TIMP-4*, na sobrevivência global dos indivíduos com CPNPC, foi realizado um estudo coorte de base hospitalar nos indivíduos com CPNPC, descritos no ponto anterior.

De acordo com os resultados obtidos, quanto à influência dos polimorfismos genéticos -735C/T e -1306C/T do gene *MMP-2* na sobrevivência global dos doentes com CPNPC, verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre estes polimorfismos genéticos e o *outcome* clínico descrito ((-735C/T: teste *Log Rank* $p=0,196$) e (-1306 C/T: teste *Log Rank* $p=0,672$) (Figura 5)).

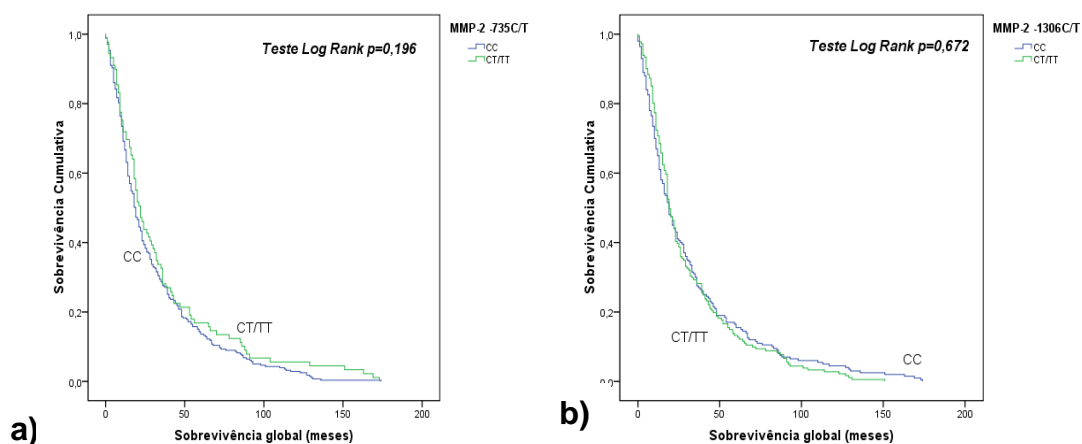


Figura 5: Curvas de sobrevivência global, de acordo com os polimorfismos genéticos a) -735C/T e b) -1306C/T do gene *MMP-2*

Em relação aos polimorfismos genéticos estudados no gene *MMP-7* e a sua influência na sobrevivência global dos doentes com CPNPC, os resultados encontram-se descritos na Figura 6. Contudo, para ambos os polimorfismos genéticos estudados não se verificou nenhuma associação estatisticamente significativa entre estes e as curvas de sobrevivência global dos doentes com CPNPC (-181A/G: teste *Log Rank* $p=0,211$; -153C/T: teste *Log Rank* $p=0,408$) (Figura 6).

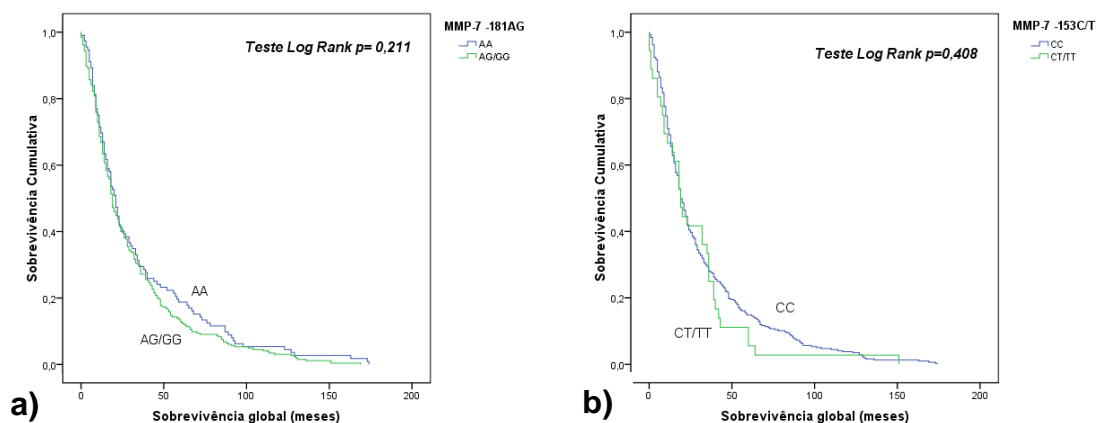


Figura 6: Curvas de sobrevivência global, de acordo com os polimorfismos genéticos **a)** -181A/G e **b)** -153 C/T do gene *MMP-7*

Quanto aos polimorfismos genéticos -1562C/T e R279Q, no gene *MMP-9*, os resultados relativos à influência destes na sobrevivência global dos indivíduos com CPNPC encontram-se na Figura 7. Relativamente aos polimorfismos -1562C/T e R279Q, observa-se que estes não influenciam a sobrevivência global dos doentes com CPNPC (- 1562C/T: teste *Log Rank* $p=0,140$; R279Q: teste *Log Rank* $p=0,563$) (Figura 7).

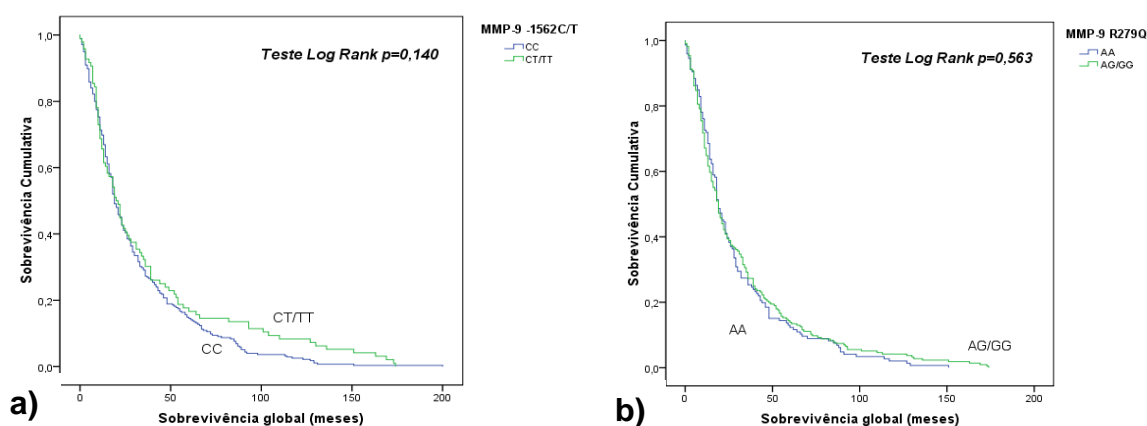


Figura 7: Curvas de sobrevivência global, de acordo com os polimorfismos genéticos **a)** -1562 C/T e **b)** R279Q do gene *MMP-9*

Relativamente aos polimorfismos genéticos -2803T/C e -55T/C respetivamente, nos genes *TIMP-2* e *TIMP-4*, também não se verificou nenhuma associação estatisticamente significativa, entre estes a sobrevivência global dos doentes com CPNPC (teste *Log Rank* $p=0,908$; teste *Log Rank* $p=0,336$, respetivamente) (Figura 8).

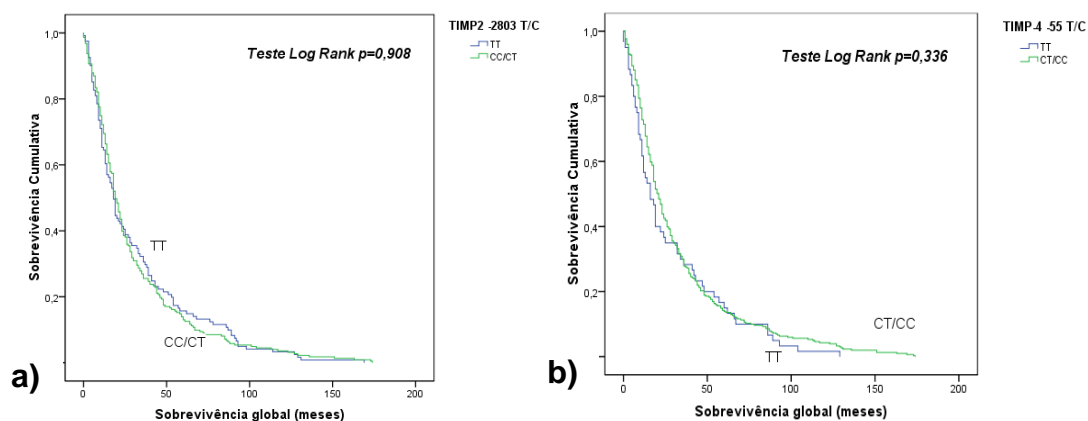


Figura 8: Curvas de sobrevivência global, de acordo com os polimorfismos **a)** -2803T/C do gene *TIMP-2* e **b)** -55T/C do gene *TIMP-4*

Em relação ao polimorfismo -174G/C no gene *IL-6*, este foi avaliado na coorte de doentes com CPNPC. No que diz respeito às frequências genóticas para o referido polimorfismo estas encontram-se distribuídas da seguinte forma: GG (37,62%), GC (54,91%) e CC (7,47%). Para a análise estatística os genótipos foram agrupados mediante o racional biológico deste polimorfismo, assim foram definidos dois grupos: portadores do genótipo CC e portadores dos genótipos GC/GG. De acordo com os resultados obtidos, é possível verificar que os indivíduos portadores do genótipo CC apresentam uma maior sobrevivência global (62,79 meses) comparativamente aos indivíduos portadores dos genótipos GC/GG que sobrevivem em média 42,31 meses, sendo que esta diferença é estatisticamente significativa (teste de *Log Rank* $p=0,032$) (Figura 9).

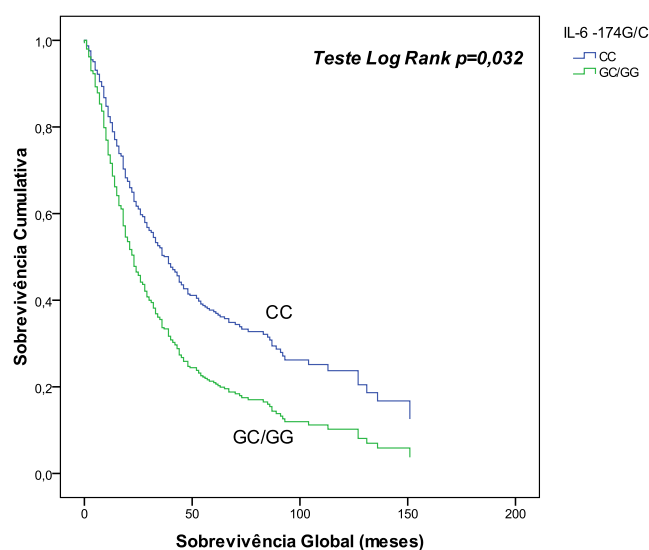


Figura 9: Curvas de sobrevivência global, de acordo com o polimorfismo genético -174 G/C do gene *IL-6*

De forma a avaliar o valor de prognóstico independente do referido polimorfismo na sobrevivência global dos doentes com CPNPC, foi realizada uma regressão multivariada, utilizando um modelo de risco proporcional de Cox, de forma a eliminar as possíveis variáveis de confundimento (género, idade, estadio, tipo histológico e hábitos tabágicos). Na tabela 10 é possível verificar que, atendendo a todas as possíveis variáveis, o polimorfismo -174G/C no gene *IL-6* continua a manter o seu valor de prognóstico independente ($p=0,022$).

Tabela 10: Análise multivariada, utilizando o modelo de regressão de Cox, atendendo a possíveis variáveis de confundimento para a sobrevivência global

	HR	95% CI	p
IL-6 -174 G/C	1,68	1,08-2,63	0,022
Género	0,96	0,67-1,39	0,844
Idade (≥ 63 vs < 63)	0,98	0,79-1,22	0,871
Hábitos tabágicos	1,42	1,00-2,02	0,049
Tipo histológico	0,93	0,81-1,07	0,336
Estadio	2,47	1,97-3,10	$< 0,001$

p - valor de p obtido pelo teste de χ^2 ; HR- hazard ratio; IC 95%- intervalo de confiança a 95%

3.4 Discussão

Após a descodificação do genoma humano, foi possível compreender que diferentes suscetibilidades e diferentes comportamentos de desenvolvimento tumoral poderiam ser explicados por diferenças nas sequências de DNA. Estas diferenças, designadas de polimorfismos genéticos, podem ter repercussões a diferentes níveis (Knudsen et al. 2001). Os polimorfismos genéticos quando localizados na região promotora do gene, podem alterar a atividade transcricional e assim condicionar a expressão genética ou por outro lado, se forem localizados em regiões codificantes, podem em algumas situações levar a uma troca de aminoácidos que por sua vez, poderá conduzir a alterações na proteína (Chorley et al. 2008). Atendendo a que os polimorfismos genéticos podem implicar várias consequências funcionais, que poderão ter impacto no desenvolvimento tumoral e no prognóstico clínico, o estudo destes biomarcadores torna-se uma ferramenta molecular bastante útil para a compreensão do desenvolvimento e progressão tumoral.

Relativamente aos mediadores inflamatórios, MMPs, TIMPs e ILs, vários são os polimorfismos genéticos funcionais descritos nestes genes, sendo que existem vários na região promotora que podem alterar a atividade transcricional do gene, assim como outros que alteram a capacidade funcional das proteínas (Chetty et al. 2011). Alguns dos polimorfismos genéticos descritos nos genes das MMPs, TIMPs e ILs, surgem na literatura como associados com a suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro, ou como biomarcadores que influenciam os *outcomes* clínicos, nomeadamente a sobrevivência global (DeMichele et al. 2003; Beeghly-Fadiel et al. 2008; Gonzalez-Arriaga et al. 2012; Mandal et al. 2014).

No presente estudo os polimorfismos genéticos englobados foram selecionados segundo a estratégia *candidate gene approach*, sendo que foram incluídos polimorfismos genéticos em que a variante menos frequente estivesse presente em pelo menos 10% da população saudável e com um potencial efeito funcional. Todos os polimorfismos selecionados estavam localizados na região promotora do gene, ou em regiões codificantes do mesmo.

Atendendo às premissas descritas anteriormente, foram considerados os polimorfismos genéticos -1306 C/T e -735 C/T na região promotora do gene *MMP-2*. Sendo que se encontra descrito e estabelecido na literatura que ambos os polimorfismos afetam a atividade transcricional do gene, uma vez que o alelo T

suprime o sítio de ligação do fator de transcrição Sp-1, tendo como consequência funcional a diminuição da atividade do promotor deste gene (Price et al. 2001). Assim, coloca-se a hipótese de que os portadores dos genótipos CT/TT tenham uma atividade do promotor diminuída e por sua vez uma menor expressão de *MMP-2*. Tendo em conta a consequência funcional destes polimorfismos genéticos, foi avaliada a sua influência quer no risco para o desenvolvimento de CPNPC, quer na sobrevivência global dos doentes. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os indivíduos portadores dos genótipos CT/TT do polimorfismo -1306 C/T apresentavam um risco acrescido para o desenvolvimento de CPNPC, em comparação com os indivíduos portadores do genótipo CC (OR=1,84; $p=0,001$). Contudo, esta associação é também verificada quando existe uma estratificação por tipo histológico, ou seja os indivíduos portadores dos genótipos CT/TT apresentam um risco para o desenvolvimento quer de adenocarcinomas (OR=1,82; $p=0,004$) quer para o desenvolvimento de carcinomas epidermóides (OR=1,74; $p=0,012$).

Este resultado, aparentemente, sugere uma incongruência com a consequência funcional deste polimorfismo. No entanto, verifica-se que outros autores encontram resultados semelhantes, em que os genótipos associados a uma menor atividade do promotor (CT/TT) estão associados com um risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias, nomeadamente em cancro da bexiga e da próstata (Sharma et al. 2012; Srivastava et al. 2012).

De entre os processos biológicos em que as MMPs estão implicadas, encontra-se descrito que a inflamação e a resposta inflamatória são exemplos desses processos (Manicone and McGuire 2008; Nissinen and Kahari 2014). Encontra-se demonstrado que, em situações em que é necessário uma resposta inflamatória, é fundamental que as células do sistema imunológico se desloquem para o local da inflamação. Para ocorrer este processo de migração, as MMPs são moléculas de extrema importância, uma vez que são responsáveis pela degradação das proteínas da matriz e assim permitem a movimentação das células do sistema imunológico para o local onde são necessárias (Manicone and McGuire 2008). Vários estudos *in vitro* demonstraram que os leucócitos utilizam as MMPs para a degradação das proteínas da matriz de forma a conseguirem a sua movimentação para o local onde são necessários, esta evidência foi também verificada *in vivo* por outros autores (Manicone and McGuire 2008; Coito 2011). As MMPs, nomeadamente as MMP-2 e MMP-9 (ambas pertencentes à classe gelatinases) têm a capacidade de clivar as

junções das células epiteliais (nomeadamente as oclodinas, componentes transmembranares de junções das células epiteliais) e assim permitir o extravasamento das células do sistema imunológico, nomeadamente os leucócitos (Reijerkerk et al. 2006; Nissinen and Kahari 2014). As capacidades da *MMP-2* também são importantes num conceito de vigilância imunológica, pois aquando do início de desenvolvimento tumoral, os leucócitos têm que se deslocar de forma a eliminarem as células tumorais iniciais (Ben-Baruch 2006; Khokha et al. 2013).

Assim, os resultados obtidos podem ser analisados sob o ponto de vista do conceito da vigilância imunológica, ou seja, os indivíduos que possuem os genótipos CT/TT têm menor expressão de *MMP-2*, que por sua vez fará com que possuam uma menor capacidade de degradação da matriz e dos seus componentes. O que em última análise poderá levar a uma menor capacidade dos leucócitos se movimentarem para o local de início do desenvolvimento tumoral, e não conseguirem de forma eficaz e eficiente eliminar as células tumorais iniciais, aumentando assim o risco dos indivíduos portadores dos genótipos CT/TT de desenvolverem neoplasias em consequência de uma resposta imunológica enfraquecida/atenuada.

Relativamente ao polimorfismo -735C/T localizado também na região promotora do gene *MMP-2*, e apesar de a literatura também indicar que os genótipos CT/TT afetam o local de ligação de Sp-1, diminuindo assim a expressão de *MMP-2*, na população em estudo não se verificou nenhuma associação estatisticamente significativa entre este polimorfismo e o risco de desenvolvimento de CPNPC.

Quanto aos polimorfismos genéticos estudados no gene *MMP-7*, ambos localizados na região promotora do gene, encontra-se descrito na literatura que estes apresentam a capacidade de modular a atividade transcricional, influenciando a ligação das proteínas nucleares e alterando a expressão do gene (Jormsjo et al. 2001). Vários têm sido os estudos que associam os genótipos AG/GG do polimorfismo -181 A/G no gene *MMP-7* com o risco para o desenvolvimento de várias neoplasias, nomeadamente CPNPC (Zhang et al. 2005; Sharma et al. 2012). De acordo com os resultados obtidos na população em estudo, os indivíduos portadores dos genótipos AG/GG apresentam um risco para o desenvolvimento de CPNPC, quando comparados com os indivíduos portadores do genótipo AA (OR=1,50; $p=0,022$). Contudo, este risco é também observado quando se realiza

uma análise estratificada por tipo histológico, observando-se que os indivíduos portadores do genótipo AG/GG apresentam um risco de desenvolver CPNPC do tipo histológico adenocarcinoma (OR=1,64; $p=0,019$). No entanto, este risco aumentado não se verifica para o subtipo histológico carcinoma epidermóide (OR=1,20; $p=0,393$).

De acordo com a literatura, estudos *in vitro* demonstraram que a presença do alelo G confere uma maior afinidade para a ligação a proteínas nucleares do que o alelo A, sendo que na presença do alelo G a atividade do promotor é cerca de 2 a 3 vezes superior em comparação com o alelo A (Jormsjo et al. 2001). O aumento da atividade do promotor irá resultar numa elevada expressão de MMP-7, que poderá ter como consequência alterações na sinalização da superfície celular, nomeadamente em processos como a proliferação celular, invasão e apoptose (Yu et al. 2002).

Relativamente ao polimorfismo -153C/T também localizado na região promotora do gene *MMP-7*, verificou-se que este não tinha influência no risco para o desenvolvimento de CPNPC (OR:0,76; $p=0,321$). No entanto, quando se avaliou o risco para metastização à distância, verificou-se que os portadores dos genótipos CT/TT apresentavam um risco de cerca de 2 vezes superior para o desenvolvimento de metástases, em comparação com os indivíduos portadores do genótipo CC (OR= 2,19; $p=0,021$). De acordo com a literatura, o alelo T encontra-se associado com uma maior atividade transcricional do promotor, aumentando a expressão do gene (Jormsjo et al. 2001).

A MMP-7 difere das outras MMPs uma vez que é mais expressa em células tumorais e epiteliais do que em células do tecido estromal (Liu et al. 2007). Existem vários mecanismos pelos quais a MMP-7 pode contribuir para a iniciação tumoral e promoção, nomeadamente pela degradação de componentes não relacionados com a matriz extracelular, como por exemplo, o Fas ligando (estimulador transmembranar de morte celular), TNF- α , IGFBP (*insulin-like growth factor binding protein*) e HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor*), conferindo sinais anti-apoptóticos à célula tumoral (Beeghly-Fadiel et al. 2008; Gialeli et al. 2011).

Por outro lado, a MMP-7 é importante na migração celular, uma vez que tem a capacidade de degradar a E-caderina que está nas junções célula-célula, permitindo uma diminuição da adesão celular e facilitando a migração celular (Manicone and McGuire 2008). De acordo com o descrito, os resultados obtidos neste estudo

encontram-se de acordo com a literatura, uma vez que os polimorfismos estudados se encontram associados a uma maior expressão de *MMP-7*, o que condicionará os processos biológicos inerentes à carcinogénese e à própria progressão tumoral.

Apesar de na literatura se encontrar descrito que os polimorfismos genéticos que foram estudados no gene *MMP-9* têm impacto funcional quer na expressão do gene (-1562C/T) quer na influência da estrutura da proteína (R279Q) e que estes mesmos polimorfismos genéticos estão em vários modelos tumorais associados a um pior prognóstico e uma pior sobrevivência global, na população em estudo não se verificou nenhuma associação estatisticamente significativa (Hu et al. 2005; Scherf et al. 2010; Peng et al. 2010; Sharma et al. 2012). No entanto, é de salientar que as frequências genóticas descritas no presente estudo são semelhantes às encontradas noutras populações europeias (Kubben et al. 2006; Rollin et al. 2007; Mossbock et al. 2010) .

Relativamente aos polimorfismos genéticos estudados nos genes *TIMP-2* (-2083T/C) e *TIMP-4* (-55C/T), não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre estes e o risco para o desenvolvimento de CPNPC, nem para o risco de desenvolvimento de metástases à distância. No entanto, sobre estes dois polimorfismos existem poucos estudos publicados, relacionando a influência destes com o desenvolvimento de cancro ou a sua associação com os *outcomes* clínicos (Rodriguez-Perez et al. 2014; Tsai et al. 2014; Haerian et al. 2015). No entanto, existe um trabalho publicado que, tal como o presente estudo, não encontrou nenhuma associação entre o polimorfismo -2803T/C e a sobrevivência global em doentes com cancro da mama (Peterson et al. 2009).

Quando se avaliou a influência dos polimorfismos genéticos estudados na sobrevivência global dos doentes com CPNPC, verificou-se que apenas o polimorfismo -174G/C no gene *IL-6* é que demonstrou ter influência neste *outcome* clínico. Os indivíduos portadores dos genótipos GC/GG sobrevivem em média 42,31 meses, e os portadores do genótipo CC sobrevivem em média 62,79 meses ($p=0,032$). Este polimorfismo genético, resulta em dois fenótipos diferentes, em que os portadores dos genótipos GC/GG são considerados como tendo um fenótipo de alta produção de IL-6, enquanto os indivíduos que possuem o genótipo CC são considerados como produtores de baixa expressão de *IL-6* (Fishman et al. 1998). De acordo com a literatura, a sobre-expressão de *IL-6* em órgãos específicos, como o pulmão, o cérebro ou fígado, consegue atrair células tumorais em circulação,

promovendo nesses órgãos o estabelecimento e a fixação de metástases (Ara and Declerck 2010). Vários estudos têm demonstrado que níveis elevados de IL-6 no soro estão correlacionados com um pior *outcome* clínico em vários modelos tumorais (Gao et al. 2007; Song et al. 2013).

Na literatura vários têm sido os estudos que encontram uma associação entre os níveis séricos em circulação de IL-6 e os *outcomes* clínicos. Ao nível do cancro do pulmão, vários autores demonstraram que os níveis de IL-6 no soro e outras citocinas podem ter um papel importante na sobrevivência dos doentes com esta neoplasia (Enewold et al. 2009; Crohns et al. 2010). No entanto, este estudo demonstra pela primeira vez que o polimorfismo -174G/C no gene *IL-6* está correlacionado com a sobrevivência global de doentes com CPNPC, uma vez que os indivíduos portadores dos genótipos GC/GG (altos produtores) apresentam uma diminuição na sobrevivência global, quando comparados com os indivíduos portadores dos genótipos CC (baixos produtores), mesmo quando realizada uma análise multivariada para os possíveis fatores de confundimento ($p=0,022$).

Assim, e de acordo com os resultados obtidos, compreende-se que os mediadores inflamatórios podem desempenhar um papel importante quer no risco para o desenvolvimento de CPNPC, quer no risco para o desenvolvimento de metástases à distância ou mesmo na sobrevivência global dos doentes do CPNPC.

Capítulo IV

4.1 Quantificação dos níveis de expressão de mRNA de *MMP-7*, *MMP-9*, *TIMP-2* e *TIMP-4* e a sua relevância em CPNPC

De acordo com a literatura, são vários os estudos que demonstram que os níveis de expressão de mRNA de MMPs e TIMPs podem estar associados com o desenvolvimento e prognóstico de CPNPC (Lichtinghagen et al. 2002; Liu et al. 2007; Safranek et al. 2007; El-Badrawy et al. 2014; Liang et al. 2014). Atendendo às funções biológicas destas moléculas, os níveis de expressão mRNA poderiam ser possíveis biomarcadores de suscetibilidade ou de prognóstico em CPNPC, uma vez que, em situações de neoplasia, estas moléculas podem apresentar oscilações nos níveis de expressão de mRNA, comparativamente a estados fisiológicos sem doença neoplásica.

A grande maioria dos estudos, recorre a amostras biológicas de tecido tumoral, tecido estromal ou células de tecido normal de forma a avaliar a influência dos níveis de expressão de mRNA de *MMPs* e *TIMPs*, nos diversos *outcomes* clínicos, uma vez que estas moléculas podem ser expressas em vários tipos de células (Lichtinghagen et al. 2002). No que diz respeito ao cancro do pulmão, existe uma grande dificuldade em ter acesso a tecido tumoral, uma vez que só os estadios precoces é que realizam cirurgia e, nos casos mais avançados, o material biológico é muito escasso ou a biopsia não é realizada.

Assim, e de forma a tentar ultrapassar esta questão, no presente estudo foram avaliados os níveis de expressão de mRNA dos *MMP-7*, *MMP-9*, *TIMP-2* e *TIMP-4* em circulação no sangue periférico. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos transcritos destes genes quer na capacidade de deteção de indivíduos com CPNPC, quer a sua influência na sobrevivência global.

4.2 Material e Métodos

Caracterização da população em estudo

De forma a ser possível avaliar a influência dos níveis de expressão de mRNA em circulação no sangue periférico de MMPs e TIMPs no desenvolvimento e progressão de CPNPC, foi realizado um estudo do tipo caso-controlo de base hospitalar. Do grupo de indivíduos com CPNPC, descrito no capítulo anterior, foram selecionados os 92 indivíduos que, à data da colheita do sangue periférico, não tinham sido submetidos a nenhum regime de tratamento. Relativamente ao grupo controlo, do grupo descrito anteriormente, foram selecionados 53 indivíduos de forma aleatória. As características clinicopatológicas do grupo de doentes com CPNPC e as características gerais do grupo controlo encontram-se descritas na Tabela 11.

Tabela 11: Descrição das características clinicopatológicas do grupo de casos com CPNPC e características gerais do grupo controle.

	Casos (n=92)	Controlos (n=53)
	n (%)	n (%)
Género		
Masculino	71 (77,2)	17 (32,1)
Feminino	21 (22,8)	36 (67,9)
Idade		
(média±SD)	63±10,7 anos	42±15,0 anos
Hábitos tabágicos		
Fumadores/Ex-fumadores	70 (76,1)	10 (18,9)
Não fumadores	22 (23,9)	42 (79,2)
Sem informação		1 (1,9)
Histologia		
Epidermóides	33 (35,9)	
Adenocarcinoma	46 (50,0)	
CPNPC	11 (11,9)	
Grandes células	1 (1,1)	
Outros	1 (1,1)	
Estadio		
I	3 (3,3)	
II	1 (1,1)	
III	38 (41,3)	
IV	50 (54,3)	

Genotipagem dos polimorfismos genéticos nos genes codificantes de MMPs e TIMPs e IL-6

Esta metodologia encontra-se descrita no capítulo III.

Quantificação dos níveis de expressão de mRNA de MMP-7, MMP-9, TIMP-2 e TIMP-4 no sangue periférico

Após a colheita do sangue periférico de todos os indivíduos participantes no estudo, foi realizado um *pellet* de leucócitos, que foi conservado num reagente de

conservação e isolamento *Tripure* (Roche®). Este reagente é fundamental uma vez que conserva, além de proteínas e DNA, a porção de RNA obtida a partir dos leucócitos. Desta forma, com o auxílio do reagente *Tripure* é possível isolar e separar a fração de RNA. Após esta separação, purificou-se o RNA obtido, utilizando-se para este efeito o kit comercial *GeneJET™ RNA Purification Kit* (Fermentas®). A concentração e pureza da amostra de RNA obtida foi determinada por medição da absorvância a 260 e 280 nm usando o espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000*. As amostras de RNA foram utilizadas para a síntese de cDNA, recorrendo-se ao Kit comercial *High-Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Applied Biosystems®). A quantificação dos transcritos selecionados foi realizada por PCR quantitativo em tempo real no aparelho *StepOne™ PCR*. Cada mistura de reação continha 1X *master mix* (Applied Biosystems®), 1X sondas específicas (*TaqMan® Gene Expression Assays* Hs01042796_m1 MMP-7; Hs00234579_m1 MMP-9; Hs00234278_m1 TIMP-2 e Hs00162784_m1 TIMP-4 - Applied Biosystems®), uma amostra de cDNA e como controlo endógeno foi utilizado o GUSB (Beta Glucuronidase, 433376F, Applied Biosystems®) de forma a normalizar os resultados em relação aos biomarcadores selecionados. A quantificação de mRNA foi efetuada em triplicado e utilizando dois controlos negativos por reação, de forma a garantir a qualidade dos resultados obtidos, precavendo falsos-positivos.

Análise estatística

A análise dos resultados foi realizada com recurso ao *StepOne™ Software v2.2* (Applied Biosystems®). O método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (método de Livak) e o teste *t' de Student* foram usados para avaliar as diferenças nos níveis normalizados de mRNA dos diferentes genes (Livak and Schmittgen 2001). Após ter sido avaliada e verificada a normalidade das médias de ambos os grupos, os valores de *cut-off* utilizados foram calculados com recurso ao *software Cutoff Finder* (Budczies et al. 2012). De acordo, com este *software* foi possível definir as categorias de altos e baixos níveis de expressão de mRNA. A sobrevivência global mediana foi estimada pelo método *Kaplan-Meier* e comparada pelo teste de *Log Rank*. A sobrevivência global foi definida como o intervalo de tempo entre a data de diagnóstico e a data de morte.

4.3 Resultados

4.3.1 Influência dos níveis de expressão de mRNA de MMP-7, MMP-9, TIMP-2 e TIMP-4 na capacidade de detecção de indivíduos com CPNPC

Com o objetivo de avaliar a diferença entre os níveis de expressão das moléculas *MMP-7*, *MMP-9*, *TIMP-2* e *TIMP-4*, no grupo controlo e no grupo de CPNPC, foi avaliada a magnitude da diferença de expressão de mRNA entre estes dois grupos, recorrendo ao método de *Livak*.

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que os transcritos dos genes *MMP-7* e *MMP-9* apresentam níveis de expressão mais elevados no grupo de CPNPC do que no grupo controlo ($p < 0,001$, em ambos os genes). Contrariamente, nos genes *TIMP-2* e *TIMP-4*, verifica-se que os níveis de expressão de mRNA são mais elevados no grupo controlo do que no grupo de CPNPC ($p < 0,001$ e $p = 0,001$, respetivamente) (Figura 10).

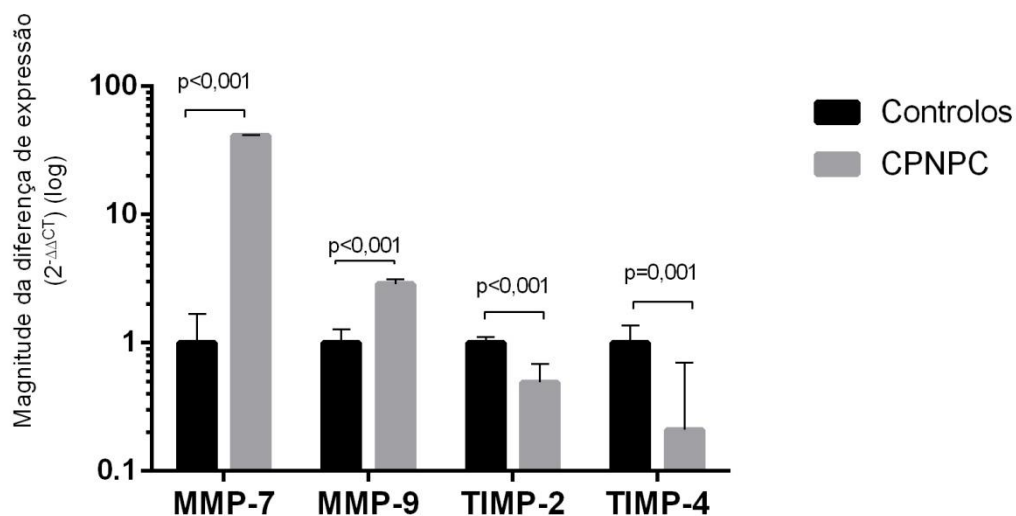


Figura 10: Magnitude da diferença de expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$), dos genes *MMP-7*, *MMP-9*, *TIMP-2* e *TIMP-4* no grupo controlo e no grupo de CPNPC

Atendendo aos resultados apresentados na figura 10, foi realizada uma análise estatística em que se avaliou a influência destes mesmos níveis de expressão na probabilidade de deteção de CPNPC. A divisão entre altos níveis e baixos níveis foi definida de acordo com o *software CuttOff Finder*. Os resultados encontram-se

apresentados na tabela 12, e de acordo com os mesmos verifica-se que os níveis de expressão dos transcritos de *MMP-7*, *MMP-9* e *TIMP-2*, encontram-se associados com a probabilidade de detecção de CPNPC. Observa-se que os indivíduos que têm níveis de expressão mais elevados de *MMP-7* apresentam uma probabilidade aumentada, de cerca de 7 vezes de apresentarem CPNPC, comparativamente aos indivíduos que apresentam baixos níveis de expressão deste transcrito (OR=7,17; IC 95%=1,55-33,20; $p=0,005$). Associado a este teste, foi calculada a sensibilidade e a especificidade, sendo que foram de 55% e 91%, respetivamente.

Cumulativamente, também se observa que os indivíduos que possuem níveis de expressão mais elevados de mRNA de *MMP-9*, exibem uma probabilidade aumentada de cerca de 3,5 vezes de apresentarem CPNPC, quando comparados com os indivíduos com baixos níveis de mRNA deste marcador (OR=3,54; IC 95%=1,60-7,83; $p=0,001$). A sensibilidade para este teste foi de 55% e a especificidade de 64%. Em relação ao *TIMP-2*, observa-se que os indivíduos com elevados níveis de expressão deste mRNA, apresentam uma menor probabilidade para a detecção de CPNPC, em comparação com os restantes indivíduos (OR=0,15; IC 95%=0,05-0,41; $p<0,001$). Neste caso, a sensibilidade foi de 48% e a especificidade foi de 18% (Tabela 12). Relativamente ao *TIMP-4*, não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa.

Tabela 12: Frequência dos níveis de expressão de *MMP-7*, *MMP-9* e *TIMP-2*, no grupo controlo e grupo de CPNPC, e análise de OR, atendendo aos níveis de expressão de mRNA das referidas moléculas

	Grupo Controlo n (%)	CPNPC n (%)	OR	IC 95%	p
MMP-7					
Baixa expressão	15 (88,2)	46 (51,1)	1	referência	
Alta expressão	2 (11,8)	44 (48,9)	7,17	1,55-33,20	0,004 ^a
MMP-9					
Baixa expressão	33 (73,3)	35 (43,7)	1	referência	
Alta expressão	12 (26,7)	45 (56,3)	3,54	1,60-7,83	0,001
TIMP-2					
Baixa expressão	7 (15,9)	22 (56,4)	1	referência	
Alta expressão	37 (84,1)	17 (43,6)	0,15	0,05-0,41	<0,001

p - valor de p obtido pelo teste de χ^2 ; OR- *odds ratio*; IC 95%- intervalo de confiança a 95%; a- teste exato de Fisher

Atendendo à importância das funções que as MMPs desempenham no processo de metastização, foram avaliados os níveis de expressão de mRNA de *MMP-7* e *MMP-9*, consoante os estadios de desenvolvimento tumoral (I,II,III vs IV). De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* encontram-se mais elevados no estadio IV, em comparação com os estadios I,II e III ($p=0,011$) (Figura 11). Relativamente aos níveis de expressão de *MMP-7* verifica-se também que os níveis de expressão de mRNA deste gene são superior no estadio IV, quando comparados com os restantes estadios, no entanto esta diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,613$) (Figura 11).

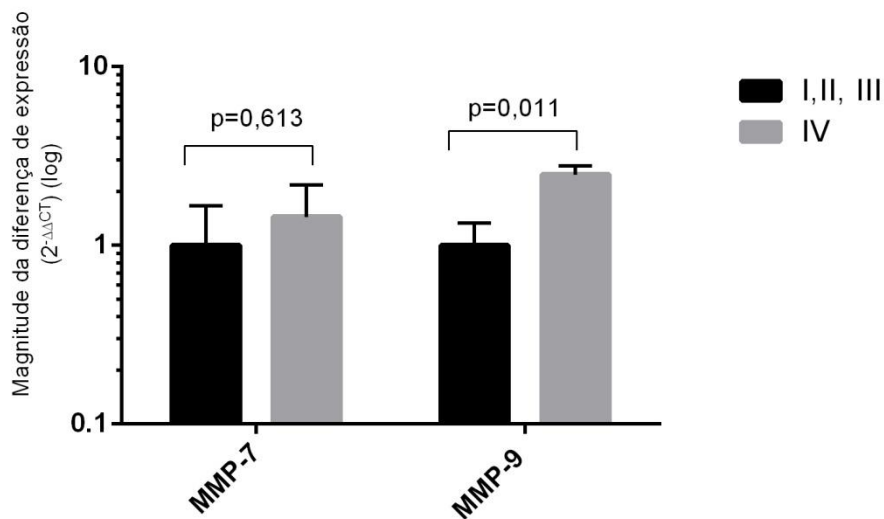


Figura 11: Magnitude da diferença de expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos genes *MMP-7* e *MMP-9*, atendendo à estratificação por estadio (I,II,III vs IV)

4.3.2 Influência dos polimorfismos genéticos nos níveis de expressão de mRNA

Atendendo a que na literatura se encontra descrito que os polimorfismos genéticos nos genes *MMPs* e *TIMPs*, avaliados no capítulo anterior, podem alterar os níveis de expressão de mRNA dos respetivos genes, foi avaliada a influência dos polimorfismos genéticos descritos, nos níveis de expressão de mRNA de *MMPs* e *TIMPs* na população em estudo. De acordo com os resultados, verifica-se que apenas o polimorfismo genético R279Q no gene *MMP-9* está associado com os níveis de expressão de mRNA do mesmo. Desta forma, observa-se que os indivíduos portadores do genótipo AA apresentam também níveis mais elevados de expressão de mRNA de *MMP-9*, em comparação com os indivíduos portadores dos genótipos AG/GG, que possuem níveis de expressão de mRNA mais baixos ($p=0,011$) (Figura 12).

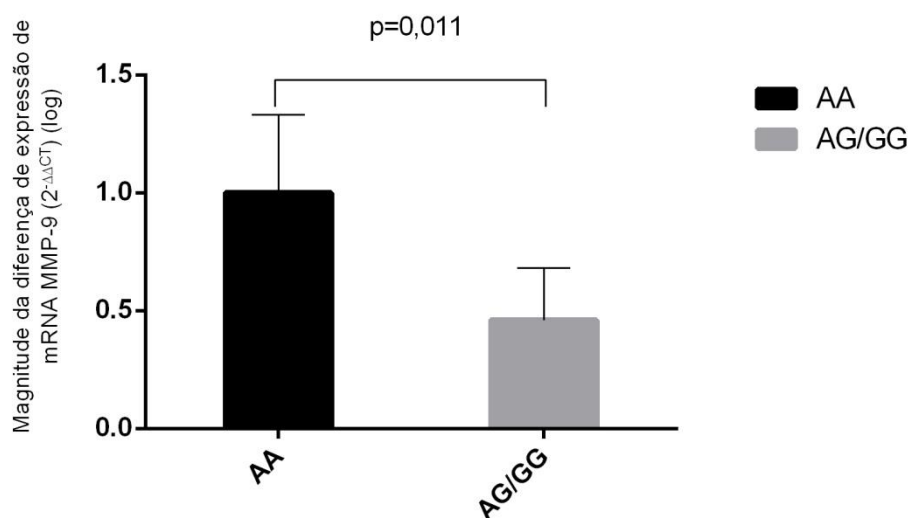


Figura 12: Magnitude da diferença da expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de MMP-9 atendendo aos genótipos do polimorfismo R279Q (AA vs AG/GG)

Com o intuito de avaliar a influência do polimorfismo genético $-174G/C$ no gene *IL-6* na expressão de mRNA de *MMP-9* e *MMP-7*, procedeu-se à avaliação da magnitude da diferença da expressão deste mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$) atendendo aos genótipos do polimorfismo referido (Figura 13). Assim, observou-se que os indivíduos portadores dos genótipos GC/GG (fenótipo de alta expressão de IL-6),

apresentam também níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* mais elevados, do que os indivíduos portadores do genótipo CC (fenótipo de baixa expressão de IL-6), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,036$) (Figura 13a). Quanto aos níveis de expressão de mRNA de *MMP-7*, não se verifica qualquer associação estatisticamente significativa com os genótipos do polimorfismo -174G/C no gene *IL-6* ($p=0,324$) (Figura 13b).

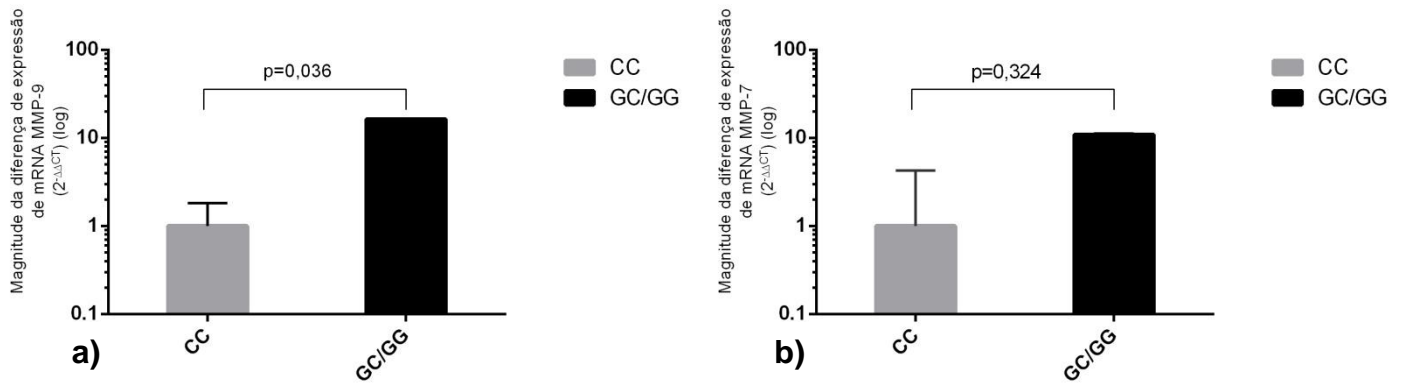


Figura 13: Magnitude da diferença da expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de a) *MMP-9* e b) *MMP-7*, atendendo aos genótipos polimorfismo -174G/C do gene *IL-6*

4.3.3 Influência dos níveis de expressão de mRNA de MMP-7, MMP-9, TIMP-2 e TIMP-4 na sobrevivência global dos doentes com CPNPC

Para avaliar a influência dos níveis de expressão de mRNA de *MMP-7*, *MMP-9*, *TIMP-2* e *TIMP-4* na sobrevivência global dos indivíduos com CPNPC, foi realizado um estudo de coorte de base hospitalar, avaliando o grupo de indivíduos com CPNPC, descrito anteriormente.

Assim, relativamente ao gene *MMP-7*, verifica-se que as diferenças na sobrevivência global dos indivíduos com CPNPC, consoante alta ou baixa expressão de mRNA do gene *MMP-7*, não são estatisticamente significativas (teste *Log Rank* $p=0,070$) (Figura 14a). Contudo, no que diz respeito ao gene *MMP-9*, observa-se que os indivíduos que possuem altos níveis de expressão sobrevivem em média 17,87 meses, enquanto os indivíduos que apresentam baixos níveis de expressão apresentam uma sobrevivência global média de 26,88 meses, sendo que esta diferença é estatisticamente significativa (teste *Log Rank* $p=0,041$) (Figura 14b).

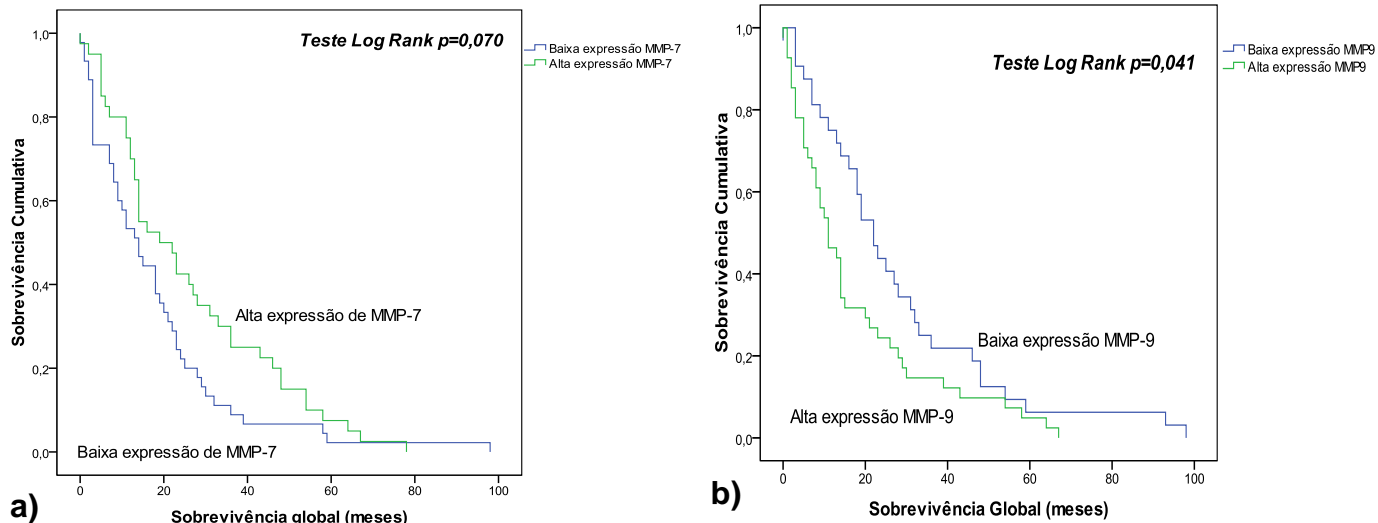


Figura 14: Curvas de sobrevivência global, de acordo com os níveis de expressão (alta e baixa) de a) mRNA do gene *MMP-7* b) mRNA do gene *MMP-9*

Em relação ao *TIMP-2*, não se verifica uma associação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão deste gene e a sobrevivência global dos doentes com CPNPC (teste *Log Rank* $p=0,447$) (Figura 15a). Por fim, foi avaliada a influência dos níveis de expressão de *TIMP-4* na sobrevivência global dos doentes

com CPNPC, e os resultados demonstram que os indivíduos que têm níveis mais baixos de *TIMP-4* sobrevivem em média 11,80 meses em comparação com os indivíduos que possuem níveis mais elevados, que sobrevivem em média 19,33 meses, sendo que esta associação é estatisticamente significativa (teste *Log Rank*, $p=0,022$) (Figura 15b).

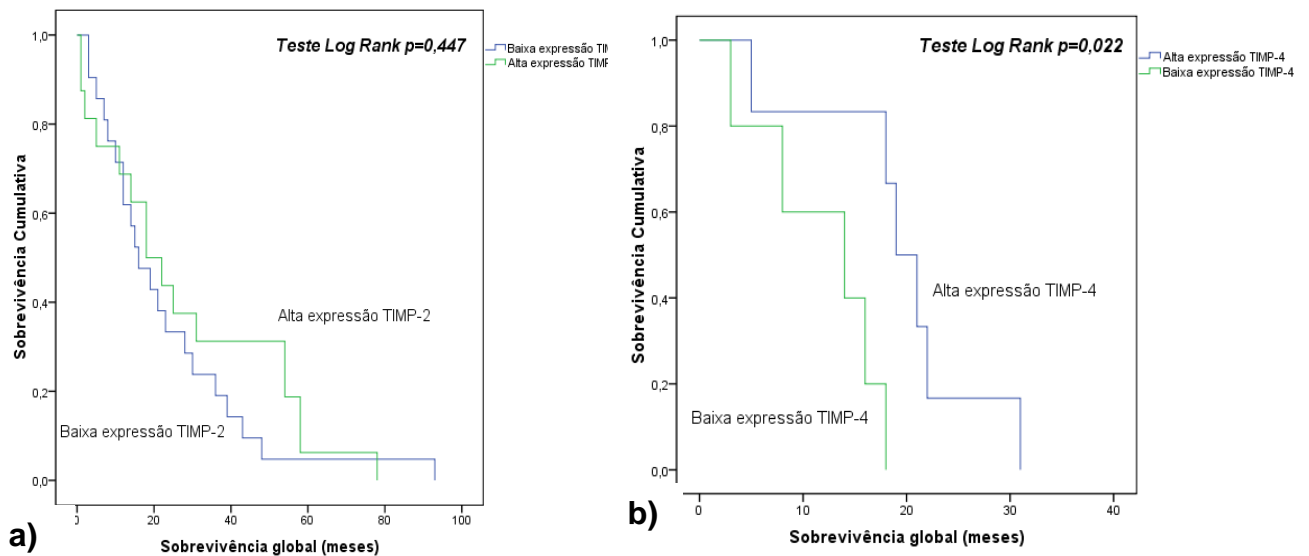


Figura 15: Curvas de sobrevivência global, de acordo com os níveis de expressão (alta e baixa) de **a)** mRNA do gene *TIMP-2* **b)** mRNA do gene *TIMP-4*

Atendendo a que baixos níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* e elevados níveis de expressão de *TIMP-4* conferem melhor sobrevivência global a indivíduos com CPNPC, foi realizada uma análise combinada, considerando o efeito destas moléculas na sobrevivência global. De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que os indivíduos com um perfil de baixa expressão de *MMP-9*/elevada expressão de *TIMP-4*, sobrevivem em média 22,50 meses em comparação com os restantes indivíduos com uma sobrevivência global média de 12,14 meses, sendo que esta diferença é estatisticamente significativa (teste *Log Rank* $p= 0,031$) (Figura 16).

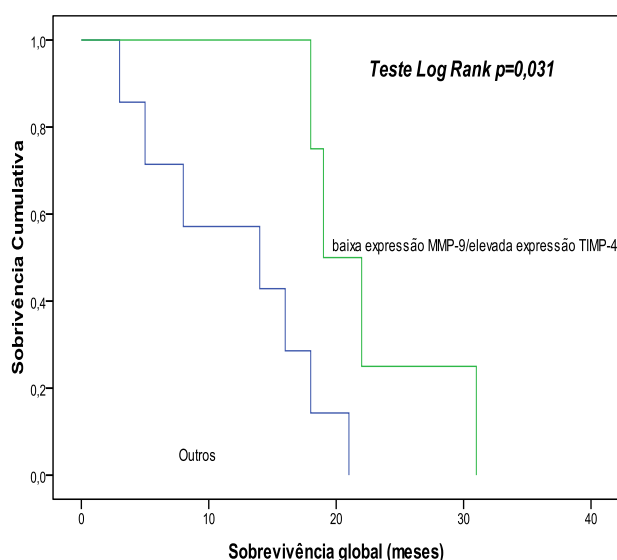


Figura 16: Curvas de sobrevivência global, de acordo com os níveis de expressão mRNA: baixa expressão *MMP-9*/elevada expressão *TIMP-4* vs outros perfis

Considerando o mau prognóstico dos doentes com CPNPC, foi avaliada influência destes biomarcadores na sobrevivência a 1 ano. De acordo com os resultados, verifica-se que apenas os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* influenciam esta sobrevivência, sendo que os indivíduos com baixos níveis de expressão de mRNA de *MMP-9*, sobrevivem 10,41 meses, em comparação com os indivíduos com altos níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* que sobrevivem em média 8,54 meses (teste *Log Rank* $p=0,015$). A análise de regressão multivariada, utilizando um modelo de risco proporcional de Cox, para as variáveis de confundimento - gênero, idade, estadió e tipo histológico, permitiu verificar que indivíduos que apresentam elevados níveis de expressão de mRNA de *MMP-9*, têm um maior risco de morte (HR= 2,55, IC 95%= 1,113-5,837, $p= 0,027$) (Tabela 13).

Tabela 13: Análise multivariada, utilizando o modelo de regressão de Cox, atendendo a possíveis variáveis de confundimento para a sobrevivência a 12 meses

	HR	95% CI	<i>p</i>
mRNA <i>MMP-9</i> (baixos vs altos)	2,55	1,11-5,84	0,027
Gênero	1,01	0,39-2,61	0,988
Idade (≥ 63 vs < 63)	0,99	0,96-1,03	0,631
Tipo histológico	1,62	0,70-3,77	0,260
Estadió	2,80	1,24-6,35	0,014

HR, hazard ratio; IC 95%, intervalo confiança 95%

O índice de concordância C foi utilizado para comparar a capacidade preditiva de morte por CPNPC de diferentes variáveis com significado de prognóstico associadas à sobrevivência. O valor preditivo foi obtido usando o índice de concordância de *Harrel's*, onde um *índice-C* de 1 indica a concordância perfeita (Harrell et al. 1996). Assim, verifica-se que nos modelos 1 e 2 onde só se avalia o estadio tumoral e o tipo histológico, estes apresentam uma capacidade preditiva menor (tipo histológico índice C: 0,524; estadio tumoral-índice C: 0,670), em comparação com o modelo 3 onde se insere conjuntamente o tipo histológico, estadio tumoral e os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9*, onde a capacidade preditiva é mais elevada (índice C: 0,757) (Tabela 14).

Tabela 14: Modelo preditivo de sobrevivência a 12 meses, atendendo as possíveis variáveis com significado de prognóstico.

	HR	95% CI	p	Índice C
Modelo 1				
Tipo histológico	1,14	0,92-1,42	0,233	0,524
Modelo 2				
Estadio tumoral	2,17	1,64-2,88	<0,001	0,670
Modelo 3				
Tipo histológico	0,72	0,40-1,34	0,305	
Estadio tumoral	2,72	1,27-5,87	0,010	0,757
mRNA MMP-9 (baixos vs altos)	2,47	1,09-5,60	0,030	

HR, hazard ratio; IC 95%, intervalo confiança 95%

4.4 Discussão

O equilíbrio entre a biodisponibilidade de MMPs e TIMPs, tem sido discutido ao longo dos últimos anos, e de acordo com as funções descritas, entende-se que só quando existe equilíbrio entre estas duas classes de moléculas é que poderá existir um estado normal, sem nenhuma patologia associada (Chirco et al. 2006). Contudo, situações de desregulação entre estas duas moléculas são verificadas em situações patológicas, como o caso de cancro. Assim, é importante entender como se comportam estas moléculas e qual o seu papel ao nível da carcinogénese e da progressão tumoral, em especial no CPNPC.

Muito se tem descrito sobre o papel dos TIMPs, sendo que de uma forma tradicional são considerados inibidores endógenos da ativação das MMPs, contribuindo para o normal funcionamento do organismo, como a reparação dos tecidos após algum dano, assim como para o desenvolvimento embrionário (Egeblad and Werb 2002; Jackson et al. 2017). No entanto também estão associados a estados patológicos, como doenças cardiovasculares e cancro (Peterson et al. 2009). Atualmente, está esclarecido que as MMPs e TIMPs apresentam funções associadas à promoção da angiogénese, à invasão, ao crescimento tumoral e à metastização (Egeblad and Werb 2002; Cathcart et al. 2015). Sendo que todos estes processos são indispensáveis para o desenvolvimento e progressão tumorais, admite-se que o conhecimento do comportamento das moléculas MMPs e TIMPs, em situações de neoplasia, é de extrema importância para a compreensão do processo de carcinogénese e de todas as etapas inerentes a este processo.

Considerando a importância da informação obtida através dos níveis de expressão de mRNA, surgem na literatura inúmeros estudos que correlacionam os níveis de expressão de mRNA de *MMPs* e *TIMPs* com o prognóstico clínico (Lichtinghagen et al. 2002; Singh et al. 2010; Liu et al. 2010). No entanto, a grande maioria dos estudos recorre a amostras de tecido, quer sejam de tecido tumoral, tecido estromal ou tecido normal. Contudo, no presente estudo foram avaliados os níveis de expressão de mRNA de *MMPs* e *TIMPs* no sangue periférico, uma vez que desta forma seria ultrapassada a dificuldade de obtenção de tecido tumoral de doentes com cancro do pulmão. Neste modelo tumoral a cirurgia só é realizada em estadios iniciais e é a única forma de colheita de amostra biológica, e no presente estudo, à semelhança do que acontece com o estadiamento ao diagnóstico, a

maioria dos indivíduos apresenta-se com doença avançada, dificultando o acesso a amostras de tecido. Em segundo lugar, as biópsias que são realizadas, na maioria dos casos, não têm amostra biológica suficiente para serem usadas em investigação. Assim, e de forma a ultrapassar esta dificuldade, o presente estudo foi realizado recorrendo a sangue periférico, como amostra biológica, permitindo o isolamento de uma fração de mRNA de um modo minimamente invasivo.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que os níveis de expressão de mRNA de *MMP-7* e *MMP-9* encontram-se mais elevados nos doentes com CPNPC comparativamente aos indivíduos do grupo controlo, sendo que estas diferenças são consideradas estatisticamente significativas ($p < 0,001$, para ambos). Em relação às diferenças encontradas nos níveis de expressão de mRNA de *TIMP-2* e *TIMP-4*, observa-se o inverso, ou seja, é nos indivíduos do grupo controlo que os níveis de expressão de mRNA são mais elevados, comparativamente aos indivíduos do grupo com CPNPC, sendo que as diferenças de expressão são também estatisticamente significativas ($p < 0,001$ e $p = 0,001$, respetivamente). Estes resultados encontram-se em concordância com dados apresentados na literatura, uma vez o desequilíbrio entre MMPs/TIMPs é essencial para o desenvolvimento de neoplasias, sendo também crítico para eventos precoces da progressão tumoral (Herszenyi et al. 2012). O equilíbrio fisiológico MMPs/TIMPs é deslocado nos tecidos neoplásicos, uma vez que durante a progressão tumoral, há um aumento da secreção e ativação de MMPs, quer pelas células tumorais, quer pelos fibroblastos associados a tumores, iniciando-se a formação de um microambiente tumoral. A redução de mecanismos inibidores de MMPs pode alterar o balanço MMPs/TIMPs, sendo que desta forma o microambiente tumoral facilita a progressão tumoral, invasão e mesmo a metastização à distância (Deryugina and Quigley 2006; Bourboulia and Stetler-Stevenson 2010; Herszenyi et al. 2012; Langers et al. 2012; Liang et al. 2014; El-Badrawy et al. 2014; Jackson et al. 2017).

De acordo com dados apresentados na literatura, admite-se que a diminuição da expressão de *TIMP-2* e *TIMP-4*, resulte no aumento da atividade de MMPs, aumentando assim o potencial invasivo das células tumorais. Desta forma, a manutenção do balanço entre MMPs e TIMPs aparece como sendo crítica para a supressão da invasão das células tumorais (Zhao et al. 2004).

No presente trabalho, foi também verificado que quer a expressão elevada de *MMP-7*, quer de *MMP-9*, apresentam uma associação estatisticamente significativa

com uma maior probabilidade de uma amostra pertencer a um indivíduo com diagnóstico de CPNPC, quando comparados com níveis baixos de expressão destas moléculas (OR=7,17; $p=0,005$; OR=3,54; $p=0,001$, respetivamente). Pelo contrário, verifica-se que os indivíduos com altos níveis de expressão de mRNA de *TIMP-2*, apresentam uma probabilidade diminuída para a deteção de CPNPC, em comparação com níveis baixos de expressão de mRNA desta molécula (OR=0,15; $p<0,001$).

Os resultados deste trabalho vão de encontro ao proposto por outros autores, indicando um papel importante para as moléculas MMP-7 e MMP-9 no desenvolvimento de neoplasias. Estas moléculas são importantes em inúmeros processos reguladores de adesão celular, diferenciação, divisão e morte celular, invasão e metastização (Liu et al. 2007; Beeghly-Fadiel et al. 2008; Safranek et al. 2009). Relativamente à MMP-7, vários são os mecanismos em que esta molécula pode estar associada e que contribuem de forma significativa para a iniciação tumoral. Assim, num estudo com linhas celulares de carcinoma colo-retal, foi demonstrado que a expressão de *MMP-7* promove a proliferação celular através da ativação do EGFR (Mimori et al. 2004). Adicionalmente, verifica-se também que o índice de proliferação Ki-67 está associado com os níveis de expressão de *MMP-7*, admite-se também que a expressão de *MMP-7*, pode ser regulada através da β -catenina, que por sua vez é uma componente central na via de sinalização Wnt, importante na proliferação celular (Liu et al. 2007; Liang et al. 2014).

Em relação à MMP-9, esta é uma molécula bastante estudada. Apesar de ser uma enzima solúvel, esta molécula consegue ligar-se ao CD44 e ativar a via do TGF- β e assim promover a angiogénese e a transição epitelial-mesenquimal e, por outro lado, pode também subregular a E-caderina, sendo que os mecanismos descritos conferem uma vantagem para a iniciação e progressão tumoral (Gong et al. 2016).

Relativamente, aos resultados relativos à associação dos níveis de expressão de mRNA de *TIMP-2* com a probabilidade de deteção de indivíduos com CPNPC, observa-se que estes são inversos aos encontrados para as MMPs. Os dados apresentados na literatura indicam que a *TIMP-2* funciona como inibidor endógeno quer da angiogénese, quer do crescimento tumoral, efeitos que podem ser dependentes ou independentes da inibição de MMPs (Bourboulija et al. 2013; Han et al. 2014). São conhecidos mecanismos de inibição da proliferação de células

endoteliais e da migração de células tumorais quer *in vitro*, quer *in vivo*, através da ligação da TIMP-2 com o recetor da integrina $\alpha 3\beta 1$ e a ativação de SH-2, que contém a proteína tirosina fosfatase -1 (SHP-1), que suprime a atividade dos receptores de tirosina cinase VEGFR2 e FGFR-1, sobre os seus ligandos VEGF-A e FGF2 (Bourboulia et al. 2013). Por outro lado, foi verificado que a TIMP-2 potencia a expressão de um perfil anti-tumoral, quer *in vitro*, quer *in vivo*, uma vez que tem a capacidade de sobrerregular a E-caderina, aumentando a adesão celular e potenciando a inibição do crescimento celular (Bourboulia et al. 2013).

Em concordância com uma maior probabilidade de deteção de CPNPC, também foi observado que os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* se encontravam mais elevados no estadio IV, em comparação com os estadios mais precoces (I, II,III) ($p=0,011$). De facto, a *MMP-9* apresenta funções nos processos de invasão e metastização, sendo capaz de degradar o colagénio tipo IV, V, VII, IX, elastina, fibrina, fibrinogénio e plasminogénio, facilitando a invasão e metastização das células tumorais (Vandooren et al. 2013; Gong et al. 2016). Assim, a atividade proteolítica das MMPs é requerida para as células tumorais conseguirem degradar as barreiras físicas durante a sua expansão e intravasão para os vasos sanguíneos adjacentes e a extravasão e invasão para os locais à distância (Gialeli et al. 2011).

As MMPs podem ser reguladas por vários mecanismos, um deles é a sua regulação ao nível transcricional, através de polimorfismos genéticos. Esta possível regulação foi avaliada através da análise do impacto dos polimorfismos genéticos descritos no capítulo anterior, nos níveis de expressão de mRNA. De acordo com os resultados verifica-se que apenas o polimorfismo genético R279Q no gene *MMP-9* está associado a diferentes níveis de expressão de mRNA de *MMP-9*. Assim, os indivíduos portadores do genótipo AA, apresentam níveis mais elevados de expressão de mRNA de *MMP-9*, em comparação com os indivíduos portadores dos genótipos AG/GG que possuem níveis de expressão de mRNA mais baixos ($p=0,011$). Este polimorfismo localiza-se nos domínios catalíticos específicos, que têm a capacidade de aumentar a ligação ao substrato, sendo que na literatura alguns autores demonstram que o alelo G se encontra associado a níveis mais baixos de *MMP-9* (Belo et al. 2012; Kamal et al. 2017).

Contudo, é também apresentado na literatura que os níveis de expressão de MMPs poderão ser influenciados por citocinas e quimiocinas presentes no microambiente tumoral (Greenlee et al. 2007). Efetivamente, verificou-se que os

indivíduos portadores dos genótipos GC/GG do polimorfismo genético -174G/C no gene *IL-6*, associados a um fenótipo de elevada expressão desta interleucina, apresentam também níveis mais elevados de expressão de mRNA de *MMP-9*, em comparação com os indivíduos portadores de um fenótipo de baixa expressão de *IL-6* (CC) ($p=0,036$). De facto, estudos *in vitro* demonstram que a expressão de *MMP-9* é sobrerregulada por citocinas pró-inflamatórias (Farina and Mackay 2014). Na literatura, surgem estudos que demonstram que a quimiocina SDF-1/CXCL-12 pode induzir a secreção de *MMP-9*. Um estudo de *Kothari* e colaboradores, demonstrou que a *IL-6* é capaz de induzir a expressão de *MMP-9* nos macrófagos, via dependente ou independente da COX-2 (ciclooxigenase-2), sendo que requer a ativação da via MAPK ^{ERK1/2} (Kothari et al. 2014). Por outro lado, em linhas celulares, foi demonstrado que citocinas pró-inflamatórias como, *IL-1*, *IL-6* e *TNF- α* , sobre regulam a expressão de *MMPs* (Greenlee et al. 2007).

Em relação à influência dos níveis de expressão de mRNA de *MMPs* e *TIMPs* na sobrevivência global dos doentes com CPNPC, verifica-se no presente estudo, que apenas os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* e *TIMP-4* influenciam a sobrevivência destes doentes. De acordo com os resultados obtidos, os indivíduos portadores de altos níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* sobrevivem menos meses do que os indivíduos portadores de baixos níveis expressão de mRNA de *MMP-9* (teste *Log Rank* $p=0,041$). De forma inversa, os indivíduos portadores de altos níveis de expressão de mRNA de *TIMP-4* sobrevivem em média mais meses do que os indivíduos portadores de níveis baixos níveis de mRNA de *TIMP-4* (teste *Log Rank* $p=0,022$). Atendendo a estes resultados, foi avaliada a influência conjunta de baixos níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* e altos níveis de expressão de *TIMP-4*, em comparação com todos os outros perfis. De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que os indivíduos com um perfil de baixo nível de expressão de *MMP-9*/elevado nível de expressão de *TIMP-4* sobrevivem em média, aproximadamente mais 10 meses, do que os indivíduos com os restantes perfis ($p=0,031$). Por último, foi avaliada a influência dos níveis de expressão de mRNA das moléculas estudadas na sobrevivência a 12 meses e verifica-se que apenas os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* influenciam este parâmetro clínico (teste *Log Rank* $p=0,015$). Atendendo a este resultado, foi realizada uma regressão multivariada, utilizando um modelo de risco proporcional de Cox, para as possíveis variáveis de confundimento (género, idade, estadio, tipo histológico) de forma a

avaliar o valor de prognóstico independente dos níveis de expressão de mRNA de *MMP-9*. Foi possível verificar que apesar de todas as variáveis de confundimento, os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* continuam a manter o seu valor de prognóstico ($p= 0,027$). De acordo com o índice-C verifica-se que no modelo onde se insere os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9*, a capacidade preditiva é mais elevada (índice C: 0,757), do que no modelo onde só são inseridas as possíveis variáveis clinicopatológicas (estadio tumoral, índice C: 0,670 e tipo histológico, índice C:0,524). Assim é possível inferir que os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* podem ser considerados possíveis biomarcadores de prognóstico, quando associados a outras características com significado prognóstico, reforçando os resultados anteriores.

Na literatura, são vários os estudos que associam os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* com a sobrevivência global e na grande maioria deles, os níveis mais elevados estão associados a um pior prognóstico (Kallakury et al. 2001; Liu et al. 2010; Gong et al. 2016). Compreende-se que de acordo com as funções da *MMP-9* associadas à progressão tumoral, que níveis mais elevados de mRNA de *MMP-9* estejam associados a um pior prognóstico, nomeadamente a uma menor sobrevivência dos doentes. Noutros modelos tumorais, nomeadamente em cancro colo-retal, também se verifica que níveis mais elevados de expressão de *MMP-9* estão associados a uma menor sobrevivência global. No entanto, os níveis de expressão de *MMP-9*, podem ser condicionados por vários fatores, entre eles as citocinas e outras moléculas. Um estudo de Qian e colaboradores, em CPNPC, demonstrou que a sobre-expressão de *MMP-9* pode ser induzida pela sobre-estimulação de CypA (*cyclophylin A*), esta estimulação é conseguida através do ligando CD147 (Qian et al. 2012).

Em relação ao papel que os TIMPs desempenham no desenvolvimento tumoral, este tem sido bastante discutido nos últimos anos, sem que exista um verdadeiro consenso sobre o papel desempenhado por estas proteínas nos processos relacionados com o cancro. Os TIMPs demonstram papéis diferentes e às vezes opostos nos processos de ativação de MMPs, apoptose, proliferação celular e invasão (Gong et al. 2014). O envolvimento do TIMP-4 na carcinogénese foi descrito recentemente, e os estudos realizados são em poucos modelos tumorais. No entanto, e de forma similar aos outros TIMPs, tem sido descrito como apresentando um papel paradoxal no desenvolvimento tumoral (Jiang et al. 2002;

Lizarraga et al. 2015). Por um lado, foi descrito em carcinoma do endométrio que a expressão no tecido de TIMP-4 estava correlacionada com a invasão do miométrio. Por outro lado, em gliomas, foi verificado que os níveis aumentados de mRNA de *TIMP-4* apresentavam uma correlação negativa com características de malignidade (Groft et al. 2001). No estudo em gliomas, ensaios de invasão *in vitro* mostraram que o TIMP-4 inibiu a formação de estruturas tipo endotélio, induzidas pelo VEGF e bFGF, em géis de fibrina (Groft et al. 2001). Num estudo, *in vitro*, em tumores de Wilms, verifica-se um efeito supressor tumoral, uma vez que o TIMP-4 inibe o crescimento da linha celular G401 em concentrações inferiores às que são requeridas para a inibição de MMPs (Celiker et al. 2001). Em linhas celulares de cancro do colo do útero, verificou-se que a sobre-regulação de TIMP-4 sensibiliza as células à apoptose, através da modulação de proteínas apoptóticas, como o Bcl-2, e em células que expressam TIMP-4, estas também expressam caspase-8, relacionada com a apoptose (Lizarraga et al. 2016). Assim, de acordo com estes estudos pode concluir-se que o TIMP-4 pode apresentar um papel anti-tumorigénico, sensibilizador da apoptose, o que pode explicar os resultados obtidos relativamente à associação dos níveis de expressão deste gene e a sua influência com a sobrevivência global dos doentes com CPNPC.

De acordo, com os resultados obtidos neste capítulo, é possível concluir que os níveis de expressão de *MMP-9* podem ser influenciados por polimorfismos genéticos do mesmo gene, mas também podem ser influenciados por uma sobre-expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o caso da IL-6. É possível concluir também que os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* e *TIMP-4* podem influenciar a sobrevivência global dos doentes com esta neoplasia. Por último, os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* podem ser uma boa ferramenta como preditores de *outcomes* clínicos, quando associados a outros parâmetros com significado de prognóstico.

Capítulo V

5.1 Doseamento dos níveis séricos de MMP-2 e MMP-9: influência no desenvolvimento de CPNPC

De acordo com a literatura e tal como referido anteriormente, as MMPs apresentam a particularidade de serem expressas em vários tipos de células, nomeadamente células tumorais, células do estroma e células inflamatórias, que serão libertadas conjuntamente para o microambiente tumoral. Assim, a avaliação dos níveis séricos destas proteínas poderá ser uma ferramenta bastante útil no conhecimento da biologia tumoral, fornecendo uma melhor indicação do balanço total dos níveis de MMPs no microambiente tumoral (Grobewska et al. 2014).

Na literatura, vários são os estudos que indicam que os níveis proteicos em circulação de MMPs, poderão ter influência quer no desenvolvimento de CPNPC, quer como fator de prognóstico. Sendo que alguns dos estudos indicam que níveis aumentados destas moléculas em circulação estão associados a um pior prognóstico. De acordo com dados apresentados na literatura os níveis proteicos em circulação poderão ser considerados quer possíveis biomarcadores quer de diagnóstico, quer de prognóstico (Laack et al. 2002; Qian et al. 2010; Xu et al. 2016).

Assim, neste capítulo foi avaliada a influência dos níveis séricos de MMP-2, MMP-9, quer ao nível da probabilidade de deteção de indivíduos com CPNPC, quer ao nível da sobrevivência global dos doentes.

5.2 Material e Métodos

Caracterização da população em estudo

Para avaliar a influência dos níveis séricos de MMP-2 e MMP-9 no desenvolvimento de CPNPC, foi desenhado um estudo do tipo caso-controlo de base hospitalar. Assim, no grupo de casos descrito no capítulo III, foram selecionados 147 indivíduos com diagnóstico de CPNPC, sem que tivessem nenhuma intervenção terapêutica, todos seguidos no IPO-Porto e residentes no Norte de Portugal. Relativamente aos indivíduos do grupo controlo, estes também foram selecionados do grupo descrito no capítulo III (n=33). A todos os indivíduos que aceitaram participar no estudo, foi pedido que assinassem o consentimento informado, de acordo com a declaração de Helsínquia. A todos os indivíduos que participaram no estudo foi colhida uma amostra de sangue periférico (8 mL), em tubos serológicos, por uma técnica padronizada de colheita intravenosa. As principais características de ambos os grupos encontram-se descritas na tabela 15.

Tabela 15: Descrição das características clinicopatológicas do grupo de casos com CPNPC e características gerais do grupo controle.

	Casos (n=147)	Controlos (n=33)
	n (%)	n (%)
Género		
Masculino	32 (21,8)	26 (78,8)
Feminino	115 (78,2)	7 (21,2)
Idade		
(média±SD)	63±10,7 anos	58±4,5 anos
Hábitos tabágicos		
Fumadores/Ex-fumadores	109 (74,1)	26 (78,8)
Não fumadores	35 (23,8)	7 (21,2)
Sem informação	3 (2,1)	
Histologia		
Epidermóides	55 (37,4)	
Adenocarcinoma	72 (48,9)	
CPNPC	16 (10,9)	
Grandes células	2 (1,4)	
Outros	2 (1,4)	
Estadio		
I	8 (5,5)	
II	3 (2,0)	
III	66 (44,9)	
IV	70 (47,6)	

Genotipagem do polimorfismo genético -174G/C no gene IL-6

Esta metodologia encontra-se descrita no capítulo III.

Doseamento dos níveis séricos de MMP-2 e MMP-9

Após a colheita de sangue periférico, a fração de soro do sangue total foi separada por técnica de centrifugação durante 10 min a 2500 rpm. Assim, o soro foi recolhido e conservado a -80°C até posterior análise. Posteriormente este material biológico foi usado para o doseamento das proteínas descritas anteriormente, recorrendo-se à técnica de ELISA (ensaio de imunoabsorvância enzimática), utilizando-se kits comerciais: *Human MMP-2 DuoSet DY902*; *Human MMP-9 DuoSet DY911 da R&D Systems*®.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS (versão 19.0, IBM SPSS Statistics). Os valores de *cut-off utilizados* foram calculados com recurso ao *software Cutoff Finder* (Budczies et al. 2012). Os valores de *P* foram calculados por testes não paramétricos - *Mann Whitney Test*. A sobrevivência global mediana foi estimada pelo método *Kaplan-Meier* e comparada pelo teste de *Log Rank*. A duração da sobrevivência global foi definida como o intervalo de tempo entre a data de diagnóstico e a data de morte.

5.3 Resultados

5.3.1 Influência dos níveis séricos de MMP-2 e MMP-9 na capacidade de detecção de indivíduos com CPNPC

A primeira análise que foi realizada consistiu em avaliar as diferenças dos níveis proteicos em circulação no grupo controlo e no grupo de CPNPC. Deste modo, verifica-se que a mediana dos níveis séricos das proteínas em estudo é mais elevada no grupo de indivíduos com CPNPC do que no grupo controlo. Assim, a mediana dos níveis séricos de MMP-2 no grupo controlo é 6000 pg/mL (1000 pg/mL-17000 pg/mL) e no grupo de CPNPC é de 27000 pg/mL (1000 pg/mL-49000 pg/mL) ($p=0,010$). Em relação aos níveis séricos de MMP-9, observa-se que no grupo controlo a mediana é de 414 pg/mL (119 pg/mL-2775 pg/mL) e no grupo de indivíduos com CPNPC a mediana dos níveis séricos foi de 2334 pg/mL (340 pg/mL-7279 pg/mL) ($p<0,001$) (Figura 17).

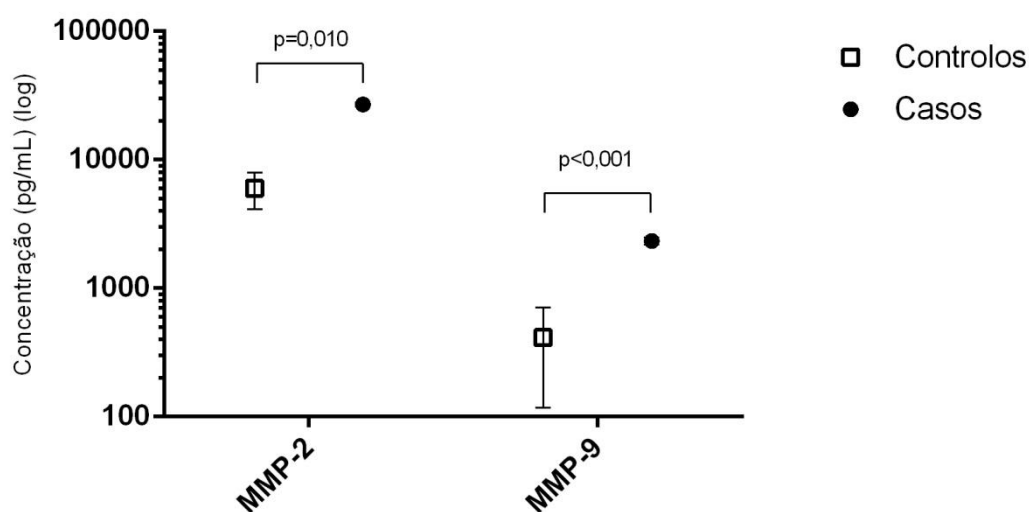


Figura 17: Concentração mediana (pg/mL) dos níveis séricos das proteínas MMP-2 e MMP-9 no grupo controlo e grupo de CPNPC

Após terem sido verificadas estas diferenças, foi avaliado se os níveis proteicos poderiam influenciar a probabilidade de detecção de CPNPC. Foram definidas duas categorias: níveis sérico baixos vs níveis séricos elevados. Os valores de *cut off* utilizados de forma a serem definidas as categorias referidas foram as seguintes: MMP-2 (25500 pg/mL) e MMP-9 (2185 pg/mL), definidos com recurso ao *software*

CuttOff Finder. De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que níveis elevados em circulação das proteínas MMP-2 e MMP-9 encontram-se associados com uma probabilidade aumentada de deteção de CPNPC. Assim, indivíduos que possuem níveis elevados de MMP-2, manifestam uma probabilidade aumentada de cerca de 11 vezes de apresentarem CPNPC, quando comparados com os indivíduos que apresentam níveis de séricos mais baixos desta proteína (OR= 11,56; IC 95%= 3,38-39,58; $p < 0,001$). Para esta análise foi avaliada a sensibilidade e especificidade, sendo de 97% e de 75%, respetivamente.

Em relação à MMP-9, observa-se que os indivíduos que possuem níveis mais elevados desta proteína em circulação, apresentam uma probabilidade aumentada de cerca de 45 vezes de apresentarem um CPNPC, quando comparados com os indivíduos que apresentam níveis mais baixos desta proteína (OR=45,65; IC 95%=7,65-155,58; $p < 0,001$). A sensibilidade é de 99% e a especificidade é de 25% (Tabela 16).

Tabela 16: Frequência dos níveis proteicos em circulação de MMP-2, MMP-9, no grupo controlo e grupo de CPNPC, e análise de OR, atendendo aos níveis de proteicos

	Grupo Controlo n (%)	CPNPC n (%)	OR	IC 95%	<i>p</i>
MMP-2					
Baixos níveis	31 (91,1)	67 (47,2)	1	referência	
Altos níveis	3 (8,9)	75 (52,8)	11,56	3,38-39,58	<0,001 ^a
MMP-9					
Baixos níveis	29 (96,7)	54 (38,9)	1	referência	
Altos níveis	1 (3,3)	85 (61,1)	45,65	7,65-155,58	<0,001 ^a

p- valor de *p* obtido pelo teste de χ^2 ; OR- *odds ratio*; IC 95%- intervalo de confiança a 95% ^a- teste exato de Fisher

De forma a avaliar a distribuição dos níveis séricos de MMP-2 e MMP-9, consoante o estadio tumoral, analisaram-se os níveis séricos destas moléculas no estadio I,II e III vs IV. Na população em estudo, verifica-se que os níveis séricos de ambas as moléculas se encontram mais elevados no estadio IV em comparação com os estadios I,II e III (MMP-2: $p=0,006$; MMP-9: $p=0,001$) (Figura 18).

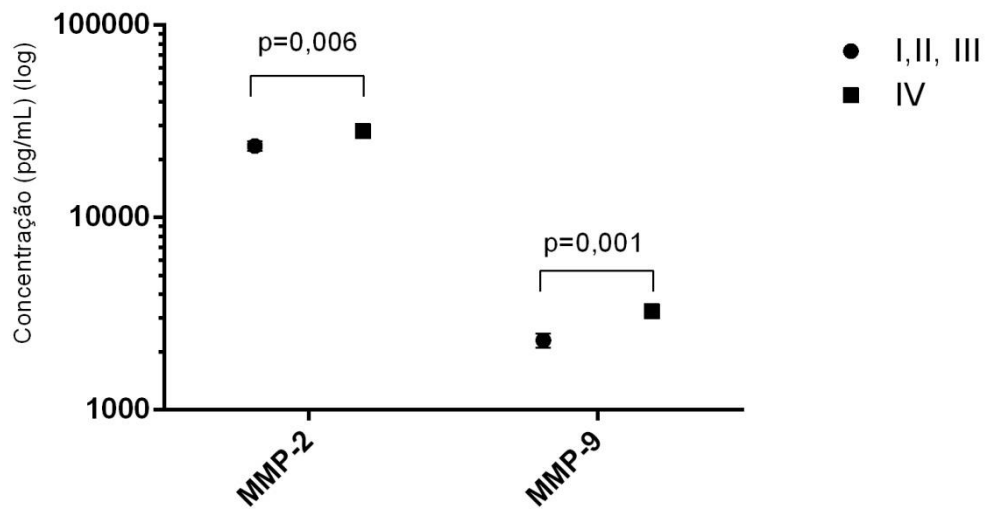


Figura 18: Concentração mediana (pg/mL) dos níveis séricos das proteínas MMP-2, MMP-9, de acordo com os estádios I,II,III versus IV

5.3.2 Influência de polimorfismo genético -174G/C no gene IL-6 nos níveis séricos de MMP-2 e MMP-9

Tal como referido anteriormente, os genótipos GC/GG do polimorfismo genético -174G/C encontram-se associados a um fenótipo de elevada produção de IL-6. Os indivíduos portadores destes genótipos apresentam também níveis proteicos em circulação mais elevados de MMP-9, quando comparados com os indivíduos portadores do genótipo CC, que apresentam níveis mais baixos de MMP-9 em circulação ($p=0,046$) (Figura 19b). Em relação aos níveis séricos de MMP-2, e de acordo com os resultados obtidos neste estudo, os níveis desta molécula parecem não ser influenciados pelos genótipos do polimorfismo -174 G/C do gene *IL-6* ($p=0,459$) (Figura 19a).

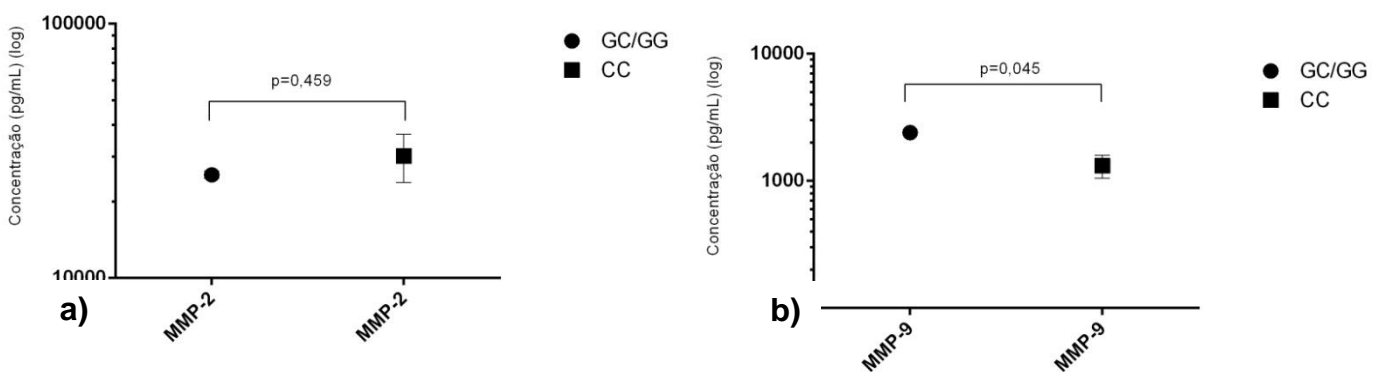


Figura 19: Concentração mediana (pg/mL) dos níveis séricos das proteínas **a)** MMP-2 e **b)** MMP-9, atendendo aos genótipos de IL-6 (CC vs GC/GG)

5.3.3 Influência dos níveis séricos de MMP-2 e MMP-9 na sobrevivência global dos doentes com CPNPC

De forma a avaliar a influência dos níveis séricos de MMP-2 e MMP-9 (níveis altos e baixos, definidos na secção anterior) na sobrevivência global dos indivíduos com CPNPC, foi realizado um estudo de coorte de base hospitalar dos indivíduos com CPNPC descritos anteriormente.

De acordo com os resultados, observa-se que os níveis séricos de MMP-2 não influenciam a sobrevivência dos doentes com CPNPC (teste *Log Rank* $p=0,374$) (Figura 20).

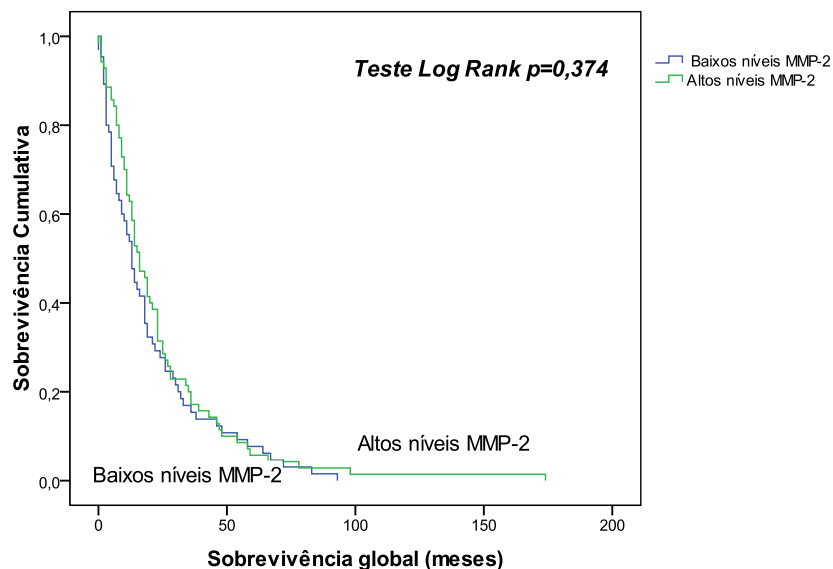


Figura 20: Curvas de sobrevivência global, de acordo com os níveis proteicos (altos e baixos) de MMP-2

Por outro lado, os níveis séricos de MMP-9 encontram-se associados com a sobrevivência global dos doentes, uma vez que os indivíduos com níveis séricos mais elevados vivem em média 17,74 meses, enquanto os indivíduos com níveis mais baixos de MMP-9 sobrevivem em média 26,42 meses, sendo esta diferença estatisticamente significativa (teste *Log Rank* $p=0,045$) (Figura 21).

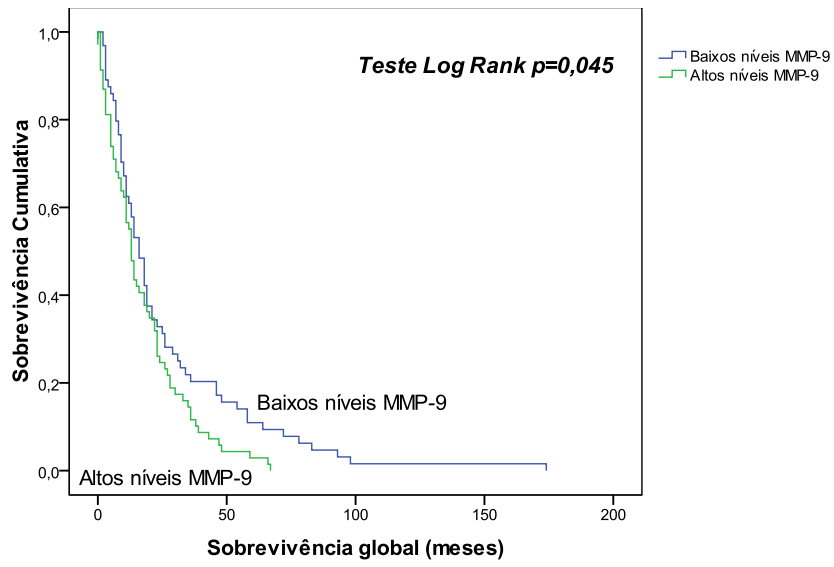


Figura 21: Curvas de sobrevivência global, de acordo com os níveis proteicos (altos e baixos) de MMP-9

5.4 Discussão

A atualização do conhecimento ao longo dos últimos anos tem reforçado o importante papel que as MMPs desempenham na biologia tumoral. No entanto, ainda existe alguma controvérsia sobre a influência destas moléculas em alguns modelos tumorais (Egeblad and Werb 2002).

De acordo com a literatura, várias são as células com capacidade de expressar as MMPs, nomeadamente fibroblastos, macrófagos, monócitos, células dendríticas, entre outras (Grobewska et al. 2014). No entanto, todas as MMPs são expressas na sua forma inativa, tendo que ser ativadas para a sua função ser efetiva. Assim, torna-se também relevante avaliar qual o papel dos níveis séricos das MMPs ativas em circulação e qual a sua influência no desenvolvimento e progressão tumoral.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os níveis proteicos em circulação de MMP-2 e MMP-9 encontram-se mais elevados nos indivíduos do grupo de CPNPC, comparativamente aos indivíduos do grupo controlo, sendo estas diferenças estatisticamente significativas (MMP-9, $p < 0,001$; MMP-2 $p = 0,010$). Adicionalmente a este resultado, observa-se também que os níveis séricos de MMP-2 e MMP-9, estão associados a uma probabilidade aumentada de detetar indivíduos com CPNPC ($p < 0,001$, para ambas as moléculas).

Em relação aos níveis séricos de MMP-2 e MMP-9 estarem mais elevados no grupo de CPNPC, em comparação ao grupo controlo, este resultado encontra-se de acordo com as funções que estas MMPs desempenham na carcinogénese, uma vez que ambas pertencem ao grupo das gelatinases, que têm como função a degradação de componentes da matriz extracelular, nomeadamente colagénio e elastina (Foda and Zucker 2001). Contudo, a MMP-2 parece ser especialmente relevante, uma vez que a mais amplamente secretada e é expressa de forma constitutiva pela maioria das células, incluindo células endoteliais e epiteliais (Foda and Zucker 2001). Esta MMP tem ainda a capacidade de quebrar a proteína de ligação ao IGF, que é conhecido como tendo um forte efeito na estimulação da proliferação celular e inibição da apoptose (Zhou et al. 2005). Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com outros autores, uma vez que é descrito na literatura que a sobre-expressão de MMP-2 tem sido detetada em lesões pré-malignas e em estadios iniciais de cancro, o que indica que esta MMP poderá estar associada a eventos iniciais da carcinogénese (Zhou et al. 2005). Estudos

realizados em cancro do pulmão têm descrito que os níveis aumentados de MMP-2 estão presentes tanto nas células tumorais como no tecido estromal (Qian et al. 2010).

Relativamente aos níveis séricos de MMP-9, estes resultados encontram-se de acordo com outros trabalhos que também estudam doentes com cancro do pulmão, em que se observa que os níveis mais elevados de MMP-9 no soro, encontram-se normalmente associados a doentes com CPNPC, quando comparados com indivíduos saudáveis (Laack et al. 2002; Xu et al. 2016). Em relação aos níveis proteicos em circulação de MMP-9 estarem correlacionados com uma probabilidade aumentada para a deteção de indivíduos com CPNPC, é possível colocar a hipótese de que os níveis proteicos desta molécula possam ser considerados possíveis biomarcadores de diagnóstico para CPNPC, uma vez que quer o resultado deste trabalho, quer o de outros autores, nomeadamente de Xu e colaboradores, demonstram que a avaliação dos níveis séricos de MMP-9 pode ser uma ferramenta útil na deteção de casos de CPNPC. (Xu et al. 2016). Efetivamente, um estudo *in vitro* de Cai e colaboradores, em linhas celulares cancro do pulmão, demonstrou que uma correlação da URGCP (*up-regulator of cell proliferation*) e a da MMP-9, sendo que ambas se encontravam sobrerreguladas, nestas linhas celulares. Este estudo demonstrou que a URGCP ativa a via de sinalização NF- κ B, resultando no direto aumento de expressão de MMP-9, o que promove uma capacidade mais invasiva em cancro do pulmão (Cai et al. 2015). Adicionalmente este estudo demonstrou ainda que o silenciamento de UGRCP em linhas celulares de CPNPC, mostra um efeito terapêutico *in vivo*, resultando na supressão quase completa de metástases à distância, indicando que o URGCP é importante na regulação de MMP-9 (Cai et al. 2015). Este dado da literatura vai de encontro com os resultados deste trabalho, relativos à associação dos níveis proteicos de MMP-2 e MMP-9 com os estadios tumorais (I,II,III vs IV), em que se demonstra que os níveis séricos de ambas as moléculas se encontram mais elevados no estadio IV comparativamente com os estadios I, II, III ($p=0,006$, $p=0,001$, respetivamente), ou seja um estadio com características mais invasivas e mais agressivas. Ainda relativamente, aos níveis séricos de MMP-9, verifica-se que níveis elevados desta proteína no soro se encontram correlacionados com uma menor sobrevivência global dos doentes com CPNPC, quando comparados com os indivíduos com baixo níveis proteicos em circulação ($p=0,045$). A associação dos níveis proteicos em circulação de MMP-9,

com a sobrevivência global poderá ser explicada pelas funções que a MMP-9 desempenha, na degradação do colagénio tipo IV, V, VII, IX, elastina, fibrina, fibrinogénio e plasminogénio, facilitando a invasão e metastização das células tumorais (Gong et al. 2016). Ainda neste capítulo também se verificou que o polimorfismo genético -174G/C no gene *IL-6* influencia os níveis séricos de MMP-9. Assim, verifica-se que os indivíduos portadores dos genótipos GC/GG (fenótipo de alta produção de IL-6), apresentam também níveis mais elevados no soro de MMP-9, quando comparados com os indivíduos portadores do genótipo CC que apresentam níveis em circulação de MMP-9, mais baixos ($p=0,046$). Este resultado, vai de encontro ao demonstrado e explicado no capítulo anterior sobre a influência das citocinas, nomeadamente IL-6, na expressão de MMP-9. Assim, este resultado além de reforçar o descrito no capítulo anterior, demonstra que a IL-6 também pode condicionar os níveis séricos de MMP-9. De acordo com a literatura, sabe-se que a MMP-9 é expressa predominantemente por células do estroma, no entanto as células tumorais podem estimular as células do estroma a sintetizar MMPs. Este estímulo pode ocorrer de forma parácrina através da secreção de interleucinas, interferões e fatores de crescimento, por parte das células tumorais (Egeblad and Werb 2002).

A associação dos níveis proteicos de MMP-9 com a sobrevivência global, vem corroborar o verificado no capítulo anterior, em que também se observava que os níveis elevados de expressão de mRNA de *MMP-9* estavam associados com uma menor sobrevivência. De facto, a MMP-9 é uma proteína extremamente importante e fortemente associada a processos importantes relacionados com a progressão tumoral, sendo que níveis elevados de mRNA ou níveis proteicos de MMP-9, desencadeiam e potenciam inúmeros processos como a promoção da angiogénese, da invasão e metastização, tendo como consequência uma menor sobrevivência dos doentes.

Atendendo aos resultados deste capítulo, é possível inferir que os níveis séricos MMP-9 poderão ser considerados possíveis biomarcadores de diagnóstico, uma vez que os indivíduos com CPNPC apresentam níveis mais elevados, quando comparados com os indivíduos do grupo controlo. Por outro lado, os níveis séricos elevados de MMP-9 encontram-se associados com a sobrevivência global dos doentes com CPNPC e atendendo a estes resultados, poder-se-á admitir que este marcador poderá ser usado como um possível fator de prognóstico.

Capítulo VI

6.1 Linhas celulares linfoblastóides humanas como potencial modelo *in vitro* preditivo de resposta à terapia

No campo da farmacogenómica, o objetivo principal é tentar perceber de que forma as características genótípicas do indivíduo podem influenciar a resposta a determinado fármaco. Na última década, as LCLs humanas demonstraram ser um modelo *in vitro* muito relevante e útil na procura de marcadores genéticos subjacentes às variações interindividuais na resposta à sensibilidade a fármacos (Sie et al. 2009). Em estudos farmacogenómicos, estas linhas constituem um modelo adequado para a identificação de variantes genéticas associadas com fenótipos farmacológicos (Wheeler and Dolan 2012). Por outro lado, estas linhas celulares podem também ser úteis na pesquisa de biomarcadores moleculares associados à resposta a fármacos.

Assim, a utilização de LCL's, derivadas de doentes submetidos a diferentes regimes terapêuticos, poderá ser um bom modelo preditivo de resposta ao tratamento, permitindo posteriormente testar a sensibilidade de determinado doente à terapia indicada, e evitando perdas de tempo precioso com terapias que não serão eficazes. Mais ainda, conseguiria também obviar-se a necessidade de tecido tumoral de muito difícil obtenção no cancro do pulmão, para avaliação de marcadores moleculares preditivos de resposta.

Neste capítulo, o objetivo é estabelecer LCLs de doentes com CPNPC, antes de qualquer tratamento e avaliar a resposta a fármacos analisando a influência dos níveis de MMP's e TIMPs .

6.2 Material e Métodos

Caracterização da população em estudo

Neste trabalho, foi desenhado um estudo prospetivo de base hospitalar, tendo sido recrutados de forma aleatória e consecutiva 16 indivíduos com diagnóstico histopatológico de CPNPC, todos os indivíduos eram seguidos no Hospital Santo António - Centro Hospitalar do Porto (HSA-CHP). Os indivíduos que foram incluídos no estudo eram residentes no Norte de Portugal e todos caucasianos. Como fator de exclusão foram considerados os seguintes critérios: história familiar de cancro e a não-aceitação em participar no estudo. A todos os indivíduos foi explicado o desenho do estudo e a todos foi pedido a assinatura do respetivo consentimento informado, de acordo com a declaração de Helsínquia. A colheita de sangue periférico foi realizada à data do diagnóstico, ou seja antes de qualquer intervenção terapêutica. Aos participantes no estudo foram recolhidos 8 mL de sangue periférico (tubo EDTA) e 8 mL para um tubo CPT, de forma a ser possível o isolamento de PBMC's (*peripheral blood mononuclear cell*). Os dados clinicopatológicos dos indivíduos participantes no estudo encontram-se descritos na tabela 17.

Tabela 17: Descrição das características clinicopatológicas do grupo de casos com CPNPC

Casos (n=16)	
n (%)	
Género	
Masculino	13 (81,2)
Feminino	3 (18,8)
Idade	
(média±SD)	63±10,8 anos
Hábitos tabágicos	
Fumadores/Ex-fumadores	13 (81,2)
Não fumadores	3 (18,8)
Histologia	
Epidermóides	4 (25,0)
Adenocarcinoma	12(75,0)
Estadio	
III	5 (31,3)
IV	10 (62,5)
Sem Informação	1 (6,2)

Transformação e estabelecimento de LCLs

Para ser possível a transformação e o estabelecimento de LCLs, foi utilizada uma linha celular B95-8 (ATCC® VR-1492™), de forma a infectar com EBV as PBMCs. Esta infeção culmina na transformação e imortalização de células do hospedeiro- estabelecimento de LCLs.

Após a colheita de sangue periférico para os tubos CPT (*Cell Preparation Tube*), estes são centrifugados a 2500 durante 30 min, de forma a serem isoladas as PBMCs, que são transferidas para um tubo cónico de 15 mL. As PBMCs são lavadas em PBS (*phosphate buffered saline*), sendo para isso sujeitas a várias centrifugações consecutivas (15 min a 2000 rpm e 20 min a 1500 rpm). Após esta lavagem, as PBMCs são colocadas em frascos de cultura (T25 cm²), com meio de cultura designado de meio de transformação (RPMI 1640 (1X) (*Gibco*®), 1% de uma mistura de antibióticos (penicilina (100U/mL) + estreptomicina (100 µg/mL)) (*Gibco*®), 20% de soro bovino fetal (*Gibco*®) e 400ng/mL de ciclosporina) juntamente com o sobrenadante de células B95-8. As células são mantidas em atmosfera húmida,

numa incubadora a 37°C e 5% de CO₂. As PBMCs ficam em cultura durante três semanas, sendo que o meio de cultura é mudado a cada 5 dias. No fim deste tempo, as PBMCs já se encontram transformadas e podem ser designadas de LCLs. As LCLs são mantidas em cultura sob as seguintes condições: RPMI 1640 (1X) (*Gibco*®), 1% de uma mistura de antibióticos (penicilina (100U/mL) + estreptomicina (100 µg/mL)) (*Gibco*®) e 20% de soro bovino fetal (*Gibco*®), designado de meio de crescimento, numa atmosfera húmida, numa incubadora a 37°C e 5% de CO₂.

Quantificação dos níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* e *TIMP-4*

Relativamente à técnica para quantificação dos transcritos, esta foi a mesma da descrita no capítulo IV.

Doseamento dos níveis proteicos de *MMP-9* e *TIMP-4*

Para o doseamento das proteínas, recorreu-se novamente à técnica de ELISA, conforme descrito no capítulo V. Os níveis proteicos de *TIMP-4* foram analisados pelo kit comerciais da R&D, *Human TIMP-2 DuoSet DY971*; *Human TIMP-4 DuoSet DY974*, respetivamente.

Teste de sensibilidade *in vitro* a fármacos em LCL's

Segundo o protocolo descrito anteriormente, foram estabelecidas 11 LCLs, dos doentes descritos neste capítulo. Após este passo, as 11 LCLs foram mantidas em cultura celular com as condições adequadas de temperatura e atmosfera. De forma a verificar o efeito citotóxico nas linhas celulares, foi utilizada a gencitabina. Assim, as linhas celulares estabelecidas, foram plaqueadas em placas de 96 poços (200000 células/mL). Foram realizadas 8 réplicas para as condições controlo e para o fármaco foram realizadas 6 réplicas para cada condição, foram também realizados controlos negativos, que apenas continha o meio de cultura. A gencitabina foi adicionada às linhas celulares numa concentração de 5 µg/µL e 100 µg/µL, de forma a ser estabelecido o IC₅₀ de cada linha celular. As linhas celulares foram incubadas durante 24 horas, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera. Após esta incubação, foi medida a viabilidade celular, recorrendo ao Kit XTT® (*Cell Proliferation*

Kit II, Roche®) em que a absorvância foi medida após 6 horas de incubação a um comprimento de onda de 450nm.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS (versão 19.0, IBM SPSS Statistics). Os valores *cut-offs utilizados* foram calculados com recurso ao *software Cutoff Finder* (Budczies et al. 2012).

O método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (método de *Livak*) e o teste *t' de Student* foram usados para avaliar as diferenças nos níveis normalizados de mRNA dos diferentes genes (Livak and Schmittgen 2001). Após ter sido avaliada e verificada a normalidade das médias de ambos os grupos, as diferenças entre as medianas dos níveis proteicos das moléculas em estudo foram calculados, com recurso a testes não paramétricos- *Mann-Whitney Test*.

6.3 Resultados

6.3.1 Níveis de expressão: PBMCs vs LCLs

De modo a confirmar a ausência de efeito do processo de imortalização ao nível do perfil transcriptómico, foram analisados os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* e *TIMP-4*, antes (PBMCs) e após o processo de imortalização (LCLs). De acordo com os resultados, verifica-se que os níveis de expressão destas moléculas não sofrem alterações devidas a este processo ($p=0,989$ e $p=0,082$, respetivamente) (Figura 22).

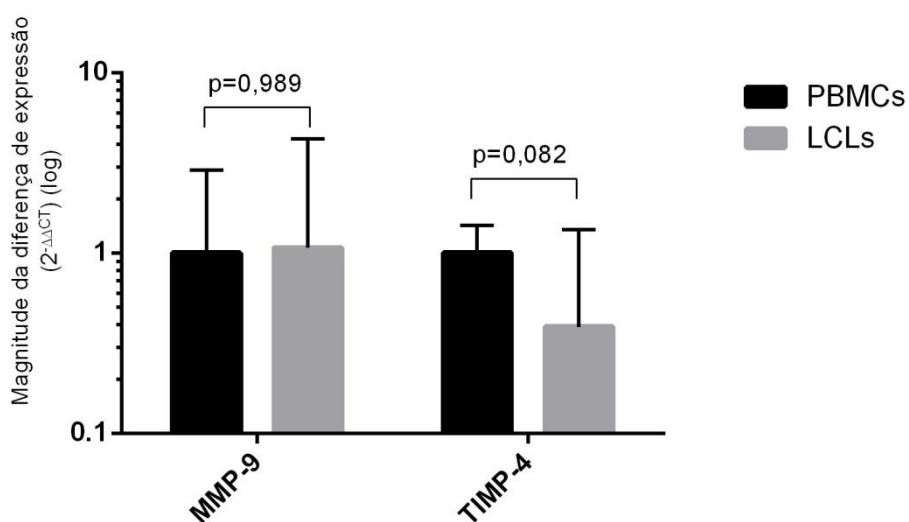


Figura 22: Magnitude da diferença de expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos genes MMP-9 e TIMP-4 antes do processo de imortalização (PBMCs) e após este processo (LCLs)

6.3.2 Resposta das LCLs à gencitabina e a sua associação com níveis de MMP-9 e TIMP-4

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que as diferentes linhas celulares apresentam uma resposta diferente à gencitabina. Assim, todas elas apresentam um IC 50 diferente, ou seja a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%. Os resultados obtidos demonstram que as LCLs 4,6,7 e 9, após a administração de gencitabina apresentam uma viabilidade celular superior a 50% (Figura 23a), de acordo com estes resultados foram designadas de LCLs resistentes à gencitabina. Enquanto as LCLs 1,2,3,5,8,10,11, após ter sido submetidas à gencitabina, apresentam percentagens de viabilidade celular inferiores a 50%, assim, denominadas de LCLs sensíveis à gencitabina (Figura 23b).

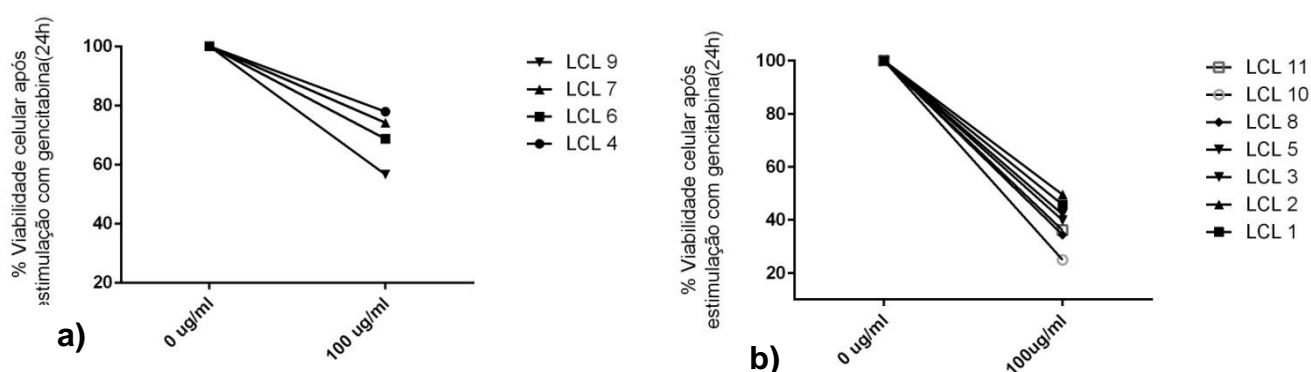


Figura 23: Percentagem de viabilidade celular, das diferentes LCLs em resposta à gencitabina (100 µg/µL), **a)** LCLs com menor sensibilidade à gencitabina (viabilidade celular superior a 50%) **b)** LCLs com maior sensibilidade à gencitabina (viabilidade celular inferior a 50%)

Após esta classificação, LCLs sensíveis vs LCLs resistentes, foi analisado o impacto dos níveis proteicos de MMP-9 e TIMP-4 destas LCLs na resposta à gencitabina. As LCLs resistentes à gencitabina, apresentam níveis mais elevados de TIMP-4, comparativamente com as LCLs sensíveis à gencitabina que apresentam níveis mais baixos de TIMP-4 ($p=0,001$) (Figura 24).

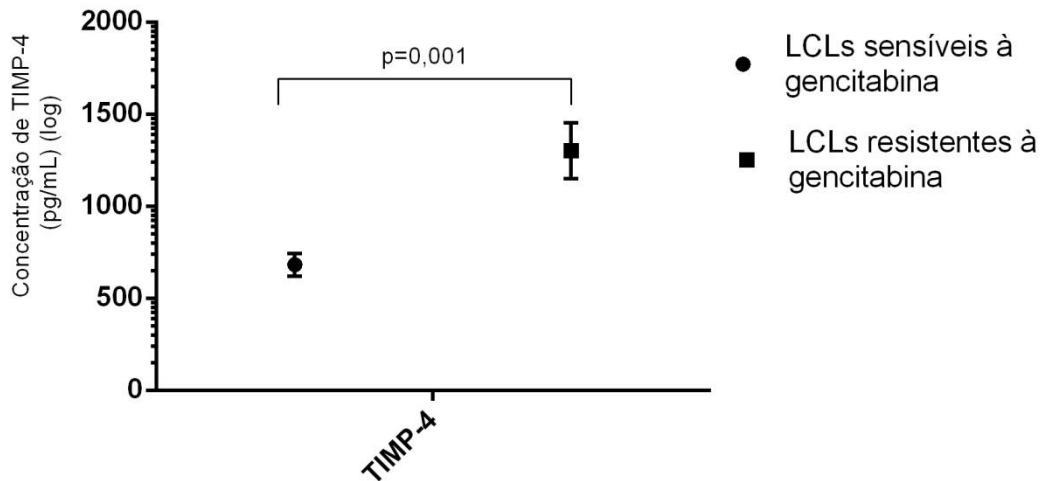


Figura 24: Concentração mediana de TIMP-4 (pg/mL) nas LCLs, atendendo à sensibilidade vs resistência à gencitabina

Em relação aos níveis proteicos de MMP-9 nas LCLs, observa-se que as LCLs sensíveis à gencitabina apresentam níveis proteicos mais elevados em comparação com as LCLs resistentes à gencitabina, que apresentam níveis proteicos mais baixos de MMP-9 ($p=0,012$) (Figura 25).

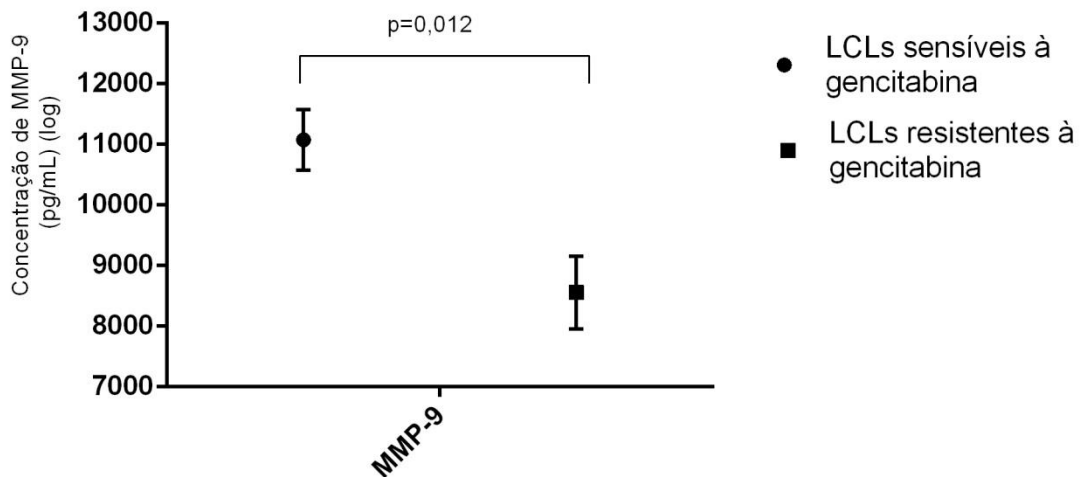


Figura 25: Concentração mediana de MMP-9 (pg/mL) nas LCLs, atendendo à sensibilidade vs resistência à gencitabina

6.4 Discussão

Os avanços na área da investigação biomédica têm sido estimulados, em parte, pela disponibilidade de linhas celulares derivadas de material biológico que consiga oferecer conhecimento sobre as características genóticas e as suas consequências ao nível dos fenótipos (Hussain and Mulherkar 2012). Um dos maiores contributos para o aumento deste conhecimento é o estabelecimento de LCLs. Estas linhas celulares são conseguidas a partir da infeção das PBMCs do hospedeiro pelo EBV. Nos últimos anos, esta metodologia tem sido amplamente aplicada, como modelo de estudo, apresentando benefício tais como fácil estabelecimento e manutenção acessível. Por outro lado, estas exibem uma taxa de mutação somática bastante reduzida, quando mantidas em cultura celular contínua (Hussain and Mulherkar 2012).

Admite-se assim, que estas células são uma fonte de informação sobre biomoléculas como o DNA, o RNA e as proteínas, sendo consideradas um bom modelo *in vitro* para estudos de correlação genótipo-fenótipo e uma variedade de ensaios funcionais relacionados com a imunologia e a biologia molecular (Sie et al. 2009; Tan et al. 2011). A utilidade das LCLs tem sido documentada em diversos estudos de sensibilidade a fármacos, nomeadamente associados ao tratamento de cancro, e também no estudo de danos e reparação do DNA, e a grande maioria destes mostram o valor destas linhas celulares e reforçam-nas como uma estratégia promissora para um maior conhecimento na área da farmacogenómica (Hussain et al. 2012; Jeon 2014).

Atendendo ao estudo apresentado neste capítulo, observa-se que a técnica de transformação dos linfócitos B em LCL, pelo EBV não alterou a expressão dos biomarcadores que eram de interesse neste estudo, tendo-se mantido os níveis de expressão de mRNA de *MMP-9* e *TIMP-4*, após a técnica de transformação. Este resultado encontra-se de acordo com o descrito na literatura, uma vez que é referido que existe uma grande concordância nas sequências de DNA dos linfócitos B e das LCLs (Londin et al. 2011).

Admitindo que os doentes com CPNPC não respondem de forma totalmente eficaz aos esquemas terapêuticos e que alguns deles desenvolvem resistência aos tratamentos, torna-se essencial tentar compreender que alterações moleculares poderão estar inerentes a estes processos.

A gencitabina é um citostático que demonstra um significativo efeito terapêutico em vários modelos tumorais, nomeadamente em CPNPC. Foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) em combinação com cisplatina para primeira linha de tratamento em doença localmente avançada (IIIB) ou metastática (IV) para doentes com CPNPC (Sandler et al. 2000). A gencitabina é uma prodroga que tem que ser transportada para o interior das células e convertida por cinases na sua forma ativa (Li et al. 2012). Apesar de a gencitabina ser usualmente utilizada no tratamento de CPNPC avançado, a resposta a esta droga é bastante variável.

De acordo com os resultados, verificou-se que as respostas à gencitabina foram variáveis, tal como observado na prática clínica, tendo sido possível distinguir dois grupos: as LCLs resistentes à gencitabina em que a viabilidade celular foi superior a 50% e as LCLs sensíveis à gencitabina em que a viabilidade celular foi inferior a 50%. Após terem sido estabelecidos estes dois grupos, de acordo com a resposta à gencitabina, a análise seguinte consistiu em avaliar como estavam distribuídos os níveis proteicos de MMP-9 e TIMP-4, nos dois grupos formados. Assim, observa-se que as LCLs que são sensíveis à gencitabina, apresentam níveis proteicos mais elevados de MMP-9 e níveis de TIMP-4 mais baixos, em comparação com as LCLs resistentes à gencitabina que apresentam níveis proteicos de MMP-9 mais baixos e de TIMP-4 mais elevados.

Os resultados observados nas LCLs relativamente aos níveis de MMP-9 e TIMP-4, e à sua associação com a viabilidade celular, encontram-se de acordo com o observado no capítulo IV deste trabalho. Em que se demonstrou que os doentes que apresentavam uma sobrevivência global menor eram os que tinham os níveis de MMP-9 mais elevados e de TIMP-4 mais baixos. Ou seja, quer nos doentes com CPNPC, quer nas LCLs os níveis elevados de MMP-9 e mais baixos de TIMP-4 encontram-se associados com um pior prognóstico. Um estudo de *Kunz* e colaboradores, em doentes com osteossarcoma, verificou que os indivíduos que respondiam melhor aos tratamentos apresentavam também níveis proteicos mais elevados de MMP-9, com comparação com os indivíduos que respondiam pior ao tratamento, o que é também corroborado por outros autores (Kushlinsky et al. 2010; Shen et al. 2014; Li et al. 2014; Kunz et al. 2016). A relação das MMPs com a resposta aos esquemas terapêuticos ainda se encontra por elucidar, no entanto, uma das hipóteses colocadas é a associação das MMPs com os processos de vascularização e a neo-angiogénese. Estudos demonstram que a MMP-9 que é

produzida por células do estroma tem a capacidade de libertar fatores angiogénicos como o VEGF e bFGF, que são importantes para a promoção da angiogénese (Roy et al. 2009). A promoção da angiogénese tumoral ativa a formação de novos vasos sanguíneos, caracterizados como caóticos, desorganizados e frágeis, o que pode resultar numa limitada eficácia de perfusão, comprometendo a eficácia dos agentes anti-neoplásicos usados nos tratamentos quimioterápicos (Carreau et al. 2011; Guise et al. 2014) Assim, é descrito que os tumores menos vascularizados apresentam uma melhor resposta aos esquemas terapêuticos e um melhor prognóstico. Sendo que os níveis de MMPs podem condicionar o desenvolvimento da vascularização e potenciar a angiogénese, assim será possível inferir que a resposta aos esquemas terapêuticos será menos eficaz nos indivíduos com níveis mais elevados de MMPs (Chantrain et al. 2004; Kunz et al. 2015).

Apesar de as LCLs poderem ser uma ferramenta bastante útil na definição de possíveis biomarcadores associados à resposta aos fármacos, estas apresentam algumas limitações. Duas das maiores limitações associadas à utilização das LCLs são estas representam apenas um tipo específico de tecido linfóide, e os efeitos que a transformação pelo EBV possa desencadear (Jeon 2014). Tendo em conta estas limitações os resultados obtidos utilizando LCLs devem ser replicados em tecidos do modelo tumoral em estudo e realizados estudos de validação funcional.

Capítulo VII

7. Conclusão e Perspetivas Futuras

O cancro, como uma doença marcante e desafiadora do século XXI, merece toda a atenção por parte da comunidade científica e todo o esforço para um conhecimento mais completo do seu desenvolvimento será fundamental para um maior controlo desta doença. Apesar de nos últimos anos ter-se assistido a um desenvolvimento e melhoramento das opções terapêuticas ao nível do cancro do pulmão, nomeadamente em CPNPC, este modelo tumoral apresenta ainda taxas de mortalidade bastante elevadas, comparativamente a outros modelos. O que reflete o urgente e necessário investimento na investigação e no conhecimento da biologia tumoral desta neoplasia. Assim, a definição de possíveis biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico será fundamental para um maior sucesso quer na identificação de indivíduos com CPNPC, quer na monitorização da resposta aos esquemas terapêuticos propostos. Deste modo, é fundamental desenhar estudos de investigação que sejam pensados de forma a aplicar os conhecimentos adquiridos na prática clínica para ser possível uma maior translação e aplicabilidade do conhecimento obtido.

O conhecimento e identificação das variações genéticas e a sua repercussão no desenvolvimento e progressão tumoral e a forma como estas podem condicionar o comportamento de moléculas importantes para os processos de inerentes à carcinogénese, poderá ser encarada como uma estratégia útil na definição de possíveis biomarcadores moleculares de diagnóstico ou de prognóstico. Por outro lado, a informação relativa ao comportamento de níveis de expressão de mRNA ou de níveis proteicos, poderá também ser relevante como estratégia de controlo à progressão tumoral.

O CPNPC é um modelo tumoral, bastante peculiar uma vez que a grande maioria das doentes apresenta ao momento do diagnóstico, doença localmente avançada ou mesmo metastização à distância. Por outro lado, este modelo tumoral apresenta também uma relação bastante estreita com a inflamação crónica. Assim, nesta neoplasia é pertinente um maior conhecimento sobre mediadores inflamatórios que desempenham funções relacionadas com os processos de inflamação, invasão e de metastização.

As MMPs, TIMPs, e ILs são moléculas centrais no desenvolvimento neoplásico, desta forma o conhecimento do comportamento destas moléculas no contexto de CPNPC será bastante relevante para um possível controlo da taxa de mortalidade associada a esta neoplasia.

De acordo com o presente trabalho é possível observar que as variações genéticas nos genes codificantes de *MMP-2*, *MMP-7* e *IL-6* são relevantes para o risco de desenvolvimento de CPNPC, risco de metastização à distância e também com a sobrevivência global dos doentes com CPNPC. Assim, é possível afirmar que os polimorfismos genéticos estudados nestes genes são importantes para uma possível definição de grupos de risco de desenvolvimento desta neoplasia e por outro lado, são também importantes como preditores do *outcome* clínico, nomeadamente a sobrevivência global dos doentes com CPNPC. No entanto, os polimorfismos genéticos funcionais são também importantes reguladores da transcrição dos genes, assim observa-se neste estudo que algumas destas variações genéticas podem condicionam os níveis de expressão de mRNA e de proteínas que por sua vez apresentam um impacto na sobrevivência global dos doentes. Desta forma, observou-se que o polimorfismo genético -174 G/C no gene *IL-6* influencia os níveis de expressão de mRNA e os níveis proteicos de MMP-9.

No presente estudo, foi possível realçar que o desequilíbrio entre MMPs/TIMPs é fundamental para o desenvolvimento de neoplasias e fulcral para eventos da iniciação tumoral. No entanto, existem evidências que demonstram que os TIMPs apresentam uma atividade independente da inibição das MMPs, incluindo efeitos no crescimento, diferenciação e migração celular, assim como apoptose e angiogénese.

Assim, foi possível constatar que nos doentes com CPNPC os níveis de expressão de mRNA de *MMPs* eram mais elevados e que por sua vez os níveis de expressão de mRNA de *TIMPs* eram mais baixos, em comparação com os indivíduos saudáveis. Nos resultados deste trabalho, verifica-se também que os níveis de expressão de mRNA de *MMPs* e *TIMPs* estão também associados com a sobrevivência global dos doentes com CPNPC. Observou-se que os indivíduos com níveis mais elevados de expressão de mRNA de *MMP-9* e níveis mais baixos de expressão de mRNA de *TIMP-4*, apresentam uma sobrevivência global diminuída.

Atendendo a que os tratamentos em CPNPC apresentam uma eficácia relativamente baixa, seria importante tentar prever a resposta dos doentes a determinado fármaco, esse é o objetivo da farmacogenómica. O estabelecimento de

LCLs é um modelo útil da predição de resposta a fármacos, atendendo às características genéticas dos indivíduos. Assim, com o estabelecimento de LCLs derivadas de doentes com CPNPC foi possível verificar que as LCLs que são sensíveis à gencitabina apresentam também níveis proteicos mais elevados de MMP-9, e mais baixos de TIMP-4 e que pelo contrário as LCLs que são resistentes à gencitabina apresentam níveis mais baixos de MMP-9 e mais elevados de TIMP-4. Estes resultados reforçam o descrito na literatura, uma vez que vários autores indicam que os níveis elevados de MMPs se encontram associados a uma pior resposta aos tratamentos e por consequência a um pior prognóstico.

Os resultados apresentados neste trabalho, reforçam a importância que as MMPs e os seus inibidores desempenham no desenvolvimento e progressão tumoral, sejam através de variações genéticas presentes nos seus genes codificantes, sejam através dos seus níveis de expressão alterados. Por outro lado, foi possível compreender que a utilização de LCLs poderá ser um bom modelo preditivo de resposta à quimioterapia utilizada para os doentes com CPNPC e que a sensibilidade aos fármacos poderá também estar associada com os níveis de MMPs e TIMPs. Assim é possível admitir que os marcadores estudados neste trabalho, nomeadamente o desequilíbrio do balanço MMPs/TIMPs, poderiam ser considerados como possíveis marcadores de diagnóstico, de prognóstico e mesmo de resposta às terapias administradas aos doentes com CPNPC.

Relativamente aos estudos futuros e de forma a complementar os resultados obtidos, seria importante validar os resultados em tecido tumoral de CPNPC e seria igualmente útil consolidar os resultados com uma validação de mais ensaios funcionais, de forma a sustentar as hipóteses colocadas neste trabalho. As LCLs parecem ser um bom modelo preditivo de resposta, num futuro próximo seria interessante utilizar este modelo como preditivo de resposta aos fármacos antes dos doentes realizarem as terapias, como forma de teste de sensibilidade aos quimioterápicos.

Capítulo VIII

8. Referências

- Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B (2009) Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* 15 (2):425-430. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0149
- Ahmad A, Gadgeel S (2016) *Lung Cancer and Personalized Medicine: Current Knowledge and Therapies* Springer, Switzerland
- Ara T, Declerck YA (2010) Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer* 46 (7):1223-1231. doi:10.1016/j.ejca.2010.02.026
- Beeghly-Fadiel A, Long JR, Gao YT, Li C, Qu S, Cai Q, Zheng Y, Ruan ZX, Levy SE, Deming SL, Snoddy JR, Shu XO, Lu W, Zheng W (2008) Common MMP-7 polymorphisms and breast cancer susceptibility: a multistage study of association and functionality. *Cancer Res* 68 (15):6453-6459. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0636
- Belo VA, Souza-Costa DC, Luizon MR, Lanna CM, Carneiro PC, Izidoro-Toledo TC, Ferraz KC, Tanus-Santos JE (2012) Matrix metalloproteinase-9 genetic variations affect MMP-9 levels in obese children. *Int J Obes (Lond)* 36 (1):69-75. doi:10.1038/ijo.2011.169
- Ben-Baruch A (2006) Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Seminars in cancer biology* 16 (1):38-52. doi:10.1016/j.semcancer.2005.07.006
- Ben Nejima D, Ben Zarkouna Y, Pujol P, Gammoudi A, Boussen H, Manai M (2016) Clinicopathologic and Prognostic Significance of Metalloproteinase Tissue Inhibitor-2 Promoters in Tunisian Colorectal Cancer: A Case-Control Study. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 24 (8):583-588. doi:10.1097/PAI.0000000000000231
- Blankenstein T (2005) The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Current opinion in immunology* 17 (2):180-186. doi:10.1016/j.coi.2005.01.008
- Bourboulia D, Han H, Jensen-Taubman S, Gavil N, Isaac B, Wei B, Neckers L, Stetler-Stevenson WG (2013) TIMP-2 modulates cancer cell transcriptional profile and enhances E-cadherin/beta-catenin complex expression in A549 lung cancer cells. *Oncotarget* 4 (1):166-176. doi:10.18632/oncotarget.801
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG (2010) Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Seminars in cancer biology* 20 (3):161-168. doi:10.1016/j.semcancer.2010.05.002
- Bremnes RM, Al-Shibli K, Donnem T, Sirera R, Al-Saad S, Andersen S, Stenvold H, Camps C, Busund LT (2011) The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic*

- oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer 6 (4):824-833. doi:10.1097/JTO.0b013e3182037b76
- Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234 (2):177-186
- Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C (2012) Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS ONE* 7 (12):e51862. doi:10.1371/journal.pone.0051862
- Cai J, Li R, Xu X, Zhang L, Wu S, Yang T, Fang L, Wu J, Zhu X, Li M, Huang Y (2015) URGCP promotes non-small cell lung cancer invasiveness by activating the NF-kappaB-MMP-9 pathway. *Oncotarget* 6 (34):36489-36504. doi:10.18632/oncotarget.5351
- Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C (2011) Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 15 (6):1239-1253. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x
- Catarino R, Coelho A, Araujo A, Gomes M, Nogueira A, Lopes C, Medeiros R (2012) Circulating DNA: diagnostic tool and predictive marker for overall survival of NSCLC patients. *PLoS ONE* 7 (6):e38559. doi:10.1371/journal.pone.0038559
- Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J (2015) Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. *Genes & diseases* 2 (1):26-34. doi:10.1016/j.gendis.2014.12.002
- Celiker MY, Wang M, Atsidaftos E, Liu X, Liu YE, Jiang Y, Valderrama E, Goldberg ID, Shi YE (2001) Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA. *Oncogene* 20 (32):4337-4343
- Chang KT, Huang CY, Tsai CM, Chiu CH, Lok YY (2005) Role of IL-6 in neuroendocrine differentiation and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289 (3):L438-445. doi:10.1152/ajplung.00033.2005
- Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, Groshen S, Ye W, Shalinsky DR, Werb Z, Coussens LM, DeClerck YA (2004) Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer Res* 64 (5):1675-1686
- Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong KK (2014) Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature reviews Cancer* 14 (8):535-546. doi:10.1038/nrc3775
- Chetty C, Rao JS, Lakka SS (2011) Matrix metalloproteinase pharmacogenomics in non-small-cell lung carcinoma. *Pharmacogenomics* 12 (4):535-546. doi:10.2217/pgs.10.207
- Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR (2006) Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer metastasis reviews* 25 (1):99-113. doi:10.1007/s10555-006-7893-x
- Chorley BN, Wang X, Campbell MR, Pittman GS, Nouredine MA, Bell DA (2008) Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in

- regulatory genomic regions: current and developing technologies. *Mutat Res* 659 (1-2):147-157. doi:10.1016/j.mrrev.2008.05.001
- Coito AJ (2011) Leukocyte transmigration across endothelial and extracellular matrix protein barriers in liver ischemia/reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant* 16 (1):34-40. doi:10.1097/MOT.0b013e328342542e
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30 (7):1073-1081. doi:10.1093/carcin/bgp127
- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420 (6917):860-867. doi:10.1038/nature01322
- Crohns M, Saarelainen S, Laine S, Poussa T, Alho H, Kellokumpu-Lehtinen P (2010) Cytokines in bronchoalveolar lavage fluid and serum of lung cancer patients during radiotherapy - Association of interleukin-8 and VEGF with survival. *Cytokine* 50 (1):30-36. doi:10.1016/j.cyto.2009.11.017
- Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE (2013) The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *Journal of thoracic disease* 5 Suppl 5:S463-478. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.43
- de Groot P, Munden RF (2012) Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiologic clinics of North America* 50 (5):863-876. doi:10.1016/j.rcl.2012.06.006
- DeMichele A, Martin AM, Mick R, Gor P, Wray L, Klein-Cabral M, Athanasiadis G, Colligan T, Stadtmauer E, Weber B (2003) Interleukin-6 -174G-->C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer. *Cancer Res* 63 (22):8051-8056
- Deryugina EI, Quigley JP (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews* 25 (1):9-34. doi:10.1007/s10555-006-7886-9
- Devarakonda S, Morgensztern D, Govindan R (2015) Genomic alterations in lung adenocarcinoma. *The lancet oncology* 16 (7):e342-351. doi:10.1016/S1470-2045(15)00077-7
- Didkowska J, Wojciechowska U, Manczuk M, Lobaszewski J (2016) Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Annals of translational medicine* 4 (8):150. doi:10.21037/atm.2016.03.11
- Domagala-Kulawik J (2015) The role of the immune system in non-small cell lung carcinoma and potential for therapeutic intervention. *Translational lung cancer research* 4 (2):177-190. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2015.01.11
- Domagala-Kulawik J, Osinska I, Hoser G (2014) Mechanisms of immune response regulation in lung cancer. *Translational lung cancer research* 3 (1):15-22. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2013.11.03
- Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 4 (1):11-22. doi:10.1038/nrc1252
- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews Cancer* 2 (3):161-174. doi:10.1038/nrc745
- El-Badrawy MK, Yousef AM, Shaalan D, Elsamanoudy AZ (2014) Matrix metalloproteinase-9 expression in lung cancer patients and its relation to

- serum mmp-9 activity, pathologic type, and prognosis. *Journal of bronchology & interventional pulmonology* 21 (4):327-334. doi:10.1097/LBR.0000000000000094
- Enewold L, Mechanic LE, Bowman ED, Zheng YL, Yu Z, Trivers G, Alberg AJ, Harris CC (2009) Serum concentrations of cytokines and lung cancer survival in African Americans and Caucasians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18 (1):215-222. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0705
- Engle LJ, Simpson CL, Landers JE (2006) Using high-throughput SNP technologies to study cancer. *Oncogene* 25 (11):1594-1601. doi:10.1038/sj.onc.1209368
- Farina AR, Mackay AR (2014) Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. *Cancers* 6 (1):240-296. doi:10.3390/cancers6010240
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136 (5):E359-386. doi:10.1002/ijc.29210
- Fidler IJ, Kripke ML (2015) The challenge of targeting metastasis. *Cancer metastasis reviews* 34 (4):635-641. doi:10.1007/s10555-015-9586-9
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102 (7):1369-1376. doi:10.1172/JCI2629
- Foda HD, Zucker S (2001) Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov Today* 6 (9):478-482
- Gao SP, Mark KG, Leslie K, Pao W, Motoi N, Gerald WL, Travis WD, Bornmann W, Veach D, Clarkson B, Bromberg JF (2007) Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest* 117 (12):3846-3856. doi:10.1172/JCI31871
- Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS journal* 278 (1):16-27. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x
- Gong L, Wu D, Zou J, Chen J, Chen L, Chen Y, Ni C, Yuan H (2016) Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 7 (14):18458-18468. doi:10.18632/oncotarget.7607
- Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK (2014) Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers* 6 (3):1298-1327. doi:10.3390/cancers6031298
- Gonzalez-Arriaga P, Pascual T, Garcia-Alvarez A, Fernandez-Somoano A, Lopez-Cima MF, Tardon A (2012) Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival. *BMC Cancer* 12:121. doi:10.1186/1471-2407-12-121

- Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F (2007) Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiological reviews* 87 (1):69-98. doi:10.1152/physrev.00022.2006
- Grignon DJ, Sakr W, Toth M, Ravery V, Angulo J, Shamsa F, Pontes JE, Crissman JC, Fridman R (1996) High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res* 56 (7):1654-1659
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140 (6):883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025
- Groblewska M, Mroczko B, Gryko M, Pryczynicz A, Guzinska-Ustymowicz K, Kedra B, Kemona A, Szmitkowski M (2014) Serum levels and tissue expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) in colorectal cancer patients. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (4):3793-3802. doi:10.1007/s13277-013-1502-8
- Groft LL, Muzik H, Rewcastle NB, Johnston RN, Knauper V, Lafleur MA, Forsyth PA, Edwards DR (2001) Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas. *Br J Cancer* 85 (1):55-63. doi:10.1054/bjoc.2001.1854
- Guise CP, Mowday AM, Ashoorzadeh A, Yuan R, Lin WH, Wu DH, Smaill JB, Patterson AV, Ding K (2014) Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia. *Chin J Cancer* 33 (2):80-86. doi:10.5732/cjc.012.10285
- Gurwitz D, Pirmohamed M (2010) Pharmacogenomics: the importance of accurate phenotypes. *Pharmacogenomics* 11 (4):469-470. doi:10.2217/pgs.10.41
- Hadler-Olsen E, Winberg JO, Uhlin-Hansen L (2013) Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34 (4):2041-2051. doi:10.1007/s13277-013-0842-8
- Haerian BS, Sha'ari HM, Fong CY, Tan HJ, Wong SW, Ong LC, Raymond AA, Tan CT, Mohamed Z (2015) Contribution of TIMP4 rs3755724 polymorphism to susceptibility to focal epilepsy in Malaysian Chinese. *J Neuroimmunol* 278:137-143. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.12.016
- Han H, Bourbouli D, Jensen-Taubman S, Isaac B, Wei B, Stetler-Stevenson WG (2014) An endogenous inhibitor of angiogenesis inversely correlates with side population phenotype and function in human lung cancer cells. *Oncogene* 33 (9):1198-1206. doi:10.1038/onc.2013.61
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1):57-70
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harrell FE, Jr., Lee KL, Mark DB (1996) Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring

- and reducing errors. *Stat Med* 15 (4):361-387. doi:10.1002/(SICI)1097-0258(19960229)15:4<361::AID-SIM168>3.0.CO;2-4
- Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, Rota M, Bertuccio P, Malvezzi M, Negri E (2016) The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Ann Oncol* 27 (5):926-933. doi:10.1093/annonc/mdw027
- Herszenyi L, Hritz I, Lakatos G, Varga MZ, Tulassay Z (2012) The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences* 13 (10):13240-13263. doi:10.3390/ijms131013240
- Hidalgo M, Eckhardt SG (2001) Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 93 (3):178-193
- Hofmann JN, Yu K, Bagni RK, Lan Q, Rothman N, Purdue MP (2011) Intra-individual variability over time in serum cytokine levels among participants in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening Trial. *Cytokine* 56 (2):145-148. doi:10.1016/j.cyto.2011.06.012
- Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, Xu L, Ma H, Zhu J, Wei Q, Shen H (2005) Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res* 11 (15):5433-5439. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0311
- Hussain T, Kotnis A, Sarin R, Mulherkar R (2012) Establishment & characterization of lymphoblastoid cell lines from patients with multiple primary neoplasms in the upper aero-digestive tract & healthy individuals. *The Indian journal of medical research* 135 (6):820-829
- Hussain T, Mulherkar R (2012) Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *International journal of molecular and cellular medicine* 1 (2):75-87
- IARC (2012) Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. , vol Volume 100F. 2012 edn. World Health Organization/IARC

Lyon

- Jackson HW, Defamie V, Waterhouse P, Khokha R (2016) TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. *Nature reviews Cancer*. doi:10.1038/nrc.2016.115
- Jackson HW, Defamie V, Waterhouse P, Khokha R (2017) TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. *Nature reviews Cancer* 17 (1):38-53. doi:10.1038/nrc.2016.115
- Jeon J-P (2014) *Human Lymphoblastoid cell Lines in Pharmacogenomics*. 1st edn. Elsevier,
- Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE (2002) Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21 (14):2245-2252. doi:10.1038/sj.onc.1205291
- Jormsjo S, Whatling C, Walter DH, Zeiher AM, Hamsten A, Eriksson P (2001) Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-7 promoter activity is associated with coronary artery luminal dimensions among

- hypercholesterolemic patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21 (11):1834-1839
- Joyce JA, Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews Cancer* 9 (4):239-252. doi:10.1038/nrc2618
- Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS (2001) Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7 (10):3113-3119
- Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119 (6):1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
- Kamal A, Elgengehy FT, Abd Elaziz MM, Gamal SM, Sobhy N, Medhat A, El Dakrony AH (2017) Matrix Metalloproteinase-9 rs17576 Gene Polymorphism and Behcet's Disease: Is There an Association? *Immunological investigations*:1-9. doi:10.1080/08820139.2017.1296857
- Kasaian K, Jones SJ (2011) A new frontier in personalized cancer therapy: mapping molecular changes. *Future Oncol* 7 (7):873-894. doi:10.2217/fon.11.63
- Kerr KM, Nicolson MC (2016) Non-Small Cell Lung Cancer, PD-L1, and the Pathologist. *Archives of pathology & laboratory medicine* 140 (3):249-254. doi:10.5858/arpa.2015-0303-SA
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141 (1):52-67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015
- Khokha R, Murthy A, Weiss A (2013) Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nature reviews Immunology* 13 (9):649-665. doi:10.1038/nri3499
- Knudsen LE, Loft SH, Autrup H (2001) Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutat Res* 482 (1-2):83-88
- Kothari P, Pestana R, Mesraoua R, Elchaki R, Khan KM, Dannenberg AJ, Falcone DJ (2014) IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages. *J Immunol* 192 (1):349-357. doi:10.4049/jimmunol.1301906
- Kristiansen OP, Nolsoe RL, Larsen L, Gjesing AM, Johannesen J, Larsen ZM, Lykkesfeldt AE, Karlsen AE, Pociot F, Mandrup-Poulsen T (2003) Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Hum Mol Genet* 12 (10):1101-1110
- Kubben FJ, Sier CF, Meijer MJ, van den Berg M, van der Reijden JJ, Griffioen G, van de Velde CJ, Lamers CB, Verspaget HW (2006) Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *Br J Cancer* 95 (6):744-751. doi:10.1038/sj.bjc.6603307
- Kunz P, Fellenberg J, Moskovszky L, Sapi Z, Krenacs T, Machado I, Poeschl J, Lehner B, Szendroi M, Ruef P, Bohlmann M, Bosch AL, Ewerbeck V, Kinscherf R, Fritzsching B (2015) Improved survival in osteosarcoma patients with atypical low vascularization. *Ann Surg Oncol* 22 (2):489-496. doi:10.1245/s10434-014-4001-2

- Kunz P, Sahr H, Lehner B, Fischer C, Seebach E, Fellenberg J (2016) Elevated ratio of MMP2/MMP9 activity is associated with poor response to chemotherapy in osteosarcoma. *BMC Cancer* 16:223. doi:10.1186/s12885-016-2266-5
- Kushlinsky NE, Solovyov YN, Babkina IV, Gershtein ES, Bulicheva IV (2010) Matrix metalloproteinases 2, 7, 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in the sera of patients with bone tumors. *Bull Exp Biol Med* 149 (2):233-235
- Laack E, Kohler A, Kugler C, Dierlamm T, Knuffmann C, Vohwinkel G, Niestroy A, Dahlmann N, Peters A, Berger J, Fiedler W, Hossfeld DK (2002) Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 13 (10):1550-1557
- Langers AM, Verspaget HW, Hawinkels LJ, Kubben FJ, van Duijn W, van der Reijden JJ, Hardwick JC, Hommes DW, Sier CF (2012) MMP-2 and MMP-9 in normal mucosa are independently associated with outcome of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 106 (9):1495-1498. doi:10.1038/bjc.2012.80
- Langers AM, Verspaget HW, Hommes DW, Sier CF (2011) Single-nucleotide polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastrointestinal cancer. *World journal of gastrointestinal oncology* 3 (6):79-98. doi:10.4251/wjgo.v3.i6.79
- Leventakos K, Mansfield AS (2014) Reflections on immune checkpoint inhibition in non-small cell lung cancer. *Translational lung cancer research* 3 (6):411-413. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2014.09.09
- Li H, Zhang K, Liu LH, Ouyang Y, Bu J, Guo HB, Xiao T (2014) A systematic review of matrix metalloproteinase 9 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (6):5487-5491. doi:10.1007/s13277-014-1717-3
- Li L, Schaid DJ, Fridley BL, Kalari KR, Jenkins GD, Abo RP, Batzler A, Moon I, Pelleymounter L, Eckloff BW, Wieben ED, Sun Z, Yang P, Wang L (2012) Gemcitabine metabolic pathway genetic polymorphisms and response in patients with non-small cell lung cancer. *Pharmacogenet Genomics* 22 (2):105-116. doi:10.1097/FPC.0b013e32834dd7e2
- Liang Y, Guo S, Zhou Q (2014) Prognostic value of matrix metalloproteinase-7 expression in patients with non-small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (4):3717-3724. doi:10.1007/s13277-013-1491-7
- Lichtinghagen R, Musholt PB, Lein M, Romer A, Rudolph B, Kristiansen G, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Jung K (2002) Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol* 42 (4):398-406
- Lin EY, Pollard JW (2004) Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer* 90 (11):2053-2058. doi:10.1038/sj.bjc.6601705

- Lin WW, Karin M (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 117 (5):1175-1183. doi:10.1172/JCI31537
- Liss M, Sreedhar N, Keshgegian A, Sauter G, Chernick MR, Prendergast GC, Wallon UM (2009) Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 is elevated in early-stage breast cancers with accelerated progression and poor clinical course. *Am J Pathol* 175 (3):940-946. doi:10.2353/ajpath.2009.081094
- Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Yokomise H, Ueno M, Kadota K, Urushihara M, Huang CL (2007) Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 58 (3):384-391. doi:10.1016/j.lungcan.2007.07.005
- Liu RY, Song X, Chen P, Lei Z, Miao J, Yi N, Zhang K, Pasche B, Zhang HT (2012) Association between IL6 -174G/C and cancer: A meta-analysis of 105,482 individuals. *Experimental and therapeutic medicine* 3 (4):655-664. doi:10.3892/etm.2012.454
- Liu YE, Wang M, Greene J, Su J, Ullrich S, Li H, Sheng S, Alexander P, Sang QA, Shi YE (1997) Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *J Biol Chem* 272 (33):20479-20483
- Liu Z, Li L, Yang Z, Luo W, Li X, Yang H, Yao K, Wu B, Fang W (2010) Increased expression of MMP9 is correlated with poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* 10:270. doi:10.1186/1471-2407-10-270
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25 (4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lizarraga F, Ceballos-Cancino G, Espinosa M, Vazquez-Santillan K, Maldonado V, Melendez-Zajgla J (2015) Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4 Triggers Apoptosis in Cervical Cancer Cells. *PLoS ONE* 10 (8):e0135929. doi:10.1371/journal.pone.0135929
- Lizarraga F, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, Vazquez-Santillan K, Bahena-Ocampo I, Schwarz-Cruz YCA, Vega-Gordillo M, Garcia Lopez P, Maldonado V, Melendez-Zajgla J (2016) Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) regulates stemness in cervical cancer cells. *Mol Carcinog* 55 (12):1952-1961. doi:10.1002/mc.22442
- Londin ER, Keller MA, D'Andrea MR, Delgrosso K, Ertel A, Surrey S, Fortina P (2011) Whole-exome sequencing of DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and EBV-transformed lymphocytes from the same donor. *BMC Genomics* 12:464. doi:10.1186/1471-2164-12-464
- Lu H, Ouyang W, Huang C (2006) Inflammation, a key event in cancer development. *Molecular cancer research : MCR* 4 (4):221-233. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0261
- Lunshof JE, Gurwitz D (2012) Pharmacogenomic testing: knowing more, doing better. *Clin Pharmacol Ther* 91 (3):387-389. doi:10.1038/clpt.2011.339
- Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P (2016) Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. doi:10.1183/13993003.00359-2016

- Malvezzi M, Bosetti C, Rosso T, Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Romano C, Negri E, La Vecchia C (2013) Lung cancer mortality in European men: trends and predictions. *Lung Cancer* 80 (2):138-145. doi:10.1016/j.lungcan.2013.01.020
- Mandal S, Abebe F, Chaudhary J (2014) -174G/C polymorphism in the interleukin-6 promoter is differently associated with prostate cancer incidence depending on race. *Genetics and molecular research : GMR* 13 (1):139-151. doi:10.4238/2014.January.10.5
- Manicone AM, McGuire JK (2008) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol* 19 (1):34-41. doi:10.1016/j.semcdb.2007.07.003
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454 (7203):436-444. doi:10.1038/nature07205
- Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Carrilho S, Oliveira J, Lopes C (2003) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the shedding of circulating tumour cells in the blood of prostate cancer patients. *Cancer Lett* 189 (1):85-90
- Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, Carvalho R, Lopes C (2002) Linkage between polymorphisms in the prostate specific antigen ARE1 gene region, prostate cancer risk, and circulating tumor cells. *Prostate* 53 (1):88-94. doi:10.1002/pros.10135
- Mimori K, Yamashita K, Ohta M, Yoshinaga K, Ishikawa K, Ishii H, Utsunomiya T, Barnard GF, Inoue H, Mori M (2004) Coexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and epidermal growth factor (EGF) receptor in colorectal cancer: an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor is effective against MMP-7-expressing cancer cells. *Clin Cancer Res* 10 (24):8243-8249. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0849
- Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA (2008) Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic* 83 (5):584-594. doi:10.4065/83.5.584
- Monzo M, Navarro A, Ferrer G, Artells R (2008) Pharmacogenomics: a tool for improving cancer chemotherapy. *Clin Transl Oncol* 10 (10):628-637
- Mossbock G, Weger M, Faschinger C, Zimmermann C, Schmut O, Renner W, El-Shabrawi Y (2010) Role of functional single nucleotide polymorphisms of MMP1, MMP2, and MMP9 in open angle glaucomas. *Mol Vis* 16:1764-1770
- Nissinen L, Kahari VM (2014) Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1840 (8):2571-2580. doi:10.1016/j.bbagen.2014.03.007
- Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M (2001) Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 114 (Pt 1):111-118
- Orozco-Morales M, Soca-Chafre G, Barrios-Bernal P, Hernandez-Pedro N, Arrieta O (2016) Interplay between Cellular and Molecular Inflammatory Mediators in Lung Cancer. *Mediators of inflammation* 2016:3494608. doi:10.1155/2016/3494608

- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 8 (3):221-233. doi:10.1038/nrm2125
- Pao W, Girard N (2011) New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *The lancet oncology* 12 (2):175-180. doi:10.1016/S1470-2045(10)70087-5
- Peebles KA, Lee JM, Mao JT, Hazra S, Reckamp KL, Krysan K, Dohadwala M, Heinrich EL, Walser TC, Cui X, Baratelli FE, Garon E, Sharma S, Dubinett SM (2007) Inflammation and lung carcinogenesis: applying findings in prevention and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 7 (10):1405-1421. doi:10.1586/14737140.7.10.1405
- Peng B, Cao L, Ma X, Wang W, Wang D, Yu L (2010) Meta-analysis of association between matrix metalloproteinases 2, 7 and 9 promoter polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis* 25 (4):371-379. doi:10.1093/mutage/geq015
- Perlikos F, Harrington KJ, Syrigos KN (2013) Key molecular mechanisms in lung cancer invasion and metastasis: a comprehensive review. *Crit Rev Oncol Hematol* 87 (1):1-11. doi:10.1016/j.critrevonc.2012.12.007
- Peterson NB, Beeghly-Fadiel A, Gao YT, Long J, Cai Q, Shu XO, Zheng W (2009) Polymorphisms in tissue inhibitors of metalloproteinases-2 and -3 and breast cancer susceptibility and survival. *Int J Cancer* 125 (4):844-850. doi:10.1002/ijc.24405
- Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews Cancer* 9 (4):265-273. doi:10.1038/nrc2620
- Popper HH (2016) Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer metastasis reviews* 35 (1):75-91. doi:10.1007/s10555-016-9618-0
- Price SJ, Greaves DR, Watkins H (2001) Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276 (10):7549-7558. doi:10.1074/jbc.M010242200
- Pulukuri SM, Patibandla S, Patel J, Estes N, Rao JS (2007) Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene in human prostate tumors. *Oncogene* 26 (36):5229-5237. doi:10.1038/sj.onc.1210329
- Qian Q, Wang Q, Zhan P, Peng L, Wei SZ, Shi Y, Song Y (2010) The role of matrix metalloproteinase 2 on the survival of patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Cancer Invest* 28 (6):661-669. doi:10.3109/07357901003735634
- Qian Z, Zhao X, Jiang M, Jia W, Zhang C, Wang Y, Li B, Yue W (2012) Downregulation of cyclophilin A by siRNA diminishes non-small cell lung cancer cell growth and metastasis via the regulation of matrix metalloproteinase 9. *BMC Cancer* 12:442. doi:10.1186/1471-2407-12-442
- Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Khazen S, Dijkstra CD, de Vries HE (2006) Diapedesis of monocytes is associated with MMP-mediated occludin disappearance in brain endothelial cells. *FASEB J* 20 (14):2550-2552. doi:10.1096/fj.06-6099fje

- Ridge CA, McErlean AM, Ginsberg MS (2013) Epidemiology of lung cancer. *Seminars in interventional radiology* 30 (2):93-98. doi:10.1055/s-0033-1342949
- Rodriguez-Perez JM, Martinez-Rodriguez N, Vargas-Alarcon G, Vallejo M, Monroy-Munoz IE, Posadas-Romero C, Kimura-Hayama E, Juarez-Cedillo T, Fragoso JM, Perez-Hernandez N (2014) TIMP2 gene polymorphisms are associated with hypertension in patients with myocardial infarction. *Journal of genetics* 93 (2):517-522
- Roeb E, Schleinkofer K, Kernebeck T, Potsch S, Jansen B, Behrmann I, Matern S, Grotzinger J (2002) The matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *J Biol Chem* 277 (52):50326-50332. doi:10.1074/jbc.M207446200
- Rollin J, Regina S, Vourc'h P, Iochmann S, Blechet C, Reverdiau P, Gruel Y (2007) Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 56 (2):273-280. doi:10.1016/j.lungcan.2006.11.021
- Roy R, Yang J, Moses MA (2009) Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 27 (31):5287-5297. doi:10.1200/JCO.2009.23.5556
- Safranek J, Holubec L, Jr., Topolcan O, Pesta M, Klecka J, Vodicka J, Finek J, Kormunda S, Pesek M (2007) Expression of mRNA MMP-7 and mRNA TIMP-1 in non-small cell lung cancer. *Anticancer research* 27 (4C):2953-2956
- Safranek J, Pesta M, Holubec L, Kulda V, Dreslerova J, Vrzalova J, Topolcan O, Pesek M, Finek J, Treska V (2009) Expression of MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA in lung tissue of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and benign pulmonary disease. *Anticancer research* 29 (7):2513-2517
- Sandler AB, Nemunaitis J, Denham C, von Pawel J, Cormier Y, Gatzemeier U, Mattson K, Manegold C, Palmer MC, Gregor A, Nguyen B, Niyikiza C, Einhorn LH (2000) Phase III trial of gemcitabine plus cisplatin versus cisplatin alone in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 18 (1):122-130. doi:10.1200/JCO.2000.18.1.122
- Santarpia M, Daffina MG, Karachaliou N, Gonzalez-Cao M, Lazzari C, Altavilla G, Rosell R (2016) Targeted drugs in small-cell lung cancer. *Translational lung cancer research* 5 (1):51-70. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.12
- Scherf DB, Dally H, Muller P, Werle-Schneider G, Jager B, Edler L, Tuengerthal S, Fischer JR, Drings P, Bartsch H, Risch A (2010) Single nucleotide polymorphisms in matrix metalloproteinase genes and lung cancer chemotherapy response and prognosis. *Eur Respir J* 35 (2):381-390. doi:10.1183/09031936.00125608
- Schweigert D, Cicenias S, Bruzas S, Samalavicius NE, Gudleviciene Z, Didziapetriene J (2013) The value of MMP-9 for breast and non-small cell lung cancer patients' survival. *Advances in medical sciences* 58 (1):73-82. doi:10.2478/v10039-012-0066-y

- Serke M (2010) Adjuvant therapy in early-stage non-small cell lung cancer. *Frontiers of radiation therapy and oncology* 42:135-144. doi:10.1159/000262468
- Shackelford RE, Vora M, Mayhall K, Cotelingam J (2014) ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: a review. *Genes & cancer* 5 (1-2):1-14. doi:10.18632/genesandcancer.3
- Sharma KL, Misra S, Kumar A, Mittal B (2012) Higher risk of matrix metalloproteinase (MMP-2, 7, 9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) genetic variants to gallbladder cancer. *Liver Int* 32 (8):1278-1286. doi:10.1111/j.1478-3231.2012.02822.x
- Shen W, Xi H, Wei B, Chen L (2014) The prognostic role of matrix metalloproteinase 2 in gastric cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 140 (6):1003-1009. doi:10.1007/s00432-014-1630-6
- Shi M, Cao M, Song J, Liu Q, Li H, Meng F, Pan Z, Bai J, Zheng J (2015) PinX1 inhibits the invasion and metastasis of human breast cancer via suppressing NF-kappaB/MMP-9 signaling pathway. *Mol Cancer* 14:66. doi:10.1186/s12943-015-0332-2
- Shimoda M, Jackson HW, Khokha R (2016) Tumor suppression by stromal TIMPs. *Molecular & cellular oncology* 3 (3):e975082. doi:10.4161/23723556.2014.975082
- Sie L, Loong S, Tan EK (2009) Utility of lymphoblastoid cell lines. *J Neurosci Res* 87 (9):1953-1959. doi:10.1002/jnr.22000
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2016) Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians* 66 (1):7-30. doi:10.3322/caac.21332
- Singh RD, Haridas N, Patel JB, Shah FD, Shukla SN, Shah PM, Patel PS (2010) Matrix metalloproteinases and their inhibitors: correlation with invasion and metastasis in oral cancer. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 25 (3):250-259. doi:10.1007/s12291-010-0060-8
- Song XY, Zhou SJ, Xiao N, Li YS, Zhen DZ, Su CY, Liu ZD (2013) Research on the relationship between serum levels of inflammatory cytokines and non-small cell lung cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 14 (8):4765-4768
- Soria JC, Marabelle A, Brahmer JR, Gettinger S (2015) Immune checkpoint modulation for non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 21 (10):2256-2262. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2959
- Srivastava P, Lone TA, Kapoor R, Mittal RD (2012) Association of promoter polymorphisms in MMP2 and TIMP2 with prostate cancer susceptibility in North India. *Archives of medical research* 43 (2):117-124. doi:10.1016/j.arcmed.2012.02.006
- Sugimoto M, Yamaoka Y, Furuta T (2010) Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. *World J Gastroenterol* 16 (10):1188-1200
- Sukari A, Nagasaka M, Al-Hadidi A, Lum LG (2016) Cancer Immunology and Immunotherapy. *Anticancer research* 36 (11):5593-5606. doi:10.21873/anticancer.11144

- Swanton C, Govindan R (2016) Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer. *N Engl J Med* 374 (19):1864-1873. doi:10.1056/NEJMra1504688
- Szarvas T, Becker M, Vom Dorp F, Meschede J, Scherag A, Bankfalvi A, Reis H, Schmid KW, Romics I, Rubben H, Ergun S (2011a) Elevated serum matrix metalloproteinase 7 levels predict poor prognosis after radical prostatectomy. *Int J Cancer* 128 (6):1486-1492. doi:10.1002/ijc.25454
- Szarvas T, Jager T, Becker M, Tschirdewahn S, Niedworok C, Kovalszky I, Rubben H, Ergun S, vom Dorp F (2011b) Validation of circulating MMP-7 level as an independent prognostic marker of poor survival in urinary bladder cancer. *Pathol Oncol Res* 17 (2):325-332. doi:10.1007/s12253-010-9320-4
- Tan XL, Moyer AM, Fridley BL, Schaid DJ, Niu N, Batzler AJ, Jenkins GD, Abo RP, Li L, Cunningham JM, Sun Z, Yang P, Wang L (2011) Genetic variation predicting cisplatin cytotoxicity associated with overall survival in lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 17 (17):5801-5811. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1133
- Thunnissen E, van der Oord K, den Bakker M (2014) Prognostic and predictive biomarkers in lung cancer. A review. *Virchows Arch* 464 (3):347-358. doi:10.1007/s00428-014-1535-4
- Torre LA, Siegel RL, Jemal A (2016) Lung Cancer Statistics. *Advances in experimental medicine and biology* 893:1-19. doi:10.1007/978-3-319-24223-1_1
- Tsai HT, Hsieh MJ, Chiou HL, Lee HL, Hsin MC, Liou YS, Yang CC, Yang SF, Kuo WH (2014) TIMP-3 -1296 T>C and TIMP-4 -55 T>C gene polymorphisms play a role in the susceptibility of hepatocellular carcinoma among women. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (9):8999-9007. doi:10.1007/s13277-014-2170-z
- Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G (2013) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 48 (3):222-272. doi:10.3109/10409238.2013.770819
- Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, Herbst RS, Gettinger SN, Chen L, Rimm DL (2014) Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest* 94 (1):107-116. doi:10.1038/labinvest.2013.130
- Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* 92 (8):827-839. doi:10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D
- Wang YS, Miao LY, Liu L, Cai HR, Ding JJ, Ren SX, Zhou CC, Schmid-Bindert G (2013) Serum cytokine levels in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with clinical outcome of erlotinib treatment. *Chinese medical journal* 126 (20):3931-3935
- Wheeler HE, Dolan ME (2012) Lymphoblastoid cell lines in pharmacogenomic discovery and clinical translation. *Pharmacogenomics* 13 (1):55-70. doi:10.2217/pgs.11.121

- Wilson CL, Matrisian LM (1996) Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol* 28 (2):123-136
- Wojcik E, Jakubowicz J, Skotnicki P, Sas-Korczynska B, Kulpa JK (2010) IL-6 and VEGF in small cell lung cancer patients. *Anticancer research* 30 (5):1773-1778
- Wu AH, Fontham ET, Reynolds P, Greenberg RS, Buffler P, Liff J, Boyd P, Henderson BE, Correa P (1995) Previous lung disease and risk of lung cancer among lifetime nonsmoking women in the United States. *Am J Epidemiol* 141 (11):1023-1032
- Xu L, Lina W, Xuejun Y (2016) The diagnostic value of serum CEA, NSE and MMP-9 for on-small cell lung cancer. *Open Medicine* 11:59-62. doi:DOI 10.1515/med-2016-0012
- Yanagawa H, Sone S, Takahashi Y, Haku T, Yano S, Shinohara T, Ogura T (1995) Serum levels of interleukin 6 in patients with lung cancer. *Br J Cancer* 71 (5):1095-1098
- Yang B, Su K, Gao J, Rao Z (2012) Expression and prognostic value of matrix metalloproteinase-7 in colorectal cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 13 (3):1049-1052
- Yang L, Wang L, Zhang Y (2016) Immunotherapy for lung cancer: advances and prospects. *American journal of clinical and experimental immunology* 5 (1):1-20
- Ye S (2000) Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 19 (7):623-629
- Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D (2004) Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res* 64 (20):7622-7628. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1521
- Yu WH, Woessner JF, Jr., McNeish JD, Stamenkovic I (2002) CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev* 16 (3):307-323. doi:10.1101/gad.925702
- Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S (1999a) Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. *Hum Genet* 105 (5):418-423
- Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM (1999b) Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 99 (14):1788-1794
- Zhang J, Jin X, Fang S, Wang R, Li Y, Wang N, Guo W, Wang Y, Wen D, Wei L, Dong Z, Kuang G (2005) The functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-7 promoter increases susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma, gastric cardiac adenocarcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis* 26 (10):1748-1753. doi:10.1093/carcin/bgi144

- Zhao YG, Xiao AZ, Park HI, Newcomer RG, Yan M, Man YG, Heffelfinger SC, Sang QX (2004) Endometase/matrixin-2 in human breast ductal carcinoma in situ and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases-2 and -4: a putative role in the initiation of breast cancer invasion. *Cancer Res* 64 (2):590-598
- Zhou Y, Yu C, Miao X, Wang Y, Tan W, Sun T, Zhang X, Xiong P, Lin D (2005) Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 and lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 26 (6):1117-1121. doi:10.1093/carcin/bgi057

ANEXOS

Chapter 1

The Role of Inflammation in Lung Cancer

Mónica Gomes, Ana Luísa Teixeira, Ana Coelho, António Araújo
and Rui Medeiros

Abstract Lung cancer remains a serious public health problem and is the first cause of cancer death worldwide, and the overall 5-year survival rate for all stages is 14–17 % for Non-small-cell lung cancer and 6 % for small-cell lung cancer. Clinical and epidemiologic studies have suggested a strong association among chronic infection, inflammation, and cancer. Immune system plays a critical role in maintaining tissue homeostasis, cell turnover, tissue remodeling, and preventing

M. Gomes (✉) · A. L. Teixeira · A. Coelho · R. Medeiros
Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, EPE, Grupo de Oncologia Molecular—CI, Edifício Laboratórios, 4º piso Rua Dr. António Bernardino de Almeida, Porto 4200-072, Portugal
e-mail: monicagomes26@gmail.com

M. Gomes · A. L. Teixeira · R. Medeiros
ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Porto, Portugal

A. Coelho
Faculty of Medicine of University of Porto, Porto, Portugal

M. Gomes · A. L. Teixeira · A. Coelho · R. Medeiros
LPCC Research Department-Portuguese League Against Cancer (NRNorte), Porto, Portugal

R. Medeiros
CEBIMED, Health Sciences Faculty, Fernando Pessoa, University of Porto, Porto, Portugal

A. Araújo
Chief of the Medical Oncology Service of Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal

A. Araújo
Chief of the Medical Oncology Service of Centro Hospitalar de Entre Douro e Vouga, Santa Maria da Feira, Portugal

A. Araújo
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Porto, Portugal

B. B. Aggarwal et al. (eds.), *Inflammation and Cancer*, Advances in Experimental Medicine and Biology 816, DOI: 10.1007/978-3-0348-0837-8_1, © Springer Basel 2014

1

infection and cell transformation. The inflammatory component in the development of the neoplasm includes a diverse leukocyte population; these components are considered inflammatory tumor key factors promoting tumor progression due to its ability to release a variety of cytokines, chemokines, and cytotoxic mediators such as reactive oxygen species (ROS), metalloproteinases, interleukins, and interferons. Cancer-related inflammation affects many aspects of malignancy, including the proliferation and survival of malignant cells, angiogenesis, tumor metastasis, and tumor response to chemotherapeutic drugs and hormones. Moreover, epidemiologic studies and meta-analysis have shown that prolonged use of non-steroid anti-inflammatory (NSAID) drugs reduces the risk of several solid tumor including lung cancer. Strong lines of evidence suggest that the chemopreventive properties of chronic NSAID administration are based on their COX-inhibitory activity. However, the prevention is a much better and more economical way to fight against cancer than treating an already advanced and often incurable disease.

1.1 Introduction: Incidence, Survival, Major Gene Products and Current Therapies for Lung Cancer

In 2008, about 12.7 million cancer cases and 7.6 million cancer deaths are estimated to have occurred in this year worldwide, with 56 % of cases and 64 % of the deaths in the economically developing world (Jemal et al. 2011). Lung cancer was found to be the most commonly diagnosed cancer as well as the primary cause of cancer-related mortality for males worldwide and the second leading cause of cancer-related deaths for women (Jemal et al. 2011; Siegel et al. 2012). For the year 2012, it is estimated that lung cancer will account for 26 % of all female cancer deaths and 29 % of all male cancer deaths (Siegel et al. 2012). Breast cancer in females and lung cancer in males are the most frequently diagnosed cancers and the leading cause of cancer death for each sex in both economically developed and developing countries, except lung cancer is preceded by prostate cancer as the most frequent cancer among males in economically developed countries (Jemal et al. 2011).

Lung cancer was the most commonly diagnosed cancer as well as the leading cause of cancer death in males in 2008, globally. Among females, it was the fourth most commonly diagnosed cancer and the second leading cause of cancer death (Jemal et al. 2011; Ferlay et al. 2010). Lung cancer accounts for 13 % (1.6 million) of the total cases and 18 % (1.4 million) of the deaths in 2008 (Ferlay et al. 2010; Jemal et al. 2011).

The observed variations in lung cancer rates and trends across countries or between males and females within each country largely reflect differences in the stage and degree of the tobacco epidemic (Jemal et al. 2011).

Lung cancer can be divided into two major groups: small-cell lung cancer (SCLC) and non-small-cell cancer (NSCLC) (Hoffman et al. 2000; Molina et al. 2008), NSCLC accounts for approximately 85 % of all cases of lung cancer

(Molina et al. 2008; Araujo et al. 2007). These lung cancer cells can again be categorized based on their histological characteristics as squamous cell carcinoma, large cell carcinoma, and adenocarcinoma (Tang et al. 2013). NSCLC spreads slower than SCLC, so many patients who are diagnosed at an earlier stage are potentially curable, though NSCLC may often relapse at other metastatic site. Furthermore, NSCLC is generally less responsive to chemotherapy than SCLC, so that even with surgical resection at early diagnosis, approximately 50 % of NSCLC patients face recurring cancers (Tang et al. 2013). The 1-year survival rate for lung cancer was 43 % in 2003–2006. However, despite extensive preclinical and clinical research, the overall 5-year survival rate for all stages is still as low as 14–17 % for NSCLC (Araujo et al. 2007; Peebles et al. 2007) and even lower in SCLC (6 %) (Wu et al. 2012).

In recent years, knowledge concerning the molecular mechanisms underlying cellular transformation and development of cancer has been greatly expanded (Araujo et al. 2007). Alteration of the major cell signaling and regulatory pathways either by overexpression or gene sequence variation is a frequent event in lung cancer. These changes include alterations in receptor tyrosine kinases (TKs), such as epidermal growth factor receptor (EGFR), and alterations in angiogenesis pathways, apoptosis, proteasome regulation, and cell cycle control, among others (Molina et al. 2008).

The EGFR is a tyrosine kinase that contributes to the regulation of cellular homeostasis. It is a 170-KDa membrane protein that stimulates downstream cell proliferation, survival, and tumorigenesis (Wheeler et al. 2010; Cohen 1965). EGFR has been implicated in the growth of several human epithelial malignancies, including lung cancer. It is overexpressed in several cancers, including approximately 40–80 % of NSCLC, which made EGFR a popular target for new drug treatment exploration (Tang et al. 2013).

The ALK tyrosine kinase receptor has gained much attention recently as a newly emerging relevant biomarker and therapeutic target in NSCLC (Wu et al. 2012). The activation of ALK is primarily through the formation of fusion genes. EML4-ALK translocation is the most common ALK gene rearrangement. This rearrangement in NSCLC patients is mainly found in younger non-smoking patients with adenocarcinoma (Wu et al. 2012; Kwak et al. 2010). EML4-ALK rearrangements are mutually exclusive with EGFR or KRAS mutations (Wu et al. 2012; Li et al. 2013). It has been reported that approximately 2–11 % of tumors carrying positive EML4-ALK (Li et al. 2013).

KRAS mutations are a negative predictor of response to EGFR TKs, mainly accounting for primary resistance (Linardou et al. 2008; de Mello et al. 2011). Most KRAS mutations in lung adenocarcinoma are associated with smoking. KRAS positive mutations are limited to NSCLC and are mutually exclusive to mutations in EGFR and ALK (Linardou et al. 2008; Wu et al. 2012).

Lung cancer is a very aggressive cancer and its treatment still remains a challenge for health professionals. Conventional treatments are based on surgery, radiation therapy, and chemotherapy. The selection of therapeutic regimen is based on the cancer type (small-cell or non-small-cell), stage of disease, patient's functional

ability, and genetic characterization (Wu et al. 2012; Tang et al. 2013; Hoffman et al. 2000).

The majority of stage I through stage IIIA lung cancer patients generally choose surgery as their primary option. Another popular option is preoperative chemotherapy, which has been shown to improve survival rate in patients with NSCLC. Patients who require complete resection and no preoperative chemotherapy usually invest in adjuvant chemotherapy. For patients with unresectable NSCLC, RT and chemotherapy are excellent options for treatment (Tang et al. 2013). Further, certain agents have been combined with the chemotherapy to enhance its effects. The anti-vascular endothelial growth factor agent, bevacizumab, for example, when combined with chemotherapy, has resulted in increased survival rate when compared to chemotherapy treatment alone (Tang et al. 2013).

For first-line chemotherapy, a platinum-based two-drug combination is suggested for patients (Azzoli et al. 2009; Molina et al. 2008). Studies show that the cisplatin, when used in combination chemotherapy, is associated with improved response rates, no change in survival rate, and increased toxicity when compared with the carboplatin (Tang et al. 2013). Also, another drug bevacizumab has demonstrated great potential when used in combination with carboplatin or paclitaxel in NSCLC patients (Tang et al. 2013; Molina et al. 2008).

The second-line chemotherapy treatment options, after primary treatment fails to yield effective results, do differ from the first-line drugs. Approximately 30 % of NSCLC patients who undergo first-line cancer treatment are candidates for second- or third-line therapeutics. The first agent that was approved for second-line therapeutics was docetaxel (Fossella et al. 2000). Other drugs that were also soon approved include pemetrexed, erlotinib, and gefitinib (Tang et al. 2013). Undergoing research is currently evaluating other possible strategies for second-line therapeutics.

1.2 Inflammatory Signaling Pathways Associated with Lung Cancer

Cancer is a hyperproliferative disorder that involves morphological cellular transformation, dysregulation of apoptosis, uncontrolled cellular proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis (Lin and Karin 2007; Hanahan and Weinberg 2011).

Clinical and epidemiologic studies have suggested strong association between chronic infection, inflammation, and cancer (Coussens and Werb 2002; Lin and Karin 2007; Ribeiro et al. 2007). Up to 20 % of cancers are linked to chronic infections, 30 % can be attributed to tobacco smoking and inhaled pollutants (such as silica and asbestos), and 35 % to dietary factors (20 % of cancer burden is linked to obesity) (Aggarwal et al. 2009).

Approximately 150 ago, Virchow postulated that inflammation is a predisposing factor of tumorigenesis (Lu et al. 2006; Balkwill and Mantovani 2001; Schottenfeld and Beebe-Dimmer 2006). This hypothesis was based on his observation that

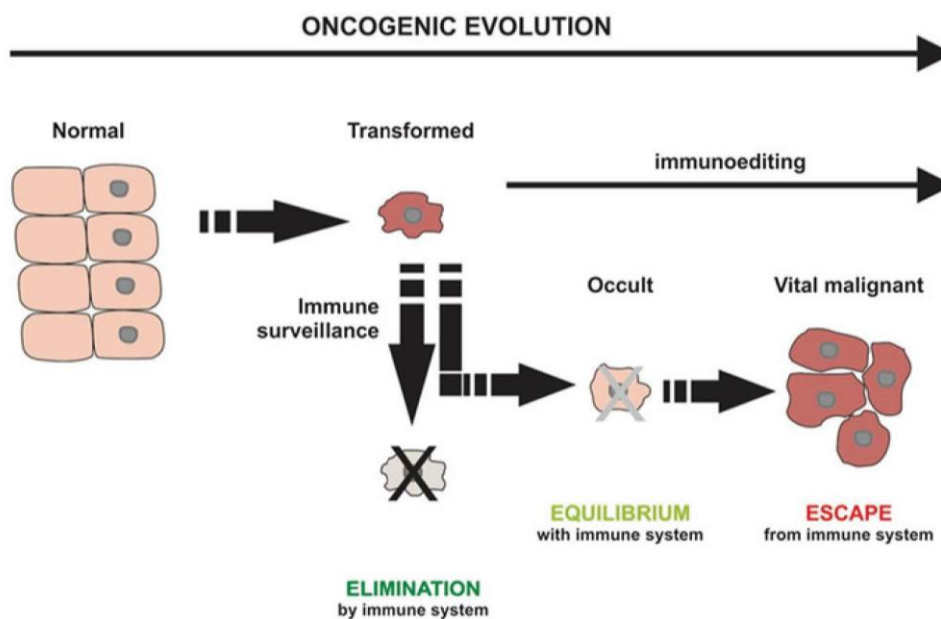


Fig. 1.1 Oncogenic evolution (adapted from Bremnes et al. 2011)

cancerous tissue often arose at sites of chronic inflammation and that inflammation cells were present in the resect tumors (Bremnes et al. 2011; Mantovani et al. 2008; Balkwill and Mantovani 2001). In contrast, Burnet proposed, in 1970, the concept of immunological surveillance: the immune system spontaneously identifies and eliminates cancer cells, thus protecting against tumor development (Bremnes et al. 2011; Van Ginderachter et al. 2006) (Fig. 1.1).

During the last decades, and according to Virchow hypothesis, epidemiological studies have shown that individuals prone to chronic inflammatory diseases have an increased risk of cancer development and that the underlying infections and inflammatory responses have been linked to 15–20 % of all cancer deaths worldwide (Bremnes et al. 2011).

The ultimate recognition of inflammation as a major player in cancer development was reinforced with the 2011 update article on cancer hallmarks by Hanahan and Weinberg, where it was classified as an enabling characteristic of tumors (Mantovani et al. 2008; Hanahan and Weinberg 2011).

These evidence gathered over the last years showed that inflammation contributes to the appearance of multiple cancer hallmark capabilities by supplying important molecules to the tumor microenvironment. Those molecules include growth factors that sustain the proliferative signaling, survival factors that limit apoptosis, pro-angiogenic factors, extracellular matrix-modifying enzymes that favor angiogenesis, invasion, and metastasis (Ben-Baruch 2006). Furthermore, inflammation manifestations are observed at the earliest stages of tumor progression and are capable of nurturing insipient neoplasias into developed cancers. In addition, inflammatory cells can release a number of chemicals, such as ROS,

that are actively mutagenic and promote malignancy even further (Hanahan and Weinberg 2011).

Immune system plays critical roles in maintaining tissue homeostasis, cell turnover, tissue remodeling, and preventing infection and cell transformation. It is composed of two distinct compartments mediating innate and adaptive immune response. Each compartment has, through a diversity of cells and soluble mediators, advanced communication networks, which enable rapid and effective responses to tissue injury (Bremnes et al. 2011).

Although it is clear that inflammation itself is not the cause of the onset of cancer cell proliferation, a sustained atmosphere rich in inflammatory cells, growth factors, and promoters activated stromal DNA damage may enhance and/or promote risk for the emergence of malignancies. This tumor microenvironment is composed not only by resident tissue cells such as fibroblasts and endothelial cells but also by infiltrating host leukocytes (Ben-Baruch 2006). Tumor cells produce several cytokines and chemokines that attract leukocytes. Several inflammatory cytokines have been implicated to mediate different steps in the pathway leading to carcinogenesis. Increased serum levels of pro-inflammatory interleukins IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, and IL-18 have been observed in different types of cancer, including lung cancer (Tsai et al. 1999; Srivani and Nagarajan 2003; Michalaki et al. 2004; Ye et al. 2007; Azevedo et al. 2011).

On the other hand, the pleiotropic anti-inflammatory interleukins, IL-4 and IL-10, stimulate the growth of many tumors, such as ovarian, prostate, and lung although they have an inhibitory effect on growth or invasion of other types of cancer (Toi et al. 1992; Takeshi et al. 2005; Lan et al. 2006; Gomes et al. 2012) (Fig. 1.2).

The inflammatory component in the development of the neoplasm includes a diverse leukocyte population, which stand macrophages (abundant in many types of tumors), lymphocytes, natural killer (NK) cells, neutrophils, and dendritic cells.

These components are considered inflammatory tumor key factors in promoting tumor progression due to its ability to release a variety of cytokines, chemokines, cytotoxic mediators such as reactive oxygen species, metalloproteinases (MMPs) and agents perforator membrane, and soluble mediators of cell death, such as TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), interleukins (IL), and interferons (IFNs) (Coussens and Werb 2002).

Many of the mediators released during chronic inflammation promote unregulated cell proliferation and invasion, induce angiogenesis, and increase mutagenesis. Due to these characteristics, the transformation and initiation of a malignant phenotype may occur and tumor progression may be promoted. In addition, many of the factors released by inflammatory cells may lead directly or indirectly to a marked suppression of the immune response, which otherwise could have an important role in tumor eradication (Ben-Baruch 2006).

The lung cancer tumor microenvironment is composed of extracellular matrix, tumor cells, fibroblasts, inflammatory cells, vascular and lymphatic endothelial cells, growth factors, cytokine, chemokines, hormones, proteases, among others. Fibroblasts exist normally in the connective tissue and produce extracellular

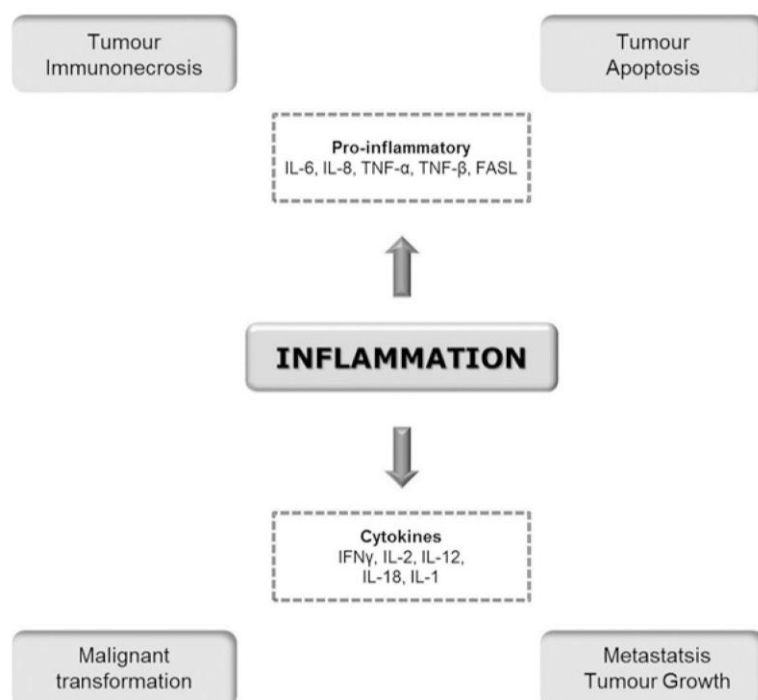


Fig. 1.2 The tumor microenvironment associated with inflammation and its consequence in cancer processes (adapted from Serefoglou et al. 2008)

matrix and collagen. They are essential in wound repairing but when exposed to cigarette smoke, they secrete pro-inflammatory mediators such as prostaglandin-E2 (PGE₂), IL-8, IL-6, and MCP-1, leading to a prolonged inflammatory response (Martey et al. 2004). Macrophages are recruited by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), GM-CSF, macrophage-stimulating protein (MSP), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- β (TGF- β), and macrophage migration inhibitory factor (MIF).

It is known that macrophages can be activated in response to microbiological agents and in particular cytokines interferon- γ (IFN- γ) (classical macrophage activation). However, it was recently discovered that anti-inflammatory molecules, such as glucocorticoid hormones and cytokines IL-4, IL-13, and IL-10, induce a different program activation of macrophages (alternative macrophage activation) (Sica et al. 2006; Mantovani et al. 2002, 2004). Tumor-associated macrophages (TAM) that interact with tumor cells to produce cytokines and growth factors that influence tumor development have two different phenotypes: M1 and M2 (O'Callaghan et al. 2010). The M1 macrophages have been associated with better prognosis in NSCLC, are efficient immune cells and are associated with an anti-tumor behavior (Bremnes et al. 2011). Nonetheless, the most prevalent phenotype is the M2, which promotes tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis.

They also suppress adaptive immunity by inducing T cell dysfunction (Bremnes et al. 2011). For a long period, classical or M1 macrophage activation was recognized as the unique activation program in response to microbial products and IFN- γ and has only recently become clear that anti-inflammatory molecules, such as glucocorticoid hormones, IL-4, IL-13, and IL-10, are more than simple inhibitors of macrophage activation, since they induce distinct M2 activation programs (Sica et al. 2006; Wang and Joyce 2010; Van Ginderachter et al. 2006). TAM derived from circulating monocytes are recruited at the tumor site by a tumor-derived chemotactic factor for monocytes, originally described by this group and later identified as the chemokine CCL2/MCP-1 (Sica et al. 2006; Coelho et al. 2006). The molecular mechanisms accounting for the constitutive expression of chemokines by cancer cells have been defined only for CXCL1 and involve NF- κ B activation by NF- κ B-inducing kinase (Sica et al. 2006).

Neutrophil infiltration was described in NSCLC, especially in the adenocarcinoma bronchoalveolar subtype, and associated with poorer outcomes. The recruitment, activation, and survival of these cells are under the influence of the tumor microenvironment. Furthermore, neutrophil release pro-inflammatory cytokines, proteases, ROS, that can cause damage to the DNA and oncogene activation, matrix degradation, tumor cell proliferation, increased metastasis and enhanced angiogenesis may also influence cellular these processes (Gregory and Houghton 2011). Neutrophils are also thought to have a polarized function, as the one that occurs in TAM, with N1 neutrophils being anti-tumor and N2 neutrophils pro-tumor (88). CD8+ T cells are proposed to have a protective role against tumors, by modifying the tumor stromal and epithelium and therefore reducing disease progression and metastasis, but sometimes fail to mount a robust anti-tumor response due to suppressive factors that affect their survival (Bremnes et al. 2011; Gregory and Houghton 2011). Nevertheless, CD8+ T cells in the stromal correlated with disease-specific survival (DSS) in NSCLC (Bremnes et al. 2011). Stromal levels of helper CD4+ T cells correlated significantly with DSS and were a favorable independent prognostic factor in NSCLC patients (Bremnes et al. 2011). The localization of CD8+ and CD4+ T cells is associated with an improved survival (Suzuki et al. 2011). Regulatory T cells suppress host immune responses and are thought to promote tumor growth. Their levels correlated positively with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression levels in NSCLC tumors and were associated with increased recurrence (Suzuki et al. 2011). Increased numbers of epithelial and stromal B lymphocytes correlated with DSS in NSCLC. This good prognosis is thought be related to limited tumor dissemination and to the antibody-mediated action of NK cells (Bremnes et al. 2011). Increasing numbers of stromal NK cells were associated with DSS and considered a favorable prognostic factor (Bremnes et al. 2011). An effective anti-tumor response depends on the action of dendritic cells given their important role as antigen-presenting cells (Bremnes et al. 2011). Increasing numbers of these cells were associated with DSS, and the density of mature dendritic cells was a better predictor of NSCLC clinical outcome (Bremnes et al. 2011). Mast cell density was also significantly associated with angiogenesis, microvessel density, and poor prognosis of NSCLC patients (Bremnes et al. 2011).

1.3 Role of Inflammatory Molecules in the Development of Lung Cancer: Evidence from in Vitro Studies

Chronic inflammation has been postulated to play a central role in orchestrating these processes in concert with irreversible mutational events and may provide reversible targets for lung cancer prevention and treatment. Cancer-related inflammation affects many aspects of malignancy, including the proliferation and survival of malignant cells, angiogenesis, tumor metastasis, and tumor response to chemotherapeutic drugs and hormones (Mantovani et al. 2008). When tissue homeostasis is persistently perturbed as in chronic inflammation, interactions between innate and adaptive immune cells as well as composition of cells and mediators will change. The inability to properly regulate the innate and adaptive immune system can result in excessive tissue remodeling, loss of tissue architecture due to destruction, protein alterations and genotoxic DNA damage due to oxidative stress and subsequently increased cancer risk (de Visser et al. 2006).

1.3.1 Role of Inflammatory Molecules in the Transformation of Lung Cancer Cells

There are some events that are required to drive from initiated cells to malignant tumors (Hanahan and Weinberg 2011). The infiltration of immune cells to tumors may repress tumor growth (Dunn et al. 2002). However, the increasing concern hypothesis is that inflammatory cells act as tumor promoters in inflammation-associated cancers (Smyth et al. 2004). Accumulated mutations in epithelial cells lead to dysregulation of their growth and migration. These dysregulated may also produce cytokines and chemokines to attract immune cells to facilitate cancer development (Lin and Pollard 2004; Coelho et al. 2006).

Several studies on tumor–host interaction have highlighted the importance of inflammatory response in the early steps of carcinogenesis as well as in established progressive tumors and are beginning now to identify the contribution of polarized inflammatory responses in cancer progression (Sica et al. 2006; Wang and Joyce 2010).

TNF is a transforming agent for carcinogen-treated fibroblast. Two weeks of exposure to the cytokine in vitro is sufficient to render cells capable of tumor formation in nude mice (Komori et al. 1993). The molecular basis may involve induction of reactive oxygen. Reactive oxygen in the form of NO is often generated by inflammatory cytokine induction of NO synthase. NO is an important regulatory molecule in both inflammation and cancer development (Lu et al. 2006). NO can directly oxidize DNA, resulting in mutagenic changes, and may damage some DNA repair proteins (Jaiswal et al. 2000). In study of Yan and co-workers, they revealed that TNF- α is potent mutagen that causes DNA damage through the induction of ROS (Yan et al. 2006; Aggarwal et al. 2006). This study brings

up two new concepts, a mechanism through which a cytokine can induce genetic instability and the involvement of the TNF- α -mediated DNA damage pathway in inflammation-associated carcinogenesis (Yan et al. 2006). DNA damage can be induced by conventional mutagens, such as radiation and chemicals, or endogenous from errors in DNA replication or ROS produced cell metabolism. Yan and co-workers found that endogenous cytokine TNF- α is potent mutagen by virtue of its ability to induce ROS (Yan et al. 2006). Therefore, TNF- α drives tumor development by promoting the accumulation of mutations and survival of precancerous or transformed cells (Yan et al. 2006).

1.3.2 Role of Inflammatory Molecules in the Survival of Lung Cancer Cells

A large number of studies suggest that TNF and chemokines are candidate linking molecules between inflammation and cancer (Lu et al. 2006). The TNF, which is produced mainly by activated macrophages but also by tumor cells, binds to membrane-bound homotrimeric receptors (Lu et al. 2006).

It is well established the critical role of TNF- α in chronic inflammatory diseases, and its tumor-promoting effects have been demonstrated (Lin and Karin 2007). The production of TNF- α by tumor cells or inflammatory cells in the tumor microenvironment can promote tumor cell survival through the induction of genes encoding NF- κ B-dependent anti-apoptotic molecules (Lin and Karin 2007; Luo et al. 2004). Furthermore, TNF- α promotes cell survival and thereby reduces asbestos-induced cytotoxicity, increasing the pool of asbestos-damaged mesothelial cells that are susceptible to malignant transformation (Yang et al. 2006; Lin and Karin 2007). Other actions of TNF- α that might enhance tumor progression, as opposed to tumor initiation, include promotion of angiogenesis and metastasis, as well as impairment of immune surveillance by strongly suppressing many T cell responses and the cytotoxic activity of activated macrophages (Elgert et al. 1998; Lin and Karin 2007).

Transforming growth factor- β (TGF β), an immunosuppressive cytokine (Flavell et al. 2010), with a pleiotropic role in tumor biology, is a cytokine frequently overexpressed in many cancers, including NSCLC (Bruno et al. 2013; Teixeira et al. 2011; Siegel and Massague 2003). TGF β belong to widely expressed family of cytokines with pleiotropic effects on a variety of cellular functions such as cell growth, proliferation, differentiation, and apoptosis (Luo et al. 2010).

TGF β also has a role in the tumor microenvironment immune cell polarization, including macrophages, neutrophils, and NK cells associated with tumor immune evasion (Flavell et al. 2010; Siegel and Massague 2003). High expression of TGF β is characteristic of NSCLC and predictive of poor survival (Teixeira et al. 2011).

Interleukin-10 (IL-10) is a multifunctional cytokine with both immunosuppressive and anti-angiogenic functions and consequently has both tumor-promoting

and tumor-inhibiting properties (Shih et al. 2005). Raised levels of serum and peri-tumoral IL-10 production have been reported in many malignant (Dummer et al. 1995), including lung cancer (Shih et al. 2005), which have been interpreted in support of a role for IL-10 in tumor escape from the immune response. Furthermore, increased production of immunosuppressive IL-10 by NSCLC and increased serum concentrations of IL-10 in NSCLC patients have both been shown recently to correlate with reduced survival (Shih et al. 2005). Serum levels of IL-10 were found to be elevated in NSCLC patients when compared to healthy controls; moreover, IL-10 serum levels were demonstrated to be higher in patients with metastatic disease as opposed to the values recorded in patients with undis-seminated cancer (De Vita et al. 2000). IL-10 promotes tumor malignancy by promoting T cell apoptosis and tumor cell survival (Wang et al. 2012). In lung carcinomas, IL-10 production can inhibit tumor cell susceptibility to cytotoxic T-lymphocyte-mediated killing (Asselin-Paturel et al. 2001). IL-10 transgenic cytotoxic mice injected with Lewis lung carcinoma cells developed larger tumors than control mice, suggesting that the production of IL-10 prevents the development of an effective immune response against the tumor cells (Montuenga and Pio 2007).

1.3.3 Role of Inflammatory Molecules in the Proliferation of Lung Cancer Cells

NF- κ B is a positive mediator of cell growth and proliferation. NF- κ B increases the expression of several factors involved cell cycle progression such as cyclins D and E (Chen et al. 2011). Upregulation of cyclin D1 expression by NF- κ B is associated with enhanced transition from G1 to S phase (Chen et al. 2011; Nogueira et al. 2013). Furthermore, NF- κ B negatively regulates expression of growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 (GADD45), a cell cycle checkpoint protein that keeps cell at the G2/M phase transition (Chen et al. 2011). Additionally, the mutual interplay between NF- κ B and proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β is also involved in stimulating cancer cell proliferation, particularly during chronic inflammation (Karin 2008). The contributions of NF- κ B to lung cancer development are complex, underlying mechanism of which have not been fully understood (Chen et al. 2011). There is considerable evidence that NF- κ B is constitutively activated in a variety of solid tumors, including prostate, breast, cervical, pancreatic, and lung cancer (Chen et al. 2011; Karin 2008). Although lung tumors are histologically heterogenic, tumor samples obtained from lung cancer patients showed high levels of NF- κ B activation in both SCLC and NSCLC and are significantly associated with disease advancement in TNM stages and poor prognosis in lung cancer patients (Chen et al. 2011). Inhibiting NF- κ B with different approaches such as siRNA, IKK inhibitors, and IkappaB super suppressor inhibited lung cancer cell's survival and proliferation (Chen et al. 2011; Karin 2008).

IL-6 is a potent pleiotropic inflammatory cytokine that is considered a key growth-promoting and anti-apoptotic factor, and this interleukin was responsible of biological activities in immune regulation, hematopoiesis, inflammation, and oncogenesis which is produced by various types of human normal and transformed tumor cells and transformed tumor cells (Ishihara and Hirano 2002; Lin and Karin 2007; Chang et al. 2005). IL-6 is of particular interest because they are expressed in malignant epithelial cells, and their expression is associated with a poor prognosis in lung cancer patients (Pine et al. 2011). Consistent with this prominent role in cell proliferation, IL-6 has been detected in primary squamous cell carcinomas, adenocarcinomas, as well as in tumor cell lines (Chang et al. 2005; Azevedo et al. 2011).

Increased serum levels of IL-6 was found in 39 % of lung cancer patients, whereas IL-6 was not detected in the serum of healthy people as well as patients with benign lung diseases (Chang et al. 2005; Yanagawa et al. 1995). Bihl and co-workers have demonstrated that IL-6 may be required in the control of cell proliferation in a subset of NSCLC cell lines, and there are two subgroups of NSCLC IL-6 dependent and independent (Bihl et al. 1998). Paradoxically, anti-tumor effects of IL-6 have been demonstrated in vitro and in vivo patients with NSCLC and breast cancer (Chang et al. 2005).

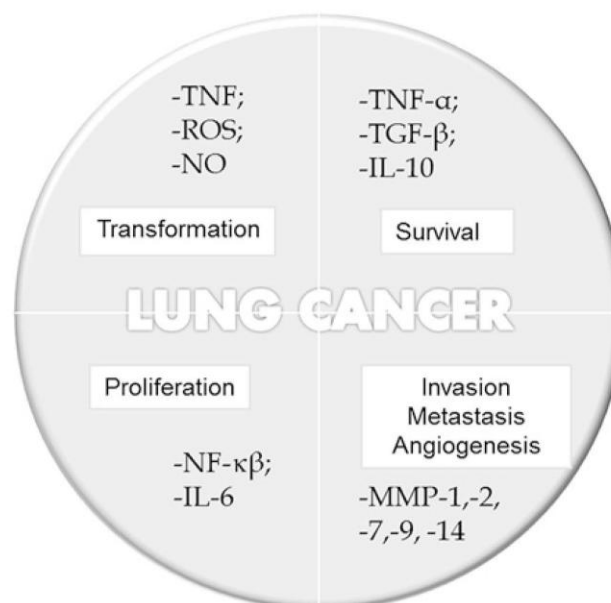
1.3.4 Role of Inflammatory Molecules in the Invasion, Metastasis, and Angiogenesis of Lung Cancer Cells

The tumor vasculature is derived from sprouting of local blood vessels (angiogenesis) and circulating vasculogenic progenitor cells derived from the bone marrow (vasculogenesis). The new vessels are often irregular and leaky due to lack of the pericyte cover, with the result that tumor cells can penetrate them more easily. As compared to blood capillaries, lymphatic endothelial cells have even less developed junctions with frequently large interendothelial gaps and impaired basement membranes (Kessenbrock et al. 2010). The invasive margin is a critical area for stimulation of angiogenesis and lymphangiogenesis in tumors, which contributes to tumor invasion and metastasis (Padera et al. 2002).

The major MMPs involved in tumor angiogenesis are MMP-2, MMP-9, and MMP-14, and to a lesser extent MMP-1 and MMP-7 (Kessenbrock et al. 2010; Rao et al. 2005).

MMPs are a family of proteolytic enzymes that are capable of degrading various components of the extracellular matrix (Liu et al. 2012). They are involved in all stages of cancer progression, not only in the process of tumor invasion and metastasis (Hu et al. 2005) but also in as proliferation, adhesion, migration, differentiation, angiogenesis, senescence, autophagy, apoptosis, and evasion of the immune system (Gonzalez-Arriaga et al. 2012; Deryugina and Quigley 2006). The expression of these MMPs by tumor cells may help to increase the invasive potential of tumor cells by allowing the remodeling of the extracellular matrix

Fig. 1.3 Overview of the role of inflammatory molecules in development of lung cancer



(Hu et al. 2005; Gomes et al. 2011). The proteolytic activity is also required for a cancer cell to invade a nearby blood vessel (intravasation) and then extravasate at a distant location and invade the distant tissue in order to seed a new metastatic site (Roy et al. 2009). Increased expression of MMP-2 and MMP-9 was shown to correlate with an invasive phenotype of cancer cells (Vihinen and Kahari 2002). Several recent reports confirmed lung neoplastic cells produce both and their inhibitors (Brown et al. 1993).

MMPs have also been implicated in the epithelial to mesenchymal transition (EMT), a hallmark of cancer progression to metastasis (Thiery 2002; Roy et al. 2009; Rao et al. 2005). During EMT, tumor cells acquire migratory characteristics and more readily invade into surrounding tissues and metastasize to secondary sites (Roy et al. 2009; Rao et al. 2005).

Several studies have reported that plasma and/or serum levels of MMP-9 and TIMP-1 are elevated in patient with stage III or IV lung cancer, when compared with those in patients with nonmalignant lung diseases (Jumper et al. 2004; Koc et al. 2006). Retrospective studies of NSCLC tissue found that MMP-7 expression was higher in squamous cell carcinomas than in adenocarcinomas and correlated with significantly lower overall in patients (Liu et al. 2007). In the normal lung, MMP-9 is not produced by resident cells, but under various forms of stimulation, bronchial epithelial cells, alveolar type II cells, fibroblasts, smooth muscle cells, and endothelial cells produce MMP-9 (Atkinson and Senior 2003). Leukocytes in the lung can also be a source of MMP-9. Macrophages, eosinophils, mast cells, lymphocytes, NK cells, and dendritic cells all can produce MMP-9 (Atkinson and Senior 2003). Lung cancer cells, both primary and metastatic, can express MMP-9 constitutively, which may correlate with metastatic potential (Atkinson and Senior 2003; Zucker et al. 1992; Baruch et al. 2001) (Fig. 1.3).

1.4 Evidence from Patients for the Role of Inflammation in Lung Cancer Cells

In study of Zeni and co-workers, they show that expression of IL-10 is increased in TAMs of patients with stage II, III, and IV NSCLC compared with those with stage I NSCLC. In addition, IL-10 positive TAM percentage was higher in patients with lymph node metastases than in those without lymph node metastases. Moreover, higher IL-10 expression by TAMs was associated with shorter overall survival (Zeni et al. 2007). This study was the first time they showed, in NSCLC, TAMs express IL-10 and that its expression correlates with both disease progression and prognosis (Zeni et al. 2007). By the other hand, the study of Hatanaka and co-workers shows that NSCLC patients with high IL-10-expressing tumors showed poorer prognosis than those without IL-10 expression (Hatanaka et al. 2000).

Another important molecule is RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted); also, CCL5 is a known chemotactic cytokine that is produced by many cell types, including T-lymphocytes, monocytes, platelets, eosinophils, epithelial cells, dendritic cells, and mast cells (Umekawa et al. 2013). RANTES has been used as a prognostic indicator in both breast and cervical cancers, and high levels of RANTES in these malignancies correlate with poor outcome (Borczuk et al. 2008; Niwa et al. 2001).

Umekawa and co-workers showed that, in NSCLC patients, high level of plasma RANTES at diagnosis was associated with the severity of general fatigue. Low level of plasma RANTES at diagnosis was significantly associated with long-term survival. Thus, patients with high systemic inflammation, as represented by RANTES, may experience severe general fatigue and shorter survival time (Umekawa et al. 2013). In another study, Moran and co-workers found a correlation between increased RANTES expression and tumor lymphocytic response in lung cancer patients (Moran et al. 2002).

De Vita, in 1998, has evaluated serum levels of IL-6 in a group of advanced NSCLC patients and found that patients who respond to cisplatin-based chemotherapy have lower serum IL-6 levels when compared with unresponsive patients. Their data suggest that NSCLC patients with high levels of IL-6 have a worse clinical outcome and may manifest resistance to cisplatin chemotherapy (De Vita et al. 1998). However, in study of Chang and co-workers, they failed to demonstrate that exogenous or endogenous IL-6 could influence cisplatin or etoposide sensitivity of the tested NSCLC cells at cellular level (Chang et al. 2005).

1.5 Inhibitors of Inflammation for the Prevention and Treatment of Lung Cancer

Epidemiologic studies and meta-analysis have shown that prolonged use of NSAIDs reduces the risk of several solid tumor including lung cancer, and recent meta-analysis suggests that low-dose aspirin could reduce the relative risk of

cancer mortality (Zhan et al. 2013; Vaish and Sanyal 2011; Setia and Sanyal 2012). Both clinical and experimental studies support the anti-neoplastic effects of NSAIDs mediated by regulation of COX-2 levels and induction of apoptosis (Haynes et al. 2003). A daily intake of NSAIDs for 1 or 2 years is reported to reduce 60–68 % of relative risk of lung cancer (Harris et al. 2007). The best known target of NSAIDs, including aspirin, is the enzyme COX-2, a key enzyme involved in the production of prostaglandins and other eicosanoids from arachidonic acid (Menter et al. 2010; Pereira et al. 2010). Due primarily to the action of COXs on the free arachidonic acid (AA) liberated from membrane phospholipids, overproduction of PGE₂ which is predominantly generated by upregulation of COX-2 is associated with a variety of carcinogenic mechanisms (Mao et al. 2005, 2011).

The association between COX-2 overexpression and survival in lung cancer patients has been studied for over a decade (Dalwadi et al. 2005). COX-2 expression has also been shown to be a poor prognostic indicator in non-small-cell lung cancer (Khuri et al. 2001; Li et al. 2011). Inhibition of COX-2 and thus of PGE₂ synthesis suppresses lung tumorigenesis in animal models (Mao et al. 2011). According to these evidences, COX-2 is one of the targets under investigation for lung cancer therapy and chemoprevention (Dubinett et al. 2003; Lee et al. 2007). Some reports indicate that the regular use of aspirin and other is associated with reduced risks of developing lung cancer in animal models and in smokers (Smith et al. 2006; Brody and Spira 2006; Peebles et al. 2007). Later epidemiologic studies have confirmed the chemopreventive effect of NSAIDs in colorectal cancer (Gupta and Dubois 2001). More recently, it has become clear that effects of aspirin may not be restricted to gastrointestinal tract cancers, but may also be relevant in the prevention of breast cancer and lung cancer (Ballaz and Mulshine 2003). In animal model of lung cancer, anti-inflammatory treatment resulted in a significance (34–52 %) reduction of tumor multiplicity (i.e., in number of tumors per animal), although treatment with anti-inflammatory drugs did not completely inhibit tumor growth (Rioux and Castonguay 1998; Duperron and Castonguay 1997; Ballaz and Mulshine 2003).

Strong lines of evidence suggest that the chemopreventive properties of chronic NSAID administration are based on their COX-inhibitory activity. Overexpression of COX-2 is associated with poorer prognosis in some cancers, including NSCLC (Brabender et al. 2002; Ballaz and Mulshine 2003).

However, increasing evidences showing that NF-κB plays a critical role in lung cancer development suggest NF-κB as a target for lung cancer chemoprevention (Chen et al. 2011). Interestingly, some agents that have lung cancer preventive potential, including NSAIDs and dietary compounds, possess inhibitory activity on NF-κB (Cuzick et al. 2009). Oral administration of pomegranate fruit extract, which inhibits NF-κB, significantly reduced multiplicity of lung tumor induced by benzo(a)pyrene and N-nitroso-tris-chloroethylurea (Khan et al. 2007a, b). Chemoprevention involves prolonged use of preventive agents. The long-time use of the NF-κB inhibitors or anti-inflammatory drugs is likely to result in un-tolerable side effects (Karin 2006). Thus, dedicated single NF-κB inhibitors are unlikely to be used as chemoprevention agents (Cuzick et al. 2009). It has been proposed

that logically constructed mixtures of agents or combination treatments are better choice for lung cancer chemoprevention (Chen et al. 2011). This strategy would improve the efficacy of cancer prevention while eliminate the possible side effects.

1.6 Conclusions and Future Directions

Inflammation can affect all hallmarks of tumor development and prognosis as well as the response to therapy. During the inflammation progress, various types of leukocytes, lymphocytes, and other inflammatory cells are activated and attracted to the inflamed site by a signaling network involving a great number of growth factors, cytokines, and chemokines (Lu et al. 2006).

In the NSCLC microenvironment, there is a complex interaction between immune cells and tumor cells as well as other stromal cell types and tissue components. The distribution of these cells and the expression of different inflammatory molecules throughout the tumor microenvironment are, to various extents, related to tumor progression and survival.

We believe that further studies are needed and further research in order to find new predictive and prognosis biomarkers in NSCLC. Also needed are new measures to reduce the risk of cancer. Thereby, prevention is a much better and more economical way to fight cancer than treating an already advanced and often incurable disease.

References

- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G (2006) Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 72(11):1605–1621. doi:[10.1016/j.bcp.2006.06.029](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.06.029)
- Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B (2009) Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* 15(2):425–430. doi:[10.1158/1078-0432.CCR-08-0149](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0149)
- Araujo A, Ribeiro R, Azevedo I, Coelho A, Soares M, Sousa B, Pinto D, Lopes C, Medeiros R, Scagliotti GV (2007) Genetic polymorphisms of the epidermal growth factor and related receptor in non-small cell lung cancer—A review of the literature. *Oncologist* 12(2):201–210. doi:[10.1634/theoncologist.12-2-201](https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-2-201)
- Asselin-Paturel C, Megherat S, Vergnon I, Echchakir H, Dorothee G, Blesson S, Gay F, Mami-Chouaib F, Chouaib S (2001) Differential effect of high doses versus low doses of interleukin-12 on the adoptive transfer of human specific cytotoxic T lymphocyte in autologous lung tumors engrafted into severe combined immunodeficiency disease-nonobese diabetic mice: relation with interleukin-10 induction. *Cancer* 91(1):113–122
- Atkinson JJ, Senior RM (2003) Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(1):12–24. doi:[10.1165/ajrmb.2002-0166TR](https://doi.org/10.1165/ajrmb.2002-0166TR)
- Azevedo A, Cunha V, Teixeira AL, Medeiros R (2011) IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development. *World J Clin Oncol* 2(12):384–396. doi:[10.5306/wjco.v2.i12.384](https://doi.org/10.5306/wjco.v2.i12.384)
- Azzoli CG, Baker S Jr, Temin S, Pao W, Aliff T, Brahmer J, Johnson DH, Laskin JL, Masters G, Milton D, Nordquist L, Pfister DG, Piantadosi S, Schiller JH, Smith R, Smith TJ, Strawn

- JR, Trent D, Giaccone G (2009) American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 27(36):6251–6266. doi:10.1200/JCO.2009.23.5622
- Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357(9255):539–545. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0
- Ballaz S, Mulshine JL (2003) The potential contributions of chronic inflammation to lung carcinogenesis. *Clin Lung Cancer* 5(1):46–62. doi:10.3816/CLC.2003.n.021
- Baruch RR, Melinscak H, Lo J, Liu Y, Yeung O, Hurta RA (2001) Altered matrix metalloproteinase expression associated with oncogene-mediated cellular transformation and metastasis formation. *Cell Biol Int* 25(5):411–420. doi:10.1006/cbir.2000.0647
- Ben-Baruch A (2006) Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin Cancer Biol* 16(1):38–52. doi:10.1016/j.semcancer.2005.07.006
- Bihl M, Tamm M, Nauck M, Wieland H, Perruchoud AP, Roth M (1998) Proliferation of human non-small-cell lung cancer cell lines: role of interleukin-6. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(4):606–612. doi:10.1165/ajrcmb.19.4.3247
- Borcuzak AC, Papanikolaou N, Toonkel RL, Sole M, Gorenstein LA, Ginsburg ME, Sonett JR, Friedman RA, Powell CA (2008) Lung adenocarcinoma invasion in TGFbetaRII-deficient cells is mediated by CCL5/RANTES. *Oncogene* 27(4):557–564. doi:10.1038/sj.onc.1210662
- Brabender J, Park J, Metzger R, Schneider PM, Lord RV, Holscher AH, Danenberg KD, Danenberg PV (2002) Prognostic significance of cyclooxygenase 2 mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Ann Surg* 235(3):440–443
- Bremnes RM, Al-Shibli K, Donnem T, Sirera R, Al-Saad S, Andersen S, Stenvold H, Camps C, Busund LT (2011) The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *J Thoracic Oncol: Official Pub Int Assoc Study Lung Cancer* 6(4):824–833. doi:10.1097/JTO.0b013e3182037b76
- Brody JS, Spira A (2006) State of the art. Chronic obstructive pulmonary disease, inflammation, and lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 3(6):535–537. doi:10.1513/pats.200603-089MS
- Brown PD, Bloxidge RE, Stuart NS, Gatter KC, Carmichael J (1993) Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85(7):574–578
- Bruno A, Focaccetti C, Pagani A, Imperatori AS, Spagnoletti M, Rotolo N, Cantelmo AR, Franzì F, Capella C, Ferlazzo G, Mortara L, Albini A, Noonan DM (2013) The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer. *Neoplasia* 15(2):133–142
- Chang KT, Huang CY, Tsai CM, Chiu CH, Lok YY (2005) Role of IL-6 in neuroendocrine differentiation and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(3):L438–L445. doi:10.1152/ajplung.00033.2005
- Chen W, Li Z, Bai L, Lin Y (2011) NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Front Biosci: J Virtual Libr* 16:1172–1185
- Coelho A, Calçada C, Catarino R, Pinto D, Fonseca G, Medeiros R (2006) CXCL12-3' A polymorphism and lung cancer metastases protection: new perspectives in immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother* 55(6):639–643. doi:10.1007/s00262-005-0062-1
- Cohen S (1965) The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol* 12(3):394–407
- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917):860–867. doi:10.1038/nature01322
- Cuzick J, Otto F, Baron JA, Brown PH, Burn J, Greenwald P, Jankowski J, La Vecchia C, Meyskens F, Senn HJ, Thun M (2009) Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *Lancet Oncol* 10(5):501–507. doi:10.1016/S1470-2045(09)70035-X
- Dalwadi H, Krysan K, Heuze-Vourc'h N, Dohadwala M, Elashoff D, Sharma S, Cacalano N, Lichtenstein A, Dubinett S (2005) Cyclooxygenase-2-dependent activation of signal

- transducer and activator of transcription 3 by interleukin-6 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11(21):7674–7682. doi:[10.1158/1078-0432.CCR-05-1205](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1205)
- de Mello RA, Marques DS, Medeiros R, Araujo AM (2011) Epidermal growth factor receptor and K-Ras in non-small cell lung cancer-molecular pathways involved and targeted therapies. *World J Clin Oncol* 2(11):367–376. doi:[10.5306/wjco.v2.i11.367](https://doi.org/10.5306/wjco.v2.i11.367)
- de Visser KE, Eichten A, Coussens LM (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6(1):24–37. doi:[10.1038/nrc1782](https://doi.org/10.1038/nrc1782)
- De Vita F, Orditura M, Auriemma A, Infusino S, Roscigno A, Catalano G (1998) Serum levels of interleukin-6 as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 5(3):649–652
- De Vita F, Orditura M, Galizia G, Romano C, Roscigno A, Lieto E, Catalano G (2000) Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Chest* 117(2):365–373
- Deryugina EI, Quigley JP (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25(1):9–34. doi:[10.1007/s10555-006-7886-9](https://doi.org/10.1007/s10555-006-7886-9)
- Dubinett SM, Sharma S, Huang M, Dohadwala M, Pold M, Mao JT (2003) Cyclooxygenase-2 in lung cancer. *Prog Exp Tumor Res* 37:138–162
- Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Brocker EB (1995) Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 5(1):67–68
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3(11):991–998. doi:[10.1038/ni1102-991](https://doi.org/10.1038/ni1102-991)
- Duperron C, Castonguay A (1997) Chemopreventive efficacies of aspirin and sulindac against lung tumorigenesis in A/J mice. *Carcinogenesis* 18(5):1001–1006
- Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW (1998) Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* 64(3):275–290
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46(4):765–781. doi:[10.1016/j.ejca.2009.12.014](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.12.014)
- Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limon P (2010) The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol* 10(8):554–567. doi:[10.1038/nri2808](https://doi.org/10.1038/nri2808)
- Fossella FV, DeVore R, Kerr RN, Crawford J, Natale RR, Dunphy F, Kalman L, Miller V, Lee JS, Moore M, Gandara D, Karp D, Vokes E, Kris M, Kim Y, Gamza F, Hammershaimb L (2000) Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. The TAX 320 Non-Small Cell Lung Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 18(12):2354–2362
- Gomes M, Coelho A, Arajo A, Catarino R, Medeiros R (2011) 1137 POSTER Is MMP-9 Q279R a possible marker of prognostic in non small cell lung cancer? *Eur J Cancer (Oxford 1990)* 47:S134–S135
- Gomes M, Coelho A, Araujo A, Teixeira AL, Catarino R, Medeiros R (2012) Influence of functional genetic polymorphism (–590C/T) in non-small cell lung cancer (NSCLC) development: the paradoxal role of IL-4. *Gene* 504(1):111–115. doi:[10.1016/j.gene.2012.05.008](https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.05.008)
- Gonzalez-Arriaga P, Pascual T, Garcia-Alvarez A, Fernandez-Somoano A, Lopez-Cima MF, Tardon A (2012) Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival. *BMC Cancer* 12:121. doi:[10.1186/1471-2407-12-121](https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-121)
- Gregory AD, Houghton AM (2011) Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res* 71(7):2411–2416. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-10-2583](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2583)
- Gupta RA, Dubois RN (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 1(1):11–21. doi:[10.1038/35094017](https://doi.org/10.1038/35094017)
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646–674. doi:[10.1016/j.cell.2011.02.013](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013)
- Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA (2007) Reduced risk of human lung cancer by selective cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of a case control study. *Int J Biol Sci* 3(5):328–334

- Hatanaka H, Abe Y, Kamiya T, Morino F, Nagata J, Tokunaga T, Oshika Y, Suemizu H, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Inoue H, Nakamura M, Ueyama Y (2000) Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 11(7):815–819
- Haynes A, Shaik MS, Chatterjee A, Singh M (2003) Evaluation of an aerosolized selective COX-2 inhibitor as a potentiator of doxorubicin in a non-small-cell lung cancer cell line. *Pharm Res* 20(9):1485–1495
- Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE (2000) Lung cancer. *Lancet* 355(9202):479–485. doi:10.1016/S0140-6736(00)82038-3
- Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, Xu L, Ma H, Zhu J, Wei Q, Shen H (2005) Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res* 11(15):5433–5439. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0311
- Ishihara K, Hirano T (2002) IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 13(4-5):357–368
- Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ (2000) Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res* 60(1):184–190
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2):69–90. doi:10.3322/caac.20107
- Jumper C, Cobos E, Lox C (2004) Determination of the serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in patients with either advanced small-cell lung cancer or non-small-cell lung cancer prior to treatment. *Respir Med* 98(2):173–177
- Karin M (2006) Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441(7092):431–436. doi:10.1038/nature04870
- Karin M (2008) The IκB kinase—a bridge between inflammation and cancer. *Cell Res* 18(3):334–342. doi:10.1038/cr.2008.30
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141(1):52–67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015
- Khan N, Afaq F, Kweon MH, Kim K, Mukhtar H (2007a) Oral consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. *Cancer Res* 67(7):3475–3482. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3941
- Khan N, Hadi N, Afaq F, Syed DN, Kweon MH, Mukhtar H (2007b) Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. *Carcinogenesis* 28(1):163–173. doi:10.1093/carcin/bgl145
- Khuri FR, Wu H, Lee JJ, Kemp BL, Lotan R, Lippman SM, Feng L, Hong WK, Xu XC (2001) Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 7(4):861–867
- Koc M, Ediger D, Budak F, Karadag M, Oral HB, Uzaslan E, Ege E, Gozu RO (2006) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) elevated in serum but not in bronchial lavage fluid in patients with lung cancer. *Tumori* 92(2):149–154
- Komori A, Yatsunami J, Suganuma M, Okabe S, Abe S, Sakai A, Sasaki K, Fujiki H (1993) Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Res* 53(9):1982–1985
- Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Janne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelmann JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ (2010) Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363(18):1693–1703. doi:10.1056/NEJMoa1006448
- Lan Q, Zheng T, Rothman N, Zhang Y, Wang SS, Shen M, Berndt SI, Zahm SH, Holford TR, Leaderer B, Yeager M, Welch R, Boyle P, Zhang B, Zou K, Zhu Y, Chanock S (2006) Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107(10):4101–4108. doi:10.1182/blood-2005-10-4160

- Lee JM, Mao JT, Krysan K, Dubinett SM (2007) Significance of cyclooxygenase-2 in prognosis, targeted therapy and chemoprevention of NSCLC. *Future Oncol* 3(2):149–153. doi:[10.2217/14796694.3.2.149](https://doi.org/10.2217/14796694.3.2.149)
- Li F, Liu Y, Chen H, Liao D, Shen Y, Xu F, Wang J (2011) EGFR and COX-2 protein expression in non-small cell lung cancer and the correlation with clinical features. *J Exp Clin Cancer Res* 30:27. doi:[10.1186/1756-9966-30-27](https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-27)
- Li Y, Yang T, Wei S, Wang J, Wang M, Wang Y, Zhou Q, Liu H, Chen J (2013) Clinical significance of EML4-ALK fusion gene and association with EGFR and KRAS gene mutations in 208 Chinese patients with non-small cell lung cancer. *PLoS One* 8(1):e52093. doi:[10.1371/journal.pone.0052093](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052093)
- Lin EY, Pollard JW (2004) Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer* 90(11):2053–2058. doi:[10.1038/sj.bjc.6601705](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601705)
- Lin WW, Karin M (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 117(5):1175–1183. doi:[10.1172/JCI31537](https://doi.org/10.1172/JCI31537)
- Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, Papadimitriou CA, Murray S (2008) Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 9(10):962–972. doi:[10.1016/S1470-2045\(08\)70206-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70206-7)
- Liu D, Guo H, Li Y, Xu X, Yang K, Bai Y (2012) Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis. *PLoS One* 7(2):e31251. doi:[10.1371/journal.pone.0031251](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031251)
- Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Yokomise H, Ueno M, Kadota K, Urushihara M, Huang CL (2007) Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 58(3):384–391. doi:[10.1016/j.lungcan.2007.07.005](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.07.005)
- Lu H, Ouyang W, Huang C (2006) Inflammation, a key event in cancer development. *Molecular cancer research : MCR* 4(4):221–233. doi:[10.1158/1541-7786.MCR-05-0261](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0261)
- Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M (2004) Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 6(3):297–305. doi:[10.1016/j.ccr.2004.08.012](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.08.012)
- Luo X, Ding Q, Wang M, Li Z, Mao K, Sun B, Pan Y, Wang Z, Zang YQ, Chen Y (2010) In vivo disruption of TGF-beta signaling by Smad7 in airway epithelium alleviates allergic asthma but aggravates lung carcinogenesis in mouse. *PLoS One* 5(4):e10149. doi:[10.1371/journal.pone.0010149](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010149)
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454(7203):436–444. doi:[10.1038/nature07205](https://doi.org/10.1038/nature07205)
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25(12):677–686. doi:[10.1016/j.it.2004.09.015](https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015)
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23(11):549–555
- Mao JT, Cui X, Reckamp K, Liu M, Krysan K, Dalwadi H, Sharma S, Hazra S, Strieter R, Gardner B, Dubinett SM (2005) Chemoprevention strategies with cyclooxygenase-2 inhibitors for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 7(1):30–39. doi:[10.3816/CLC.2005.n.019](https://doi.org/10.3816/CLC.2005.n.019)
- Mao JT, Roth MD, Fishbein MC, Aberle DR, Zhang ZF, Rao JY, Tashkin DP, Goodglick L, Holmes EC, Cameron RB, Dubinett SM, Elashoff R, Szabo E, Elashoff D (2011) Lung cancer chemoprevention with celecoxib in former smokers. *Cancer Prev Res (Phila)* 4(7):984–993. doi:[10.1158/1940-6207.CAPR-11-0078](https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0078)
- Martey CA, Pollock SJ, Turner CK, O'Reilly KM, Baglole CJ, Phipps RP, Sime PJ (2004) Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(5):L981–L991. doi:[10.1152/ajplung.00239.2003](https://doi.org/10.1152/ajplung.00239.2003)

- Menter DG, Schilsky RL, DuBois RN (2010) Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward. *Clin Cancer Res* 16(5):1384–1390. doi:[10.1158/1078-0432.CCR-09-0788](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0788)
- Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J (2004) Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 90(12):2312–2316. doi:[10.1038/sj.bjc.6601814](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601814)
- Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA (2008) Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc Mayo Clin* 83(5):584–594. doi:[10.4065/83.5.584](https://doi.org/10.4065/83.5.584)
- Montuenga LM, Pio R (2007) Tumour-associated macrophages in nonsmall cell lung cancer: the role of interleukin-10. *Eur Respir J* 30(4):608–610. doi:[10.1183/09031936.00091707](https://doi.org/10.1183/09031936.00091707)
- Moran CJ, Arenberg DA, Huang CC, Giordano TJ, Thomas DG, Misek DE, Chen G, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash S, Beer DG (2002) RANTES expression is a predictor of survival in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 8(12):3803–3812
- Niwa Y, Akamatsu H, Niwa H, Sumi H, Ozaki Y, Abe A (2001) Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. *Clin Cancer Res* 7(2):285–289
- Nogueira A, Assis J, Catarino R, Medeiros R (2013) DNA repair and cytotoxic drugs: the potential role of RAD51 in clinical outcome of non-small-cell lung cancer patients. *Pharmacogenomics* 14(6):689–700. doi:[10.2217/pgs.13.48](https://doi.org/10.2217/pgs.13.48)
- O'Callaghan DS, O'Donnell D, O'Connell F, O'Byrne KJ (2010) The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *J Thoracic Oncol: Off Pub Int Assoc Study Lung Cancer* 5(12):2024–2036
- Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 296(5574):1883–1886. doi:[10.1126/science.1071420](https://doi.org/10.1126/science.1071420)
- Peebles KA, Lee JM, Mao JT, Hazra S, Reckamp KL, Krysan K, Dohadwala M, Heinrich EL, Walser TC, Cui X, Baratelli FE, Garon E, Sharma S, Dubinett SM (2007) Inflammation and lung carcinogenesis: applying findings in prevention and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 7(10):1405–1421. doi:[10.1586/14737140.7.10.1405](https://doi.org/10.1586/14737140.7.10.1405)
- Pereira C, Pimentel-Nunes P, Brandao C, Moreira-Dias L, Medeiros R, Dinis-Ribeiro M (2010) COX-2 polymorphisms and colorectal cancer risk: a strategy for chemoprevention. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22(5):607–613. doi:[10.1097/MEG.0b013e3283352cbb](https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3283352cbb)
- Pine SR, Mechanic LE, Enewold L, Chaturvedi AK, Katki HA, Zheng YL, Bowman ED, Engels EA, Caporaso NE, Harris CC (2011) Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer. *J Nat Cancer Inst* 103(14):1112–1122. doi:[10.1093/jnci/djr216](https://doi.org/10.1093/jnci/djr216)
- Rao JS, Gondi C, Chetty C, Chittivelu S, Joseph PA, Lakka SS (2005) Inhibition of invasion, angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus-mediated transfer of antisense uPAR and MMP-9 in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 4(9):1399–1408. doi:[10.1158/1535-7163.MCT-05-0082](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0082)
- Ribeiro R, Araujo A, Lopes C, Medeiros R (2007) Immunoinflammatory mechanisms in lung cancer development: is leptin a mediator? *J Thoracic Oncol: Off Pub Int Assoc Study Lung Cancer* 2(2):105–108
- Rioux N, Castonguay A (1998) Prevention of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398. *Cancer Res* 58(23):5354–5360
- Roy R, Yang J, Moses MA (2009) Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 27(31):5287–5297. doi:[10.1200/JCO.2009.23.5556](https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.5556)
- Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J (2006) Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* 56(2):69–83
- Serefoglou Z, Yapijakis C, Nkenke E, Vairaktaris E (2008) Genetic association of cytokine DNA polymorphisms with head and neck cancer. *Oral Oncol* 44(12):1093–1099. doi:[10.1016/j.oraloncology.2008.02.012](https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.02.012)

- Setia S, Sanyal SN (2012) Upregulation of intrinsic apoptotic pathway in NSAIDs mediated chemoprevention of experimental lung carcinogenesis. *Pharmacol Rep: PR* 64(3):615–624
- Shih CM, Lee YL, Chiou HL, Hsu WF, Chen WE, Chou MC, Lin LY (2005) The involvement of genetic polymorphism of IL-10 promoter in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 50(3):291–297. doi:[10.1016/j.lungcan.2005.07.007](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.07.007)
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42(6):717–727. doi:[10.1016/j.ejca.2006.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.003)
- Siegel PM, Massague J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3(11):807–821. doi:[10.1038/nrc1208](https://doi.org/10.1038/nrc1208)
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62(1):10–29. doi:[10.3322/caac.20138](https://doi.org/10.3322/caac.20138)
- Smith CJ, Perfetti TA, King JA (2006) Perspectives on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers. *Inhalation Toxicol* 18(9):667–677. doi:[10.1080/08958370600742821](https://doi.org/10.1080/08958370600742821)
- Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y (2004) Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* 202:275–293. doi:[10.1111/j.0105-2896.2004.00199.x](https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00199.x)
- Srivani R, Nagarajan B (2003) A prognostic insight on in vivo expression of interleukin-6 in uterine cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer: Off J Int Gynecol Cancer Soc* 13(3):331–339
- Suzuki K, Kachala SS, Kadota K, Shen R, Mo Q, Beer DG, Rusch VW, Travis WD, Adusumilli PS (2011) Prognostic immune markers in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 17(16):5247–5256. doi:[10.1158/1078-0432.CCR-10-2805](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2805)
- Takeshi U, Sadar MD, Suzuki H, Akakura K, Sakamoto S, Shimbo M, Suyama T, Imamoto T, Komiya A, Yukio N, Ichikawa T (2005) Interleukin-4 in patients with prostate cancer. *Anticancer Res* 25(6C):4595–4598
- Tang J, Salama R, Gadgeel SM, Sarkar FH, Ahmad A (2013) Erlotinib resistance in lung cancer: current progress and future perspectives. *Front Pharmacol* 4:15. doi:[10.3389/fphar.2013.00015](https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00015)
- Teixeira AL, Araujo A, Coelho A, Ribeiro R, Gomes M, Pereira C, Medeiros R (2011) Influence of TGFBI+869T>C functional polymorphism in non-small cell lung cancer (NSCLC) risk. *J Cancer Res Clin Oncol* 137(3):435–439. doi:[10.1007/s00432-010-0896-6](https://doi.org/10.1007/s00432-010-0896-6)
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2(6):442–454. doi:[10.1038/nrc822](https://doi.org/10.1038/nrc822)
- Toi M, Bicknell R, Harris AL (1992) Inhibition of colon and breast carcinoma cell growth by interleukin-4. *Cancer Res* 52(2):275–279
- Tsai CC, Chen CC, Lin CC, Chen CH, Lin TS, Shieh TY (1999) Interleukin-1 beta in oral sub-mucous fibrosis, verrucous hyperplasia and squamous cell carcinoma tissues. *Kaohsiung J Med Sci* 15(9):513–519
- Umekawa K, Kimura T, Kudoh S, Suzumura T, Oka T, Nagata M, Mitsuoka S, Matsuura K, Nakai T, Yoshimura N, Kira Y, Hirata K (2013) Plasma RANTES, IL-10, and IL-8 levels in non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. *BMC Res Notes* 6(1):139. doi:[10.1186/1756-0500-6-139](https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-139)
- Vaish V, Sanyal SN (2011) Chemopreventive effects of NSAIDs on cytokines and transcription factors during the early stages of colorectal cancer. *Pharmacol Rep: PR* 63(5):1210–1221
- Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P (2006) Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 211(6–8):487–501. doi:[10.1016/j.imbio.2006.06.002](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.06.002)
- Vihinen P, Kahari VM (2002) Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 99(2):157–166. doi:[10.1002/ijc.10329](https://doi.org/10.1002/ijc.10329)
- Wang HW, Joyce JA (2010) Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions. *Cell Cycle* 9(24):4824–4835
- Wang YC, Sung WW, Wu TC, Wang L, Chien WP, Cheng YW, Chen CY, Shieh SH, Lee H (2012) Interleukin-10 haplotype may predict survival and relapse in resected non-small cell lung cancer. *PLoS One* 7(7):e39525. doi:[10.1371/journal.pone.0039525](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039525)

- Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM (2010) Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 7(9):493–507. doi:[10.1038/nrclinonc.2010.97](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.97)
- Wu K, House L, Liu W, Cho WC (2012) Personalized targeted therapy for lung cancer. *Int J Mol Sci* 13(9):11471–11496. doi:[10.3390/ijms130911471](https://doi.org/10.3390/ijms130911471)
- Yan B, Wang H, Rabbani ZN, Zhao Y, Li W, Yuan Y, Li F, Dewhirst MW, Li CY (2006) Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res* 66(24):11565–11570. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-06-2540](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2540)
- Yanagawa H, Sone S, Takahashi Y, Haku T, Yano S, Shinohara T, Ogura T (1995) Serum levels of interleukin 6 in patients with lung cancer. *Br J Cancer* 71(5):1095–1098
- Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, Elmishad AG, Chen Y, Liu Z, Bubici C, Mossman BT, Pass HI, Testa JR, Franzoso G, Carbone M (2006) TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(27):10397–10402. doi:[10.1073/pnas.0604008103](https://doi.org/10.1073/pnas.0604008103)
- Ye ZB, Ma T, Li H, Jin XL, Xu HM (2007) Expression and significance of intratumoral interleukin-12 and interleukin-18 in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 13(11):1747–1751
- Zeni E, Mazzetti L, Miotto D, Lo Cascio N, Maestrelli P, Querzoli P, Pedriali M, De Rosa E, Fabbri LM, Mapp CE, Boschetto P (2007) Macrophage expression of interleukin-10 is a prognostic factor in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 30(4):627–632. doi:[10.1183/09031936.00129306](https://doi.org/10.1183/09031936.00129306)
- Zhan P, Qian Q, Yu LK (2013) Prognostic value of COX-2 expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Thoracic Dis* 5(1):40–47. doi:[10.3978/j.issn.2072-1439.2013.01.02](https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.01.02)
- Zucker S, Lysik RM, Malik M, Bauer BA, Caamano J, Klein-Szanto AJ (1992) Secretion of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by human lung cancer cell lines and revertant cell lines: not an invariant correlation with metastasis. *Int J Cancer* 52(3):366–371

16 Inflammation and Lung Cancer

Oxidative Stress, ROS, and DNA Damage

*Mónica Gomes, Ana Luísa Teixeira, Ana Coelho,
António Araújo, and Rui Medeiros*

CONTENTS

Abstract.....	215
16.1 Introduction	215
16.2 Inflammation	216
16.2.1 Inflammation, Oxidative Stress, and DNA Damage	218
16.2.2 Role of Inflammation in Lung Cancer.....	219
16.2.3 MMPs, Lung Cancer, and Inflammation.....	220
16.3 Conclusion	221
References.....	222

ABSTRACT

Cancer is the leading cause of death in the world, accounting for more than 25% of all deaths in developed countries, and lung cancer is the most common cause of cancer-related death in the world. The predominant risk factor for this cancer is smoking, accounting for approximately 90% of these lung cancer deaths. Furthermore, lung cancer risk is associated with several indicators of inflammation. The inflammation process is a complex response to stimuli involving the interplay of host cells and signaling molecules, such as angiogenesis factors and chemokines. Inhalation of air pollutants and microorganisms results in lung injury and generation of reactive oxygen species/reactive nitrogen species (ROS/RNS), leading to a cascade of signaling events that trigger the production of proinflammatory cytokines. Inflammation is the primary reaction of a tissue to eliminate pathogenic insult and injured tissue components in order to restore normal physiological functions or replace the irreparable tissue with scar tissue. Cancer and inflammation are closely linked, and many inflammatory conditions increase the risk of cancer development. Matrix metalloproteins are clearly important effectors in inflammation both in physiological situations, such as tissue repair, and in pathological inflammatory conditions and cancer. A better understanding of the role of ROS/RNS in lung inflammation and cancer is probable to inspire new strategies for lung cancer prevention and treatment.

16.1 INTRODUCTION

Cancer is one of the leading causes of death in the world, accounting for more than 25% of all deaths in developed countries, and lung cancer holds the top position in cancer morbidity and mortality among men worldwide (Ferlay et al. 2010). Lung cancer was found to be the most commonly diagnosed cancer and the primary cause of cancer-related mortality for males worldwide and the second leading cause of cancer-related deaths for women (Jemal et al. 2011; Siegel et al. 2012). For the year 2012, it was estimated that lung cancer would account for 26% of all female cancer deaths and 29%

of all male cancer deaths (Siegel et al. 2012). The mortality in this neoplasia, during the first year after diagnosis, is very high, which is about 67% (Grigoryeva et al. 2015). Success of surgical treatment is closely related to the opportunity for early diagnosis of lung cancer. The importance of early diagnosis is confirmed by the 5-year survival rate after radical surgery, so people diagnosed with stages I and II of lung cancer tend to have higher (5-year) survival rate (63.5% and 43.5%, respectively) than people diagnosed with stage III (22.9%) (Grigoryeva et al. 2015).

Lung cancer is rare among young adults, with the average age of occurrence and diagnosis being over 60 years. There are two major classes of lung cancer: primary lung cancer and secondary lung cancer (Azad et al. 2008). Primary lung cancer originates in the lung itself and is further classified into two subtypes: small-cell lung cancer (SCLC) and non-small-cell lung cancer (NSCLC), depending on the morphology of the malignant cells; NSCLC accounts for approximately 85% of all cases of lung cancer (Molina et al. 2008; Chen et al. 2014).

NSCLC is currently defined by pathological characteristics, and the two predominant NSCLC histological phenotypes are adenocarcinoma (ADC \approx 50%) and squamous cell carcinoma (SCC \approx 40%) (Chen et al. 2014). Secondary lung cancer is initiated in other organs such as breast or colon and then spreads to the lungs (Azad et al. 2008).

Recently, molecular subtyping of NSCLC has led to the approval of and use of targeted therapies in the frontline setting. Patients with activating mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) domain and echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase (EML4-ALK) translocation benefit from firstline treatment with erlotinib or crizotinib, respectively. These mutations are seen in a relatively small subset of NSCLC patients. They are common in patients with ADC, never smokers, and patients of East Asian origin. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) is the most common mutation found in NSCLC; however, an effective targeted therapy for this subset of NSCLC does not exist. Despite the addition of new therapies, the median 5-year overall survival of patients in advanced staged disease remains a dismal 1%–2% (Aggarwal 2014).

Several researches indicate that long-term exposure to inhaled carcinogens has the greatest impact on risk of lung cancer. The predominant risk factor for lung cancer is smoking, accounting for approximately 90% of these lung cancer deaths (Azad et al. 2008; Shiels et al. 2013). Mostly, polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) are the major components of tobacco that are associated with the etiology of lung cancer (Azad et al. 2008). The lung is vulnerable to a wide range of toxicants and infectious agents with the potential to induce oxidative damage (Azad et al. 2008). An average adult inhales about 10,000 L of air per day, polluted with cigarette smoke, automobile exhaust, diesel soot, ozone (O₃), sulfur dioxide (SO₂), nitrogen dioxide (NO₂), and varying degrees of other pollutants. Inhalation of such toxic air pollutants and microorganisms results in lung injury and generation of reactive oxygen species/reactive nitrogen species (ROS/RNS), leading to cascades of signaling events that trigger the production of proinflammatory cytokines and chemokines (Azad et al. 2008). Additionally, lung cancer risk is associated with several indicators of inflammation, including pulmonary fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and chronic pulmonary infections, even after taking the effects of smoking into consideration (Shiels et al. 2013). Overall, the pathogenesis of lung cancer involves multiple molecular abnormalities accrued over a long period. Although a large number of genetic pathways associated with lung cancer are being discovered, the basic molecular mechanisms involved in lung cancer are still unclear (Azad et al. 2008).

16.2 INFLAMMATION

Inflammation is a physiologic process in response to tissue damage resulting from microbial pathogen infection, chemical irritation, and/or wounding. At the very early stage of inflammation, neutrophils are the first cells to migrate to the inflammatory sites under the regulation of molecules, produced by rapidly responding macrophages and mast cells prestationed in tissues (Lu et al. 2006).

As the inflammation progresses, various types of leukocytes, lymphocytes, and other inflammatory cells are activated and attracted to the inflamed site by a signaling network involving a great number of growth factors, cytokines, and chemokines (Lu et al. 2006).

The most commonly recognized features of cancer-associated inflammation are also those expressed by innate immune system, normally activated in response to stress or infection. The observed chronic inflammation milieu in notable subsets of human cancers is proposed to support tumor growth, plasticity, and resistance to therapy (Grimm et al. 2013). Unluckily, dysregulated persistent inflammation contributes to the chronic phase of many diseases, including maintenance of many cancers. It is accepted that inflammation drives the development of some cancers that adapt to thrive in the oxidant-rich microenvironment as described initially by *co-opting* expression of inflammation mediators (Coussens and Werb 2002; de Visser et al. 2006).

The dynamic role of chronic inflammation in cancer is not novel. In 1863, Rudolf Virchow hypothesized that some irritants associated with tissue injury and resulting cellular inflammation may play a role in cell proliferation and neoplastic development (Balkwill and Mantovani 2001). Based on his observations that normal cellular responses might lead to cancer, he postulated that cancer may develop at sites of chronic inflammation (Balkwill and Mantovani 2001).

Over recent years, several research in this area clearly demonstrated that cell proliferation alone does not produce cancer. However, unlimited proliferation potential of cells is achieved in an environment that is rich in inflammatory cells, producing abundant ROS and RNS promoting unremitting DNA damage, inactivation of apoptosis, upregulation of growth factors and cytokines, and activation of growth-supporting genes (Azad et al. 2008). In recent years, increased understanding of the basic mechanisms involved in inflammation and its physiological systems supported Virchow's hypothesis, establishing an important relationship between cancer and inflammation (Azad et al. 2008).

Inflammation is the primary reaction of a tissue to eliminate pathogenic insult and injured tissue components in order to restore normal physiological functions or replace the irreparable tissue with scar tissue (Azad et al. 2008). The inflammation process is a complex response to stimuli involving the interplay between host cells and signaling molecules, such as proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, growth and angiogenesis factors, and chemokines (Shiels et al. 2013).

Inflammation is classified as acute or chronic inflammation, depending on a variety of factors including clinical symptoms and the nature of injury. Acute inflammation is the immediate response, usually of short duration, and results in the release of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) so as to eliminate the pathogenic or cytotoxic insult. On the other hand, chronic inflammation is characterized by persistent inflammation, tissue injury, and tissue repair, occurring simultaneously (Azad et al. 2008).

Chronic inflammation induced by various agents including viruses and bacteria is associated with an increased cancer risk due to tissue damage and genetic instability (Linhart et al. 2014). Thereby, repeated tissue damage and regeneration produce increased ROS/RNS from inflammatory cells and then interact with DNA in proliferating epithelium, resulting in permanent genomic alteration such as point mutations, deletions, or rearrangements (Coussens and Werb 2002). Cells respond to DNA damage by activating p53-controlled genes associated with cell cycle and DNA repair, and when the rate of ROS/RNS-mediated DNA damage is extensive, it leads to chronic inflammation (Azad et al. 2008). Chronic inflammation provides a microenvironment rich in inflammatory cells, ROS/RNS, recurring DNA damage, cell-proliferating growth factors, and other growth-supporting stimuli, which increases the frequency of mutations. In pulmonary pathologies such as COPD, fibrosis, and lung carcinogenesis, inflammation is considered as a major precursor or the *hallmark* for cancer development (Azad et al. 2008; Hanahan and Weinberg 2011).

By upregulating key inflammatory molecules, including inducible nitric oxide synthetase (iNOS), cyclooxygenase (COX2), and proinflammatory cytokines and chemokines, tumor cells invoke a chronic inflammatory state that also induces tumor-supporting myeloid cells such as

tumor-associated macrophages (TAMs) and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and drives their infiltration of the tumor microenvironment (TME) (Grimm et al. 2013). While many host cell types including T cells are involved in creating an inflammatory pro-TME, inflammation-directed recruitment of MDSC and macrophage polarization are also important (Grimm et al. 2013).

Actually, tumors are considered as complex tissues with a dynamic and reactive TME. The TME is populated by different nonplastic cells (inflammatory leukocytes, activated fibroblast, and endothelial cells) that actively communicate with cancer cells via chemokines or cytokines (D'Incalci et al. 2014). Recently, it is established that the persistence of inflammatory pathways in the TME is linked with tumor promotion (Diakos et al. 2014; D'Incalci et al. 2014). Among stromal cells, TAMs derived from blood circulating monocytes can functionally be *educated* by tumor cells, through the activity of different cell types of the TME. These cells can promote basically all phases of tumorigenesis and tumor progression, including tumor cell proliferation, invasion, angiogenesis, metastasis formation, and immune suppression (Allavena and Mantovani 2012; Reinartz et al. 2014). Indeed, TAMs play a major role in the production of growth factors (epidermal growth factor, chemokines, interleukins, metalloproteinase, and vascular endothelial growth factor), which promote tumor cell survival and metastatic phenotype (Galmarini et al. 2014).

16.2.1 INFLAMMATION, OXIDATIVE STRESS, AND DNA DAMAGE

ROS additionally are involved in regulating certain normal cellular processes. When excessive ROS stimulation occurs, it may trigger DNA repair responses in normal cells to remove ROS-mediated DNA damage. For highly active metabolism, cancer cells commonly have higher levels of ROS than normal cells, leading to carcinogenesis by oxidative DNA damage and DNA repair impairment. This nature of high ROS level in cancer cells also provides an opportunity for drug therapy to generate overloading ROS level and induce oxidative stress-induced cell death (Farooqi et al. 2014).

Oxidative stress is an important mechanism in the pathogenesis of many diseases including cancer. The generation of ROS with a consecutive DNA damage is an initial step in carcinogenesis induced by inflammatory processes (Aggarwal 2014). Chronic inflammation induced by various agents including viruses and bacteria is associated with an increased cancer risk due to tissue damage and genetic instability. Oxidative stress with the generation of ROS may occur in chronic infection and inflammation primarily due to the generation of nitric oxide (NO), superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), and other ROS by macrophages and neutrophils that infiltrate the inflamed tissue (Aggarwal 2014). Activated inflammatory cells in various tissues including the liver in turn induce oxidant-generating enzymes such as NADPH oxidase, iNOS, xanthine oxidase (XO), and myeloperoxidase (MPO). In such conditions, ROS and RNS are generated. As a consequence, ROS and RNS can damage DNA, RNA, lipids, and proteins through nitration and oxidation, resulting in an increased mutation load (Aggarwal 2014). Furthermore, cytokines are released in inflammatory tissues, which activate not only the aforementioned enzymes to create ROS and RNS but also NF- κ B, a nuclear transcription factor, which among others stimulates COX2, lipoxygenase (LOX), and iNOS, and upregulating these molecules (COX2, LOX, and iNOS) results in an overproduction of ROS and RNS (Aggarwal 2014).

Another process that can influence tumor progression by ROS formation is autophagy (Farooqi et al. 2014). This is a multistep process that maintains cellular homeostasis via the degradation and recycling of long-lived proteins, intracellular aggregates, and damaged organelles (Coussens and Werb 2002). The autophagy may be induced for survival and induction of apoptotic pathways in response to cellular oxidative stress (Farooqi et al. 2014). Recent studies have described a complex role of the autophagy pathway during tumor initiation. On one hand, autophagy protects against the production of ROS in the cells and therefore inhibits their deleterious effect on DNA damage and resulting mutation, which have been extensively described to induce tumorigenesis, defined as the transformation of a normal cell into a cancer cell (de Visser et al. 2006). Autophagy is also described as a tumor suppressor mechanism mainly by preventing ROS accumulation through the

elimination of damaged mitochondria that are known to be the major source of ROS production (Coussens and Werb 2002). During *in vivo* tumor formation, autophagy has been shown to play a major role for the cancer cells to survive under hypoxic stress before the vascularization of the tumor occurs (Coussens and Werb 2002). However, the mechanism is still unclear although several studies suggest a role of autophagy in the regulation of cancer cell metabolism allowing them to meet requirements for rapid proliferation (Coussens and Werb 2002).

High levels of autophagy are indeed observed in hypoxic regions of tumors, and autophagy has been described to be activated by hypoxia and ischemia (glucose deprivation and hypoxia) to promote the survival of cancer cells. Hypoxia induces ROS production leading to the stabilization of hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α). This factor, a key regulator of oxygen homeostasis, induces mitophagy through the expression of Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3 (BNIP3), allowing the cells to survive during prolonged hypoxia by preventing increased levels of ROS production (Balkwill and Mantovani 2001). On the other hand, tumor progression and aggressiveness are characterized by metastasis, epithelial–mesenchymal transition (EMT), and angiogenesis.

Metastasis is a multistep process that allows cancer cells to migrate to distant organ sites (Linhart et al. 2014). EMT is the first step of metastasis and is characterized by the loss of epithelial properties and the acquirement of mesenchymal properties leading to increased cell mobility. Several studies have described a prometastasis role of autophagy. For example, inhibition of autophagy by FIP200 deletion leads to a decrease in metastatic potential associated with an accumulation of damaged mitochondria, which could lead to increased level of ROS. Moreover, increased autophagy in human cancer is associated with metastasis and poor prognosis in patients with melanoma and breast cancer (Coussens and Werb 2002).

16.2.2 ROLE OF INFLAMMATION IN LUNG CANCER

Inflammation is recognized both as a condition that can lead to cancer development and as a condition that can arise due to oncogenic changes in cancer cells (Jafri et al. 2013). The hallmarks of cancer are distinctive and complementary capabilities that enable tumor growth and metastatic dissemination sustaining proliferative signaling, evading growth suppressors, resisting cell death, enabling replicative immortality, inducing angiogenesis, and activating invasion and metastasis (Hanahan and Weinberg 2011). Inflammation has been described as the underlying or enabling characteristic that promotes these hallmarks of cancer (Hanahan and Weinberg 2011).

Cancer and inflammation are closely linked, and many inflammatory conditions increase the risk of cancer development (Jafri et al. 2013). In the NSCLC microenvironment, there is a complex interaction between immune cells and tumor cells as well as other stromal cell types and tissue components. The distribution of these cells and the expression of different inflammatory molecules throughout the TME are to some extents related to tumor progression and survival (Gomes et al. 2014).

The concept of tumor heterogeneity applies not only to tumor epithelial cells but also to the diverse microenvironment with the tumor cells' interaction. Carcinoma cells, in the lung (and others), are closely associated with the extracellular matrix (ECM) and mesenchymal cells such as fibroblasts, infiltrating immune cells, and vasculature (Chen et al. 2014).

Lung tumors develop through a complex process involving many stages such as initiation, promotion, and progression (Hanahan and Weinberg 2011). In lung tumorigenesis, the genesis of new blood and lymphatic vessels supplies necessary nutrients for tumor growth and allows for an influx of immune cells of the myeloid and lymphoid lineages (Chen et al. 2014). In the lung, depending on the type of inflammation, there may be direct effects such as DNA damage, mutation, or an indirect effect or induced effect, induced by activated enzymes such as cytochrome P-450 oxidase or flavin monoxides that produce ROS in the cells, resulting in protein and DNA damage (Azad et al. 2008). The second stage in cancer development is the promotion, which involves clonal expansion of the initiated cells. These initiated cells may undergo promotion under persistent oxidative

stress conditions, forming focal lesions from which invasive cancers may originate. Progression is the final stage involving the formation of fully malignant cells from an early neoplastic clone via both genetic and epigenetic mechanisms (Azad et al. 2008). Tumor cells undergo autonomous uncontrolled proliferation with the aid of suitable promoting factors such as EGFR. This factor, a transmembrane receptor with intrinsic tyrosine kinase activity, triggers many transcription factors and is activated in lung tumors (Azad et al. 2008). A very important fact of cancer initiation and progression is genome instability. It was reported that the lack of mismatch in DNA at certain nucleotide level may lead to microsatellite instability in many forms of lung cancers (Massion and Carbone 2003). Despite this endogenous sources of inflammation-induced oxidative stress, exogenous sources such as hyperoxia, radiation, exposure to particulates, and chemical carcinogens are also critical in lung carcinogenesis (Azad et al. 2008). ROS/RNS produced by inflammatory cells also stimulate oncogenes such as c-Jun and c-Fos, and the overexpression of c-Jun was reported to be associated with lung cancer (Azad et al. 2008).

In lung cancers associated with nondestructive agents, such as asbestos and silica, the chronic inflammation in the lung is persistent because of the inability of the immune system to remove these substances. Many of these agents are reported to modulate and activate various transcription factors, producing changes in cell proliferation, differentiation, apoptosis, and inflammation (Azad et al. 2008). Such inflammatory responses increase the incidence of epithelial cancers, including mesothelioma and lung cancer. Cigarette smoke is a complex preneoplastic agent that may act, in part, by inducing a chronic inflammatory condition by delivering an array of genotoxic carcinogens such as nitrosamines, peroxides, and many potent oxidants into the lungs (Azad et al. 2008). Therefore, inflammatory cells influence the whole organ in tumor development, regulating the growth, migration, and differentiation of all cell types, including neoplastic cells, fibroblasts, and endothelial cells (Azad et al. 2008). Tumors can evade immune surveillance by expressing molecules that maintain tolerance to normal peripheral tissues, including the interaction of the tumor-associated programmed cell death-1 ligand 1 (PDL1) with the immune receptor programmed cell death-1 (PDI, also known as PDCD1). PDL1 is a distal modulator of the immune response whose expression occurs in 40%–50% of NSCLC patients (Guibert et al. 2015). Recently, the use of antibodies targeting the PDI-PDL1 checkpoint has resulted in some marked responses in early-stage clinical trial for a large panel of therapy refractory cancer subtypes, including advanced melanoma, NSCLC, and renal cell cancer, with a proportion of responding patients showing persistent long-term benefit (Chen et al. 2014; Guibert et al. 2015).

16.2.3 MMPs, LUNG CANCER, AND INFLAMMATION

In inflammation, matrix metalloproteins (MMPs) recruit inflammatory cells during tissue injury, which involves a series of complex morphological changes in cell barrier, cell–cell interaction, and cell–matrix interaction. MMPs also exhibit a wide functional diversity in modulating NSCLC due to their interaction with growth factor receptors, cytokines, chemokines, cell adhesion molecules, apoptotic ligands, and angiogenic factors. MMPs are involved at all junctures of inflammation as well as tumor progression, including proliferation, adhesion, migration, angiogenesis, senescence, apoptosis, cytokine and chemokine bioactivity, and evasion of the immune system (Lopez-Otin and Bond 2008). In lung cancer, the expression of a number of MMPs and their inhibitors is exaggerated and may be causally linked to enhanced tumor progression and metastasis (Sorokin 2010).

MMPs were primarily thought solely to be involved in homeostasis and turnover of the ECM, but recent observations provide evidence suggesting that MMPs act on cytokines, chemokines, and protein mediators to regulate various aspects of inflammation and immunity (Parks et al. 2004). Cancer-associated EMT is known to contribute to tumor progression, increased invasiveness and metastasis, resistance to therapies, and generation of cell populations with stem cell–like characteristics and has been implicated in progression and metastasis of cancer specifically.

EMT is characterized by the loss of cell–cell junctions, polarity, and epithelial markers, and in turn, acquisition of mesenchymal features and motility. Changes associated with this developmental process have been extensively implicated in cancer progression and metastasis. MMP-3 induces EMT associated with malignant transformation via a pathway dependent upon the production of ROS. While the process by which exposure to MMP-3 leads to induction of ROS has been extensively studied, exactly how the MMP-3-induced ROS stimulate EMT remains unknown (Cichon and Radisky 2014).

MMPs have been speculated to play a critical role in various inflammatory diseases, such as acute lung injury, COPD, and cancer. They can regulate the integrity of physical barriers and transmigration of leukocytes from vasculature to tissue. They also regulate the availability and activity of inflammatory mediators, such as cytokines and chemokines. MMPs also generate chemokine gradients in tissue to recruit inflammatory cells to the site of injury or inflammation and can also regulate the survival of inflammatory cells (Parks et al. 2004; Nissinen and Kahari 2014). Immune system plays an important role in cancer cell surveillance by recognizing and attacking cancer cells *in vivo*. However, cancer cells can escape the immune attack in various ways. On the other hand, chronic inflammation is associated with the progression of several types of cancer (Nissinen and Kahari 2014). Inflammation is necessary to promote cancer initiation and progression via vascularization and remodeling of TME, which are important for tumor cell survival. MMPs may also exert immune regulatory function in TME, and they may also help cancer cells escape immunosurveillance (Nissinen and Kahari 2014). Recent findings indicate that MMPs play an important role in the regulation of cytokine and chemokine release and their activation, which are key steps in the immune response (Sorokin 2010). For example, MMP-1, -2, -3, -7, -9, and -12 are able to process pro–tumor necrosis factor- α (TNF- α) into soluble active TNF- α . MMP-2, -3, and -9 also have the ability to cleave IL-1 β , generating a more active form. MMP-9 controls the IL-12-dependent proliferation of T lymphocytes. MMP-8, -13, and -14 can cleave IL-8 to generate truncated forms with increased activity. Therefore, inflammatory cytokines and MMPs are interconnected (Sorokin 2010).

The role of MMPs in cancer progression has been extensively studied in various animal models. In addition to tumor cells, stromal cells play an important role in cancer progression, for example, by producing MMPs (Nissinen and Kahari 2014). The association between MMPs and inflammation in cancer progression has also been emphasized. A good example of this association is that the transplantation of wild-type mouse MMP-9 expression bone marrow cells to MMP-9-deficient mice effectively restores the development of cutaneous SCC (Nissinen and Kahari 2014). Cancer progression is regulated by growth factors, chemokines, and cytokines either directly via their angiogenic or angiostatic activity or indirectly by attracting anti- or precancerous inflammatory cells. As discussed earlier, several studies have revealed the proteolytic activation or inhibition of growth factors, cytokines, and chemokines by various MMPs (Nissinen and Kahari 2014).

MMPs are clearly important effectors in inflammation both in physiological situations, such as tissue repair, and in pathological inflammatory conditions and cancer. The association of MMPs with cancer has obviously suggested them as potential therapeutic target (Nissinen and Kahari 2014).

16.3 CONCLUSION

Inflammation can affect every hallmark of tumor development and prognosis as well as the response to therapy. In the NSCLC microenvironment, there is a complex interaction between immune cells and tumor cells as well as other stromal cell types and tissue components. The production of ROS/RNS is critical for normal aerobic metabolism and functioning of several events essential for the organism. Overpowered generation of ROS/RNS is likely to induce chronic inflammatory conditions that may lead to several deleterious effects in the cells. The increased levels of ROS are extensively involved in the mechanisms of chronic lung inflammation and thus contribute

to the development of lung cancer. A better understanding of the role of ROS/RNS in lung inflammation and cancer is probable to inspire new strategies for lung cancer prevention and treatment.

REFERENCES

- Aggarwal, C. 2014. Targeted therapy for lung cancer: Present and future. *Ann Palliat Med* 3 (3):229–235.
- Allavena, P. and A. Mantovani. 2012. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: Tumour-associated macrophages: Undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immunol* 167 (2):195–205.
- Azad, N., Y. Rojanasakul, and V. Vallyathan. 2008. Inflammation and lung cancer: Roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11 (1):1–15.
- Balkwill, F. and A. Mantovani. 2001. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet* 357 (9255):539–545.
- Chen, Z., C. M. Fillmore, P. S. Hammerman, C. F. Kim, and K. K. Wong. 2014. Non-small-cell lung cancers: A heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 14 (8):535–546.
- Cichon, M. A. and D. C. Radisky. 2014. ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF- κ B-dependent activation of Snail. *Oncotarget* 5 (9):2827–2838.
- Coussens, L. M. and Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420 (6917):860–867.
- de Visser, K. E., A. Eichten, and L. M. Coussens. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6 (1):24–37.
- Diakos, C. I., K. A. Charles, D. C. McMillan, and S. J. Clarke. 2014. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol* 15 (11):e493–e503.
- D’Incalci, M., N. Badri, C. M. Galmarini, and P. Allavena. 2014. Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. *Br J Cancer* 111 (4):646–650.
- Farooqi, A. A., S. Fayyaz, M. F. Hou, K. T. Li, J. Y. Tang, and H. W. Chang. 2014. Reactive oxygen species and autophagy modulation in non-marine drugs and marine drugs. *Mar Drugs* 12 (11):5408–5424.
- Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D. M. Parkin. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127 (12):2893–2917.
- Galmarini, C. M., M. D’Incalci, and P. Allavena. 2014. Trabectedin and plitidepsin: Drugs from the sea that strike the tumor microenvironment. *Mar Drugs* 12 (2):719–733.
- Gomes, M., A. L. Teixeira, A. Coelho, A. Araujo, and R. Medeiros. 2014. The role of inflammation in lung cancer. *Adv Exp Med Biol* 816:1–23.
- Grigoryeva, E. S., D. A. Kokova, A. N. Gratchev, E. S. Cherdynstev, M. A. Buldakov, J. G. Kzhyshkowska, and N. V. Cherdynsteva. 2015. Smoking-related DNA adducts as potential diagnostic markers of lung cancer: New perspectives. *Exp Oncol* 37 (1):5–12.
- Grimm, E. A., A. G. Sikora, and S. Ekmekcioglu. 2013. Molecular pathways: Inflammation-associated nitric oxide production as a cancer-supporting redox mechanism and a potential therapeutic target. *Clin Cancer Res* 19 (20):5557–5563.
- Guibert, N., M. Delaunay, and J. Mazieres. 2015. Targeting the immune system to treat lung cancer: Rationale and clinical experience. *Ther Adv Respir Dis* 9 (3):105–120.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144 (5):646–674.
- Jafri, S. H., R. Shi, and G. Mills. 2013. Advance lung cancer inflammation index (ALI) at diagnosis is a prognostic marker in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): A retrospective review. *BMC Cancer* 13:158.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61 (2):69–90.
- Linhart, K., H. Bartsch, and H. K. Seitz. 2014. The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. *Redox Biol* 3:56–62.
- Lopez-Otin, C. and J. S. Bond. 2008. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* 283 (45):30433–30437.
- Lu, H., W. Ouyang, and C. Huang. 2006. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 4:221–233.
- Massion, P. P. and D. P. Carbone. 2003. The molecular basis of lung cancer: Molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respir Res* 4:12.
- Molina, J. R., P. Yang, S. D. Cassivi, S. E. Schild, and A. A. Adjei. 2008. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 83 (5):584–594.
- Nissinen, L. and V. M. Kahari. 2014. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1840 (8):2571–2580.

- Parks, W. C., C. L. Wilson, and Y. S. Lopez-Boado. 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4 (8):617–629.
- Reinartz, S., T. Schumann, F. Finkernagel, A. Wortmann, J. M. Jansen, W. Meissner, M. Krause et al. 2014. Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: Correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. *Int J Cancer* 134 (1):32–42.
- Shiels, M. S., R. M. Pfeiffer, A. Hildesheim, E. A. Engels, T. J. Kemp, J. H. Park, H. A. Katki et al. 2013. Circulating inflammation markers and prospective risk for lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 105 (24):1871–1880.
- Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal. 2012. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62 (1):10–29.
- Sorokin, L. 2010. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* 10 (10):712–723.

The Role of Biobanks in Oncology Research – A Portuguese Perspective

Mónica Gomes^{1,2,3,#}, Ana Luísa Teixeira^{1,2,3,#}, Ana Coelho^{1,2,3,4}, Rui Medeiros^{1,3,6} and António Araújo^{2,5,*}

¹*Molecular Oncology and Viral Pathology GRP – CI, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal*

²*Unit of Oncobiology Research- Unit for Multidisciplinary Research In Biomedicine, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Porto, Portugal (UNIO-UMIB-ICBAS)*

³*LPCC Research Department-Portuguese League Against Cancer (NRNorte) Porto, Portugal*

⁴*Faculty of Medicine of University of Porto, Portugal*

⁵*Medical Oncology Service of Centro Hospitalar do Porto, Porto*

⁶*Faculty of Health Sciences of Fernando Pessoa University, Porto, Portugal*

Abstract: Approximately, 14.1 million new cancer cases and 8.2 million deaths occurred in 2012 worldwide. Cancer is a group of diseases characterized by uncontrolled growth, spread of abnormal cells and is a leading cause of death in both more and less economically developed countries. The growth in our knowledge of cancer biology has led to remarkable progress in cancer prevention, early detection and treatment. Recent years have seen a remarkable progress in the basic, translational and clinical research in cancers. During carcinogenesis several genetic and epigenetic alterations occur and a molecular approach based on the detection of these molecular alterations can permit the definition of molecular signatures specific for different tumors, allowing the definition of molecular biomarkers. These markers can be found in a variety of fluids, tissues and cell lines, and can be used for screening the general population, for differential diagnosis in symptomatic patients and for clinical staging of cancer. Furthermore, the biomarkers can be used to evaluate response to treatment, to assess disease recurrence through monitoring and as prognostic indicators of disease progression. The advances in the molecular knowledge and technology from research is based on the study of different types of biological samples, being necessary the collection, processing, preservation, stored and maintenance of these samples required an ordered and structured plan with the consequent creation of a biobank. The promotion and operation of biobanks provide to scientists the opportunity to access to quality samples and associated data, representing an essential milestone in shortening the time between research and clinical application, improving the effectiveness of research.

Keywords: Biobank, cancer research, cancer biomarkers.

INTRODUCTION

Cancer is a group of diseases (more than 200) characterized by uncontrolled growth, spread of abnormal cells and is a leading cause of death in both more and less economically developed countries. The occurrence of cancer is increasing because of the growth and aging of the population, as well as an increasing prevalence of established risk factors such as smoking, overweight, physical inactivity, and changing reproductive patterns associated with urbanization and economic development. About 14.1 million new cancer cases and 8.2 million deaths occurred in 2012 worldwide [1]. Over the years, the burden has shifted to less developed countries, which currently account for about 57% of cases and 65% of

cancer deaths worldwide [1]. Lung cancer is the leading cause of cancer death among males in the world, and has surpassed breast cancer as the leading cause of cancer death among females in more developed countries [1].

The growth in our knowledge of cancer biology has led to remarkable progress in cancer prevention, early detection and treatment. Recent years have seen a remarkable progress in the basic, translational and clinical research in cancers. Over the last decades, the Oncology field was a target of significant advances in the knowledge of the biology of carcinogenesis processes. Several discoveries were made and the identification of key genes and molecules in the regulation of cancer growth, differentiation, apoptosis inhibition, invasion and metastasis development has dramatically changed the view of the oncology [2]. Molecular mechanism of cancer involve a several number of genetic alterations, however only a limited part of them are found in all tumor types, which could

*Address correspondence to this author at the Unit of Oncobiology Research-Unit for Multidisciplinary Research In Biomedicine, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Porto, Portugal;
Tel: +351222077500; Fax: +351222086085;
E-mail: antonio.araujo@chporto.min-saude.pt

#Contributed equally to this review.

be key alterations for oncogenesis and tumor progression [3].

The oncology community has seen a paradigm shift from the histology to the molecular diagnosis and treatment of cancer thanks to identification of genetic markers, which are more reproducible and less subject to intrinsic and extrinsic stimuli [4]. The personalized medicine (as a form of medicine that uses information about a person's genes, proteins and environment to prevent diagnose and treat disease), has changed the oncology field, in consequence of being based on understating molecular carcinogenesis, pharmacogenomics and individual genetic differences that determined the response to anti-neoplastic agents. Nowadays, the use of molecular biomarkers in oncology, that provide molecular information regarding the tumor biology, are useful tools for cancer signatures, to personalized treatment and can be divided to: diagnostic, prognostic, treatment and prevention subgroups [4].

MOLECULAR BIOMARKERS

Biomarkers can be defined as biological molecules found in blood, other body fluids or tissue that is a sign of a normal or abnormal process, or of a condition or a disease [5]. These biomarkers can typically differentiate an affected patient from a person without the disease. This differentiation could be based in several types of alterations, including germline or somatic mutations, transcriptional changes and post-translation modification. Thus, a large number of biomarkers could include proteins, nucleic acids and antibodies. Moreover, a biomarker can also be a collection of alterations such as gene expression, proteomic, and metabolomics signatures and being detected in circulation (whole blood, serum or plasma), excretions or secretion (stool, urine, sputum or nipple discharge) and could be easily assessed non-invasively [5]. By definition, an ideal cancer biomarker is characterized by the specificity for a given type of tumor with an appropriated level of sensibility, and the concentration of the biomarker should indicate the stage of the disease and the response to treatment used [3].

Recently, numerous studies have demonstrated that several molecular markers can assist to predict prognosis in cancer. During carcinogenesis several genetic and epigenetic alterations occur and a molecular approach based on the detection of these

molecular alterations can permit the definition of molecular signatures specific for different tumors, allowing the definition of molecular biomarkers [6].

Biomarkers can be used for patient's assessments in multiple clinical settings in the continuum of the disease, including risk, screening, diagnostic, determining prognosis and prediction of clinical outcomes and treatment response.

Biomarkers can be used to found an individual risk for cancer development. One example is the germline mutation in *BRAC1* gene, which increases the risk of breast and/or ovarian cancer development. Women with a strong family history of ovarian and breast cancer can undergo genetic testing to determine if she is a carrier of these mutations [5]. In positive cases, women can opt for a more intensive screening, chemoprevention with tamoxifen or prophylactic bilateral mastectomy and/or bilateral salpingo-oophorectomy in order to decrease the risk of develop these cancers [5, 7].

Another approach, is use biomarkers to screen otherwise healthy individuals for diseases, a common but controversial biomarker for screening is prostate specific antigen (PSA). The use of this biomarker was approved in 1986 by Food and Drug Administration (FDA) and is responsible for an increase in the diagnosis of prostate cancer (PC), but also led to a PC overdiagnosis and overtreatment [8].

Information provided by diagnostic biomarkers makes possible quicker and differential diagnosis. If in a patient was found a suspicious nodule in breast on mammography, histological evaluation of the biopsy specimen can determine whether the tissue is cancer, infection, inflammation or another benign process. If cancer, the tissue will be submitted to evaluation with specific immunohistochemical markers for the identification of the origin of the tumor [5, 9].

After patients being diagnosed with cancer, biomarkers could have a prognostic role (likelihood of disease recurrence independent of treatment) and/or a predictive role (help determining a more accurate treatment choice).

Classically, the clinicopathological characteristics of tumor have been used for determination of prognosis. Nowadays, newer technologies and approaches are being used to assess prognosis for individual tumors,

changing the clinical practice. In breast cancer there are a number of gene expression profiles that have been developed and that can be used to estimate prognosis for an individual patients based on the assessment of the tumor. More recently, in metastatic breast cancer the use of circulating tumor cells (CTCs) show to be prognostic for overall survival [5, 9]. On the other hand, the predictive biomarkers provide information on the probability of obtaining a response to treatment and support the process of therapeutic decision. It has been proved that somatic mutation in exons 19 or 21 of *EGFR* gene are related to tumor sensitivity to TK is therapies in lung cancer [4, 6]. In colorectal cancer, mutation of the gene *RAS* is a predictive biomarker, because *RAS* somatic mutations are associated with poor response to target therapy using antibodies anti-EGFR [5].

Thereby, biomarkers can be found in a variety of fluids, tissues and cell lines, and can be used for screening the general population, for differential diagnosis in symptomatic patients and for clinical staging of cancer. Furthermore, the biomarkers can be used to evaluate response to treatment, to assess disease recurrence through monitoring and as prognostic indicators of disease progression [9]. However, only a few markers are used in routine practice and are limited to cancer type and clinical setting [5].

The definition of new potential biomarkers can be identified through different approaches. The traditional view identifies candidate biomarkers based on the biology of the tumor and microenvironment, or the metabolism of the pharmaceutical drugs. In the new Era of molecular biology, the biomarker identification use techniques such as high-throughput sequencing, gene expression arrays and mass spectroscopy will permit to quickly identify individual or groups of biomarkers. However, for the evaluation in the daily clinical practice of a patient and for the study of new potential biomarkers, is imperative the use of biological individual samples, which can be security persevered with a quality guaranteed [5, 9]. Thus, is imperative the construction of biobanks for the present and for the future research development in this field.

EVOLUTION OF THE PATIENT'S TREATMENT BASED ON MOLECULAR SIGNATURES

During the 1970s approximately 1 of 2 people diagnosed with cancer survived at least 5 years,

nowadays more than 2 of 3 survive. Until the late 1990s nearly all drugs used in cancer treatment (with the exception of hormone treatment) worked by killing cells that were in the process of replicating their DNA and dividing to form new cells. These anti-neoplastic drugs also killed normal cells but had a greater effect in cancer cells because their turnovers were greater. During 1980s scientists observed that several growth factors and other molecules responsible for recognizing and responding to growth factors are actually products of oncogenes. Among the earliest targeted therapies that block signals are trastuzumab, gefitinib, imatinib and cetuximab [7].

Personalized therapy based on patient's individual biologic and molecular profiles is a promising approach to optimize efficacy with the available agents. The target therapy use agents that affect a known aberrant signal pathway or molecular target in cancer cell or tumor microenvironment [10]. The initial studies of target therapies included the use of trastuzumab to treat HER2-amplified breast cancer and imatinib for BCR-ABL translocated chronic myelogenous leukemia. In the last decade, it was observed an increase in clinical trials of drugs targeting oncoproteins and cancer pathways in several solid tumors [3, 7, 10].

A clear example of this field includes agents targeting receptors tyrosine kinase, such as the EGFR tyrosine kinase inhibitors (gefitinib, erlotinib or afatinib) for lung cancer treatment. Lung cancer is also a paradigmatic example of advances in patient's treatment - in the past, treatment plans have been prescribed to patients based on clinicopathological criteria [11], but in nowadays, new treatments take into account the histology, genetic and molecular characteristics of the tumor as well as patient's characteristics [12]. Thus, molecular subtyping of NSCLC has led to approval of and use of targeted therapies in the front-line setting (gefitinib, erlotinib, and afatinib for EGFR; crizotinib for ALK and ROS1) [13].

In 2004, *EGFR* mutations were detected in patients with lung adenocarcinoma and these patients responded better to tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment - a new era of targeted therapy in NSCLC has begun [2]. Mutation of *EGFR* has been detected in a small subset of NSCLC patients, more frequent in the Asian than in the Caucasian population, more frequent in non-smokers than in smokers and more frequent in adenocarcinoma histology. These are activating

mutations found in exons 18, 19, 20, 21 of the *EGFR* gene. Four randomized phase III trials with gefitinib, two randomized phase III trials with erlotinib, and one randomized phase III trial with afatinib prospectively compared the efficacy of EGFR TKis against standard platinum-based chemotherapy in patients with EGFR mutations positive NSCLC. In all trials, it was observed that EGFR-mutated NSCLC patients treated with TKis had significantly better progression-free survival (PFS) and quality of life (QOL) when compared with patients treated with platinum-based chemotherapy [13].

In 2007, Soda and co-workers, identified a small inversion in the *p* region of chromosome 2 in NSCLC patients, whose consequence was the formation of the fusion gene *EML4-ALK*. This translocation occurs in different histological types of NSCLC, in non-smoking patients and most often does not occur together with the mutations in the *EGFR* and *KRAS* genes [3, 14]. The phase III randomized trials with crizotinib compared to standard chemotherapy in patients with this gene alteration showed a statistically improved PFS with the use of target therapy [15, 16].

These evidences support the assessment of mutations in the *EGFR* gene and the *EML4-ALK* fusion gene that may be used as a predictive biomarker in NSCLC.

BIOBANKS: OVERVIEW

Over the years, the biomedical research improves the population health care. It was observed a significant increase of the studies that combined basic science and the clinic, opening a new field – the translational research. This research will be critical to improve the prevention, detection, diagnosis, intervention and treatment, including the development of new molecular tests [6, 9].

The translational research combine the molecular knowledge of basic science with clinical information, improving efficient patient's health care [17]. However, to get this aim it is necessary advances in the molecular knowledge and technology from research based on the study of different types of biological samples. The collection, processing, preservation, stored and maintenance of these samples required an ordered and structured plan with the consequent creation of a biobank.

Biobanks could be defined as storage banks for human origin samples, usually associated with

personal information, which together allow the national and international biomedical research [17, 18]. For more than 80 years tissue has been derived from human bodies, stored and used for therapeutic, educational, forensic and research purposes in most western countries [19]. Nowadays, we observed a rapid proliferation and an increase in complexity of biobanks, in consequence of diverse research purposes and types and sources of samples. Thus, it is important that biobanks bear a large number of representative samples of biological tissues, tumor cells, proteins, DNA, RNA, miRNAs and other vital fluids such as blood, serum, urine, pleural or ascitic fluid. Regarding the nucleic acids and proteins is advice that in collection and isolation be used the same tissue specimen, because tumor heterogeneity is one of the major sources of variation in biological data [20]. Taken together, the recent advances in genomic and proteomics (and other "omics") allow a better understands of the molecular characteristics of these samples. This new Era enabled a large amount of information data, ensuring the quality and the rapid availability.

According to the guidelines on Human Biobanks and Genetic Research Databases (HBGRD) established on October 2009, from Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) who helps Governments response to new development and concerns, the biobanks must be focus on the management, under safety, quality and efficiency criteria of samples.

According the principles defined by OECD, the HBGRD objective should be to foster research, as well as should be established governed, managed, operated, accessed, used and discontinued in accordance with applicable legal frameworks and ethical principles. Moreover, the HBGRD operators should strive to make data and material rapidly and widely available to researchers to advance knowledge and understanding, however, these operators and users should respect human rights, freedoms and secure of participants' privacy and the confidentiality of data and information. The operators should also considered and minimize risks to participants, their families and potentially identifiable populations or groups whose specimens and data are included in HBGRD. Regarding the collection, labeling, registration, processing, storage, tracking, retrieval, transfer, use and destruction of human biological

materials, data and/or information, the operators should document all operating procedures and policies. Moreover, the HBGRD operators should be transparent and clear regarding the nature and source of funding. As final work, the use of samples from biobanks should result in scientific publications and/or the final results must be available for all scientific community.

The biobank creation should be based on rules clearly formulated and communicated, should have professional and qualified staff for all operations, that should be efficiently performed, and should have defined a long term sustainability strategy. These guidelines provide information regarding the establishment; governance; management; oversight; terms of participation; type of biological sample; protection of human biological materials and data; access; qualifications, education and training of operators; custodianship, benefits, sharing and intellectual property; discontinuation and disposal material and data [21].

However, the creation of biobanks rises up several ethical issues [18]. The use of human biological samples can be considered as an invasion of the individual autonomy, with no self-control of the process. According to Budimir and co-workers, several questions can be made, such as - When individuals donate part of their body to a biobank how is that human sample processed? Who is the owner of the sample? Who should decide how it should be used? Who has the right to know individual results of research?

Regarding biobanks, ethical framework has been the most controversial issue. For example, the type of the study should be considered, because the epidemiological studies results will not induce the same levels of relevance as the results of genetic information. Similarly, the collection of cancer samples is not associated with the same levels of concern as for example collecting of the samples to be used in the creation of stem cells that will be transplanted into humans. Another example regarding the relevance of ethical issue is the increase of published articles related to ethics in biobanks in the last 12 years [18].

Particularly in Portugal, the main problem associated with the ethical issue of biobanks is the obtainment of informed consent. Most biological specimens stored in tumor biobanks were only collected for histopathological cancer diagnosis,

however in recent years the investigators realized that the additional molecular analysis of these samples and their correlation with the obtained clinical results could be useful for translational researches. Therefore is crucial to find a good strategy for obtaining informed consent to use specimens already collected for new translational studies.

Other important issues for biobanks creators are the accuracy of clinical information and outcome of the cancer patients treated, and the quality of tumor samples. Thus, a biobank with an effective and reliable protocol allow researchers to store and access tumor tissue samples under ideal conditions for their researches and recovery of patient's data [22].

The ethical problems, involving all aspects discussed above, will never have an easy answer and are constantly evolving, in consequence of the huge advances in genetic research together with the development of science and technology. In the future, the biobanks need to protect patients sensitive information, levels of accessibility, the need to prevent data misuse and the possibility to predict individual health-related outcomes based on the genetic/genomic information [18].

THE ROLE OF BIOBANKS IN CANCER RESEARCH

The Oncology is a wide field, with etiologic and pathophysiologic mechanisms mostly unknown or not completely understood. It is necessary to develop new therapies using genetic studies that could better characterize the patient's tumors and their carcinogenesis evolution, as well as individual's genetics characteristics.

The biobanks should offer samples from various sources of each patient (tissue or fluid) and at different times of disease progression (diagnosis, progression, pre or post-treatment) to may help to clarify the mechanisms involved in cancer development. The researchers can take advantage of the existence of a biobanks to propose the identification of new biomarkers helpful in the identification of new target molecules for the development of drugs and new therapies. Biobanks can thus have an important role on biomedicine research and decisively contribute to the development of the personalized medicine [17].

The promotion and operation of biobanks provide to scientists the opportunity to access to quality samples

and associated data, representing an essential milestone in shortening the time between research and clinical application, improving the effectiveness of research.

Nevertheless, it is important to have constant coordination and collaboration between biobanks with different professional involved in the processing of samples and the information associated with them: identification and phenotyping of donors, acquisition, processing, storage, distribution and use of samples and associated information [17]. To promote the development of effective cancer treatments, scientists increasingly rely on human tissue specimens for preclinical drug discovery. The existence of a biobank well-structured and with quality organic samples is an essential part of the complex, lengthy and expensive process for cancer drug development.

The use biobanks in cancer research is crucial to: 1) evaluate patients responses and their correlation with the clinic information (most studies using animal models for drug analysis are inefficient); 2) molecular analysis, including comparative genomic and quantified gene expression; 3) a higher number of specimens (high representatively of the disease); 4) prospective sample collection useful for drug discovery efforts; 5) high quality procedures for sample collection, storage and analysis; 6) maintained the confidential of the samples and the patients information. These procedures are basal for an ideal translational research, allowing an improvement of patient's quality of life and increasing overall survival.

In conclusion, only research biobanks provides the expertise, infrastructure and resources to provide the research community with appropriate collection of biological samples. Only biobanks provide the opportunity to biomarkers identification based on rigorous scientific studies and tested in focused well-designed clinical trials, allowing a more efficient clinical development. For patients the use of these data represents enormous benefits in consequence of the development of more efficacious and less toxic therapies, improving the overall survival [7].

REFERENCES

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 2015; 65(2): 87-108. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21262>
- [2] Popper HH, Ryska A, Timar J, Olszewski W. Molecular testing in lung cancer in the era of precision medicine. *Translational lung cancer research* 2014; 3(5): 291-300.
- [3] Nalejska E, Maczynska E, Lewandowska MA. Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology. *Molecular diagnosis & therapy* 2014; 18(3): 273-84. <http://dx.doi.org/10.1007/s40291-013-0077-9>
- [4] Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism* 2015; 64(3 Suppl 1): S16-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.027>
- [5] Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Molecular oncology* 2012; 6(2): 140-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>
- [6] Sethi S, Ali S, Philip PA, Sarkar FH. Clinical advances in molecular biomarkers for cancer diagnosis and therapy. *International journal of molecular sciences* 2013; 14(7): 14771-84. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140714771>
- [7] La Thangue NB, Kerr DJ. Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nature reviews Clinical oncology* 2011; 8(10): 587-96. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.121>
- [8] Shariat SF, Scherr DS, Gupta A, Bianco FJ, Jr., Karakiewicz PI, Zeltser IS, et al. Emerging biomarkers for prostate cancer diagnosis, staging, and prognosis. *Arch Esp Urol* 2011; 64(8): 681-94.
- [9] Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature clinical practice Oncology* 2008; 5(10): 588-99. <http://dx.doi.org/10.1038/nponc1187>
- [10] Aggarwal C. Targeted therapy for lung cancer: present and future. *Annals of palliative medicine* 2014; 3(3): 229-35.
- [11] Song G, Liu Y, Wang Y, Ren G, Guo S, Ren J, et al. Personalized biomarkers to monitor disease progression in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with icotinib. *Clin Chim Acta* 2015; 440: 44-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.11.010>
- [12] Vadakara J, Borghaei H. Personalized medicine and treatment approaches in non-small-cell lung carcinoma. *Pharmacogenomics and personalized medicine* 2012; 5: 113-23.
- [13] Korpanty GJ, Graham DM, Vincent MD, Leigh NB. Biomarkers That Currently Affect Clinical Practice in Lung Cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS. *Frontiers in oncology* 2014; 4: 204. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2014.00204>
- [14] Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448(7153): 561-6. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05945>
- [15] Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368(25): 2385-94. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1214886>
- [16] Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371(23): 2167-77. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1408440>
- [17] Purriños NDGNC. Biobancos y su importancia en el ámbito clínico y científico en relación con la investigación biomédica en España. *Reumatol Clin* 2014; 10: 304-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2014.02.011>
- [18] Budimir D, Polasek O, Marusic A, Kolcic I, Zemunik T, Boraska V, et al. Ethical aspects of human biobanks: a

- systematic review. Croatian medical journal 2011; 52(3): 262-79.
<http://dx.doi.org/10.3325/cmj.2011.52.262>
- [19] Hoeyer K. The ethics of research biobanking: a critical review of the literature. *Biotechnology & genetic engineering reviews* 2008; 25: 429-52.
<http://dx.doi.org/10.5661/bger-25-429>
- [20] Riegman PH, de Jong BW, Llobart-Bosch A. The Organization of European Cancer Institute Pathobiology Working Group and its support of European biobanking infrastructures for translational cancer research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(4): 923-6.
<http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0062>
- [21] OECD. Guidelines on human biobanks and genetic research databases 2009.
- [22] Reis ST, Feitosa EB, Pontes-Junior J, Marin CC, Abe DK, Crippa A, *et al.* Tumor banks: the cornerstone of basic research in urology. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology* 2010; 36(3): 348-54.

Received on 05-06-2015

Accepted on 29-06-2015

Published on 07-08-2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.6000/2292-2598.2015.03.02.3>

IL-6 polymorphism in non-small cell lung cancer: a prognostic value?

Mónica Gomes · Ana Coelho · António Araújo ·
Andreia Azevedo · Ana Luísa Teixeira · Raquel Catarino ·
Rui Medeiros

Received: 27 August 2014 / Accepted: 23 December 2014 / Published online: 9 January 2015
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2015

Abstract Lung cancer was found to be the most commonly diagnosed cancer, as well as the primary cause of cancer-related mortality for males worldwide and the second leading cause of cancer-related deaths for women. Cytokines are fundamental for several biological processes-associated malignant tumors. The IL-6 is a cytokine involved in the regulation of cellular functions including processes associated with cancer, such as proliferation, apoptosis, angiogenesis, and differentiation. Furthermore, IL-6 is a potent pleiotropic inflammatory cytokine that is considered a key growth-promoting and antiapoptotic factor. The polymorphism -174G/C SNP is a G to C transition in the -174 position of the promoter region of the IL-6 gene. The aim of our study was to evaluate the influence of -174G/C polymorphism in

clinical outcome of non-small cell cancer (NSCLC) patients. DNA was extracted from peripheral blood of 424 patients diagnosed with cytologically or histologically NSCLC. The characterization of IL-6 -174G/C genotypes was performed by PCR-RFLP (*NlaIII*). IL-6 polymorphism's genotypes were divided according to functional activity, so the G carriers (CG/GG) is the high-producer IL-6, and CC genotype is the low-producer IL-6. Regarding survival, we verify that patients with genotypes carrying the G allele (CG/GG) had a statistically significant diminished survival when compared with patients with CC genotype (62.79 and 42.31 months, respectively; $P=0.032$). In the promoter region of the IL-6 gene, polymorphic variants were located and may be responsible for alterations in transcription that consequently affect serum levels of the cytokine. With our study, we demonstrated that genetic variant (-174G/G and G/C) can be responsible for changes in prognosis of NSCLC patients.

M. Gomes (✉) · A. Coelho · A. L. Teixeira · R. Catarino ·
R. Medeiros
Molecular Oncology Group-CI, Portuguese Institute of Oncology,
Porto, Portugal
e-mail: monicagomes26@gmail.com

M. Gomes · A. Araújo · A. L. Teixeira · R. Medeiros
ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences,
University of Porto, Porto, Portugal

A. Araújo
Medical Oncology Service of Centro Hospitalar do Porto, Porto,
Portugal

A. Coelho · R. Catarino
Faculty of Medicine of University of Porto, Porto, Portugal

M. Gomes · A. Coelho · R. Medeiros
LPCC, Research Department-Portuguese League Against Cancer
(NRNorte), Porto, Portugal

A. Azevedo
Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology
and Energy (LEPABE), Faculty of Engineering, University of Porto,
Porto, Portugal

Keywords Interleukin-6 · Polymorphism · Non-small cell lung cancer · Survival

Introduction

Lung cancer was found to be the most commonly diagnosed cancer as well as the primary cause of cancer-related mortality for males worldwide and the second leading cause of cancer-related deaths for women [1, 2]. For the year 2012, it was estimated that lung cancer would account for 26 % of all female cancer deaths and 29 % of all male cancer deaths [2].

Lung cancer can be divided into two major groups: small-cell lung cancer (SCLC) and non-small cell cancer (NSCLC) [3]. NSCLC accounts for approximately 85 % of all cases of lung cancer [3, 4].

Clinical and epidemiologic studies have suggested a strong association between chronic infection, inflammation, and cancer [5, 6]. Overall, up to 20 % of cancers are linked to chronic infections, 30 % can be attributed to tobacco smoking and inhaled pollutants (such as silica and asbestos), and 35 % to dietary factors (20 % of cancer burden is linked to obesity) [7].

The lung cancer tumor microenvironment is composed of extracellular matrix, tumor cells, fibroblasts, inflammatory cells, vascular and lymphatic endothelial cells, growth factors, cytokines, chemokines, hormones, and proteases, among others [8].

Cytokines are fundamental for several biological processes associated with malignant tumors. These molecules are produced by normal cells or by tumor cells and may act as paracrine and as autocrine tumor cell growth factors [9, 10].

The IL-6 is a multifunctional cytokine secreted by lymphoid and nonlymphoid cells [9, 11], and it has emerged in literature as one of the most important regulators of the cytokine-related tumor biology [12], involved in key steps of tumor development, such as proliferation, apoptosis, angiogenesis, and differentiation [9, 13–19].

Furthermore, IL-6 is a potent pleiotropic inflammatory cytokine that is considered a key growth-promoting and antiapoptotic factor [6, 12, 18–20]. The IL-6 is of particular interest because it is expressed in malignant epithelial cells, and it was associated with a poor prognosis in lung cancer patients [12, 21–23].

The *IL-6* gene is located at chromosome 7p21 [15], and several studies indicated the presence of a single nucleotide polymorphism (SNP) at the promoter -174 region of the gene [15, 16, 24, 25]. This functional polymorphism (with a G-to-C substitution at position -174 (rs1800795)) [15, 16] is related to the *IL-6* gene transcription rate, with consequences in the control of the circulating IL-6 levels [15, 24–26]. As a result of this polymorphism, two phenotypes may be identified: firstly, a high-producer phenotype (in the -174G/G and -174G/C genotypes' carriers) characterized by higher circulating IL-6 levels; and secondly, a low-producer phenotype (in -174C/C genotype carriers) [25]. Genetic population's studies have shown that ethnic differences are observed in the frequency of the -174G allele, indicating the occurrence of higher frequencies in non-Caucasian in comparison to Caucasian populations [26–28]. To the best of our knowledge, this is the first study reporting the influence of -174G/C polymorphism in *IL-6* gene in the outcome of lung cancer patients.

Material and methods

Ethics statement

The study was conducted according to the principles of the Helsinki Declaration. The study was approved by the local ethics committee at the Portuguese Institute of Oncology of Porto (Portugal). All individuals signed a written informed consent prior to the inclusion in the study.

Study population

The study included 434 Caucasian patients from the north region of Portugal, with histopathological diagnosis of NSCLC, recruited in the Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal (IPO-Porto) between 1999 and 2012, with a mean age of 64.0 years±10.25 years. The inclusion criteria for the group of patients were histological or cytological confirmed diagnosis of NSCLC, no previous treatment, an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status ≤ 2 (with 0 indicating that the patient is fully active, 1 that the patient is ambulatory but restricted in strenuous activity, and 2 that the patient is ambulatory and capable of self-care but is unable to work [29]), no prior oncologic disease, and available clinical data. Within this group, we excluded patients that have no NSCLC histologic type, and patients who did not accept to participate in the study. In relation to smoking status, we define a smoker as any patient that smokes regularly at the moment of diagnosis [30].

IL-6 -174G/C genotyping

Blood samples were obtained with a standard technique using EDTA-containing tubes. DNA was extracted from the white blood cell fraction of each study subject by a commercial "QIAmp® DNA Blood Mini Kit". The *IL-6* -174G/C polymorphism was analyzed through polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP), as described previously [31]. The PCR products with 164 bp were then digested for 4 h at 37 °C with 5 units of *NlaIII* (New England, Biolabs). The restriction fragments were then analyzed in a 3 % agarose gel stained with ethidium bromide. The two fragments at 111 and 52 correspond to the homozygous genotype (C/C), and the other homozygous genotype (G/G) is represented by one fragments at 164 bp. In addition, three fragments at 111, 52, and 164pb represent the heterozygous genotype (G/C). Quality control procedures implemented for genotyping included double sampling in about 10 % of the samples to assess reliability and the use of negative controls to step-away false-positives.

Statistical analysis

Analysis of data was performed using the computer software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows (version 19.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Differences in proportions were evaluated by the χ^2 test or Fisher's exact test. A 5 % level of significance was used in the analysis. The endpoint of this study was overall survival (OS). The probability of survival was calculated, and the median and life-table was computed using the product-limit estimate of Kaplan-Meier. The curves were examined by the log-rank test, a statistical test for equality of survival distributions. Survival duration was defined as the time between diagnosis and either death or the time to the last clinical evaluation of the patient. Cause of death was determined from the patient's records, death certificate, or by speaking with her general practitioner.

Multivariate Cox proportion analysis was performed to determine the influence of age, gender, tumor stage, histological type, smoking status, and *IL-6* genotypes on OS in NSCLC patients. Hazard ratios (HRs) estimated from the Cox analysis were reported as relative risks with corresponding 95 % confidence intervals (CIs).

Results

Blood samples were collected from 434 NSCLC patients at the time of diagnosis, before treatment, and included 165 epidermoid carcinomas, 207 adenocarcinomas, 40 undifferentiated NSCLC, 14 large cells, and 5 mixed carcinomas, of which 78.11 % were male and 23.43 % were female and 72.12 % were smokers or ex-smokers and 26.17 % were non-smokers (Table 1). The frequencies of GG, GC, and CC genotypes were 37.6, 54.9, and 7.5 %, respectively.

IL-6 polymorphism's genotypes were divided according to its functional activity, in two groups as follows: high producers (G carrier genotypes), with high *IL-6* expression, and low-producer genotype (CC), corresponding to low *IL-6* expression. We found the frequency of G carrier genotype to be 92.5 %.

There were no statistically significant differences between the groups of patients with the different genotypes (CC and G carriers) regarding the age at diagnosis ($P=0.367$), histological type ($P=0.470$), gender ($P=0.761$), smoking status ($P=0.196$), and tumor stage ($P=0.238$).

We used Kaplan-Meier methodology to analyze overall survival rates (Fig. 1). The mean survival rates of NSCLC patients were statistically different according to *IL-6 -174G C* polymorphism. Attending to the split, patients with genotypes carrying the G allele (GG/GC) had a statistically significant diminished survival when compared with patients

Table 1 NSCLC patients' histopathological characteristics, according to the patients' characteristics

	Cases (n=434)	
	n	Percent
Gender		
Male	339	78.11
Female	93	21.43
No information	2	0.46
Total	434	100.0
Age		
Mean±SD	63.00±10.25	
Histology		
Epidermoid	165	38.02
Adenocarcinoma	207	47.70
NSCLC NOS	40	9.22
Large cells	14	3.22
Mixed	5	1.15
No information	3	0.69
Total	434	100.0
Tumor stage		
I	46	10.60
II	31	7.14
III	192	44.24
IV	162	37.33
No information	3	0.69
Total		100.0
Smoking		
Smokers and ex-smokers	313	72.12
Non-smokers	114	26.27
No information	7	1.61
Total	434	100.0

with the CC genotype (62.79 versus 42.31 months, respectively; $P=0.032$).

To determine the independent prognostic value of *IL-6 -174G C* polymorphism for OS, a multivariate analysis using a Cox proportional hazard model was performed. In the multivariate analysis that included gender, age, tumor stage, histological type, smoking status, and *IL-6 -174G C* polymorphism, we identified tumor stage ($P<0.001$), smoking status ($P=0.013$), and *IL-6 -174G C* polymorphism ($P=0.022$) as independent prognostic factors for OS in NSCLC patients (Table 2).

Discussion

Recent findings described that inflammatory mediators contribute to the pathogenesis of many human cancers, including

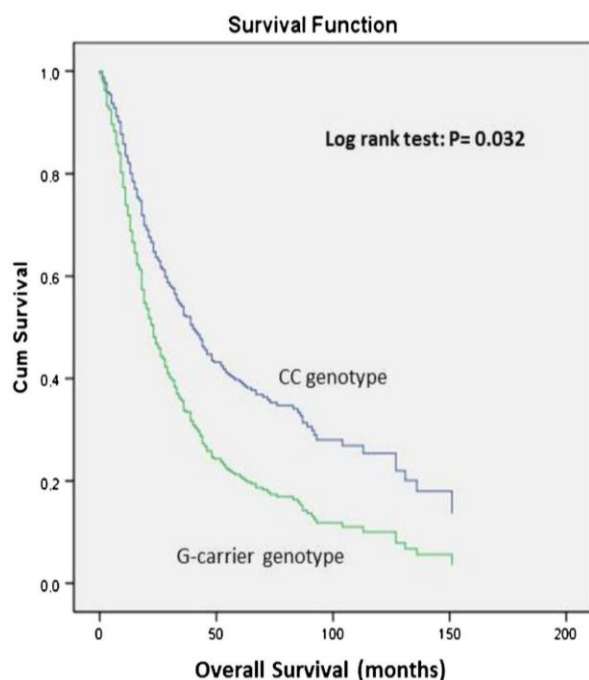


Fig. 1 Kaplan-Meier survival curve and log-rank test, according to the IL-6 genotype

lung cancer [5, 21, 32]. In literature, we find that the IL6 -174G/C polymorphism was not significantly associated with cancer risk, namely lung cancer risk [19, 33, 34]. With this reason in our study, we analyze the influence of -174G/C polymorphism in the IL-6 gene in the outcome of lung cancer patients.

IL-6 is a cytokine which has a great influence in cancer cells, involved in many processes, such as malignant differentiation of cancer cells, tumor growth, and microenvironment immunomodulation [18]. These abilities result in enhanced neo-angiogenesis, inhibition of cancer apoptosis, and acquired cell resistance [35].

IL-6 is directly involved in the stimulation of tumor growth, by activation of several signaling pathways [10]. By activating Ras/Raf/MEK/ERK1/2, IL-6 stimulates tumor cell proliferation [36–38]. On the other hand, by activating STAT3, it promotes the upregulated expression of cyclins D1, D2, B1, and MYC, as well as downregulates the

Table 2 Multivariate Cox regression analysis for predictable factors of overall survival

	HR	95 % CI	P
IL-6 -174 G/C	1.682	1.077–2.628	0.022
Gender	0.964	0.668–1.391	0.844
Age (≥ 63 ; <63)	0.982	0.788–1.224	0.871
Smoking status	1.423	1.001–2.024	0.049
Histological type	0.933	0.810–1.074	0.336
Tumor stage	2.470	1.969–3.099	<0.001

expression of cdk inhibitor p21^{Cip1}, thereby promoting the entry into the cell cycle [39–42].

The overexpression of IL-6 in specific organs, such as the lung, brain, or liver, will attract circulating tumor cell, to these organs and promote their establishment into metastatic tumors [10, 17]. However, in recent years, it has also been demonstrated that the production of IL-6, but also other cytokines such as IL-8, in primary tumor promotes the recruitment of circulating tumor cells back into their primary tumor, creating a process called “tumor self-seeding” that accelerates tumor growth, angiogenesis, and stromal cell recruitment [43]. Many studies indicate that high serum IL-6 levels have been associated with poorer clinical outcome in cancer, namely breast cancer, prostate cancer, pancreatic cancer, ovarian cancer, and lung cancer [19, 42, 44–48]. Crohns and co-workers demonstrated that IL-6 and other cytokines might have a prognostic role in survival of patients with lung cancer [9, 49]. As well, Enewold and co-workers suggest that high serum concentrations of IL-6, IL-10, and IL-12 in African Americans and IL-6 and TNF- α in Caucasians are associated with lung cancer prognosis [50]. Chang and co-workers demonstrated that patients with high circulating IL-6 also responded poorly to chemotherapy. Therefore, a high level of circulating IL-6 was associated with an inferior response and survival outcome in NSCLC patients treated with chemotherapy [51].

Polymorphic variants located in the promoter region of the IL-6 gene may be responsible for alterations in transcription that consequently affect serum levels of the cytokine [52]. The -174G/C polymorphism in *IL-6* translates into the substitution of cytosine for guanine, and it has been described that the presence of the G allele was associated with poor outcome in a variety of diseases, such as cancer [52]. Therefore, our purpose was to study the possible role of -174G/C polymorphism in the outcome of lung cancer patients.

Our results suggest that NSCLC patients with G carrier genotypes (GG/CG) show a diminished OS (20 months less), when compared with CC genotype carriers ($P=0.032$). Using multivariate Cox proportion analysis, we verify that the genetic variant still plays a very important role in the survival of NSCLC patients (HR=1.680; 95 % CI=1.075–2.624; $P=0.023$).

Several studies have found a link between IL-6 levels and lung cancer outcome, but to the best of our knowledge, to date, this is the first study to demonstrate that genetic polymorphism in the IL-6 promoter region (-174G/C) is correlated with overall survival in NSCLC patients.

Although many factors can influence production of cytokines, namely IL-6 and its subsequent serum levels, with our study, we demonstrate that the genetic variant can be responsible for clinical outcome, since patients with G carrier genotypes show a diminished overall survival, when compared with patients with CC genotype, even when using a multivariate analysis to exclude possible confounding variables.

Another explanation for this result, is interleukin-6 is also known to regulate CYP enzyme expression, and CYP1B1 is known to be overexpressed in a number of tumor types including lung, colon, and breast including CYP1A1 and 1B1 and can activate pro-carcinogens such as heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons. Patel and co-workers demonstrated an epigenetic mechanism by which IL6 represses miR27b expression involving DNA methylation resulting in CYP1B1 upregulation. IL6 can induce phenotypic changes in colon tumor cells, possibly rendering them drug resistant, or encouraging the in situ metabolism of carcinogens, thus resulting in DNA damage and potentially tumor promotion [53].

With our study, we demonstrated that *IL-6 -174G C* polymorphism can be responsible for changes in the prognosis of NSCLC patients, but further investigation is needed to verify the results. Also, more investigations should be performed for elucidation of underlying pathogenic mechanisms and determination of protective measures for specific individuals.

Acknowledgments We thank the Liga Portuguesa Contra o Cancro-Centro Regional do Norte (Portuguese League Against Cancer) for their support.

Conflicts of interest None

References

- Jemal A et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69–90.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(1):10–29.
- Molina JR et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(5):584–94.
- Araujo A et al. Genetic polymorphisms of the epidermal growth factor and related receptor in non-small cell lung cancer—a review of the literature. *Oncologist.* 2007;12(2):201–10.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860–7.
- Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1175–83.
- Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res.* 2009;15(2):425–30.
- Brandao GD, Brega EF, Spatz A. The role of molecular pathology in non-small-cell lung carcinoma—now and in the future. *Curr Oncol.* 2012;19 Suppl 1:S24–32.
- Crohns M et al. Cytokines in bronchoalveolar lavage fluid and serum of lung cancer patients during radiotherapy—association of interleukin-8 and VEGF with survival. *Cytokine.* 2010;50(1):30–6.
- Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer.* 2010;46(7):1223–31.
- Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S233–42.
- Lukaszewicz M, Mroczko B, Szmikowski M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. *Pol Arch Med Wewn.* 2007;117(5-6):247–51.
- Giri D, Ozen M, Ittmann M. Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer. *Am J Pathol.* 2001;159(6):2159–65.
- Culig Z et al. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem.* 2005;95(3):497–505.
- Giannitrapani L et al. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2013;19(16):2449–55.
- Hefler LA et al. An interleukin-6 gene promoter polymorphism influences the biological phenotype of ovarian cancer. *Cancer Res.* 2003;63(12):3066–8.
- Zhang X et al. IL-6 regulates MMP-10 expression via JAK2/STAT3 signaling pathway in a human lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer Res.* 2009;29(11):4497–501.
- Zarogoulidis P et al. Interleukin-6 cytokine: a multifunctional glycoprotein for cancer. *Immunol Res.* 2013;9(62):16535.
- Liu RY et al. Association between IL6-174G/C and cancer: a meta-analysis of 105,482 individuals. *Exp Ther Med.* 2012;3(4):655–64.
- Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(4-5):357–68.
- Pine SR et al. Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(14):1112–22.
- Azevedo A et al. IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development. *World J Clin Oncol.* 2011;2(12):384–96.
- De Vita F et al. Serum concentrations of proinflammatory cytokines in advanced non small cell lung cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 1998;17(4):413–7.
- Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur J Immunogenet.* 1998;25(2-3):267.
- Fishman D et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1369–76.
- Mandal S, Abebe F, Chaudhary J. 174G/C polymorphism in the interleukin-6 promoter is differently associated with prostate cancer incidence depending on race. *Genet Mol Res.* 2014;13(1):139–51.
- Cox ED et al. Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. *Transplantation.* 2001;72(4):720–6.
- Meenagh A et al. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Hum Immunol.* 2002;63(11):1055–61.
- Oken MM et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5(6):649–55.
- Husten CG. How should we define light or intermittent smoking? Does it matter? *Nicotine Tob Res.* 2009;11(2):111–21.
- Kristiansen OP et al. Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Hum Mol Genet.* 2003;12(10):1101–10.
- Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer.* 2007;121(11):2373–80.
- Yang M, Li C, Li M. Association of interleukin-6 (-174G/C) polymorphism with the prostate cancer risk: a meta-analysis. *Biomed Rep.* 2014;2(5):637–43.
- Zhou B et al. C-reactive protein, interleukin 6 and lung cancer risk: a meta-analysis. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e43075.
- Wojcik E et al. IL-6 and VEGF in small cell lung cancer patients. *Anticancer Res.* 2010;30(5):1773–8.
- Ara T et al. Interleukin-6 in the bone marrow microenvironment promotes the growth and survival of neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 2009;69(1):329–37.
- Ogata A et al. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol.* 1997;159(5):2212–21.

38. Smith PC et al. Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(1):33–40.
39. Bollrath J et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2009;15(2):91–102.
40. Niu G et al. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene.* 2002;21(46):7001–10.
41. Quintanilla-Martinez L et al. Analysis of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat 3) pathway in multiple myeloma: Stat 3 activation and cyclin D1 dysregulation are mutually exclusive events. *Am J Pathol.* 2003;162(5):1449–61.
42. Gao SP et al. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3846–56.
43. Kim MY et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell.* 2009;139(7):1315–26.
44. Song XY et al. Research on the relationship between serum levels of inflammatory cytokines and non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(8):4765–8.
45. Markkula A et al. IL6 genotype, tumour ER-status, and treatment predicted disease-free survival in a prospective breast cancer cohort. *BMC Cancer.* 2014;14:759.
46. Tan D et al. Interleukin-6 polymorphism is associated with more aggressive prostate cancer. *J Urol.* 2005;174(2):753–6.
47. Talar-Wojnarowska R et al. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) gene polymorphism and IL-6 serum level in pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 2009;54(3):683–9.
48. Garg R et al. Common polymorphism in interleukin 6 influences survival of women with ovarian and peritoneal carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2006;103(3):793–6.
49. Wang YS et al. Serum cytokine levels in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with clinical outcome of erlotinib treatment. *Chin Med J (Engl).* 2013;126(20):3931–5.
50. Enewold L et al. Serum concentrations of cytokines and lung cancer survival in African Americans and Caucasians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(1):215–22.
51. Chang CH et al. Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Int J Cancer.* 2013;132(9):1977–85.
52. DeMichele A et al. Interleukin-6–174G->C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer. *Cancer Res.* 2003;63(22):8051–6.
53. Patel SA et al. Interleukin-6 mediated upregulation of CYP1B1 and CYP2E1 in colorectal cancer involves DNA methylation, miR27b and STAT3. *Br J Cancer.* 2014;111(12):2287–96.

