



Mestrado em Investigação Biomédica

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Relação entre síndrome metabólica e cancro
colo-rectal - Avaliação do papel de
mediadores inflamatórios e adipocitocinas

Orientador: Raquel Maria FinoSeiça

Co-Orientador: Ana Bela Sarmiento Ribeiro

Daniela Inês dos Santos Silva

Coimbra

Setembro de 2011

Agradecimentos

A vida está repleta de pequenas conquistas e aqui esta é mais uma das minhas.

Este trabalho é inteiramente dedicado ao meu “paidrinho” Diamantino ou Tino, para os mais chegados, sei que não está cá para partilhar este momento comigo, contudo deve estar feliz por mim. Sem ele nunca teria conseguido, muito obrigado.

Ivo, obrigado por toda a paciência e compreensão, pela força e palavras de animo que me deste sempre que desanimei, por me ouvires (o que às vezes não é fácil) e por tudo o resto.

Aos meus pais, aos meus irmãos, à minha madrinha e ao meu primo Miguel agradeço o apoio que sempre me deram e por estarem sempre ao meu lado em tudo.

À Luísa, ao Quim, à Eva, ao Chico e à Teresa pela paciência que sempre tiveram para me ouvirem, pelo apoio que sempre me deram e pelos momentos descontraídos.

Agradeço à Professora Raquel por todo o carinho e amizade e principalmente, pela forma como me orientou e ajudou neste trabalho. Agradeço ao Paulo Matafome por todo o empenho e dedicação, por todas as preciosas indicações e orientações. Também não posso deixar de agradecer toda a amizade e companheirismo durante os longos dias de trabalho. Quero agradecer à Joana Crsisóstomo por todo o apoio e ajuda no decorrer deste trabalho, pela amizade e por todos os sábios concelhos. Agradeço ao Tiago Rodrigues pela amizade, companheirismo e por toda a ajuda. À Ana Pereira, à Daniela Carvalho e à Teresa Louro pela amizade e por todos os momentos descontraídos que tivemos. À professora Cristina Sena e ao Sr. Simões pela simpatia e pelo carinho.

Agradeço à Dra. Maria Amélia Fonseca Pereira e ao Hospital Distrital da Figueira da Foz, EPE, pela preciosa colaboração imprescindível na realização deste projecto.

À Sílvia Neves pela preciosa ajuda, ensinamentos e amizade. À Ana Cristina Gonçalves, à Ana Raquel, à Raquel e à Ana Margarida pela ajuda, paciência e amizade.

À Ana Margarida Soares e a Maria João Leitão, companheiras de mestrado, por todo o apoio, amizade e carinho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço o apoio, simpatia e orientação da Professora Ana Bela Sarmiento.

Índice

Índice	VII
Lista de tabelas	VIII
Lista de figuras	IX
Lista de Abreviaturas	IX
Resumo	XIV
Abstract	XV
INTRODUÇÃO	VIII
Insulino-resistência e IGF-1	5
Adiponectina	6
Leptina	9
Resistina	11
Visfatina	13
Inflamação e Angiogênese	15
Hipoxia e HIF-1	16
TNF-α	19
Os macrófagos: amigo e inimigo da progressão tumoral	20
Objectivos	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
2. Material e Métodos	27
2.1. Material e Reagentes.....	27
2.1.1. Reagentes químicos e imunológicos para o armazenamento e análise das amostras de sangue.....	27
2.1.2. Outros Materiais	28
2.1.3. Materiais, equipamentos e reagentes para a cultura de células	28
2.2. Métodos	31
2.2.1. Amostra Humana	31
2.2.2. Cultura de células	32
2.3. Análise estatística	39
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÕES	57
LISTA DE REFERÊNCIAS	61

Lista de tabelas

Tabela I: Condições de incubação das células WIDR com visfatina e resistina em monoterapia.

Tabela II. Distribuição e caracterização de doentes e controlos segundo a idade e o IMC

Lista de figuras

Figura 1. Tecido adiposo visceral de um indivíduo normal e de um indivíduo com excesso de peso.

Figura 2. Papel do MCP-1 no tecido adiposo disfuncional.

Figura 3. Caracterização dos macrófagos M1 e M2.

Figura 4. Reacção de redução da resazurina.

Figura 5. Níveis séricos de adiponectina nos diferentes grupos.

Figura 6. Níveis séricos de leptina.

Figura 7. Níveis séricos de TNF- α (A) e de MCP-1 (B), nos diferentes grupos.

Figura 8. Níveis séricos de resistina (A) e de visfatina (B) nos diferentes grupos.

Figura 9. Efeito da visfatina e da resistina na viabilidade das células WIDR.

Lista de Abreviaturas

AB – Alamar Blue

Abs – Absorvância

Adipo R – Receptor da Adiponectina

AKT/PKB – Proteína Cinase B

AMPK – Cinase Activada por AMP

ATP – Adenosina Tri-fosfato

CCL22- *C-C motif chemokine 22*

CXCL12/SDF1 – *Chemokine Stromal-derived Factor-1*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

epm – Erro Padrão da Média

ERK – *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

FBS – Soro Fetal de Bovino

FFA – *Free Fatty Acids*

FGF – *Fibroblast Growth Factor*

FIZZ – *found in inflammatory zone*

g – Grama

GSK3 – *Glycogen Synthase Kinase-3*

GH – Hormona do crescimento

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HIF-1 – Factor de transcrição induzido pela hipoxia

ICAM-1 – *Intercellular Adhesion Molecule-1*

IGF-1 – *Insulin-like Growth Factor*

IGFBP – Proteínas de transporte do IGF

I κ B – Inibidor do NF- κ B

IL-6 – *Interleukin 6*

IL-8 – *Interleukin 8*

IL-10 – *Interleukin 10*

IL-1R- Receptor da IL-1

IMC – Índice de Massa Corporal

IRS-1/2 – *Insulin Receptor Substrate Proteins*

IP – Proteína induzível do interferon;

JAK2 – *Janus Kinase 2*

JNK – *Jun N-terminal Kinase*

Kg – Quilograma

L – Litro

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LRI – Forma longa do receptor da Leptina

MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein 1*

M-CSF-1 – *Monocyte colony-stimulating factor-1*

mg – Miligrama

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

MMPs – Metaloproteinases da Matriz

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mmol – Milimole

MAPK – Proteínas cinase activadoras da mitogénese

NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (reduced form)*

NF-κB – Factor transcrição nuclear κB

Nmol – Nanomole

NO – Óxido nítrico

OB-R – Receptor da leptina

PAI-1 – *Plasminogen Activator Inhibitor*

PBS - Tampão Fosfato

PDGF – *Platelet-derived growth factor*

PCR – Proteína C reactiva

pg – Picograma

PBEF – *Pre-B enhancing factor*

PI3K – Fofotidil-inositol-3-cinase

PKC – Proteína Cinase C

PLC – Fosfolipase C

PPAR – *Peroxisome Proliferation-Activated Receptor*

RAC – *Related to A and C protein Kinases*

RELM – *Resistin Like Molecule*

ROS – Espécies Reactivas de Oxigénio

rpm – Rotações por minuto

SHBG – *Sex Hormone-binding Globulin*

SHP2 – *SH2 Domain-containing Protein Tyrosine Phosphatase*

SOCS – Supressor da sinalização das citocinas

TGF- β – Factor de crescimento transformante - β

TG – Triglicerídeos

TMB – Taxa de metabolismo basal

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor- α*

TNFR – Receptor do TNF

U – Unidades

VCAM-1 – *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

VEGF – Factor de crescimento do endotélio vascular

VEGFR – Receptor Factor de crescimento endotélio vascular

μ g – Microgramas

% – Percentagem

Resumo

A incidência de síndrome metabólica e obesidade tem vindo a aumentar, afectando já milhões de pessoas em todo o mundo e começando a tomar proporções epidémicas. Diversos estudos têm demonstrado uma relação entre a obesidade e a síndrome metabólica com diversos tipos de cancro, nomeadamente o cancro colo-rectal. Contudo, os mecanismos envolvidos nesta associação não se encontram completamente esclarecidos, apesar da adiposidade visceral ter vindo a ser apontada como um importante factor de risco. Com este estudo pretendeu-se estabelecer, em condições de excesso de peso ou obesidade, uma relação entre os parâmetros de disfunção do tecido adiposo e cancro colo-rectal e, desta forma, contribuir para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos associados.

Verificámos que os doentes com cancro colo-rectal e excesso de peso apresentaram níveis aumentados de algumas citocinas e adipocitocinas, nomeadamente a resistina, a visfatina e o MCP-1 e diminuição dos níveis de adiponectina. As experiências *in vitro*, utilizando células de cancro do cólon, mostraram que a resistina e a visfatina aumentam a viabilidade celular.

Em conclusão, a incidência de cancro colo-rectal em indivíduos com excesso de peso está associada à desregulação funcional do tecido adiposo, podendo esta contribuir, através da alteração da secreção de algumas adipocitocinas, para a progressão tumoral.

Palavras-Chave: Cancro colo-rectal; tecido adiposo; adipocitocinas; citocinas.

Abstract

The incidence of metabolic syndrome and obesity has been to increase, now affecting millions of people around the world and beginning to take epidemic proportions. Several studies have shown a relationship between obesity and metabolic syndrome with various cancer types, including colorectal. However, the mechanisms underlying this association are not completely understood despite the visceral adiposity was identified as an important risk factor. This study aimed to establish under conditions of excess weight or obesity, a relationship between the metabolic syndrome, namely adipose tissue dysfunction, and colorectal cancer and thus contribute to the understanding of pathophysiological mechanisms involved. We found that patients with colorectal cancer and excess weight have increased levels of some cytokines and adipocytokines, such as resistin, visfatin and MCP-1 and decreased levels of adiponectin. *In vitro* experiments using cells of colon cancer showed that resistin and visfatin increase cell viability.

In summary, the incidence of colorectal cancer in obese or overweight individuals is associated with dysregulation function of adipose tissue physiology which may contribute to tumor progression through altered adipocytokine secretion.

Keywords: Colorectal cancer; adipose tissue; adipocytokines; cytokines

INTRODUÇÃO

Introdução

A obesidade é uma doença crónica que afecta milhões de adultos e crianças em todo o mundo (Gnacinska *et al.*, 2009). A Organização Mundial de Saúde define obesidade como uma acumulação excessiva ou anormal de gordura, sendo que, para fins epidemiológicos, classifica como excesso de peso um índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 25kg/m^2 e como obesidade um IMC igual ou maior que 30kg/m^2 (Donohoe *et al.*, 2010). No entanto, o IMC não distingue a massa magra do tecido adiposo e não reflecte os distúrbios metabólicos deste, existindo outros métodos mais eficazes para avaliar estas alterações do tecido adiposo (Donohoe *et al.*, 2010).

A síndrome metabólica é definida por um conjunto de características associadas à obesidade central e que incluem a hipertensão, a insulino-resistência, a desregulação do metabolismo da glicose, a hiperinsulinemia e a hipertrigliceridemia, estando também associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (Gnacinska *et al.*, 2009; Healy *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010).

O tecido adiposo é composto por vários tipos de células, entre as quais adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (Gnacinska *et al.*, 2009; van Kruijsdijk *et al.*, 2009). É considerado um órgão metabolicamente activo que produz inúmeras proteínas como adipocitocinas, citocinas e factores de crescimento, cujo perfil de expressão e secreção poderá estar alterado na obesidade (Gnacinska *et al.*, 2009; Donohoe *et al.*, 2010; Yamaji *et al.*, 2010). Quando o tecido adiposo, particularmente o visceral, se expande, os adipócitos hipertrofiam e aumenta a produção de factores de quimioatração, como o *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1), que atraem monócitos para o interior do tecido, iniciando-se um estado inflamatório local (Figura 1) (van Kruijsdijk *et al.*, 2009). Além disso, surgem zonas hipóxicas no tecido, uma vez

que os vasos sanguíneos não conseguem irrigar adequadamente os adipócitos (van Kruijsdijk *et al.*, 2009). Um dos mecanismos subjacentes à inflamação do tecido adiposo envolve, aparentemente, a hipóxia e a regulação do factor de transcrição induzido pela hipoxia (HIF)-1, um importante regulador da homeostase do oxigénio (van Kruijsdijk *et al.*, 2009). Estas alterações do tecido adiposo têm como consequência o aumento da produção de adipocitocinas e citocinas pró-inflamatórias clássicas, bem como a diminuição da secreção da adiponectina (Figura 1) (van Kruijsdijk *et al.*, 2009). Para além da desregulação da expressão e secreção de adipocitocinas e citocinas, a activação das vias inflamatórias, quer pela acumulação excessiva de metabolitos lipídicos e excessiva formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) envolvidas no *stress* oxidativo, quer pelo desenvolvimento de um estado de hipoxia regional crónica, culmina no estabelecimento de um estado de insulino-resistência. Este, não só é um dos determinantes de alterações do metabolismo da glicose, como também está associado a uma maior prevalência de diversos tipos de cancro (Guilherme *et al.*, 2008).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que a inflamação crónica predispõe para diferentes tipos de cancro e que o uso de anti-inflamatórios não esteróides poderá ter um papel na protecção anti-tumoral (Mantovani *et al.*, 2007). Alguns estudos têm associado o aumento do IMC ao aumento da incidência de cancro do endométrio, colo-rectal e da mama (van Kruijsdijk *et al.*, 2009).

Nas páginas seguintes abordaremos alguns dos factores que parecem estar envolvidos no desenvolvimento do cancro na obesidade.

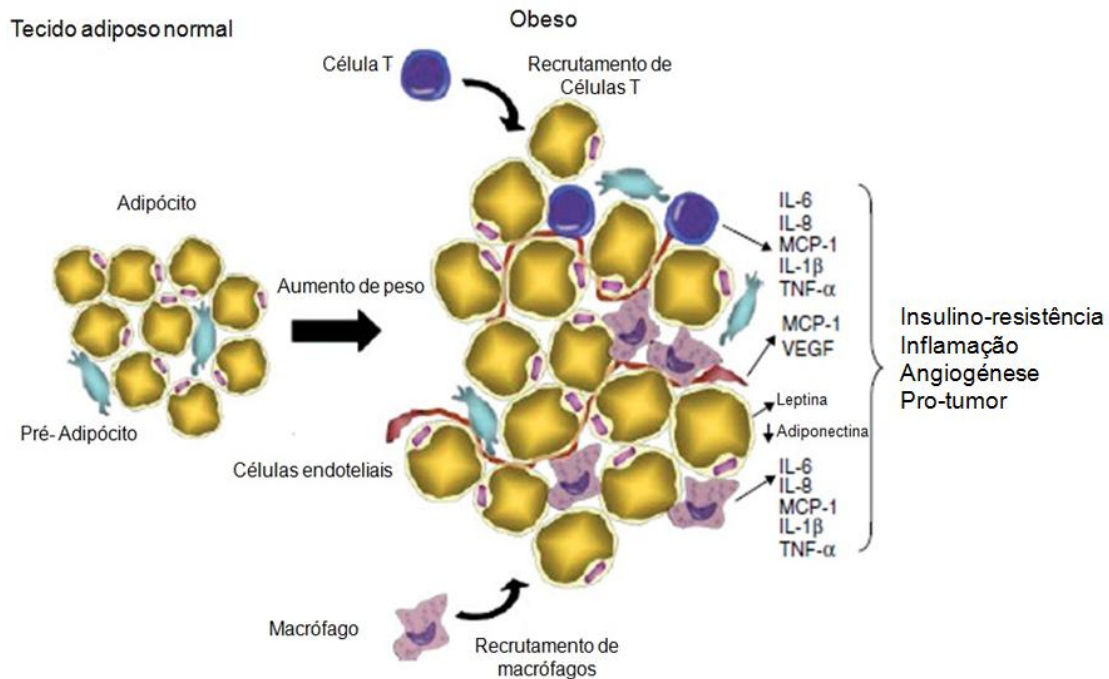


Figura 1. Tecido adiposo visceral de um indivíduo normal e de um indivíduo com excesso de peso. Com o excesso de peso o tecido adiposo torna-se disfuncional uma vez que existe a hipertrofia dos adipócitos e infiltração de macrófagos. Surge, então, a desregulação da produção de proteínas envolvidas na inflamação, insulino-resistência, angiogênese e proliferação celular.

IL- Interleucina; MCP-1- *Monocyte Chemoattractant Protein 1*; TNF- *Tumor Necrosis Factor-α*; VEGF- *Factor de crescimento do endotélio vascular*.

(Adaptado de Donohoe *et al.*, 2010)

Insulino-resistência e IGF-1

A obesidade está frequentemente associada a um estado de insulino-resistência, levando a que os níveis séricos de insulina aumentem, de forma a evitar a hiperglicemia. A hormona do crescimento (GH) é o principal estímulo para a produção de *Insulin-like Growth Factor* (IGF-1), maioritariamente no fígado. Por outro lado, a insulina parece estimular essa produção, aumentando a expressão do receptor da GH naquele órgão. A hiperinsulinemia conduz, ainda, ao aumento da biodisponibilidade de IGF-1, ao diminuir a secreção hepática das proteínas de transporte do IGF (IGFBP) -1 e -2

contribuindo, assim, para aumentar a concentração de IGF-1 livre (Calle & Thun, 2004; Cowey and Hardy, 2006; Pais *et al.*, 2009; van Kruijsdijk *et al.*, 2009).

Acredita-se que, tanto a insulina, como o IGF-1 estão envolvidos no desenvolvimento do cancro através da ligação do IGF-1 ao seu receptor (IGF-1R). O IGF-1 pode inibir a apoptose e estimular a proliferação celular através de várias vias de sinalização, incluindo a via da fofotidil-inositol-3-cinase/ proteína Cinase B (PI3-K/AKT) e RAS/RAF/MAPK (Cowey and Hardy, 2006; van Kruijsdijk *et al.*, 2009). Curiosamente, a expressão do receptor do IGF-1 encontra-se aumentada em alguns tumores, o que sugere que estas neoplasias podem ser estimuladas pelos níveis sistémicos de IGF-1 (Cowey and Hardy, 2006; van Kruijsdijk *et al.*, 2009).

Este ambiente mitogénico e anti-apoptótico causado pelo aumento dos níveis de insulina e IGF-1 acelera a acumulação de mutações genéticas, o que favorece a carcinogénese. Estudos clínicos mostram que doentes com níveis aumentados de IGF-1 apresentam um risco acrescido de alguns tipos de cancro, incluindo o cancro colo-rectal e da próstata e o cancro da mama em mulheres após a menopausa (van Kruijsdijk *et al.*, 2009; Donohoe *et al.*, 2010).

Adiponectina

O gene da adiponectina está localizado no braço longo do cromossoma 3 (3q27), um locus de susceptibilidade para diabetes e doenças cardiovasculares (Wozniak *et al.*, 2009), e codifica uma adipocitocina específica e abundantemente expressa no tecido adiposo, nomeadamente nos adipócitos maduros e durante o processo de diferenciação do adipócito (Koerner *et al.*, 2005; Antuna-Puente *et al.*, 2008; Donohoe, *et al.*, 2010; Yamaji *et al.*, 2010).

Estruturalmente, a adiponectina tem homologia com o colagénio, com o factor C1q do complemento e com o *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α). Apresenta uma região hipervariável, seguida de uma sequência de sinal, um domínio de ligação ao colagénio (importante para a construção da estrutura secundária e terciária) e um domínio carboxílico terminal que é responsável por mediar os seus efeitos biológicos. Sendo uma proteína monomérica de 30 kDa (247 aminoácidos), forma trímeros que se associam através de pontes dissulfito constituindo um complexo polimérico de maiores dimensões que inclui hexâmeros de baixo peso molecular (LMW), de aproximadamente 180 kDa, e de alto peso molecular (HMW), de 400 a 600 kDa (Koerner *et al.*, 2005; Antuna-Puente *et al.*, 2008; Yamaji *et al.*, 2010).

Os principais receptores da adiponectina são o AdipoR1 e o AdipoR2, com 7 domínios transmembranares (Koerner *et al.*, 2005; Wang, Nakayama, 2010), típicos dos receptores acoplados a proteínas G, mas funcionalmente distintos destes (Maury & Brichard, 2010; Wang, Nakayama, 2010). Estes receptores AdipoR1 e AdipoR2 localizam-se no cromossoma 1q32 e no 12p13, respectivamente. O receptor AdipoR1 é expresso de forma ubíqua, com maior expressão no músculo. Por outro lado, o receptor AdipoR2 é predominantemente expresso no fígado (Koerner *et al.*, 2005; Antuna-Puente *et al.*, 2008). A adiponectina activa vias de transdução de sinal que envolvem a AMPK e o PPAR α , conduzindo à inibição da gliconeogénese e ao aumento da oxidação dos ácidos gordos (Koerner *et al.*, 2005; Maury & Brichard, 2010). Estudos com animais *knockout* ou transgénicos mostram que estes dois receptores são os principais receptores da adiponectina e desempenham um papel importante na regulação do metabolismo dos lípidos e da glicose, na inflamação e no *stress* oxidativo (Antuna-Puente *et al.*, 2008).

Em média, a concentração desta hormona é maior em mulheres do que em homens e os seus níveis plasmáticos variam entre 5 e 30 mg/L em indivíduos normais (Antuna-

Puente *et al.*, 2008). A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina e tem um importante papel como anti-angiogénico e anti-inflamatório (Donohoe *et al.*, 2010), regulando também moléculas de adesão do endotélio vascular e inibindo a formação de células espumosas (Koerner *et al.*, 2005). A hipoadiponectinemia está associada à ocorrência de síndrome metabólica, obesidade, diabetes mellitus, hipertensão, dislipidemia, fígado gordo e isquemia cardíaca (Koerner *et al.*, 2005; Gnacinska *et al.*, 2009). Os níveis circulantes de adiponectina encontram-se inversamente relacionados com o IMC, a gordura visceral e a insulino-resistência. A perda de peso resulta, normalmente, no aumento da concentração sérica de adiponectina, melhorando, em consequência, a sensibilidade à insulina (Koerner *et al.* 2005; Gnacinska *et al.*, 2009).

Alguns autores referem que os doentes com neoplasia da mama apresentam níveis inferiores de adiponectina quando comparado com os controlos (indivíduos sem neoplasia) (Prieto-Hontoria *et al.*, 2010). Estudos *in vitro*, com células de cancro da mama, demonstram que o tratamento com adiponectina suprime o crescimento e a proliferação celulares e promove a apoptose (Prieto-Hontoria *et al.*, 2010). O facto da adiponectina ter um papel anti-angiogénico, estando envolvida na activação da cascata apoptótica das células endoteliais, realça o seu papel anti-tumoral (Prieto-Hontoria *et al.*, 2010). A adiponectina regula também o crescimento e a proliferação das células tumorais, estimulando vias apoptóticas dependentes da p53 e da p21 e inibindo as proteínas cinase activadoras da mitogénese (MAPK) (Prieto-Hontoria *et al.*, 2010). Apesar do papel da adiponectina na etiologia do cancro ainda não estar totalmente esclarecido, é possível que esta adipocitocina constitua, também, uma protecção indirecta contra a carcinogénese, ao afectar a sensibilidade à insulina e a resposta inflamatória (Prieto-Hontoria *et al.*, 2010).

Leptina

O gene *OB* codifica a leptina, um péptido não glicosilado anorexigénico de 16-kDa que contém 167 resíduos de aminoácidos, com estrutura similar à da família das citocinas (Garofalo and Surmacz, 2006; Antuna-Puente *et al.*, 2008; Gnacinska *et al.*, 2009; Donohoe *et al.*, 2010). É produzida quase exclusivamente no tecido adiposo branco (Koerner *et al.*, 2005; Garofalo and Surmacz, 2006; Antuna-Puente *et al.*, 2008; Gnacinska *et al.*, 2009; Donohoe *et al.*, 2010), especificamente aquando da diferenciação dos adipócitos (Antuna-Puente *et al.*, 2008). No entanto, estudos recentes mostram que a leptina também é produzida noutros tecidos como a placenta, os ovários, o músculo-esquelético, o estômago, a glândula pituitária e o fígado (Koerner, *et al.* 2005). O tecido adiposo subcutâneo é responsável por 80% da produção de leptina (Antuna-Puente *et al.*, 2008).

A leptina tem um importante papel no controlo do apetite, do metabolismo e do balanço energético corporal (Koerner *et al.*, 2005; Garofalo and Surmacz, 2006; Antuna-Puente *et al.*, 2008; Gnacinska *et al.*, 2009; van Kruijsdijk *et al.*, 2009; Wozniak *et al.*, 2009; Donohoe *et al.*, 2010).

A hiperleptinemia está associada à obesidade e, apesar de os doentes obesos apresentarem níveis aumentados de leptina, desenvolve-se leptino-resistência, de que resulta uma redução dos efeitos biológicos da hormona (Wozniak *et al.*, 2009).

Existe uma estreita relação entre a hiperleptinemia e o estado de inflamação crónica na obesidade (Antuna-Puente *et al.*, 2008; Wozniak *et al.*, 2009). Embora os mecanismos não sejam ainda totalmente conhecidos, a leptina é capaz de estimular a produção de TNF- α e MCP-1 (Antuna-Puente *et al.*, 2008; Wozniak *et al.*, 2009), levando ao recrutamento de monócitos e à sua activação (macrófagos infiltrados). Por outro lado,

parece que o TNF- α e a interleucina 6 (IL-6) são capazes de estimular a produção de leptina pelos adipócitos, criando um *feedback* positivo. Todas estas alterações resultam ainda, no aumento da proliferação e da migração de células endoteliais (Antuna-Puente *et al*, 2008).

O receptor da leptina (OB-R) é um receptor membranar que pertence aos receptores de citocinas de classe I. No homem existem quatro isoformas deste receptor, do tipo longa, curta e solúvel, as quais diferem entre si no terminal carboxílico (domínio citoplasmático) (Koerner, *et al* 2005). O OB-R1, a isoforma responsável pelos seus efeitos biológicos, é altamente expresso no hipotálamo; no entanto, também foi identificada em muitos órgãos periféricos (Koerner *et al*, 2005; Garofalo and Surmacz, 2006). Apresenta 1165 resíduos de aminoácidos e contém um domínio extracelular, um transmembranar e um domínio intracelular, acoplado à via de sinalização JAK2/STAT3 (Koerner *et al.*, 2005; Garofalo and Surmacz, 2006). Além disso, activa a cascata de sinalização RAS/ERK1/2 e as vias de crescimento e sobrevivência celulares, PI-3K/AKT/GSK-3 (Garofalo and Surmacz, 2006). Foi também descrito que a leptina pode activar a fosfolipase C gama (PLC- γ), a proteína cinase C (PKC), a MAPK p38 e o óxido nítrico (NO) (Garofalo and Surmacz, 2006). Em última análise, a activação do OB-R1 pode activar vários genes envolvidos na proliferação celular, incluindo *c-FOS*, *c-JUN*, *JUMB*, *EGR-1* e *SOCS3*, e a expressão de factores angiogénicos, como o factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Garofalo and Surmacz, 2006).

Estudos *in vitro* em linhas celulares de cancro do esófago e do cólon confirmam que a leptina promove a proliferação celular e a expressão de factores envolvidos na angiogénese, incluindo metaloproteinases da matriz (MMPs) (Donohoe *et al*, 2010). Contudo, apesar de vários autores mostrarem que a leptina induz a proliferação de células tumorais; não está completamente esclarecido se os níveis elevados de leptina

têm implicações fisiopatológicas no cancro, nomeadamente no colo-rectal (van Kruijsdijk *et al*, 2009; Donohoe *et al*, 2010; Fenton & Birmingham, 2010;).

Resistina

A resistina pertence a um conjunto de moléculas que são designadas por RELMs (*Resistin- like molecules*) ou FIZZ (*Found in inflammatory zone*) (Rabe *et al.*, 2008; Stofkova, 2010). É um péptido rico em resíduos de cisteína, que apresenta muitas variações entre espécies (Koerner *et al*, 2005; Wozniak *et al*, 2009; Stofkova, 2010). No Homem, o gene da resistina está localizado no cromossoma 19 e codifica uma proteína com 114 resíduos de aminoácidos, incluindo um péptido de sinal de 17 aminoácidos, uma região variável de 37 aminoácidos e uma região carboxílica terminal conservada (Koerner *et al*, 2005; Adegat, 2007; Filková *et al*, 2009).

A resistina é expressa por adipócitos e monócitos, mas os macrófagos são a sua principal origem, constituindo um marcador da actividade inflamatória destas células (Lazar, 2007; Wang, Nakayama, 2010).

Os níveis séricos de resistina encontram-se elevados em modelos animais de obesidade, geneticamente determinada (ratinhos ob/ob e db/db) ou induzida pela dieta (Koerner *et al*, 2005; Antuna-Puente *et al*, 2008; Stofkova, 2010). Existem evidências consistentes que o aumento da expressão da resistina seja uma das causas da insulino-resistência, através da activação da SOCS-3 (Koerner *et al*, 2005; Antuna-Puente *et al*, 2008). De facto, a administração exógena de resistina em ratinhos normais resultou em intolerância à glicose e hiperglicemia, enquanto a utilização de anticorpos anti-resistina melhorou a insulino-resistência em roedores obesos (Koerner *et al*, 2005). Estudos com adipócitos, *in vitro*, mostram que a resistina diminui o transporte de glicose em resposta

à insulina, enquanto a sua neutralização imunológica produz o efeito contrário (Koerner *et al*, 2005). Em ratinhos *knockout* para o gene da resistina, a administração de dieta gorda não resultou no aumento da glicemia, como observado nos controlos com a mesma dieta, o que sugere que a resistina interfere com a insulino-resistência e com a hiperglicemia associadas à obesidade (Koerner *et al*, 2005; Antuna-Puente *et al*, 2008). Além disso, a resistina inibe a adipogénese e regula o conteúdo em lípidos dos adipócitos, contribuindo para a captação de lípidos e a formação de células espumosas a partir de macrófagos (Koerner *et al*, 2005; Antuna-Puente *et al*, 2008). Em adipócitos 3T3-L, a resistina potenciou a produção de TNF- α , IL-6 e MCP-1, aumentando o estímulo pró-inflamatório (Filková *et al*, 2009; Stofkova, 2010).

Nas células endoteliais vasculares, a resistina estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como as interleucinas 1, 6, 12 e o TNF- α (Rabe *et al*, 2008; Filková *et al*, 2009; Wozniak *et al*, 2009), activando a AKT e as MAPKs, como a ERK e a p38, bem como a produção de *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1), *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM)-1 e MCP-1, de forma dependente do factor de transcrição nuclear NF-kB (Filková *et al*, 2009; Wozniak *et al*, 2009; Stofkova, 2010).

Estudos recentes indicam que algumas proteínas derivadas do tecido adiposo, nomeadamente a resistina, podem influenciar significativamente o crescimento e a proliferação de células do estroma tumoral e as células malignas (Filková *et al.*, 2009). Foram encontrados níveis elevados de resistina no plasma de mulheres com cancro da mama, sugerindo-se a sua relação com a agressividade do tumor, de forma independente da idade, da massa corporal, da glicemia e da menopausa (Filková *et al*, 2009). Também foram encontrados níveis elevados de resistina em doentes com linfoma e outras neoplasias (Filková *et al*, 2009). Embora não existam muitos estudos que relacionem a

resistina com as neoplasias malignas, as suas funções gerais podem contribuir para a tumorigenese (Filková *et al*, 2009).

Visfatina

A visfatina é uma proteína de 52 kDa, com 491 aminoácidos, inicialmente identificada como *pre-B cell enhancing factor* (PBEF), sendo actualmente designada de três formas diferentes: PBEF, visfatina e Nampt (Koerner, *et al* 2005; Gallí *et al*, 2010; Kamińska *et al*, 2010).

Esta proteína é sintetizada em vários tipos de células, da medula óssea, do fígado e do músculo-esquelético (Kamińska *et al*, 2010); no entanto, a maior fonte de visfatina é produzida no tecido adiposo visceral (Kamińska *et al*, 2010; Wang, Nakayama, 2010).

Nos mamíferos existem duas formas de Nampt, uma intracelular e outra extracelular (iNampt e eNampt, respectivamente), que possuem actividade de fosforibosiltransferase de nicotinamida (Nam-PRase), participando como enzimas chave no processo de reciclagem da síntese do dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD) (Garten *et al*, 2008; Rabe *et al* 2008; Stofkova, 2010). A forma eNampt ou visfatina é libertada pelas células através de um processo não completamente esclarecido (Garten *et al*, 2008).

Esta forma apresenta um peso molecular ligeiramente superior que a forma iNampt, o que pode resultar de uma modificação pós-transcricional diferente (Garten *et al*, 2008).

Os níveis circulantes da visfatina estão positivamente correlacionados com a acumulação de tecido adiposo visceral branco e os níveis de mRNA de visfatina estão aumentados durante a diferenciação dos adipócitos (Kamińska *et al*, 2010; Kim *et al*, 2010; Wang & Nakayama, 2010). A expressão da visfatina é regulada pela IL-6 e pelo TNF- α , mas não pela insulina (Wang, Nakayama, 2010).

Têm sido atribuídas várias acções à visfatina como a inibição da libertação de glicose pelas células do fígado (Kamińska *et al*, 2010), o armazenamento de triglicéridos nos pré-adipócitos e a activação da adipogénese (Antuna-Puente *et al*, 2008; Kamińska *et al*, 2010).

In vitro, esta proteína liga-se ao receptor da insulina (IR), num local diferente desta, induzindo a sua fosforilação e a do substrato do receptor da insulina (IRS) -1 e -2, promovendo a activação da fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K) e da AKT (Koerner, *et al* 2005; Antuna-Puente *et al*, 2008; Stofkova, 2010). A visfatina activa, igualmente, as MAPK, contribuindo para efeitos muito semelhantes aos da insulina (Koerner *et al*, 2005; Antuna-Puente *et al*, 2008).

Estudos em ratinhos sem visfatina (-/-) mostram que esta condição não é compatível com a vida. Já animais heterozigóticos (visfatina +/-) apresentam duas a três vezes menos visfatina na corrente sanguínea, quando comparados com os controlos (Antuna-Puente *et al*, 2008). No entanto, a taxa de crescimento, o peso corporal, a ingestão de alimentos e o volume de tecido adiposo castanho, do músculo e do coração não diferem dos animais controlo (Antuna-Puente *et al*, 2008). Contudo, apesar dos níveis de insulina não se alterarem, os níveis de glicose destes animais estão aumentados quando comparados com os controlos (Antuna-Puente *et al*, 2008).

Em células de cancro da mama, MCF-7, o tratamento com visfatina resultou num aumento significativo da produção de VEGF, um potente factor pró-angiogénico envolvido no crescimento e na progressão do tumor (Wozniak *et al*, 2009). Em células endoteliais humanas também se verificou um aumento da produção de MMPs, através da activação da via das MAPK e da PI3K (Wozniak *et al.*, 2009).

Outros estudos demonstraram que alterações nos níveis desta adipocitocina afectam a proliferação celular, a apoptose, a invasão tumoral e a angiogénese no cancro da mama.

A análise imunohistoquímica mostrou que a visfatina é altamente expressa no epitélio mamário de neoplasias malignas, e em doentes com cancro gástrico (Kim *et al.*, 2010).

Inflamação e Angiogénese

A resposta inflamatória, a um lesão tecidual ou celular, envolve uma complexa rede de sinais químicos e interacções celulares (Ono, 2008). Este processo resulta de um balanço entre factores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, como interleucinas, TNF- α e interferons, produzidos por vários tipos de células inflamatórias, nomeadamente neutrófilos e eosinófilos (Ono, 2008). Em resposta a estes sinais quimioactivos, os monócitos migram para a área inflamada e diferenciam-se em macrófagos, produzindo factores de crescimento, citocinas, enzimas proteolíticas, mediadores lipídicos e prostaglandinas (Ono, 2008).

A angiogénese e a inflamação são processos que se encontram intimamente ligados em algumas doenças nomeadamente doenças inflamatórias crónicas, incluindo doença de Crohn, diabetes *mellitus*, psoríase, osteoartrite, obesidade, doenças oculares e cancro (Ono, 2008). As células inflamatórias interagem com células endoteliais, fibroblastos e células da matriz extracelular, nos locais inflamados (Ono, 2008). A angiogénese partilha muitas das vias celulares da inflamação. De facto, um processo inflamatório tem subjacente uma estimulação da formação ou crescimento de vasos sanguíneos. Assim, a angiogénese é um processo complexo que envolve o crescimento e a remodelação celulares, através da degradação da matriz extracelular e da proliferação e migração celulares (Ono, 2008). Em condições normais, este processo é altamente regulado e requer um balanço muito bem controlado entre os factores pró-angiogénicos e anti-angiogénicos (Ono, 2008). Uma vez que, muitos dos factores envolvidos na

resposta inflamatória têm um papel directo na angiogénese; como a hipoxia e HIF-1 e o MCP-1, esses mecanismos serão, de seguida, discutidos.

Hipoxia e HIF-1

Estudos recentes sugerem que o equilíbrio entre a angiogénese e a hipoxia tem um impacto significativo na modulação da "boa" *versus* "má" expansão do tecido adiposo, implicando a microcirculação local como um importante modulador da fisiologia do tecido com impacto sistémico (Rutkowski *et al*, 2009). O tecido adiposo possui uma rede relativamente densa de capilares sanguíneos, assegurando uma adequada distribuição de nutrientes e oxigénio, mas que se tem de adaptar à contínua expansão/retracção do tecido (Rutkowski *et al*, 2009).

A vascularização do tecido adiposo serve, de forma muito particular, para o transporte de lípidos da circulação sistémica no sentido do seu armazenamento nos adipócitos. A circulação insuficiente causa uma hipoxia local ou regional, que se correlaciona com o desenvolvimento de um processo inflamatório. Os macrófagos do tecido adiposo apresentam múltiplas funções, incluindo a remoção dos adipócitos necróticos e a captação dos lípidos destes, podendo transformar-se em células espumosas que actuam como mediadores pro-inflamatórios e produtores de factores angiogénicos (Rutkowski *et al*, 2009).

A microcirculação é altamente regulada por quimioquinas produzidas localmente pelos macrófagos, células do estroma e adipócitos. As alterações locais e sistémicas da permeabilidade vascular e a disfunção endotelial induzida por adipocitocinas alteram o transporte trans-endotelial, bem como o controlo da migração de células do sistema imunitário (Rutkowski *et al*, 2009).

O HIF-1 α é considerado um importante factor no desenvolvimento, crescimento e metastização de uma grande variedade de neoplasias. Estudos recentes mostram que o HIF-1 α está envolvido nos mecanismos subjacentes à sobre-expressão de leptina no cancro colo-rectal e da mama. Além disso, a hipoxia nos adipócitos aumenta a expressão de MMPs e VEGF, sugerindo que a hipoxia no tecido adiposo pode ser um modulador do processo de angiogénese tumoral (van Kruijsdijk *et al*, 2009). As citocinas inflamatórias podem ainda aumentar a expressão do NF- κ B, o que leva a um aumento de óxido nítrico, um substrato para espécies reactivas de oxigénio. Estas citocinas e as espécies reactivas de oxigénio podem contribuir para a resistência à insulina. Acresce-se ainda que o excesso de glicose e ácidos gordos livres podem induzir inflamação, activando a via do NF κ B e promovendo a transcrição de genes que medeiam a proliferação, a invasão, a angiogénese, a sobrevivência e a metastização (Donohoe *et al.*, 2010).

Estudos recentes implicam também o NF- κ B na resposta à hipoxia através da interacção com o HIF-1 α , promovendo a expressão de genes como o MCP-1, o TNF- α ou a cicloxigenase-2 (Trayhurn *et al*, 2008; Rutkowski *et al*, 2009). No entanto, o papel essencial na resposta à hipoxia é induzido pelo HIF-1 α , que é considerado o regulador mestre da homeostase do oxigénio (Trayhurn *et al*, 2008).

MCP-1

O MCP-1/CCL2 é uma quimiocitocina cujo principal papel é o recrutamento de monócitos e a sua activação em macrófagos durante a inflamação (Dwyer *et al*, 2007; O'Brien & Schedin, 2009; Yoshidome *et al*, 2009). Esta quimiocitocina, codificada por um gene localizado no cromossoma 17, 17q11.2-q12, é sintetizada sob a forma de uma proteína precursora de 99 aminoácidos que sofre processamento pós-tradução, sendo

segregada como uma proteína de 76 aminoácidos (Dwyer *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2010). Desde a sua descoberta, diversos estudos têm demonstrado que a sua sobre-expressão resulta no crescimento tumoral (Zhang *et al*, 2010). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que o MCP-1 é o principal responsável pelo recrutamento de monócitos para a área tumoral (Fujimoto *et al*, 2009).

Foi demonstrado que esta molécula é produzida pelas células tumorais, o que deveria activar a função citostática dos monócitos contra as células tumorais; no entanto, tem-se observado que promove a invasão e a metastização tumoral através do aumento da formação de novos vasos (Dwyer *et al*, 2007). De facto, o MCP-1 induz angiogénese através de vários mecanismos incluindo efeitos directos e pela indução do VEGF e do HIF-1 α (Zhang *et al*, 2010). Para além das células tumorais, o MCP-1 é produzido por vários outros tipos de células, incluindo as células do estroma, leucócitos e células endoteliais (Zhang *et al*, 2010). O seu efeito no aumento da malignidade, através do aumento da migração e da metastização celular, foi observado em vários tipos de cancro, associando-se a um estado mais avançado da doença, à progressão tumoral e à angiogénese (Yoshidome *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2010).

Os componentes da inflamação crónica são comuns a muitos tipos de cancro, estando presentes no seu microambiente. Além disso, a inflamação está associada aos processos de iniciação e promoção do cancro, nomeadamente cancro de cólon, fígado, estômago e mama (O'Brien & Schedin, 2009).

Como já foi anteriormente mencionado, os monócitos periféricos são recrutados pelos MCP-1 e TNF- α , e podem diferenciar-se em macrófagos activos (Donohoe *et al*, 2010). Paralelamente, os pré-adipócitos também têm a capacidade de se diferenciar em macrófagos. Os produtos derivados dos macrófagos activos podem afectar a função dos

adipócitos e estão envolvidos na alteração do processamento da glicose nestas células, contribuindo para a insulino-resistência (Figura 2) (Donohoe *et al*, 2010).

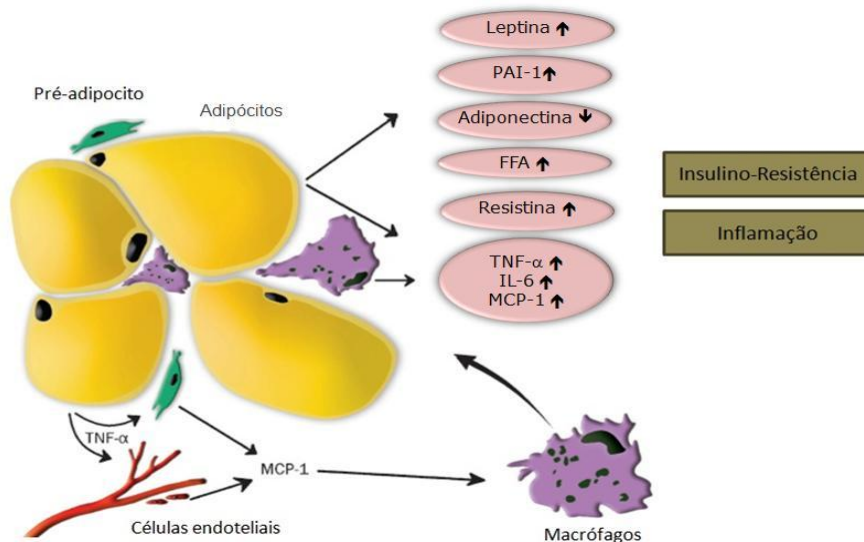


Figura 2. Papel do MCP-1 no tecido adiposo disfuncional.

FFA-*Free Fatty Acids*; IL-6-*Interleucina-6*; MCP-1- *Monocyte Chemoattractant Protein 1*; TNF- α - *Tumor Necrosis Factor- α* ; PAI-1- *Plasminogen Activator Inhibitor-1*. (Adaptado de van Kruijsdijk *et al.*, 2009)

TNF- α

O TNF- α é sintetizado como uma proteína transmembranar de 26 kDa que sofre clivagem antes de ser libertada na circulação, como uma molécula de 17 kDa (Galic *et al*, 2010). Pode ser produzido nos adipócitos bem diferenciados (Antuna-Puente *et al*, 2008; Galic *et al*, 2010; Torres-Leal *et al*, 2010). No entanto, foi recentemente reconhecido que os macrófagos são a maior fonte de TNF- α e que o aumento dos níveis desta citocina pró-inflamatória na obesidade se deve ao aumento da infiltração de macrófagos no tecido adiposo (Galic *et al*, 2010; Torres-Leal *et al*, 2010).

Alguns estudos demonstraram que o TNF- α pode bloquear a sinalização da insulina nos hepatócitos e no tecido adiposo (Galic *et al*, 2010). Mais ainda, o tratamento crónico com TNF- α diminui o estímulo da insulina e a captação de glicose no músculo-esquelético (Galic *et al*, 2010). A base molecular para o comprometimento observado na acção da insulina envolve a inibição da capacidade da sinalização do IRS através da activação de cinases de serina, como a cinase da extremidade N do factor c-JUN (JNK) ou a cinase do inibidor do NF- κ B cinase (IKK), e do aumento da expressão de supressores da sinalização das citocinas (SOCS) 3 (Antuna-Puente *et al*, 2008; Galic *et al*, 2010; Maury & Brichard, 2010; Torres-Leal *et al*, 2010). O TNF- α também reduz a oxidação dos ácidos gordos nos hepatócitos e no músculo-esquelético através da repressão da AMPK (Galic *et al*, 2010; Torres-Leal *et al*, 2010). As taxas reduzidas de oxidação dos ácidos gordos são acompanhadas pela acumulação de lípidos, como o diacilglicerol, que por sua vez activam a PKC e inibem a função do IRS (Antuna-Puente *et al*, 2008; Galic *et al*, 2010). O TNF- α também pode afectar a sensibilidade à insulina, alterando a expressão dos genes dos receptores da insulina, da adiponectina e dos PPARs e também do transportador de glicose, o GLUT4 (Zeyda & Stulnig, 2009).

A maioria dos efeitos do TNF- α no tecido adiposo é mediada pelo receptor do TNF (TNFR) 1, o que culmina com a activação de várias vias de transdução (Maury & Brichard, 2010).

Os macrófagos: amigo e inimigo da progressão tumoral

Tal como na resposta inflamatória, em que os macrófagos e os monócitos são estimulados a migrarem para a área inflamada, assim acontece na área tumoral (Ono, 2008). Os monócitos diferenciam-se em dois tipos de células com diferentes funções:

macrófagos supressores do tumor e macrófagos de apoio, sendo, no conjunto, designados de macrófagos associados ao tumor, os TAM (Ono, 2008). Os macrófagos de apoio activam a remodelação da matriz extracelular, reparam o tecido e promovem a angiogénese. Os macrófagos supressores do tumor têm actividade microbicida e funções imuno-estimuladora e citotóxica tumoral (Ono, 2008).

Os TAM são recrutados para os tumores por citocinas quimioatractivas e factores de crescimento, tais como: MCP-1/CCL2, *Monocyte colony-stimulating factor* (M-CSF/CSF-1), VEGF, angiopoietina-2, e *Chemokine Stromal-derived Factor-1* (CXCL12/SDF1) (Fujimoto *et al*, 2009; Mancino & Lawrence, 2010; Mantovani & Sica, 2010). Os TAM podem adquirir um fenótipo específico, designado M2, que é orientado para o crescimento tumoral, a angiogénese e a imunossupressão. Em vários estudos tem sido mostrada uma correlação positiva entre o número de macrófagos M2 e o pior prognóstico tumoral (Mancino & Lawrence, 2010). Em modelos experimentais, o bloqueio do recrutamento dos TAM, por exemplo, através da deleção do gene do CSF-1, bloqueia o crescimento do tumor e a angiogénese e diminui as metástases (Mancino & Lawrence, 2010).

Os monócitos respondem a estímulos envolvidos na indução de uma resposta imune contra agentes patogénicos incluindo os lipopolissacarídeos da parede bacteriana (LPS); e são também activados pelo interferon- γ (IFN- γ), a IL-1 β , TNF- α e outras citocinas. Estes sinais estão envolvidos na indução da resposta Th1 das células T; e os monócitos que respondem a estes estímulos são designados como macrófagos M1. Uma vez activos, estes macrófagos aumentam a produção de interleucinas 1, 6, 12 e 23, que vão favorecer a resposta Th1 (O'Brien & Schedin, 2009). A actividade associada a macrófagos M1 inclui a apresentação de antígenos, a eliminação de seres patogénicos e

a promoção da citotoxicidade. É importante destacar que a actividade M1 configura um ambiente anti-tumoral (O'Brien & Schedin, 2009; Fujimoto *et al*, 2009).

Em alternativa à activação dos macrófagos M1, existe outro tipo de macrófagos que são altamente reactivos, os macrófagos M2 (Fujimoto *et al*, 2009; O'Brien & Schedin, 2009; Donohoe *et al*, 2010; Mancino & Lawrence, 2010). A categoria M2, de apoio ao tumor, inclui macrófagos activados por IL-4, IL-13 e IL-10 (Fujimoto *et al*, 2009; O'Brien & Schedin, 2009; Mancino & Lawrence, 2010). Foram identificados dois subtipos de macrófagos M2, os macrófagos M2b e M2c, ambos envolvidos na imunorregulação (O'Brien & Schedin, 2009). Os macrófagos M2b são estimulados pela activação dos receptores *toll-like* (TLR), promovem a activação de resposta Th2 e a secreção combinada de citocinas, incluindo IL-1, IL-6, IL-10 e TNF- α (O'Brien & Schedin, 2009). Em contraste, os macrófagos M2c são activados e estimulados a produzir IL-10 e factor de crescimento transformante β (TGF- β) e citocinas imunossupressoras. A acção primária dos macrófagos M2c é inibir a resposta Th1 e os macrófagos M1, regulando também as moléculas do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) Classe II utilizadas para a apresentação de antigénios. Os macrófagos M2c podem ainda contribuir para a deposição da matriz e a remodelação do tecido, provavelmente mediadas pela sobre-expressão de TGF- β (O'Brien & Schedin, 2009).

Os macrófagos podem promover a disseminação do tumor, isto porque usam as fibras de colagénio para o seu transporte local e para os vasos sanguíneos e linfáticos locais favorecendo a disseminação tumoral (O'Brien & Schedin, 2009). Outra via pela qual os macrófagos podem promover o desenvolvimento e a progressão do tumor é através da promoção da angiogénese e da formação de novas redes de capilares, produzindo vários

factores angiogénicos incluindo IL-1, TGF- α , TGF- β , IGF-1, platelet-derived growth factor (PDGF) e VEGF (O'Brien & Schedin, 2009).

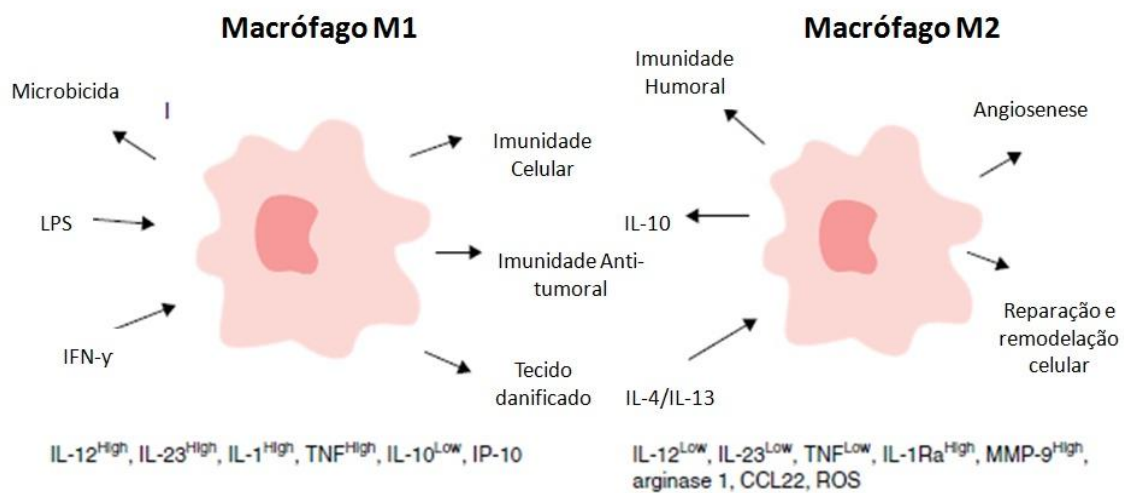


Figura 3. Caracterização dos macrófagos M1 e M2. Os macrófagos M1 são ativados de forma clássica, por estimulação do interferon (IFN) γ , por lipopolissacarídeos da membrana microbiana (LPS), por citocinas inflamatórias clássicas como a interleucina (IL) 12, sendo importantes na geração da resposta imune Th1, mediada por células do sistema imunitário, e na supressão tumoral. Os macrófagos M2 são ativados por IL-4 ou IL-13 e são caracterizados pela propriedade de apresentarem antígenos e produzirem IL-10, tendo um importante papel na promoção e progressão tumoral.

IL-1-Interleucina-1; TNF- α - Factor de necrose tumoral; IP proteína induzível do interferon; IL-1R receptor antagonista da IL-1; MMP- metaloproteinasas da matriz; CCL22 *C-C motif chemokine 22*; ROS- espécies reactivas de oxigénio.

(Adaptado de Donohoe *et al.*, 2010)

Objectivos

O objectivo deste estudo consistiu na avaliação da potencial relação entre a síndrome metabólica e o cancro colo-rectal. Pretendeu-se, concretamente, relacionar, em situações de excesso peso ou obesidade, os produtos de secreção do tecido adiposo, como as adipocitocinas, citocinas pro-inflamatórias e quimiocitocinas, com o cancro colo-rectal.

MATERIAL E MÉTODOS

2. Material e Métodos

2.1. Material e Reagentes

2.1.1. Reagentes químicos e imunológicos para o armazenamento e análise das amostras de sangue

Albumina do soro bovino isenta de protease... Sigma Chemicals CO St. Louis, EUA

Calibrator Set..... Biorad Laboratories

Control Set..... Biorad Laboratories

Duo Set ELISA Development System Human Adiponectin..... R & D System, UK

Duo Set ELISA Development System Human Leptin..... R & D System, UK

Duo Set ELISA Development System Human Resistin..... R & D System, UK

Human TNF ELISA Set..... BD Biosciences Pharmingen, CA, EUA

Human MCP-1 ELISA Set..... BD Biosciences Pharmingen, CA, EUA

RayBio Human/Mouse/Rat Visfatin Enzyme Immunoassay Kit..... RayBiotech, Inc, GA, EUA.

TMB *liquid substract system*..... Sigma Chemicals CO St. Louis, EUA

Todos os sais e solventes orgânicos utilizados na preparação das soluções foram adquiridos à Sigma Chemicals CO St. Louis ou à Merk Darmatad, Alemanha e possuíam o grau de pureza mais alto disponível.

2.1.2. Outros Materiais

Balança de precisão.....	Precisa 80-200M
Balança electrónica.....	Libra EB-2800
Centrífuga.....	Sorvall 5C-5B, Thermo Electron Corporation
Centrífuga refrigerada.....	Sorvall RT6000B, Thermo Electron Corporation
Espectrofotómetro.....	Beckman Clinical Sistem700, Beckman Coulter
Espectrofotómetro.....	Uvikon 933B double beam UV/VIS
Leitor de microplacas.....	Gen5 Software, Biotek Instruments Inc, EUA
Leitor de pH.....	MicropH 2001, Crison
Micropipetas automáticas.....	Gilson Medical Electronics, França
Microplacas de 96 poços..	<i>Immuno plate maxisorp C96</i> , Nunc Roshild, Dinamarca
Pontas de pipetas automáticas.....	Gilson Medical Electronics, França
Software de ELISA.....	Gen5 Software, Biotek Instruments Inc, EUA
Tubos de Colheitas de Sangue.....	BDVacutainer, Reino Unido
Vórtex.....	UNIMAG, ZX, Alemanha

2.1.3. Materiais, equipamentos e reagentes para a cultura de células

Neste trabalho experimental todas as soluções, material de plástico e de vidro utilizados foram esterilizados, por autoclavagem a 121°C ou por filtração utilizando filtros com poros de 0,22 µm, no caso das soluções.

2.1.3.1. Material de uso geral para a cultura de células

Micropipetas:

Pipetas de Pasteur

Pipetas de vidro graduadas (5 ml, 10 ml, 25 ml)

Placas de cultura multiwell (24, 48 e 96 poços) Costar, EUA

Tubos de eppendorf (1,5 ml e 2 ml)..... Sarstedt, Sintra, Portugal

Tubos de Falcon (15 ml e 50 ml)..... Sarstedt, Sintra, Portugal

Frascos de cultura (25 cm² e 75 cm²) Sarstedt, Sintra, Portugal

2.1.3.2. Reagentes para a cultura de células

Água miliQ/desionizada (Ultrapura)

Antibióticos: Penicilina-Estreptomicina (100 unidades/ml Penicilina e 100 µg/ml Estreptomicina)..... Sigma-Aldrich Química S.A., Sintra, Portugal

Dimetilsulfóxido (DMSO)..... Sigma-Aldrich Química S.A., Sintra, Portugal

Meio de cultura estéril Dulbecco's Modified Eagles's High Glucose 1x (DMEM) com 4,5 g/l glucose, L-glutamina, 25 mM HEPES e piruvato de sódio..... Invitrogen, Portugal

Resazurina..... Sigma-Aldrich Química S.A., Sintra, Portugal

Solução de azul de tripano 0,4% Sigma-Aldrich Química S.A., Sintra, Portugal

Soro fetal de bovino (FBS) (Após prévia inativação a 56°C durante 30 minutos, foi dividido em alíquotas de 50 ml, e congelado a -20°C)..... Invitrogen, Portugal

Tampão fosfato (PBS)..... Sigma-Aldrich Química S.A., Sintra, Portugal

Tripsina-EDTA: 20 mg/ml de EDTA, 500 mg/ml de tripsin..... Invitrogen, Portugal

Recombinant Human Visfatin..... BioVision Research Products, CA, USA

Recombinant Human Resistin..... BioVision Research Products, CA, USA

2.1.3.3. Equipamento para a cultura de células

Autoclave de bancada..... Omega Media de Prestige Medical, Blackburn, U.K.

Banho termostático sem agitação Memmert, Alemanha

Câmara de cultura com fluxo laminar verticalSteril-Polaris, Itália

Centrífuga refrigerada (D-78532 Tuttlingen, Hettich Zentrifugar, Universal 320R;
Rotor: 6318)

Espectrofotómetro/luminómetro leitor de placas, com software Gen5 (Synergy™
HT Multi-Mode Microplate Reader..... BioTek Instruments

Hemocitómetro Marienfeld, Alemanha

IncubadoraBinder

Microscópio óptico invertido e directoMotic AE31, Hg 100W

Microscópio óptico (Nikon Eclipse 80i acoplado a uma câmara digital Nikon Digital
Camera DXm 1200F, com software Nikon ACT-1).

2.2. Métodos

2.2.1. Amostra Humana

Os estudos foram efectuados no sangue periférico de 36 doentes com cancro colo-rectal (CC) seleccionados no Hospital Distrital da Figueira da Foz, EPE segundo os critérios internacionais de classificação/diagnóstico deste tipo de cancro, e em 29 indivíduos sem patologia neoplásica (CT). Em ambos os grupos foi considerado então o IMC:

- 1) IMC aumentado [CCo (n=29) e CTo (n=19)]
- 2) IMC normal [CCm (n=7) e CTm (n=10)].

Foram colhidas amostras de sangue no dia da cirurgia ou no dia da primeira consulta. O material foi recolhido segundo os princípios da Declaração de Helsínquia II, depois do estudo ser aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e do Hospital Distrital da Figueira da Foz, EPE.

Todos os doentes e controlos que participaram no estudo foram informados do teor do projecto e dos seus potenciais riscos e benefícios, e assinaram voluntariamente o consentimento informado.

O sangue foi recolhido em tubos BD Vacutainer (para soro) e tubos BD Vacutainer K3E com EDTA 5,4mg (para plasma), e centrifugado a 2500 r.p.m., à temperatura de 4°C durante 10 minutos; o plasma e o soro foram imediatamente aliquotados e guardados a -20°C.

2.2.1.2 Caracterização da amostra

2.2.1.2.1. Determinação do índice de massa corporal

O Índice de Massa Corporal foi calculado segundo a fórmula, $IMC = \text{Peso}/\text{Altura}^2$ (kg/m²), sendo feita a determinação do peso e da altura aquando da consulta.

2.2.1.2.2. Avaliação dos níveis séricos de citocinas pró e anti-inflamatórias e adipocitocinas

Determinaram-se os níveis de TNF- α e MCP-1 no soro por técnicas de ELISA, através de kits comerciais, Human TNF ELISA Set, Human MCP-1 ELISA Set, BD Biosciences Pharmigen, CA, EUA, respectivamente.

Os níveis séricos de adiponectina, leptina e resistina foram igualmente determinados por técnicas de ELISA, Duo Set ELISA Development System Human Adiponectin, Duo Set ELISA Development System Human Leptin e Duo Set ELISA Development System Human Resistin, R&D System, Reino Unido, respectivamente.

Para a determinação dos níveis plasmáticos de visfatina foi utilizado o RayBio Human/Mouse/Rat Visfatin Enzyme Immunoassay Kit, RayBiotech, Inc, GA, EUA.

Em todos os ensaios realizados foram seguidas as instruções dos fabricantes e todas as amostras apresentaram um coeficiente de variação inferior a 10%.

2.2.2. Cultura de células

A cultura de células é utilizada quando se pretende a manipulação experimental de células e tecidos *in vitro*. Esta técnica baseia-se no desenvolvimento de um sistema controlado que permite a sobrevivência, o crescimento e a multiplicação celulares,

apresentando características o mais próximo possível do seu ambiente *in vivo*. É necessário um meio de cultura com concentrações adequadas de nutrientes, quer sejam aminoácidos, sais inorgânicos, vitaminas, e hormonas/factores de crescimento, bem como condições ambientais favoráveis e constantes, incluindo pH, temperatura, atmosfera enriquecida em CO₂, humidade e assepsia. Contudo, a cultura de células também apresenta desvantagens, incluindo a alteração do fenótipo e genótipo celulares após um longo período de crescimento (Freshney, 2000).

2.2.2.1. Preparação dos meios utilizados na cultura de células

Meio de cultura

A 500 ml de meio base, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), adicionou-se 10% (v/v) FBS (Soro Fetal de Bovino) (50 ml) e 1% de solução de antibióticos estreptomicina-penicilina (100 unidades/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina).

Meio de dissociação – 500 ml:

4g NaCl (0,14 M);

0,1 g de KCl (2,7 mM);

0,58 g de Na₂PO₄ (8,2 mM);

0,1 g de KH₂PO₄ (1,5 mM);

0,08 g de EDTA (0,4 mM);

200 µL de vermelho de fenol (1% em água miliQ; 0,0004% (v/v));

Acertar pH=7,4.

2.2.2.2. Linhas celulares

As células WIDR são uma linha celular que deriva de células do carcinoma do cólon humano. Apresentam um tempo de duplicação de 15h (Noguchi P., 1979). Esta linha celular foi gentilmente cedida pela Professora Doutora Filomena Botelho, Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

2.2.2.3. Manutenção das linhas celulares

A linha celular foi cultivada e mantida em meio de crescimento (DMEM), preparado de acordo com o anteriormente descrito (2.2.2.1.), numa atmosfera humidificada, com 5% de CO₂ e à temperatura de 37°C.

A linha celular cresceu em monocamada, aderente às paredes do frasco. Quando as células atingiram uma confluência superior a 80%, foram removidas do frasco de cultura e colocadas num novo frasco a uma densidade celular inferior, permitindo a proliferação e ampliação de uma nova subcultura. Este processo, designado por “passagem”, foi efectuado após se analisar a taxa de crescimento da linha (Freshney, 2000):

1. Observou-se a confluência celular nos frascos de cultura, através do microscópio óptico invertido;
2. Quando a confluência foi igual ou superior a 80%, aspirou-se o meio de cultura e lavaram-se as células com meio de dissociação;
3. Retirou-se, então, o meio e adicionou-se Tripsina-EDTA, estando cerca de 5 minutos na incubadora a 37°C. Esta solução foi adicionada para quebrar as

ligações entre as células e quelar todos os iões Ca^{2+} e Mg^{2+} presentes nestas ligações;

4. Observou-se ao microscópio se as células já se encontravam desagregadas. Quando se verificou a total desagregação adicionou-se novo meio DMEM, já com os suplementos. O volume de meio adicionado dependeu da diluição final pretendida. Para a linha celular WIDR a diluição foi de 1:2.
5. De seguida, transferiram-se as células na diluição pretendida para um novo frasco de cultura, de 75 cm^3 , e adicionou-se meio DMEM até perfazer 15 ml.
6. As células foram propagadas e mantidas em cultura numa incubadora à temperatura de 37°C , com atmosfera humidificada e com 5% de CO_2 , iniciando-se uma nova subcultura.
7. Este procedimento foi repetido de três em três dias.

2.2.3.4. Estudo do efeito da visfatina e de resistina na proliferação e viabilidade da linha celular WIDR

Para estudar a acção das proteínas, visfatina e resistina, na proliferação e viabilidade da linha celular WIDR utilizou-se o teste do azul de tripano e do alamar-blue.

Para o efeito procedeu-se à incubação desta linha celular durante diferentes períodos de tempo (24, 48, 72 horas), na ausência e na presença de visfatina e resistina em monoterapia. As células foram incubadas com diversas concentrações de proteínas como referido na tabela I.

Tabela I: Condições de incubação das células WIDR com visfatina e resistina em monoterapia.

Células	Visfatina	Resistina
WIDR	100ng/mL; 500ng/mL	5ng/mL; 10ng/mL; 20ng/mL

De forma a analisar o efeito das adipocitocinas realizou-se previamente o seguinte procedimento:

1. Quando as células atingiram uma confluência acima de 90% nos frascos de cultura, procedeu-se à tripsinização das células (lavagem com meio de dissociação e incubação com tripsina), como referido anteriormente na manutenção da cultura celular (2.2.2.3.).
2. Quando as células já estavam desagregadas e ressuspensas no meio, foram centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos, de modo a obter no sedimento (*pellet*) apenas as células vivas.
3. Seguiu-se a contagem das células vivas, num hemocitómetro, pelo método de exclusão do azul de tripano, que permite calcular a densidade/proliferação e a viabilidade celulares uma vez que distingue células viáveis, com a membrana íntegra, de células não-viáveis, com a membrana danificada. Assim, este corante vital tem a capacidade de penetrar nas células não-viáveis corando-as de azul, enquanto as células vivas, não permeáveis ao corante, apresentam-se brilhantes e brancas quando observadas ao microscópio óptico.
4. As células foram, então, colocadas em placas *multiwell* de 48 poços (500 μ L por poço) numa concentração de 50.000 células/cm².

5. Após 24 horas, quando as células já se encontravam em monocamada, foram incubadas com resistina e visfatina, nas concentrações referidas na tabela I durante 24, 48 e 72 horas.

Posteriormente, para avaliar o efeito das adipocitocinas em estudo na viabilidade/proliferação das células WIDR, foi utilizado o teste de Alamar Blue (AB).

O teste de AB é um método colorimétrico/fluorimétrico que quantifica, *in vitro*, a viabilidade celular (Fields *et al*, 1993). O corante Resazurina, solúvel em PBS, é extremamente estável, não tóxico e não lesivo e não promove a desagregação celular, no caso das células aderentes. Assim, torna-se uma técnica vantajosa porque além de não danificar as células, permite a monitorização celular. Quando adicionado à cultura celular, a forma oxidada de AB (resazurina) entra no citosol e, ao actuar como um aceitador intermediário de electrões da cadeia respiratória mitocondrial, ao nível do complexo IV, é convertida na forma reduzida (resorufina) pela actividade enzimática mitocondrial, através dos aceitadores de electrões NADPH, FADH, FMNH e NADH bem como dos citocromos (Perrot *et al.*, 2003, Borra *et al.*, 2009). A reacção redox é acompanhada pela alteração de cor do meio, passando de azul (cor da resazurina) para rosa púrpura (cor da resorufina), o qual pode ser facilmente quantificado por espectrofotometria (Figura 4). Devido a esta alteração de cor determina-se a actividade metabólica das células, um indicador de proliferação/viabilidade celular (Al-Nasiry *et al*, 2007, Borra *et al*, 2009).

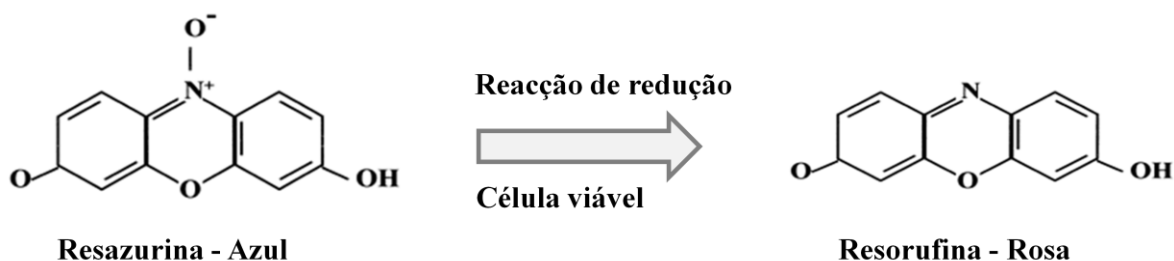


Figura 4. Reacção de redução da resazurina. A resazurina funciona como um aceitador intermediário na cadeia transportadora de electrões. Na presença de actividade mitocondrial a resazurina (cor azul) é reduzida a resorufina (cor rosa), em células viáveis. (Adaptado de O'Brien *et al*, 2000).

Neste estudo, analisou-se a absorvância (Abs) nos comprimentos de onda de 570 nm (resorufina - cor rosa) e de 600 nm (resazurina - cor azul), sendo a diferença proporcional ao número de células viáveis. A viabilidade celular foi determinada em termos de percentagem em relação às células controlo (células não tratadas) de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{(\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{600})_{\text{amostra}} - (\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{600})_{\text{branco}}}{(\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{600})_{\text{controlo}} - (\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{600})_{\text{branco}}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Na equação 1 o branco corresponde à solução de Alamar Blue incubada durante o mesmo tempo que as amostras.

Protocolo do ensaio de AB:

1. Previamente preparou-se uma placa multiwell de 48 poços com uma densidade final de 50.000 células/cm². Após diferentes tempos de incubação das células com as proteínas (24, 48, 72 horas), procedeu-se à determinação da viabilidade;

2. Preparou-se a solução de Alamar Blue a 10% (v/v) em meio DMEM;
3. Aspirou-se o meio das células, com o cuidado de não tocar com a ponta da pipeta na monocamada, e adicionaram-se 500 µl da solução de Alamar Blue atrás referida. Colocou-se um poço com a solução diluída do Alamar Blue para servir de branco;
4. Após incubação durante 24 horas, a 37°C numa atmosfera humidificada e com 5% CO₂, retiraram-se 100µl de cada poço para uma placa *multiwell* de 96 poços;
5. Procedeu-se à leitura das absorvâncias, no espectrofotómetro, nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm;
6. A viabilidade celular foi determinada em termos de percentagem em relação às células controlo (células não tratadas) de acordo com a equação 1 referida anteriormente.

2.3. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm e.p.m. Foi utilizado o teste t de Student para verificar as diferenças entre os diferentes grupos. A correlação entre parâmetros foi realizada através do teste de Spearman. Foram consideradas significativamente diferentes amostras com $P < 0,05$.

RESULTADOS

Resultados

1. Caracterização da amostra

Para a elaboração deste trabalho experimental foram seleccionados doentes com cancro colo-rectal (CC) e sem patologia neoplásica (controles) (CT), com IMC inferior a 25Kg/m^2 (CCm e CTm, respectivamente) e com IMC igual ou superior a 25Kg/m^2 (CCo e CTo, respectivamente) (Tabela II). Os grupos são formados por homens e mulheres, sendo que a percentagem de mulheres no grupo CCm é de 40%, no grupo CCo é de 32,35 %, no grupo CTm é de 88,89% e no grupo CTo é de 35,29% ou seja, os doentes com cancro colo-rectal incluindo neste estudo foram sobretudo homens. Os grupos não apresentam diferenças estatísticas em relação à idade, sendo que, em média, todos os grupos apresentam uma idade superior a 68 anos.

Tabela II. Distribuição e caracterização de doentes e controlos segundo a idade e o IMC

Parâmetro	CCm	CCo	CTm	CTo
Idade (anos)	76,2±2,6	68,9±3,1	72,2±4,3	72,4±1,6
IMC (kg/m^2)	23,1±0,5	29,3±1	22,4±0,6	28,8±1

IMC-índice de massa corporal; CC-doentes com cancro colo-rectal; CT- controlos (indivíduos sem patologia neoplásica); CCm e CTm – doentes e controlos com IMC inferior a 25Kg/m^2 , respectivamente; CCo e CTo - doentes e controlos com IMC igual ou superior a 25Kg/m^2 , respectivamente.

2. Níveis séricos de adipocitocinas e factores inflamatórios

Na Figura 5 estão representados os níveis séricos de adiponectina em doentes com cancro colo-rectal e respectivos controlos tendo em atenção o IMC de cada grupo. Como podemos observar nesta Figura, apesar da diminuição dos níveis séricos de adiponectina no grupo CCo, em relação ao grupo CCm, esta diferença é estatisticamente significativa apenas em relação ao grupo CTm ($P<0,05$) (Figura 5).

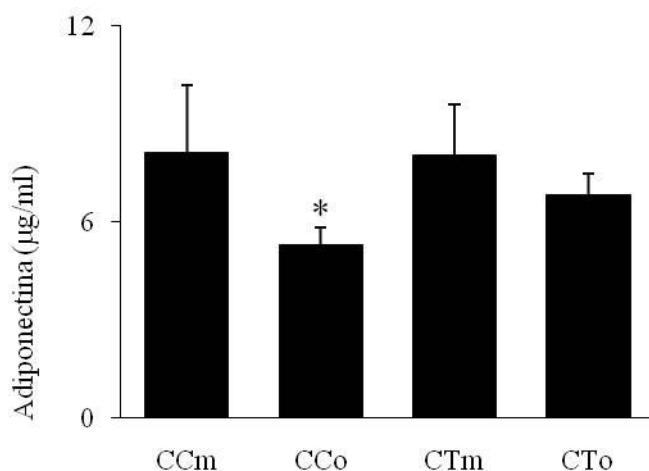


Figura 5. Níveis séricos de adiponectina nos diferentes grupos.

Os resultados são apresentados em $\mu\text{g/ml}$ e representam a média \pm e.p.m. CCm e CTm – doentes com cancro colo-rectal e controlos (indivíduos sem patologia neoplásica) com IMC inferior a 25Kg/m^2 , respectivamente; CCo e CTo – doentes e controlos com IMC igual ou superior a 25Kg/m^2 , respectivamente.

* diferente de CTm (* $P<0,05$).

Por outro lado, os níveis séricos de leptina não foram significativamente diferentes entre os diferentes grupos (Figura 6A). No entanto, a análise da correlação entre a leptinemia e o IMC, mostrou que existe uma correlação significativa, tanto nos controlos e como nos doentes com cancro colo-rectal, quando analisados em conjunto e em separado ($P<0,0001$) (Figura 6

B e C). Desta forma, níveis mais elevados de leptina no soro associam-se a valores superiores de IMC, sem que isso se altere nos doentes com cancro.

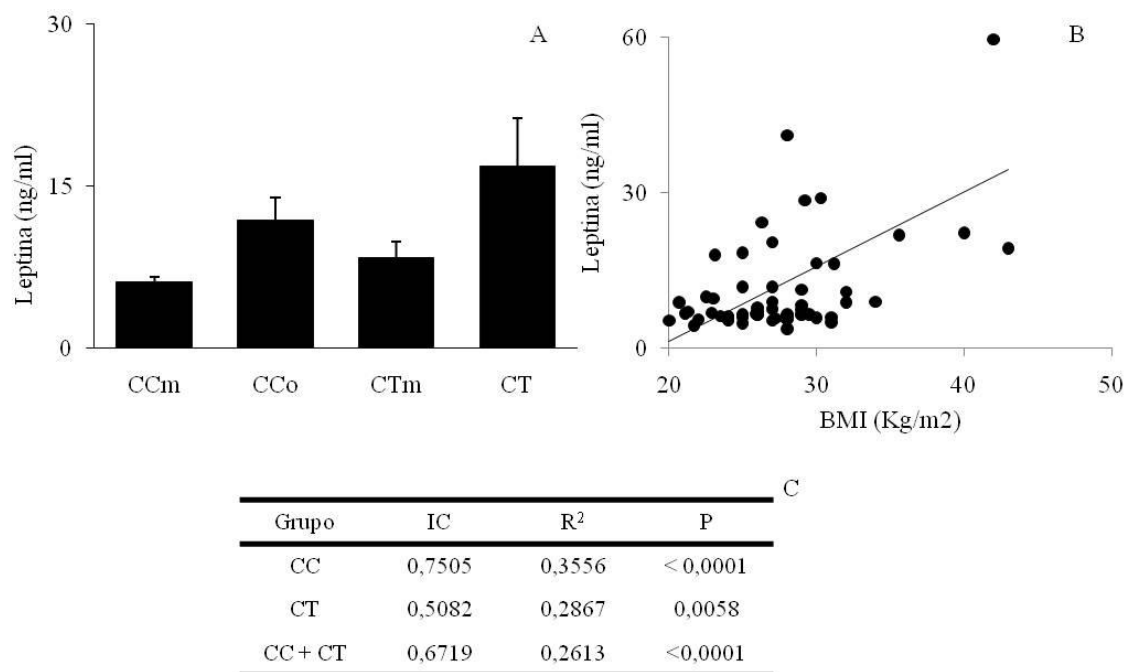


Figura 6. Níveis séricos de leptina. Em (A) nos diferentes grupos; Em (B) Gráfico de dispersão dos níveis séricos de leptina e IMC, incluindo toda a amostra e respectiva correlação entre doentes, controlos e amostra total (C). Os níveis séricos estão expressos em ng/ml; IMC-índice de massa corporal; CC-doentes com cancro colo-rectal; CT- controlos (indivíduos sem patologia neoplásica); CCm e CTm – doentes e controlos com IMC inferior a 25Kg/m², respectivamente; CCo e CTo - doentes e controlos com IMC igual ou superior a 25Kg/m², respectivamente.

Em relação aos níveis séricos de TNF- α , uma citocina pro-inflamatória, apesar dos doentes CCo terem tendência para evidenciar níveis mais elevados desta citocina relativamente aos controlos e aos doentes CCm, os resultados não são estatisticamente significativos (Figura 7A). Pelo contrário, as diferenças observadas nos níveis séricos da quimiocitocina MCP-1 apresentam diferenças estatísticas entre os grupos, sendo os valores mais elevados no grupo CCo em relação aos grupos CCm, CTm e CTo ($P < 0,05$) (Figura 7B).

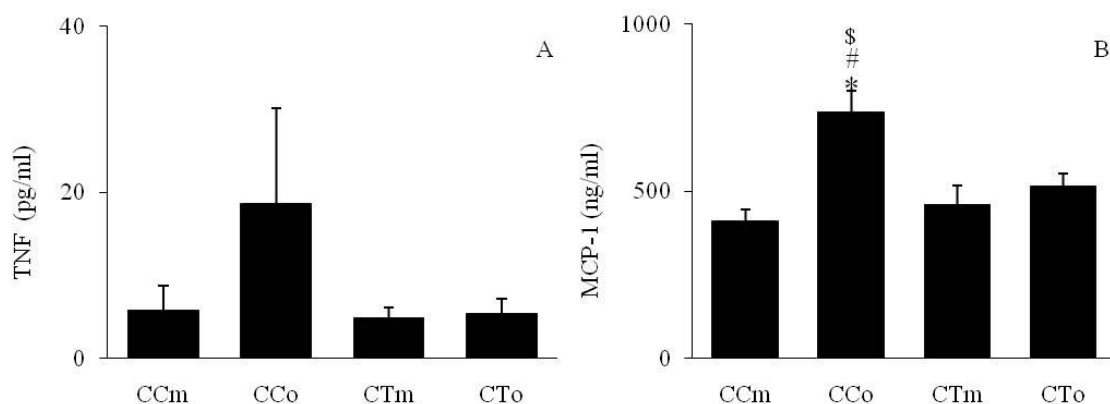


Figura 7. Níveis séricos de TNF- α (A) e de MCP-1 (B), nos diferentes grupos de doentes e controlos.

Os resultados são apresentados em pg/ml e ng/ml, respectivamente para o TNF- α e MCP-1 e representam a média \pm e.p.m. CCm e CTm – doentes com cancro colo-rectal e controlos (indivíduos sem patologia neoplásica) com IMC inferior a 25Kg/m², respectivamente; CCo e CTo - doentes e controlos com IMC igual ou superior a 25Kg/m², respectivamente.

* diferente de CTm (* P<0,05).

diferente de CTo (## P<0,05).

\$ diferente de CCm (\$ P<0,05).

Na Figura 8 estão representados os níveis sistémicos de resistina (Figura 8A) e visfatina (Figura 8B). Como podemos verificar os doentes com cancro colo-rectal (CCo e CCm) apresentam níveis sistémicos mais elevados destas adipocitocinas em relação aos respectivos controlos (CTo e CTm). De facto, as diferenças são estatisticamente significativas para resistina quando analisamos o grupo CCo, em relação aos grupos controlo (CTm: $P<0,01$ e CTo: $P<0,05$), e no grupo CCm em relação ao grupo CTm ($P<0,01$) (Figura 8A). O mesmo acontece para os níveis de visfatina, os quais se encontraram mais elevados no grupo CCo, ao relação em grupo CTm ($P<0,05$) (Figura 8B).

No entanto, apesar de os doentes com CCR e com IMC superior ou igual a 25 (CCo) evidenciarem níveis superiores de visfatina em relação aos doentes com IMC inferior a 25 (CCm), as diferenças não são estatisticamente significativas (Figura 8A).

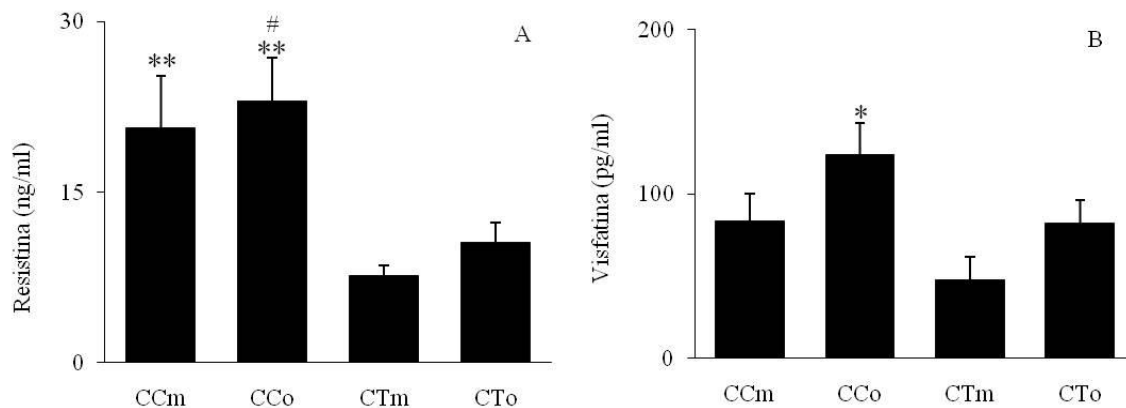


Figura 8. Níveis séricos de resistina (A) e de visfatina (B) nos diferentes grupos.

Os resultados são apresentados em ng/ml e representam a média \pm e.p.m. CCm e CTm – doentes com cancro colo-rectal e controlos (indivíduos sem patologia neoplásica) com IMC inferior a 25Kg/m², respectivamente; CCo e CTo - doentes e controlos com IMC igual ou superior a 25Kg/m², respectivamente.

* diferente de CTm (** P<0,01).

diferente de CTo (# P<0,05).

3. Efeito da visfatina e da resistina na viabilidade da linha celular WIDR

De forma a avaliar o efeito da resistina e da visfatina, as duas adipocitocinas sistemicamente elevadas nos doentes com cancro, na progressão do cancro, as células WIDR foram incubadas com diferentes doses destas proteínas.

Como podemos observar na Figura 9, a visfatina e a resistina induzem aumento da proliferação/viabilidade das células WIDR, de modo dependente da dose, do tempo de incubação e da respectiva adipocitocina. Assim, o efeito da resistina parece ser mais

precoce, uma vez que, após 48h de incubação, as células que foram submetidas a concentrações crescentes de resistina (5 ng/ml e 10 ng/ml) apresentaram um aumento da viabilidade celular ($P<0,05$). Por outro lado, o efeito da visfatina, apesar de ser mais tardio, é sobreponível após 72h de incubação, ao da resistina (Figura 9).

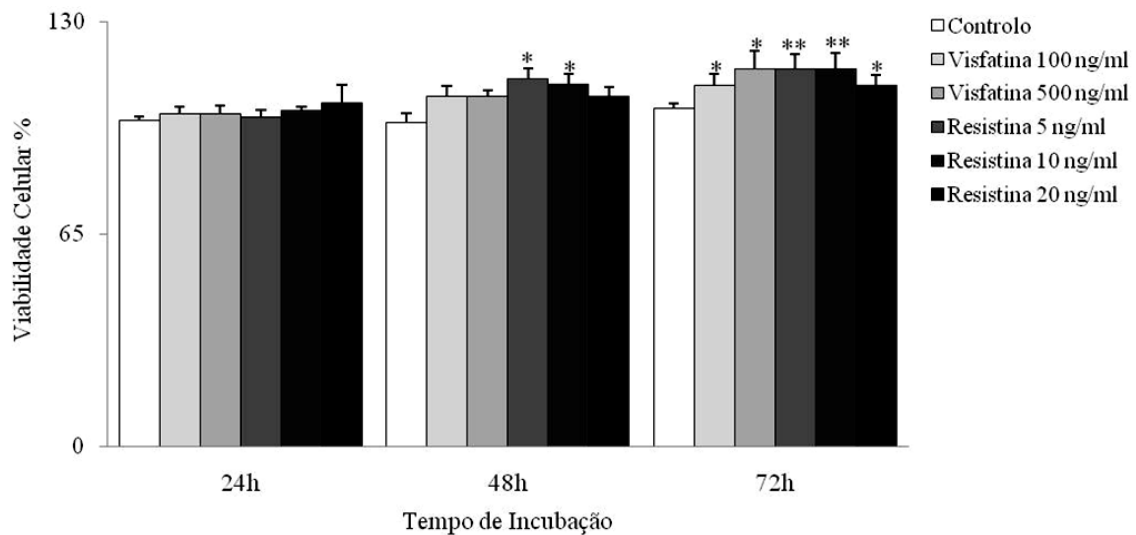


Figura 9. Efeito da visfatina e da resistina na viabilidade das células WIDR. As células WIDR foram incubadas numa densidade inicial de 20×10^4 células/cm², durante 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações de visfatina e resistina, referenciadas na figura. Após incubação nos diferentes períodos de tempo indicados, determinou-se a viabilidade celular através do teste do Alamar Blue, de acordo o descrito na secção material e métodos. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de três ensaios independentes, realizados em duplicado.

* diferente de Controlo (* $P<0,05$).

DISCUSSÃO

Discussão

Este estudo permitiu avaliar a relação entre o cancro colo-rectal e alguns dos marcadores de disfunção do tecido adiposo. Para tal, procedeu-se à avaliação dos níveis sanguíneos de adipocitocinas e citocinas pro-inflamatórias derivadas do tecido adiposo. Também foi avaliada a viabilidade celular de uma linha tumoral do cólon humano em resposta a diferentes concentrações de resistina e visfatina, as duas adipocitocinas que apresentaram níveis sistémicos aumentados nos doentes com cancro.

A obesidade está associada a um aumento da mortalidade, devido às co-morbilidades que lhe estão associadas particularmente diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. O aumento da prevalência da obesidade, sobretudo a associada ao excesso de tecido adiposo visceral, tem sido relacionada com a maior incidência de insulino-resistência, hipertensão e dislipidemia (Ouchi N. *et al*, 2011). Alguns autores têm sugerido que a obesidade está associada a uma inflamação sistémica de baixo grau (Prieto-Hontoria *et al*, 2010), a qual tem sido apontada como uma das principais causas da relação entre obesidade e insulino-resistência, aterosclerose e até mesmo cancro (Prieto-Hontoria *et al*, 2010; Ouchi N. *et al*, 2011). De facto, nos últimos anos a obesidade tem sido apontada como factor de risco para o desenvolvimento de alguns tipos de cancros, nomeadamente o colo-rectal e o da mama (Prieto-Hontoria *et al*, 2010; Birmingham *et al*, 2009).

A expansão do tecido adiposo, particularmente o visceral, associa-se a alterações da produção de citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- α e as Interleucinas 1 e 6, quimiocitocinas, MCP-1, e adipocitocinas como a adiponectina, a leptina, a resistina ou

a visfatina (Prieto-Hontoria *et al*, 2010), as quais poderão contribuir para o desenvolvimento das neoplasias associadas a obesidade.

A adiponectina é uma proteína maioritariamente sintetizada no tecido adiposo, tendo efeitos anti-inflamatórios e promotores da sensibilidade à insulina (Prieto-Hontoria *et al*, 2010). Alguns autores indicam que a hipoadiponectinemia pode ser considerada como um factor de risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas, uma vez que esta proteína pode actuar de duas formas, indirectamente diminuindo a resistência à insulina e directamente, exercendo um efeito antiproliferativo sobre as células tumorais (Maury & Brichard, 2010). Os seus níveis sistémicos estão diminuídos em doentes com diabetes tipo 2 e indivíduos obesos, uma vez que a sua produção é inibida pela activação de vias inflamatórias e por factores pró-inflamatórios, como o TNF- α , que nestes doentes se encontram elevados (Ouchi N. *et al*, 2011). Neste estudo verificamos que os doentes com cancro colo-rectal e excesso de peso apresentam valores inferiores de adiponectina e, simultaneamente, valores de TNF- α que tendem a ser mais elevados

A leptina é uma proteína com funções múltiplas, nomeadamente na regulação do apetite (acção central anorexigénica), na reprodução e na formação do osso; tem também um importante papel pró-angiogénico (Vona-Davis & Rose, 2009). Os níveis sanguíneos desta proteína correlacionam-se com o IMC; embora a leptina seja inibidora do apetite e promotora da oxidação lipídica, os indivíduos obesos desenvolvem, normalmente, resistência à acção desta hormona, pelo que os indivíduos obesos são, normalmente, hiperleptinémicos (Ouchi N. *et al*, 2011). Foi demonstrado que a leptina estimula a proliferação de alguns tecidos normais e cancerígenos, tendo sido encontrados receptores de leptina em alguns tipos de cancro, gástrico, do pulmonar e mamário (Cirillo, *et al*, 2008). Persistem, no entanto, dúvidas sobre o papel da leptina no desencadeamento do processo tumoral pois, até hoje, os estudos apenas suportam o seu

papel na proliferação, mas não na transformação celular (Vona-Davis & Rose, 2009; Sălăgeanu *et al*, 2010). No nosso estudo, os grupos de indivíduos com excesso de peso, doentes ou controlos, apresentam níveis circulantes mais elevados de leptina, embora não estatisticamente diferentes, uma vez que os indivíduos envolvidos no estudo apresentam excesso de peso e não obesidade. No entanto, verifica-se, em concordância com a literatura, uma correlação muito forte entre a leptina no soro e o IMC, sendo que esta relação não se altera nos doentes com cancro colo-rectal (Cirillo *et al.*, 2008). Embora a leptina possa estar envolvida no processo tumoral devido aos seus efeitos proliferativos os nossos resultados não revelam o seu envolvimento no desenvolvimento do cancro colorectal no grupo de doentes estudados.

A visfatina é produzida, maioritariamente, no tecido adiposo visceral e os seus efeitos ainda não estão totalmente desvendados. Alguns autores apontam que a visfatina poderá ter alguns efeitos semelhantes aos da insulina, ligando-se a uma região diferente do receptor desta hormona (Stofkova, 2010). Estudos anteriores mostram que os níveis desta proteína se encontram elevados em diabéticos do tipo 2, indivíduos obesos (Ouchi N. *et al*, 2011) e em doentes com cancro gástrico (Kim *et al*, 2010). Os nossos resultados mostram que os doentes com cancro colo-rectal e excesso de peso têm níveis de visfatina superiores aos controlos com IMC normal, o que não acontece com os controlos com excesso de peso, sugerindo que a desregulação da expressão desta adipocitocina no tecido adiposo poderá estar relacionada com o processo tumoral.

A resistina é expressa maioritariamente por macrófagos residentes no tecido adiposo, constituindo um marcador da actividade inflamatória destas células (Lazar, 2007; Wang *et al*, 2010). Esta proteína tem sido associada a diversas doenças metabólicas e inflamatórias, nomeadamente através do aumento da insulino-resistência; no entanto, os mecanismos que envolvem tais processos ainda são uma incógnita (Galic *et al*, 2010). A

resistina tem sido apontada como um mediador inflamatório em células endoteliais (Filková *et al*, 2009), estimula a secreção de citocinas inflamatórias (Wozniak *et al*, 2009; Filková *et al*, 2009) e activa proteínas, como a AKT e as MAPKs, envolvidas na sobrevivência e crescimento celulares (Filková *et al*, 2009; Stofkova, 2010). Alguns estudos com ratos obesos mostram que os níveis de resistina nestes animais se encontram mais elevados (Ouchi N. *et al*, 2011; Galic *et al*, 2010). Foi também descrito que os níveis desta proteína se encontram aumentados em doentes com cancro da mama (Filková *et al*, 2009) e em doentes com cancro colo-rectal (Sălăgeanu *et al*, 2010). Os nossos dados mostram que os doentes com cancro colo-rectal e IMC normal ou excesso de peso apresentam níveis significativamente mais elevados que os grupos controlo, sugerindo um envolvimento da resistina no cancro colo-rectal de modo independente do tecido adiposo.

Estudos recentes mostram que o tratamento com visfatina de células de cancro da próstata aumenta a taxa de proliferação destas células (Kim *et al*, 2010). Como já foi mencionado anteriormente, os níveis de resistina encontram-se aumentados em doentes com cancro da mama (Filková *et al*, 2009) e em doentes com cancro colo-rectal (Sălăgeanu *et al*, 2010). Foi também demonstrado que a resistina (100ng/ml) induz proliferação de células endoteliais por um mecanismo dependente da PI3K (Robertson *et al*, 2008). No nosso estudo, a incubação da linha celular de cancro do cólon (WIDR) com diferentes concentrações destas proteínas mostrou que, após 48h, a resistina (5 e 10 ng/ml) promove um aumento da viabilidade celular e após 72h esse aumento é induzido por ambas as proteínas, resistina e visfatina, sugerindo que estas adipocitocinas poderão ter efeitos tumorigénicos, induzindo a progressão tumoral. Estes dados vão ao encontro do descrito na literatura; contudo, para afirmarmos que estas proteínas aumentam a

proliferação celular deveríamos proceder a outros estudos, como por exemplo a análise do ciclo celular.

O TNF- α é um factor pro-inflamatório produzido pelos monócitos e macrófagos e tem um papel importante na inflamação e nas doenças auto-imunes (Ouchi N. *et al*, 2011). No tecido adiposo é produzido pelos adipócitos e, sobretudo, pelos macrófagos (Vona-Davis & Rose, 2009). É também produzido em grandes quantidades pelos macrófagos associados a tumores (Allavena *et al*, 2008; Solinas *et al*, 2009). Alguns estudos mostram que os níveis sanguíneos de TNF- α se encontram elevados em indivíduos obesos e que, quando existe uma perda de peso, estes níveis baixam (Ouchi N. *et al*, 2011). O papel deste factor no desenvolvimento do cancro não se encontra totalmente esclarecido, uma vez que poderá ter uma acção anti-tumoral por activar a Caspase 3 e, deste modo, desencadear a apoptose. Por outro lado, poderá ter um papel pro-tumoral, uma vez que poderá activar o NF- κ B, um factor de transcrição envolvido na expressão de outros factores inflamatórios (Prieto-Hontoria *et al*, 2010). Sendo sugerido que o TNF- α poderá estar envolvido na progressão tumoral (Lorincz *et al*, 2006); os nossos resultados mostram que os níveis sistémicos de TNF- α não reflectem um particular envolvimento no processo tumoral. Será necessário, no futuro, estudar o tecido tumoral e adiposo peri-tumoral, nomeadamente a sua expressão e a dos seus receptores, a fim de determinar a sua relação com o desenvolvimento deste tipo de cancro.

O tecido adiposo tem, na sua constituição, macrófagos residentes; quando este tecido se torna disfuncional aumenta a infiltração de macrófagos, devido ao aumento da produção de MCP-1 pelos adipócitos (Maury & Brichard, 2010). Esta quimiocitocina é frequentemente encontrada em diversos tumores, como da mama e colo-rectal, sendo-lhe atribuído um papel preponderante no recrutamento de monócitos para os tecidos afectados (Yoshidome *et al*, 2009). Como já foi mencionado anteriormente, o MCP-1

está envolvido no recrutamento de monócitos que estão envolvidos na metastização tumoral (Yoshidome *et al*, 2009). Estudos anteriores mostram que a expressão de MCP-1 está associada a pior prognóstico, à progressão tumoral e à angiogénese. O MCP-1 induz angiogénese através de vários mecanismos incluindo a indução directa VEGF e HIF-1 (Zhang *et al*, 2010); está, também, positivamente relacionada com a expressão de angiopoetina-2, um factor angiogénico muito importante (Yoshidome *et al*, 2009). Neste estudo podemos observar que os doentes com cancro colo-rectal e excesso de peso apresentam níveis sistémicos superiores desta quimiocina reforçando o seu papel no desenvolvimento de tumores associados ao excesso de peso.

CONCLUSÕES

Conclusões

Neste estudo observamos que os doentes com cancro colo-rectal e excesso de peso, apresentam alterações da função do tecido adiposo evidenciadas pelas alterações de algumas adipocitocinas (adiponectina, resistina e visfatina), e da quimiocitocina MCP-1. Há uma redução dos níveis séricos de adiponectina e um aumento sistémico de MCP-1, visfatina e resistina, sendo que esta última adipocitocina se encontra igualmente elevada nos doentes com cancro e IMC normal.

Este estudo permitiu, ainda, verificar que a visfatina e a resistina são proteínas que aumentam a proliferação/viabilidade celular, sugerindo o seu envolvimento na progressão tumoral. Estes resultados sugerem ainda que estas adipocitocinas poderão constituir um potencial alvo terapêutico para o tratamento dos doentes com cancro colo-rectal. Além disso, a perda da função secretora normal do tecido adiposo, em situações de excesso de peso, poderá estar envolvida na progressão do cancro colo-rectal.

LISTA DE REFERÊNCIAS

Referências

Adeghat E.; An update on the biology and physiology of resistin; CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 61 (2004) 2485–2496; 1420-682X/04/202485-12; DOI 10.1007/s00018-004-4083-2

Allavena P., Sica A, Solinas G., Porta C, Mantovani A, The inflammatory micro-environment in tumor progression-. The role of tumor-associated macrophages, Critical Reviews in Oncology/Hematology 66(2008)1-9, doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.07.004

Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R., The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. Human Reprod 2007;22(5):1304-1309.

Antuna-Puente B., Feve B., Fellahi S., Bastard J. P., Adipokines: The missing Link Between insulin resistance and obesity (2008), Diabetes &Metabolism, 34 2-11

Becker S., Dossus L., Kaaks R., Obesity related hyperinsulinaemia and hyperglycaemia and cancer development (2009), Archives of Physiology and Biochemistry, 115(2):86-96

Birmingham J. M., Busik J. V., Hansen-Smith F. M., Fenton J. I.; Novel mechanism for obesity-induced colon cancer progression; Carcinogenesis vol.30 no.4 pp.690–697, 2009; doi:10.1093/carcin/bgp041.vg \cf

Bobe G., Murphy G., Rogers C. J., Hance K. W., Albert P. S., Laiyemo A. O., Sansbury L. B., Lanza E., Schatzkin A., Cross A. J., (2010) Serum Adiponectin, Leptin, C-Peptide, Homocysteine, and Colorectal Adenoma Recurrence in the Polyp Prevention Trial, Cancer Epidemiology, Biomarkers & prevention

Borra RC, Lotufo MA, Gagioto SM, Barros FM, Andrade PM. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz Oral Res* 2009; 23 (3):255-62.

Cater J. C., Church F. C., Obesity and Breast Cancer: The Roles of Peroxisome Proliferator-Activated receptor- γ and Plasminogen activator Inhibitor-1 (2009), *PPAR Research* 10.1155/2009/345320

Cirillo D., Rachiglio A. M., Montagna R., Giordano A., Normanno N., Leptina Signaling in Breast Cancer: Na Overview, *Journal of Cellular Biochemistry* 105:956-964(2008), DOI 10.1002/jcb.21911

Costa J. V., Duarte J. S.; TECIDO ADIPOSEO E ADIPOCINAS; *Acta Med Port* 2006; 19: 251-256

Cowey S., Hardy R. W. (2006) The Metabolic Syndrome A High-Risk State for Cancer?. *The American Journal of Pathology* 10.2353

Calle E. E. & Thun M. J.; Obesity and cancer; *Oncogene* (2004) 23, 6365–6378

Dwyer R.M., Potter-Beirne S. M., Harrington K.A., Lowery A.J., Hennessy E., Murphy J.M., Barry F.P., O'Brien T., Kerin M.J.; Monocyte Chemotactic Protein-1 Secreted by Primary Breast Tumors Stimulates Migration of Mesenchymal Stem Cells; *Clin Cancer Res* 2007;13(17) 2007

Donohoe CL, Pidgeon GP, Lysaght J, Reynolds JV. Obesity and gastrointestinal cancer. *British Journal of Surgery* 2010; **97**: 628–642.

Fenton J. I., Birmingham J. M., Adipokine Regulation of Colon Cancer: Adiponectin Attenuates Interleukin-6-Induced Colon Carcinoma Cell Proliferation Via Stat-3 (2010) *Molecular Carcinogenesis* 49:700-709

Fields RD, Lancaster MV. Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. *Am Biotechnol Lab* 1993;11:48-50

Filková M, Haluzík M, Gay S, Senolt L.; The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies; *Clin Immunol.* 2009;133(2):157-70.

Freshney RI. *Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique.* 4rd Edition, New York, Wiley-Liss; 2000.

Fujimoto H., Sangai T., Ishii G., Ikehara A., Nagashima T., Miyazaki M., Ochiai A.; Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression; *Int. J. Cancer:* 125, 1276–1284 (2009)

Galic S., Oakhill J. S., Steinberg G. R., Adipose tissue as an endocrine organ, *Molecular and cellular Endocrinology* 316(2010)129-139 doi:10.1016/j.mce.2009.08.018

Gallí M., Gool F. V., Rongvaux A., Andris F., Leo O.; The Nicotinamide Phosphoribosyltransferase: A Molecular Link between Metabolism, Inflammation, and Cancer; *Cancer Res;* 70(1) January 1, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-2465

Garofalo C, Surmacz E.; Leptin and cancer; *J Cell Physiol.* 2006 Apr;207(1):12-22.

Galic S., Oakhill J., Steinberg G. R.; Adipose tissue as an endocrine organ; *Molecular and Celular Endocrinology* 316 (2010) 129-139.

Garten A., Petzold S., Antje Koerner A., Imai S., Kiess W.; *Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer;* 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.tem.2008.10.004.

Gnacinska M., Malgorzewicz S., Stojek M., Lysiak-Szydłowska W., Sworzak K., Role of adipokines in complications related to obesity: A review (2009); *Advances in Medical Sciences* 10.2478/v 10039-009-0035-2

Guilherme A, Virbasis JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Molecular Cell Biology* 2008; **9(5)**: 367-377

Healy L. A., Ryan A. M., Carroll P., Ennis D., Crowley V., Boyle T., Kennedy M. J., Connolly E., Reynolds J. V.; Metabolic Syndrome, Central Obesity and Insulin Resistance are Associated with Adverse Pathological Features in Postmenopausal Breast Cancer; *Clinical Oncology* 22 (2010) 281–288

Kamińska A., Kopczyńska E., Bronisz A., Żmudzińska M., Bieliński M., Borkowska A., Tyrakowski T., Junik R.; An evaluation of visfatin levels in obese subjects; *Polish Journal of Endocrinology*; Volume 61; /Number 2/2010; ISSN 0423–104X

Kim J. G., Eun E. O., Jeong B. R., Min Y. J., Park J. W., Kim E. S., Namgoong I. S., Kim Y. I Lee B. J.; Visfatin Stimulates Proliferation of MCF-7 Human Breast Cancer Cells; *Molecules and Cells*; 2010; DOI/10.1007/s10059-010-0124-x

Koerner A., Kratzsch J., Kiess W., Adipocytokines: leptin-the classical, resistin-the controversial, adiponectin-the promising, and more to come (2005), *Best Practice & Research Clinical endocrinology & Metabolism*, 525-546

Lazar M. A., Resistin- and Obesity-associated Metabolic Diseases, *Resistin and Metabolic Diseases* (2007); 39: 710 – 716

Liu C., Hsu H., Li C., Jan C., Li T., Lin W., Lin T., Chen Y., Lee C., Lin C., Central obesity and atherogenic dyslipidemia in metabolic syndrome are associated with increased risk for colorectal adenoma in a Chinese population (2010), *BMC Gastroenterology* 10:51

Lorincz AM, Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2006; **13**: 279–292.

Mantovani A., Marchesi F., Porta C., Sica A., Allavena P., Inflammation and cancer: Breast cancer as a prototype (2007), *The Breast* 16 S27-S33

Maury E., Brichard S.M.; Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome; *Molecular and Cellular Endocrinology* 314 (2010) 1–16

Mancino A. and Lawrence T.; Nuclear Factor- κ B and Tumor Associated Macrophages; *Clin Cancer Res*; 16(3), 2010;

Mantovani A., Sica A.; Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity; *Current Opinion in Immunology* 2010, 22:231

Noguchi P., Wallace R., Johnson J., Earley E.M., O'Brien S., Ferrone S., Pellegrino M.A., Milstien J., Needy C., Brown W., Petricciani J., Characterization of the WIDR: a human colon carcinoma cell line (1979), A.S. National Library of Medicine National Institutes of Health

O'Brien J. & Schedin P.; Macrophages in Breast Cancer: Do Involution Macrophages Account for the Poor Prognosis of Pregnancy-Associated Breast Cancer?; *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2009) 14:145–157; DOI 10.1007/s10911-009-9118-8

O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000;267:5421–5426.

Ono M., Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy (2008), *Japanese Cancer Association* 10.1111/j.1349-7006.2008.00853.x

Ouchi N., Parker J. L., Lugus J. J., Walsh K., A.; Reviews: Adipokines in inflammation and metabolic disease (2011), *Nature Reviews – Immunology*, doi:10.1038/nri2921

Pais R., Silaghi H., Silaghi A. C., Rusu M. L., Dumitrascu D. L. Metabolic syndrome and risk of subsequent colorectal cancer, *World Journal of Gastroenterology* (2009) ISSN 1007-9327

Pollard J. W.; Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer; *Journal of Leukocyte Biology* Volume 84, September 2008; doi: 10.1189/jlb.1107762

Prieto-Hontoria P. L., Pérez-Matute P., Fernández-Galilea M., Bustos M., Martínez J. A., Moreno-Aliaga M.J.; Role of obesity-associated dysfunctional adipose tissue in cancer: A molecular nutrition approach; *Biochim. Biophys. Acta* (2010), doi:10.1016/j.bbabbio.2010.11.004

Rabe K., Lehrke M., Parhofer K. G., Broedl U. C.; Adipokines and Insulin Resistance; *MOL MED* 14 (11 - 12) 741-751; 2008; doi: 10.2119/2008-00058

Rutkowski J.M., Davis K. E., Scherer P. E., Mechanisms of obesity and related pathologies: The macro- and microcirculation of adipose tissue; *The Authors Journal compilation 2009 FEBS*; doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07303.x

Robertson S. A., Rae C. J., Graham A., Induction of angiogenesis by murine resistin: Putative role of PI3-kinase and NO-dependent pathways, *Regulatory Peptides* 152 (2009) 41–47, doi:10.1016/j.regpep.

Sălăgeanu A., Țucureanu C., Lerescu L., Caraș I., Ramona Pitica R., Gangură G., Costea R., Neagu S., Serum levels of adipokines resistin and leptin in patients with colon cancer, *Journal of Medicine and Life* (2010) pp.416-420

Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F., The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics (2005), *Cell Biol Toxicol*, 21(1):1-26

Smith U., Gaime E. A. M., Cancer and diabetes: are we ready for prime time?, *Diabetologia* (2010) 53:1541-1544

Solinas G., Germano G., Mantovani A., Allavena P., Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation, *Journal of Leukocyte Biology* volume 86 (2009), DOI: 10.1189/jlb.0609385

Stofkova A; Resistin and visfatin: Regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity; *Endocrine Regulations*, Vol.44, 25–36, 2010; doi:10.4149/endo_2010_01_25

Tilg H. and Moschen A. R.; Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases; *Clinical Science* (2008).

Torres-Leal F. L., Fonseca-Alaniz M. H., Rogero M. M., Tirapegui J.; The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance; *Cell Biochem Funct* 2010; 28: 623–631; DOI: 10.1002/cbf.1706

Trayhurn P., Wang B., Wood I. S.; Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity?; *British Journal of Nutrition* (2008), 100, 227–235; doi:10.1017/S0007114508971282

Wang Z., Nakayama T., Inflammation, a Link between Obesity and Cardiovascular Disease (2010) *Mediators of Inflammation*, 10.1155/2010/535918

Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE; Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article; *Dig Dis Sci.* 2009;54(9):1847-56

van Kruijsdijk R. C.M., van der Wall E., Visseren F. L.J., Obesity and Cancer: The Role of Dysfunctional Adipose Tissue, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(10). October 2009

Vázquez-Vela M. E. F., Torres N. Tovar A. R.; white Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity; *Archives of Medical Research* 39 (2008) 715-728; doi: 10.1016/j.arcmed.2008.09.005

Yamaji T., Iwasaki M., Sasazuki S., Tsugane S., Interaction between Adiponectin and Leptine Influeces the Risk of Colorectal Adenoma, (2010) Preventin and Epidemiology

Yoshidome H., Kohno H., Shida T., Kimura F., Shimizu H., Ohtsuka M., Nakatani Y., Miyazaki M.; Significance of monocyte chemoattractant protein-1 in angiogenesis and survival in colorectal liver metastases; International Journal of Oncology; 34: 923-930, 2009

Zeyda M., Stulnig T. M.; Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance – A Mini-Review; Gerontology 2009; 55:379–386; DOI: 10.1159/000212758

Zhang J., Lu Y., Pienta K. J.; Multiple Roles of Chemokine (C-C Motif) Ligand 2 in Promoting Prostate Cancer Growth; 2010. Published by Oxford University Press; DOI: 10.1093/jnci/djq044