

MARIA AMÉLIA FONSECA PEREIRA

# IMPORTÂNCIA CLÍNICA DE NOVOS MARCADORES MOLECULARES NO CANCRO COLORRETAL

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, na especialidade de Medicina Interna (Oncologia), orientada pelo Senhor Professor Doutor José Manuel Nascimento Costa e pela Senhora Professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

JULHO / 2014



**Maria Amélia Fonseca Pereira**

# **IMPORTÂNCIA CLÍNICA DE NOVOS MARCADORES MOLECULARES NO CANCRO COLORRETAL**

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, na especialidade de Medicina Interna (Oncologia), orientada pelo Senhor Professor Doutor José Manuel Nascimento Costa e pela Senhora Professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

31 de julho de 2014



**UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

Capa

Desenho de:

Alvaro Manuel Cação Biscaia, 2014



## AGRADECIMENTO

A vida é feita de pequenas conquistas!

Ao terminar o trabalho que deu origem à tese de dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo Medicina, especialidade Medicina Interna (Oncologia), gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de uma ou outra forma, contribuíram para a sua realização, todo o apoio, simpatia, disponibilidade e incentivo demonstrados, imprescindíveis à sua concretização.

Em primeiro lugar **aos doentes** que são a razão da minha escolha e da minha dedicação, particularmente àqueles que aceitaram participar no estudo.

Ao Professor Doutor José Manuel Nascimento Costa, meu orientador, pela confiança com que recebeu e apoiou este projeto, pela sua orientação científica e pela disponibilidade demonstrada.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, minha co-orientadora, pela confiança com que recebeu e apoiou este projeto, pelo apoio na definição do projeto, pela sua orientação científica, por todo o seu trabalho e disponibilidade.

À Professora Doutora Raquel Seiça, Diretora do Serviço de Fisiologia, e a todos os seus colaboradores, pelo apoio, simpatia e trabalho desenvolvido.

Ao Conselho de Administração do Hospital Distrital da Figueira da Foz, EPE, (HDFE, EPE) por ter permitido a realização deste projeto.

Ao Serviço de Cirurgia do HDFE, EPE nas pessoas dos seus Diretores, Dr. Alberto Seabra e Dr. Amândio José Couceiro, ao Bloco Operatório nas pessoas dos seus Diretores, Dr. Sérgio Martins e Dr. Nuno Azenha, ao Serviço de Patologia Clínica nas pessoas das suas Diretoras Dra. Natália Novais e Dra. Paula Moutinho, ao Hospital de Dia na pessoa da sua responsável, Dra. Fátima Guedes, ao Serviço de Medicina e ao Arquivo Clínico na pessoa da sua responsável, Dra Margarida Cunha.

Aos Médicos, Enfermeiros, Técnicos de Patologia Clínica, Secretariado Clínico e Assistentes Operacionais.

A toda a minha Família e particularmente ao meu Pai, com saudade, à minha Mãe e à minha Madrinha, pelo amor e apoio incondicional, por me respeitarem como sou, por serem um exemplo diário na minha vida.

Ao João Pedro e à Ana Cristina

Por serem a continuação da minha vida, uma razão para lutar, para querer ir sempre mais longe, pelo amor incondicional, respeito e presença amiga.

Ao Tó

Pelo amor, amizade, respeito, compreensão e companheirismo. Pelo incentivo, colaboração e perspetiva positiva da vida.

À Joana e à Inês

Por terem entrado na minha vida, por a terem enriquecido, pelo amor, pela amizade. Em especial à Inês pelo apoio e colaboração neste projeto da minha vida.

Aos meus amigos

Pela amizade verdadeira, pelas palavras certas, pelo apoio incondicional, não só ao longo destes 6 anos, mas durante todo o meu percurso de vida. Felizmente, a lista é extensa e difícil de enumerar sem esquecer alguém, mas estas pessoas sabem quem são. Obrigada pelos momentos de trabalho, de convívio, pela paciência, pelas ótimas recordações, pelo apoio, enfim pela amizade.

Um agradecimento especial

À Ana Cristina

Que foi a grande incentivadora, orientadora, colaboradora, amiga, filha, com a sua exigência e sentido crítico, foi peça importante deste meu trabalho. Fico-lhe a dever esta grande conquista.

A todos o meu bem-haja por terem tornado este caminho difícil bastante mais agradável e fácil de percorrer.





“Recomeça ... se puderes, sem angústia e sem pressa e os passos que deres, nesse caminho duro do futuro, dá-os em liberdade, enquanto não alcances não descanses, de nenhum fruto queiras só metade.”

Miguel Torga



*“Every 3.5 minutes, someone is diagnosed with colorectal cancer (CRC); every 9 minutes, someone dies from CRC; and every 5 seconds, someone who should be screened for CRC is not. The 5-year mortality for people diagnosed with CRC is approximately 40%; however, survival improves substantially if the cancer is diagnosed while still localized.”*

(B. Benson III, 2007)



# ÍNDICE

|  |          |
|--|----------|
| ÍNDICE   | XI       |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                | XV       |
| ÍNDICE DE TABELAS                                | XVII     |
| RESUMO   | XIX      |
| ABSTRACT   | XXIII    |
| LISTA DE ABREVIATURAS                            | XXVII    |
| <b>1.INTRODUÇÃO</b>                              | <b>3</b> |
| 1.1.EPIDEMIOLOGIA                                | 4        |
| 1.1.1.INCIDÊNCIA E MORTALIDADE                   | 4        |
| 1.1.2.VARIAÇÃO GEOGRÁFICA                        | 6        |
| 1.1.3.RAÇA E ETNIA                               | 7        |
| 1.1.4.FATORES SÓCIO-ECONÓMICOS                   | 7        |
| 1.1.5.LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA                      | 9        |
| 1.1.6.OUTROS FATORES DE RISCO                    | 9        |
| 1.2.ETIOLOGIA                                    | 10       |
| 1.2.1.PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA                     | 10       |
| 1.2.2.FATORES AMBIENTAIS                         | 11       |
| 1.3.BIOLOGIA DO CANCRO                           | 14       |
| 1.3.1. CARCINOGENESE COLORRETAL                  | 16       |
| 1.3.2.PATOGÊNESE DO CANCRO COLORRETAL ESPORÁDICO | 20       |
| 1.3.3.CANCRO COLORRETAL HEREDITÁRIO              | 29       |
| 1.4.BIOMARCADORES TUMORAIS NO CANCRO COLORRETAL  | 32       |
| 1.5. ADIPOCITOCINAS E CANCRO COLORRETAL          | 35       |
| 1.5.1.ADIPONECTINA                               | 38       |
| 1.5.2.LEPTINA                                    | 43       |
| 1.5.3.RESISTINA                                  | 46       |
| 1.5.4.VISFATINA                                  | 49       |
| 1.5.5.MCP-1                                      | 51       |
| 1.5.6.TNF- $\alpha$                              | 52       |
| 1.6.ABORDAGEM CLÍNICA DO CANCRO COLORRETAL       | 54       |
| 1.6.1.DIAGNÓSTICO                                | 54       |
| Clínica  | 55       |
| Exames complementares de diagnóstico             | 56       |
| Diagnóstico diferencial                          | 58       |
| Estudo familiar                                  | 59       |
| 1.6.2.RASTREIO                                   | 62       |
| 1.6.3. ESTADIAMENTO                              | 63       |
| 1.6.4. TRATAMENTO                                | 68       |
| Cirurgia   | 68       |
| Ablação por radiofrequência (ARF)                | 71       |
| Radioembolização arterial                        | 71       |
| Bombas de infusão intra-arterial                 | 72       |
| Terapêuticas loco-regionais não cirúrgicas       | 72       |
| Tratamento farmacológico                         | 73       |
| Radioterapia                                     | 75       |
| Estratégias Terapêuticas                         | 76       |
| 1.6.5.VIGILÂNCIA APÓS TERAPÊUTICA                | 82       |
| 1.6.6. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA                     | 82       |
| 1.6.7.PROGNÓSTICO                                | 83       |

|   |            |
|---|------------|
| 1.6.8. SEGUIMENTO   | 87         |
| <b>2. OBJETIVOS</b>   | <b>91</b>  |
| Objetivos gerais:   | 91         |
| Objetivos específicos:  | 91         |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>  | <b>95</b>  |
| 3.1. SELEÇÃO DE DOENTES E CONTROLOS   | 95         |
| 3.2. RECOLHA DE AMOSTRA   | 97         |
| 3.3. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA  | 98         |
| 3.3.1. <i>Determinação das medidas antropométricas</i>  | 98         |
| 3.3.2. <i>Avaliação do estado funcional</i>   | 99         |
| 3.3.3. <i>Avaliação dos níveis séricos de adipocitocinas e fatores inflamatórios</i>  | 100        |
| 3.3.4. <i>Avaliação dos níveis de expressão génica de adipocitocinas e fatores inflamatórios em tecidos de cólon tumoral e normal</i>                                     | 103        |
| 3.3.4.1. Extração de ARN  | 103        |
| 3.3.4.2. Conversão de ARN em cADN   | 104        |
| 3.3.4.3. Quantificação da expressão génica das adipocitocinas e fatores inflamatórios por PCR em tempo real quantitativo  | 105        |
| 3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA  | 108        |
| <b>4. RESULTADOS</b>  | <b>113</b> |
| 4.1. ENQUADRAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DO ESTUDO   | 113        |
| 4.2. COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA   | 114        |
| 4.2.1. <i>COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA</i>   | 114        |
| 4.2.2. <i>CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DA AMOSTRA</i>  | 114        |
| 4.2.3. <i>CARACTERÍSTICAS DO TUMOR, TERAPÊUTICA E SOBREVIVÊNCIA GLOBAL</i>  | 122        |
| 4.2.3.2. <i>Características anatomopatológicas e moleculares do tumor</i>   | 125        |
| 4.2.3.3. <i>Tratamento e sobrevivência global</i>   | 126        |
| 4.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM DOENTES COM CANCRO COLORRETAL   | 129        |
| 4.3.1. <i>CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA</i>   | 130        |
| 4.3.2. <i>DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS EM DOENTES COM CANCRO COLORRETAL E CONTROLOS</i>   | 131        |
| 4.3.2.1. <i>Análise dos níveis séricos de citocinas em doentes com cancro colorretal e controlos de acordo com o género</i>   | 133        |
| 4.3.2.2. <i>Análise dos níveis séricos de citocinas em doentes com cancro colorretal de acordo com os hábitos alimentares e perfil metabólico</i>                         | 137        |
| 4.3.2.3. <i>Análise dos níveis séricos de citocinas em doentes com cancro colorretal de acordo com as características do tumor</i>  | 144        |
| 4.3.3. <i>ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÉNICA DAS ADIPOCITOCINAS E DE FATORES INFLAMATÓRIOS EM DOENTES COM CANCRO COLORRETAL E CONTROLOS</i>                                      | 149        |
| 4.3.4. <i>AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E TECIDULARES DAS ADIPOCITOCINAS E DE FATORES INFLAMATÓRIOS COMO MARCADORES TUMORAIS DE CANCRO COLORRETAL E DE PROGNÓSTICO</i>     | 153        |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>   | <b>165</b> |
| 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA  | 166        |
| 5.1.1. <i>Caracterização epidemiológica e clínica dos doentes com CCR</i>   | 166        |
| 5.1.2. <i>Variáveis patológicas</i>   | 168        |
| 5.2. CITOCINAS E FATORES INFLAMATÓRIOS  | 169        |
| 5.2.1. <i>INFLUÊNCIA DO GÉNERO NOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS E FATORES INFLAMATÓRIOS EM DOENTES COM CANCRO E CONTROLOS</i>  | 173        |
| 5.2.2. <i>ANÁLISE DOS VALORES SÉRICOS DE CITOCINAS E FATORES INFLAMATÓRIOS EM DOENTES COM CANCRO E CONTROLOS DE ACORDO COM OS HÁBITOS ALIMENTARES E PERFIL METABÓLICO</i> | 176        |

---

|  |            |
|--|------------|
| 5.2.3. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS E FATORES INFLAMATÓRIOS EM DOENTES COM CANCRO E CONTROLOS DE ACORDO COM OS POTENCIAIS BIOMARCADORES TUMORAIS. | 181        |
| 5.3. EXPRESSÃO GÉNICA DAS CITOCINAS E FATORES INFLAMATÓRIOS EM DOENTES COM CANCRO COLORRETAL E EM CONTROLOS  | 186        |
| 5.4. ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS E TECIDULARES DAS CITOCINAS COMO MARCADORES TUMORAIS DE DOENÇA E DE PROGNÓSTICO  | 187        |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>  | <b>193</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFIA</b>   | <b>197</b> |





## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| Figura 1: Previsão da incidência de cancro em Portugal entre 2010 e 2030.....   | 3   |
| Figura 2: Fatores que potencialmente contribuem para a incidência do cancro colorretal. ....  | 12  |
| Figura 3: “Hallmarks of cancer”. ....   | 15  |
| Figura 4: O papel dos genes no aparecimento da célula tumoral.....  | 18  |
| Figura 5: Fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento do Cancro Colorretal. ....  | 21  |
| Figura 6: Tipos de instabilidade genómica identificada no cancro colorretal. ....   | 24  |
| Figura 7: Um modelo para a via de sinalização Wnt. ....   | 26  |
| Figura 8: Citocinas, obesidade e cancro. ....   | 37  |
| Figura 9: Vias de sinalização da Adiponectina e Leptina.....  | 42  |
| Figura 10: Vias de sinalização intracelular e Leptina.....  | 45  |
| Figura 11: Vias de sinalização de cancro e Resistina. ....  | 48  |
| Figura 12: Resumo dos mecanismos de participação da inflamação no desenvolvimento do cancro. ....   | 53  |
| Figura 13: Estadiamento do cancro colorretal. ....  | 64  |
| Figura 14: Fluxograma de decisão terapêutica. ....  | 69  |
| Figura 15: Esquema representativo de um ensaio <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA competitivo). ....   | 102 |
| Figura 16: Exemplo representativo de uma reta de amplificação (A) e de uma curva padrão (B) de PCR em tempo real (qPCR). ....   | 106 |
| Figura 17: Incidência anual de cancro colorretal no período de 1 de março de 2010 a 28 de fevereiro de 2013. ....   | 113 |
| Figura 18: Distribuição dos doentes com cancro colorretal segundo a idade estratificada por décadas. ....   | 116 |
| Figura 19: Naturalidade e residência da população de doentes com cancro colorretal. ....  | 117 |
| Figura 20: Hábitos alimentares dos doentes com cancro colorretal.....   | 118 |
| Figura 21: Hábitos farmacológicos dos doentes com cancro colorretal. ....   | 119 |
| Figura 22: Capacidade funcional dos doentes com cancro colorretal avaliada pelo sistema ECOG da Organização Mundial de Saúde.....   | 120 |
| Figura 23: Distribuição da localização tumoral primária nos doentes com cancro colorretal. ....   | 123 |
| Figura 24: Estadiamento patológico dos doentes com cancro colorretal. ....  | 124 |
| Figura 25: Sobrevivência global dos doentes com cancro colorretal. ....   | 128 |
| Figura 26: Sobrevivência global dos doentes com cancro colorretal em função do estágio ao diagnóstico. ....   | 129 |
| Figura 27: Análise dos níveis séricos de adiponectina (A), leptina (B), resistina (C), visfatina (D), TNF- $\alpha$ (E) e MCP-1 (F) em doentes com cancro colorretal e em controlos de acordo com o género. ....    | 135 |
| Figura 28: Análise dos níveis séricos de adiponectina (A), leptina (B), resistina (C), visfatina (D), TNF- $\alpha$ (E) e MCP-1 (F) em doentes com cancro colorretal de acordo com o Índice de Massa Corporal. .... | 140 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 29: Análise das correlações entre os níveis séricos das adipocitocinas e citocinas inflamatórias e o Índice de massa corporal em doentes com cancro colorretal.....   | 143 |
| Figura 30: Análise dos níveis séricos de adiponectina (A), leptina (B), resistina (C), visfatina (D), TNF- $\alpha$ (E) e MCP-1 (F) em doentes com cancro colorretal de acordo com o estadiamento do tumor.....                                      | 147 |
| Figura 31: Avaliação da expressão dos genes das adipocitocinas e citocinas inflamatórias por PCR em tempo real.....  | 150 |
| Figura 32: Análise das correlações entre a expressão génica de adipocitocinas e fatores inflamatórios nos tecidos normal e tumoral de doentes com cancro colorretal.....   | 152 |
| Figura 33: Avaliação dos níveis de citocinas séricos como potenciais marcadores de diagnóstico em doentes com cancro colorretal através da análise de curvas <i>Receiver Operating Characteristic</i> (ROC).<br>.....                                | 156 |
| Figura 34: Avaliação dos níveis de citocinas séricos como potenciais marcadores de prognóstico em doentes com cancro colorretal através da análise de curvas <i>Receiver Operating Characteristic</i> (ROC).<br>.....                                | 158 |
| Figura 35: Avaliação dos níveis de expressão génica das citocinas no tecido tumoral como potenciais marcadores de prognóstico em doentes com cancro colorretal através da análise de curvas <i>Receiver Operating Characteristic</i> (ROC).<br>..... | 159 |
| Figura 36: Análise da sobrevivência global de doentes com cancro colorretal em função dos níveis séricos da adiponectina, da leptina, da resistina, da visfatina, do TNF- $\alpha$ e do MCP-1.....   | 161 |
| Figura 37: Análise da sobrevivência global de doentes com cancro colorretal em função dos níveis de expressão genica no tecido tumoral da adiponectina, da leptina, da resistina, da visfatina, do TNF- $\alpha$ e do MCP-1.....                     | 162 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1: Taxa de incidência do cancro colorretal em Portugal, 2007.....   | 5   |
| Tabela 2: Fatores potencialmente envolvidos na carcinogénese colorretal.....   | 13  |
| Tabela 3: Padrões de Instabilidade Genómica no Cancro Colorretal.....  | 23  |
| Tabela 4: Critérios de Amesterdão clássicos.....   | 60  |
| Tabela 5: Critérios de Amsterdão modificados.....  | 60  |
| Tabela 6: Critérios de Bethesda.....   | 61  |
| Tabela 7: Classificação dos tumores malignos do cólon e reto.....  | 66  |
| Tabela 8: Estadiamento do cancro colorretal de acordo com o sistema de classificação da AJCC.....  | 67  |
| Tabela 9: Estadiamento AJCC, Dukes e Astler-Coller.....  | 67  |
| Tabela 10: Fármacos usados no tratamento do cancro colorretal.....   | 74  |
| Tabela 11: Sobrevivência do cancro do reto.....  | 85  |
| Tabela 12: Taxa de mortalidade no cancro do cólon.....   | 85  |
| Tabela 13: Taxa de mortalidade no cancro do reto.....  | 86  |
| Tabela 14: Índice de Massa Corporal de acordo com Organização Mundial da Saúde.....  | 98  |
| Tabela 15: Escalas de capacidade funcional.....  | 100 |
| Tabela 16: Genes e respetivos <i>primers</i> de qPCR.....  | 108 |
| Tabela 17: Caracterização global da amostra.....   | 115 |
| Tabela 18: Sintomatologia ao diagnóstico dos doentes com cancro colorretal.....  | 120 |
| Tabela 19: Caracterização da amostra em função do género.....  | 121 |
| Tabela 20: Distribuição topográfica da neoplasia.....  | 123 |
| Tabela 21: Estadiamento ao diagnóstico de acordo com a AJCC (2010).....  | 125 |
| Tabela 22: Tratamento cirúrgico e farmacológico dos doentes com cancro colorretal.....   | 126 |
| Tabela 23: Tratamento de quimioterapia efetuado aos doentes com cancro colorretal.....   | 127 |
| Tabela 24: Caracterização da amostra de doentes e controlos.....   | 130 |
| Tabela 25: Análise dos níveis séricos de citocinas e de fatores inflamatórios em doentes com cancro colorretal e controlos.....  | 131 |
| Figura 26: Análise dos níveis séricos de adiponectina (A), leptina (B), resistina (C), visfatina (D), TNF- $\alpha$ (E) e MCP-1 (F) em doentes com cancro colorretal e em controlos..... | 132 |
| Tabela 27: Nível sérico das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios nos doentes com cancro colorretal e nos controlos de acordo com o género.....                                     | 134 |
| Tabela 28: Níveis séricos das adipocitocinas e citocinas inflamatórias de acordo com o Índice de Massa Corporal.....   | 139 |
| Tabela 29: Correlação entre os níveis séricos de adipocitocinas e fatores inflamatórios entre si e com outras características dos doentes com cancro colorretal.....                     | 142 |
| Tabela 30: Níveis séricos das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios em doentes com CCR de acordo com a topografia do tumor.....   | 144 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 31: Níveis séricos das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios em doentes com CCR de acordo com o perímetro da cintura .....      | 145 |
| Tabela 32: Níveis séricos das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios em doentes com CCR de acordo com o estágio do tumor .....          | 146 |
| Tabela 33: Valores medianos das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios segundo a dimensão T do Tumor .....                              | 149 |
| Tabela 34: Capacidade discriminatória das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios na identificação de doentes com cancro colorretal..... | 154 |
| Tabela 35: Capacidade discriminatória das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios na sobrevivência de doentes com cancro colorretal..... | 157 |

## RESUMO

**Introdução:** Os avanços significativos nos últimos anos no conhecimento das bases moleculares e celulares do cancro colorretal (CCR) têm permitido o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, modificando completamente o paradigma da evolução desta neoplasia.

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na carcinogénese, no desenvolvimento e progressão do CCR são múltiplos, ocorrendo em várias etapas, desde a lesão inicial nas criptas (pólipos adenomatosos), ao carcinoma *in situ*, até à sua progressão e metastização.

Para além das múltiplas alterações genéticas e epigenéticas conhecidas, vários estudos têm demonstrado a associação entre obesidade e o aumento da incidência e da mortalidade por cancro. Durante a última década, o tecido adiposo tem ganho importância, pois para além do seu papel no armazenamento de energia, tem-se mostrado um órgão endócrino onde são produzidas várias hormonas e, ou citocinas, denominadas adipocitocinas, com um papel importante na homeostase energética, no metabolismo glucídico e lipídico e na regulação do peso corporal. O aumento da gordura abdominal (visceral) e as alterações metabólicas com ela relacionadas, nomeadamente a insulinoresistência, o hipersinsulinismo, a hiperglicémia, a dislipidémia, a inflamação crónica e o aumento dos radicais livres de oxigénio, levam à maior produção das citocinas provocando um estado inflamatório crónico, o que relaciona a obesidade com o risco de cancro.

As adipocitocinas têm sido relacionadas com vários tipos de cancro, pela sua capacidade de promover proliferação, diferenciação e morte celular. No entanto, o

seu papel no desenvolvimento e progressão do CCR, bem como a sua potencial utilização como marcadores tumorais, não está totalmente estudado.

**Objectivos:** Avaliar a importância clínica dos níveis séricos e de expressão génica das adipocitocinas (Adiponectina, Leptina, Resistina e Visfatina) e das citocinas inflamatórias (MCP-1 e TNF $\alpha$ ) no desenvolvimento e progressão do cancro colorretal, bem como a sua eventual utilização como novos marcadores tumorais que, de um modo não invasivo, permitam fazer um diagnóstico precoce e avaliar o prognóstico dos doentes com CCR, definindo novos grupos de risco.

**Material e Métodos:** Foram seleccionados 89 doentes com o diagnóstico histológico de adenocarcinoma do cólon ou reto, seguidos no Hospital Distrital da Figueira da Foz (HDFF, EPE), e 73 controlos sem doença neoplásica conhecida.

O estudo foi aprovado pelas comissões de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e do HDFF, EPE. Foi efetuada uma entrevista para recolha de dados demográficos, hábitos alimentares, medidas antropométricas e dados relacionados com a história da doença, diagnóstico e evolução. Todos os participantes foram classificados segundo o Índice de Massa Corporal (IMC) e o perímetro da cintura (PC), tendo ainda em atenção a localização topográfica do tumor e o seu estadiamento clínico ou patológico. Foram colhidas amostras de sangue e avaliados vários parâmetros bioquímicos nomeadamente o estado metabólico e a diabetes. Aos doentes foram colhidas amostras de sangue, tecido tumoral e tecido do cólon normal. Aos controlos foram colhidas amostras de sangue e tecido de cólon normal.

Os níveis séricos de Adiponectina, Leptina, Resistina, TNF $\alpha$ , Visfatina e MCP-1 foram determinados por técnicas de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A

expressão dos genes que codificam as citocinas referidas anteriormente foi avaliada através da reacção de polimerização em cadeia em tempo real (Q-PCR).

**Resultados e Discussão:** A amostra constituída por 89 doentes com CCR e 73 controlos, não apresentou diferenças significativas no que diz respeito à idade, IMC e PC (entre os dois grupos), apenas diferindo no género (existe um predomínio do género masculino nos doentes com CCR).

Os valores medianos dos níveis séricos de adiponectina, resistina, visfatina e TNF $\alpha$  foram mais elevados nos doentes do que nos controlos, enquanto os de MCP-1 e de leptina foram mais baixos, sendo estes resultados independentes do IMC e das características do tumor. No entanto, as diferenças encontradas apenas foram estatisticamente significativas para a resistina, visfatina, TNF- $\alpha$  e leptina. Estes resultados sugerem que a resistina, a visfatina, o TNF- $\alpha$  e a leptina podem influenciar o desenvolvimento do CCR.

Observou-se ainda uma correlação negativa significativa ( $p < 0,001$ ) entre os níveis séricos de resistina e a sua expressão génica tecidual, bem como, uma correlação positiva entre a expressão génica no tecido normal e tumoral desta citocina e também da adiponectina e TNF- $\alpha$ .

A análise dos níveis de citocinas séricas como potenciais marcadores preditivos de diagnóstico e/ou de prognóstico, recorrendo a curvas *receiver operator characteristic curve* (ROC), indica que a leptina, a visfatina, o TNF- $\alpha$  e a resistina são as citocinas que apresentam um potencial valor preditivo, embora apenas a resistina seja aquela que apresenta maior poder discriminatório (AUC=0,850). Além disso, os doentes que apresentam níveis mais elevados de adiponectina e visfatina

e, ou níveis mais baixos de leptina são os que apresentam menor sobrevivência global.

**Conclusões:** Os resultados sugerem que o nível sérico de resistina poderá constituir um potencial biomarcador de CCR e que a adiponectina, a visfatina e a leptina poderão influenciar a evolução e sobrevivência dos doentes, podendo contribuir para a identificação de novos grupos de risco. Desta forma, estas citocinas poderão constituir eventuais novos marcadores de prognóstico em doentes com CCR. Contudo, estes estudos necessitam de ser validados através de estudos multicêntricos que englobem um maior número de doentes.

Palavras-chave: Cancro colorretal; tecido adiposo; adipocitocinas; obesidade



---

## ABSTRACT

**Introduction:** The significant advances in recent years in understanding the molecular and cellular bases of colorectal cancer (CRC) have allowed the development of new therapeutic approaches, completely changing the paradigm of the evolution of this neoplasm.

The cellular and molecular mechanisms involved in carcinogenesis, in the development and progression of CRC are multiple, occurring in several stages, from the initial lesion in the crypts (adenomatous polyps), the carcinoma in situ, to its progression and metastasis.

Besides multiple genetic and epigenetic changes already known, several studies have reported an association between obesity and increased incidence and cancer mortality.

During the last decade, adipose tissue has been gaining importance because besides its role in energy storage, it has been shown as an endocrine organ where several hormones and, or cytokines, called adipocytokines, are produced, which have an important role in energy homeostasis in glucidic and lipid metabolism and body weight regulation.

The increase in abdominal fat (visceral) and metabolic disorders related to it, including insulin resistance, hypersinsulinism, hyperglycemia, dyslipidemia, chronic inflammation and increased oxygen free radicals, lead to increased production of cytokines developing a chronic inflammatory condition, which relates obesity to the risk of cancer.

The adipocytokines have been related to several types of cancer, for their ability to promote proliferation, differentiation and cell death. However, its role in the development and progression of CRC, as well as their potential use as a tumor marker is not fully studied.

**Objectives:** To evaluate the clinical significance of serum levels and gene expression of adipocytokines (adiponectin, leptin, resistin and visfatin) and inflammatory cytokines (MCP-1 and TNF $\alpha$ ) in the development and progression of colorectal cancer as well as their possible use as new tumor markers, which through a non-invasive way enable early diagnosis and evaluate the prognosis of CRC patients, defining new risk groups.

**Material and Methods:** 89 patients were selected with the histologic diagnosis of adenocarcinoma of the colon or rectum, followed at the District Hospital in Figueira da Foz (HDFF, EPE), and 73 control individuals without known neoplastic disease.

The study was approved by the ethics commissions of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra and of the HDFF, EPE.

An interview was performed in order to collect demographic data, eating behaviours, anthropometric measurements and data related to the disease history, diagnosis and outcome.

All participants were classified according to the Body Mass Index (BMI) and Waist Circumference (WC), taking into account the topographic location of the tumor and its clinical and pathological stage. Blood samples were collected and biochemical parameters were assessed such as metabolic condition and diabetes.

Patients' samples of blood, tumor tissue and normal colon tissue were collected.

Blood samples and normal colon tissue were collected from control individuals.

The serum levels of adiponectin, leptin, resistin, TNF $\alpha$ , visfatin and MCP-1 were determined by techniques Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The expression of the genes encoding the above cytokines was evaluated by polymerase chain reaction in real time (Q-PCR).

**Results and discussion:** The sample consisting of 89 patients with CRC and 73 control individuals, showed no significant differences regarding age, BMI and WC (between groups), only differing in gender (there is a male predominance in patients with CRC).

The average values of serum levels of adiponectin, resistin, visfatin and TNF- $\alpha$  were higher in patients than in control individuals, whereas MCP-1 and leptin were lower, and these results were independent from BMI and tumor characteristics. However, the differences were only statistically significant for resistin, visfatin, leptin and TNF- $\alpha$ . These results suggest that resistin, visfatin, TNF- $\alpha$  and leptin can influence the development of CRC.

A significant negative correlation was observed ( $p < 0.001$ ) between serum resistin levels and its tissue expression gene and a positive correlation between the cytokine gene expression in normal and tumoral tissue and the adiponectin and TNF- $\alpha$ .

Analysis of serum cytokines levels as potential predictive markers for diagnosis and, or prognosis using receiver operator characteristic curve (ROC) curves, indicates that leptin, visfatin, TNF- $\alpha$  and resistin are the cytokines that have a potential predictive value, although only resistin is the one that has greater discriminatory value (AUC = 0.850). In addition, patients who have higher adiponectin and visfatin levels and/or lower leptin levels are those with lower overall survival.

**Conclusions:** The results suggest that serum resistin level may represent a potential biomarker for CRC and that adiponectin, visfatin and leptin may influence the evolution and survival of patients and may contribute to the identification of new risk groups. As shown, these cytokines may constitute eventual new prognostic markers in CRC patients. However, these studies must be validated through multicentered essays including larger number of patients.

Key words: colorectal cancer; adipose tissue; adipocytokines; obesity

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - percentagem

µg – microgramas

15-PGDH – *hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-nicotinamide adenine dinucleotide*

5-FU – 5-Fluoracilo

5-FU/LV – 5-Fluoracilo/leucoverina ou ácido folínico

Ac – anticorpo

AdipoQ – adiponectina

AdipoR – recetor da adiponectina

AdipoR1 – recetor 1 da adiponectina

AdipoR2 – recetor 2 da adiponectina

ADN – ácido desoxirribonucleico

AINE – anti-inflamatórios não esteróides

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

AKT/PBK – *protein Kinase B*

AMPK – *5' - adenosine monophosphate-activated protein kinase*

APC – *adenomatous polyposis coli*

APM-1 – *adiPose most abundant gene transcript*

BAX – *bcl-2-like protein 4 gene*

BCL2 – *B cell lymphom 2*

BRAF – *sarcoma viral oncogene homolog B*

CBP – *CREB-binding protein*

CCL2 – equivalente da *MCP-1*

CCNPH – carcinoma colorretal não polipóide hereditário

CCR – cancro colorretal

CD14 – *cluster of differentiation 14*

CDC4 – *cell division control protein 4*

CEA – antigénio carcinoembrionário

CIN – instabilidade cromossómica

CK 1 e 2 – *caseinkinase 1 e 2*

*c-MYC* – *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*

COX-2 – ciclo-oxigenase 2

CpG – dinucleótido citosina-fosfato-guanina

CR – cancro do reto

CSC – *cancer stem cell*

CU – colite ulcerosa

DCC – *deleted in colorectal carcinoma*

DGS – Direção Geral de Saúde

DII – doença inflamatória do intestino

DNMT – metiltransferases de ADN

EGF – fator de crescimento epidérmico

EGFR – recetor do fator de crescimento epidérmico

ERK – *extracellular signal regulated kinases*

EUA – Estados Unidos da América

EUROCARE-5 – *European Cancer Registry-based 5*

FAP – polipose adenomatosa familiar

FMUC – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

FOCCO – fotografia do cancro colorretal em Portugal

FOLFIRI - ácido folínico, 5-fluoruracilo, irinotecano

FOLFOX - ácido folínico, 5-fluoruracilo, oxaliplatina

GAPDH – glicerol 3 fosfato desidrogenase

GICD – Grupo de Investigação do Cancro Digestivo

GRO – *chemokine growth-regulated protein*

GSK3B – *glycogen synthase kinase 3 beta*

GST – genes supressores tumorais

HbA<sub>1c</sub> – hemoglobina glicosilada

HDFE, EPE – Hospital Distrital da Figueira da Foz, EPE

HIF-1 – fator de transcrição induzido pela hipóxia

CCNPH - cancro colorretal hereditário não polipóide

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

IC – Instabilidade Cromossómica

ICAM-1 – *intercellular adhesion molecule 1*

ICAMs – *intercellular adhesion molecule*

IGF-1 – *insulin-like growth factor 1*

IGF-1R – *insulin-like growth factor receptor*

IκB – *nuclear factor of kappa light polypeptide*

IL-1 – interleucina 1

IL-12 – interleucina 12

IL-6 – interleucina 6

IMC – Índice de Massa Corporal

IMS – instabilidade de microssatélites

INE – Instituto Nacional de Estatística

iNOS – *inducible nitric oxide synthase*

IQR – amplitude interquartil

JAK2 – *janus kinase 2*

JNK – *Jun N-terminal kinase*

KRAS – *kirsten rat sarcoma oncogene*

LDH - desidrogenase do lactato

LEP – leptina

LEPR – recetor da leptina

LPS – *lipopolysaccharide*

LRP5/6 – *low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*

LV – levofolinato

MAPK – *mitogen-activated protein kinase*

MCP-1 – *monocyte chemoattractant protein-1*

MCPs – *membrane cofactor protein*

MINT – *Msx2 interacting nuclear target*

MLH1 – *mutL homolog 1*

MMP – *metaloproteinases da matriz*

MMR – *mismatch repair*

MSH2 – *mutS homolog 2*

MSH6 – *mutS homolog 6*

mTOR – mammalian-target of rapamycin

MYH – *mut Y Homolog*



n – número de casos

NAD – nicotinamida adenina dinucleotido

NAMPT – *nicotinamide phosphoribosyl transferase*

NCCN – *National Comprehensive Cancer Network*

NFAT – *nuclear factor of activated T-cells NF-kB fator nuclear kB*

NF-kB – fator nuclear kB

ng – nanogramas

NO – óxido nítrico

NOS – espécies reativas de nitrogénio

OBRb – recetor da leptina

OMS – Organização Mundial de Saúde

p38 – *mitogen activated protein kinase*

p50 – *nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit*

p65 – *nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit*

PAS – ácido periódico de Schiff

PBEF – *pre-B cell enhancing factor*

PCR-hs – *proteína creativa de alta sensibilidade*

PET – tomografia de emissão de positrões

pg – picogramas

PI3K – *phosphoinositide 3-kinase inhibitor*

PIK3CA – *phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

PSOF - *pesquisa de sangue oculto nas fezes*

PTEN – *phosphatase and tensin homolog*

RECIST- *Evaluation Criteria In Solid Tumours*

RELMs – *resistina-like molecules*

RETN – *resistina*

RMN – ressonância magnética nuclear

ROC - *receiver operator characteristic curve*

ROM – *reactive oxygen metabolites*

RORC – Registo Oncológico do Centro

ROS - espécies reativas de oxigénio

SF – sigmoidoscopia flexível

SM – síndrome metabólica

*SMAD – protein mother against deceptaplegic*

*SMAD4 – protein mother against deceptaplegic 4*

SNC – sistema nervoso central

SOCS – *suppressor of cytokine signaling*

STAT – *signal transducer and activator of transcription*

STAT3 – *signal transducer and activator of transcription 3*

TAM – macrófagos associados ao tumor

TC – tomografia computadorizada

Tcf/LEF – *transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor 1*

TGFBR2 – *transforming growth factor, beta receptor II*

TGFβ – *transforming growth factor beta*

TLR-2 – *toll-like-receptor-2*

TLR-4 – *toll-like-receptor-4*

TNF – fator de necrose tumoral

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral - alfa

TNM – tumor, nódulo, metástase

TP53 – gene supressor tumoral p53

TRAIL - *TNF related apoptosis inducing ligand*

TS – timidilato sintetase

VCAM-1 – *vascular cell adhesion molecule 1*

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFR – recetor do fator de crescimento do endotélio vascular

WCRF– *World Cancer Research Foundation*

WNT – *Wingless*



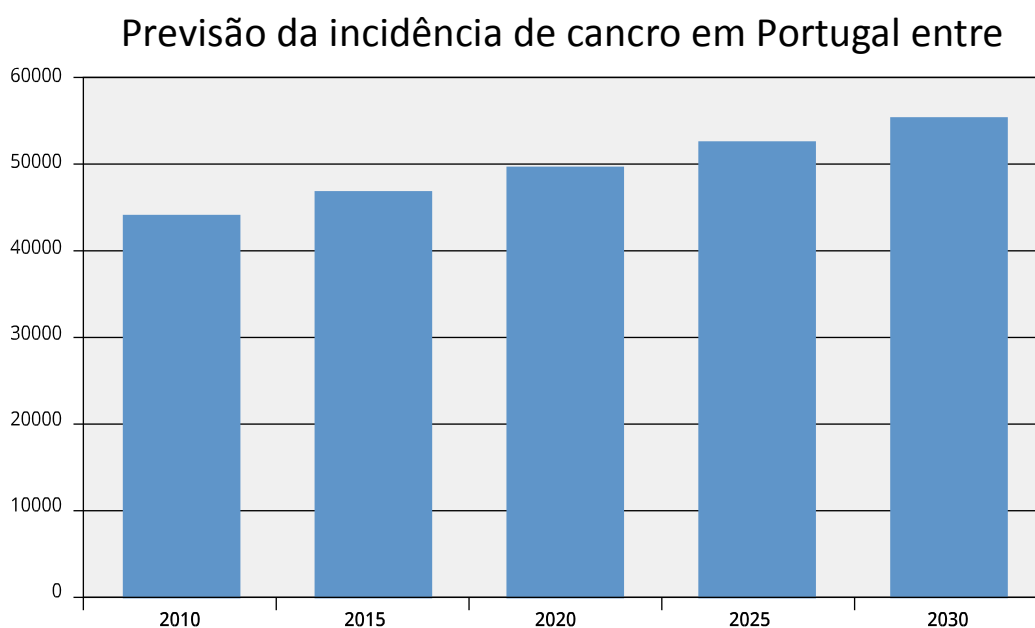
## 1.INTRODUÇÃO

- 1
- 2
- 3

## 1. INTRODUÇÃO

Os desafios que a Medicina irá enfrentar nos próximos anos, nomeadamente na área da oncologia, irão influenciar significativamente a sociedade. O cancro é uma doença que, para além de uma abordagem clínica multidisciplinar, exige uma visão política e social abrangente. Além disso, tem um profundo impacto nos doentes, nos familiares e na sociedade em geral, sendo provavelmente uma das doenças mais temidas pela população (Direção Geral de Saúde, 2013).

Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS), a previsão realizada pela International Agency for Research on Cancer (IARC) para a União Europeia, tendo por base o envelhecimento da população, estabelece um aumento de novos casos de cancro em 13,7%. Também para Portugal, como se pode ver na Figura 1, as previsões apontam para um aumento de 12,6% (Direção Geral de Saúde, 2013).



**Figura 1: Previsão da incidência de cancro em Portugal entre 2010 e 2030.**

Fonte: Portugal – Doenças Oncológicas em números 2013 (Direção Geral de Saúde)

Apesar dos múltiplos avanços na sua abordagem, a taxa de mortalidade por cancro tem estabilizado, nomeadamente em Portugal. No entanto, este indicador nos casos específicos do cancro colorretal (CCR) aumentou até 2011 (Direção Geral de Saúde, 2013).

O desenvolvimento da biologia molecular tem permitido identificar várias moléculas como fatores de crescimento, recetores e vias de sinalização envolvidas na regulação do ciclo celular, na proliferação celular, na angiogénese e na apoptose, que contribuem para os processos envolvidos na oncogénese do cancro do cólon. O conhecimento detalhado da etiologia, dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão do CCR, permite desenvolver abordagens dirigidas para a sua prevenção, rastreio, diagnóstico e terapêutica.

## **1.1.EPIDEMIOLOGIA**

### **1.1.1.INCIDÊNCIA E MORTALIDADE**

A nível mundial o CCR é um dos cancros mais frequentes, atingindo o terceiro lugar em incidência (Danese *et al.*, 2012) e o segundo lugar em causa de morte por cancro. Segundo o *World Cancer Research Foundation (WCRF)*, em 2012 foram registados cerca de 1,4 milhões de casos, representando cerca de 10% da incidência global do cancro. Destes, cerca de 746.000 (54,9%) eram homens e 614.000 (45,1%) mulheres. A WCRF estima que em 2035 sejam diagnosticados cerca de 2,4 milhões de casos.

De acordo com a Tabela 1, os dados publicados em 2013 pela DGS, em Portugal referente a 2007, a taxa de incidência bruta de cancro do cólon era de 42,8 e do reto de 24 por 100.000 habitantes (Direção Geral de Saúde, 2013).



**Tabela 1: Taxa de incidência do cancro colorretal em Portugal, 2007.**

| Género       | Incidência bruta |      |      | Incidência padronizada população europeia |      |      |
|--------------|------------------|------|------|---|------|------|
|              | H                | M    | HM   | H   | M    | HM   |
| <b>Cólon</b> | 50,7             | 35,2 | 42,8 | 39,6                                      | 22,9 | 30,3 |
| <b>Reto</b>  | 31,0             | 17,3 | 24,0 | 24,6                                      | 11,9 | 17,5 |

Fonte: Registo Oncológico Nacional 2007 – RORENO 2013

Segundo o Registo Oncológico do Centro (RORC), em 2010 no Distrito de Coimbra, a taxa de incidência bruta por 100.000 habitantes, foi de 47,14 novos casos para o cancro do cólon, 26,14 para o cancro do reto e de 3,5 para o cancro da região retossigmoideia, o que corresponde a uma incidência superior aos dados nacionais de 2007 (Instituto Português de Oncologia, 2010).

A grande maioria dos casos de CCR corresponde à forma esporádica, embora em cerca de 15% dos casos, possa ser hereditário, familiar como a polipose adenomatosa familiar (FAP) e o cancro colorretal hereditário não polipóide (CCNPH).

A idade tem um maior impacto na incidência do que qualquer outro fator demográfico. A incidência do CCR aumenta significativamente acima dos 45 a 50 anos, sendo a taxa de incidência ajustada à idade maior para os homens do que para as mulheres. No ocidente o CCR é a segunda causa de cancro na mulher, depois do cancro da mama e a terceira no homem, depois dos cancros da próstata e pulmão (Direção Geral de Saúde, 2013).

Segundo o Annual Report to the Nation on the Status of Cancer de 2013, entre 2000 e 2009, assistiu-se a uma estabilidade ou ligeira redução da incidência anual de CCR, bem como a uma ligeira redução da sua taxa de mortalidade, em ambos os géneros,

em todas as raças e grupos étnicos, exceto Índios americanos e nativos do Alaska (National Cancer Institute, 2013).

Alguns autores referem que pode existir uma suscetibilidade diferente para o desenvolvimento do CCR nos diferentes segmentos do cólon, assistindo-se a um aumento da incidência do cancro do cólon direito (cego e ascendente) e sigmóide e à diminuição do cancro do reto (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

### **1.1.2.VARIAÇÃO GEOGRÁFICA**

A incidência do CCR apresenta uma grande variação geográfica. É mais frequente nos países industrializados e urbanizados, como a América do Norte, Austrália, Nova Zelândia e Europa Ocidental, no entanto, a sua incidência tem vindo a aumentar nos países em vias de desenvolvimento. É raro na Ásia, América do Sul e África subsariana (Adams, 2007).

Tem-se verificado que o risco de desenvolver CCR aumenta em populações que migram de zonas de baixo risco para outras de nível elevado. Este facto foi demonstrado num estudo efetuado numa população de Chineses que emigraram para os Estados Unidos da América (EUA), em que a incidência de CCR aumentou em relação à população controlo que permaneceu no seu país de origem. Este aumento de incidência foi atribuído a um maior consumo de carne e à diminuição da atividade física (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011). Também no Japão, país onde a incidência de CCR era baixa, se verificou um aumento progressivo da sua incidência à medida que foi adotada uma alimentação com características mais ocidentais.

Nos homens com alto consumo de carne processada observou-se aumento de risco enquanto nas mulheres com ingestão diária de café o risco diminuiu (Oba *et al.*, 2006).

### **1.1.3.RAÇA E ETNIA**

Atualmente parece haver taxas mais elevadas de incidência e mortalidade associadas à população de raça negra relativamente à caucasiana (Siegel, Naishadham, & Jemal, 2013). Além disso, foi encontrada uma mutação no gene adenomatosis polyposis coli (APC) (I1307K), que confere um alto risco de CCR entre famílias de ascendência judaica (Ashkenazi Jewish), menos frequente noutros grupos (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

### **1.1.4.FATORES SÓCIO-ECONÓMICOS**

As taxas mais elevadas de incidência e mortalidade por CCR têm sido relacionadas com os países economicamente mais favorecidos. O consumo de alimentos com alto teor de gordura, de grande quantidade de carne vermelha, o excesso de álcool, e a falta de exercício físico, levam à obesidade e contribuem para estas elevadas taxas. De acordo com vários estudos prospetivos, existe uma relação entre o aumento do Índice de Massa Corporal (IMC) e o elevado risco de desenvolvimento de CCR. Estes estudos apontam para o facto de esta relação ser mais acentuada no género masculino, estando provavelmente relacionada com uma distribuição predominantemente visceral da gordura, que apresenta uma maior atividade pró-inflamatória (Johnson & Lund, 2007).

Os obesos em geral apresentam cerca de 1,5 a 2 vezes maior risco de desenvolver cancro gastrointestinal, do que os indivíduos saudáveis (Prashant Kant & Mark A. Hull, 2011). A dieta do tipo mediterrânico, que se caracteriza por um baixo consumo de carne vermelha e um elevado consumo de azeite, peixe e vegetais frescos, tem um importante papel na prevenção do CCR, diminuindo a sua incidência. No entanto a correlação negativa encontrada entre o consumo elevado de fibras e a diminuição do risco de CCR ainda não teve resultados consistentes (Dahm *et al.*, 2010).

Estudos de cohort e caso-controlo indicam que a obesidade e a ingestão total de calorias são fatores de risco independentes para o desenvolvimento do CCR (Gonullu, Kahraman, Bedir, Bektas, & Yücel, 2010).

Existem alguns estudos que mostram um ligeiro aumento do risco de CCR associado ao consumo de álcool, particularmente de cancro do reto no género masculino. O alcoolismo crónico, com uma ingestão acima de 45 gramas por dia, através do consumo de folato presente no cólon, aumenta significativamente a incidência de CCR (Baan *et al.*, 2007).

Demonstrou-se ainda, que o tabagismo, de acordo com a carga tabágica, tem influência no desenvolvimento de adenomas, aumentando também o risco de CCR.

Foram efetuados alguns estudos tentando relacionar a ingestão de chá ou café com o aumento de risco de CCR, mas os resultados não confirmaram esta relação (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

A obstipação tem sido considerada como um fator de risco, uma vez que a baixa motilidade intestinal expõe a superfície intestinal a um maior contacto com os agentes carcinogénicos, aumentando a probabilidade de desenvolver CCR.

No entanto, estudos recentes publicados em 2012, mostram que a obstipação a longo prazo não aumenta do risco de CCR (American College of Gastroenterology , 2012).

O exercício físico diminui o risco de cancro por reduzir os níveis de prostaglandina E. Esta prostaglandina tem uma atividade anti-apoptótica, induzindo assim a proliferação da mucosa do cólon e o crescimento tumoral (Sanchez *et al.*, 2012).

#### **1.1.5.LOCALIZAÇÃO ANATÓMICA**

Classicamente, o CCR era identificado como uma doença do cólon distal ou esquerdo. No entanto, verificou-se ao longo dos anos um aumento da sua incidência no cólon proximal ou direito, tanto nos EUA como na Europa ou na Ásia. Estas alterações parecem ser multifatoriais: aumento da longevidade, resposta diferente do cólon direito e esquerdo aos carcinogéneos endoluminais e diferentes fatores genéticos implicados, no cólon proximal, a instabilidade de microssatélites (IMS) e no cólon distal, a via da instabilidade cromossómica (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

#### **1.1.6.OUTROS FATORES DE RISCO**

O risco de CCR está aumentado nas pessoas com antecedentes de pólipos adenomatosos, principalmente se estes forem múltiplos e de grandes dimensões (superiores a 1 cm), se existir displasia grave, se a arquitetura do pólipo for do tipo viloso ou se a idade do diagnóstico for inferior a 60 anos (Walsh, 2003).

A doença inflamatória intestinal (DII), nomeadamente a colite ulcerosa (CU) com evolução prolongada, aumenta o risco de CCR. Nos doentes com mais de 10 anos de

evolução da doença, este risco aumenta progressivamente, atingindo o máximo a partir da quarta década de evolução. A doença de Crohn apresenta igualmente um risco aumentado de CCR, sendo este risco proporcional à área do cólon afetada (Lukas, 2010).

A colecistectomia e a gastrectomia têm sido consideradas nalguns estudos um fator de risco, o que não foi confirmado noutros estudos (Shao T, 2005). Os doentes submetidos a ureterossigmoidostomia, têm igualmente um risco muito aumentado de cancro na mucosa do cólon distal à implantação dos ureteres (Chris C.W. Chan, 2008)(Mehta, Ennis, & Whitten, 2012).

O CCR tem sido também relacionado com o esófago de Barret, com a exposição a radiação (radioterapia ou acidentes nucleares) e com infeção por *Schistosoma japonicum* (H Salim, Hamid, Mekki, Suleiman, & Ibrahim, 2010).

## **1.2.ETIOLOGIA**

### **1.2.1.PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA**

A história familiar de CCR, confere a um determinado indivíduo um aumento do risco para a doença. Verificou-se que o risco relativo de CCR duplica em familiares do primeiro grau de doentes com adenoma. O risco também está aumentado nos familiares em segundo grau. A idade do diagnóstico é igualmente importante, tendo sido descrito um aumento adicional do risco se o familiar foi afetado antes dos 60 anos (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

Existem polimorfismos genéticos que variam de acordo com as raças e etnias e estes podem ser a chave de algumas das variações geográficas (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

### 1.2.2.FATORES AMBIENTAIS

Muitas neoplasias resultam da interação entre a genética e o meio ambiente, estando a maioria das neoplasias relacionadas com a ação de fatores genéticos e ambientais. Os hábitos alimentares são dos fatores ambientais evidenciados na literatura que mais contribuem para o risco de desenvolvimento de CCR, como mencionado. A dieta altamente calórica e a obesidade são fatores de risco independentes para o CCR. O aumento da gordura corporal e abdominal tem sido relacionado com o desenvolvimento deste tipo de cancro (Figura 2) (Tulubas, 2013). Os indivíduos obesos apresentam um maior risco de desenvolver cancro em cerca de 1,5 a 2 vezes em relação aos indivíduos com peso normal (Fazeli *et al.*, 2013).

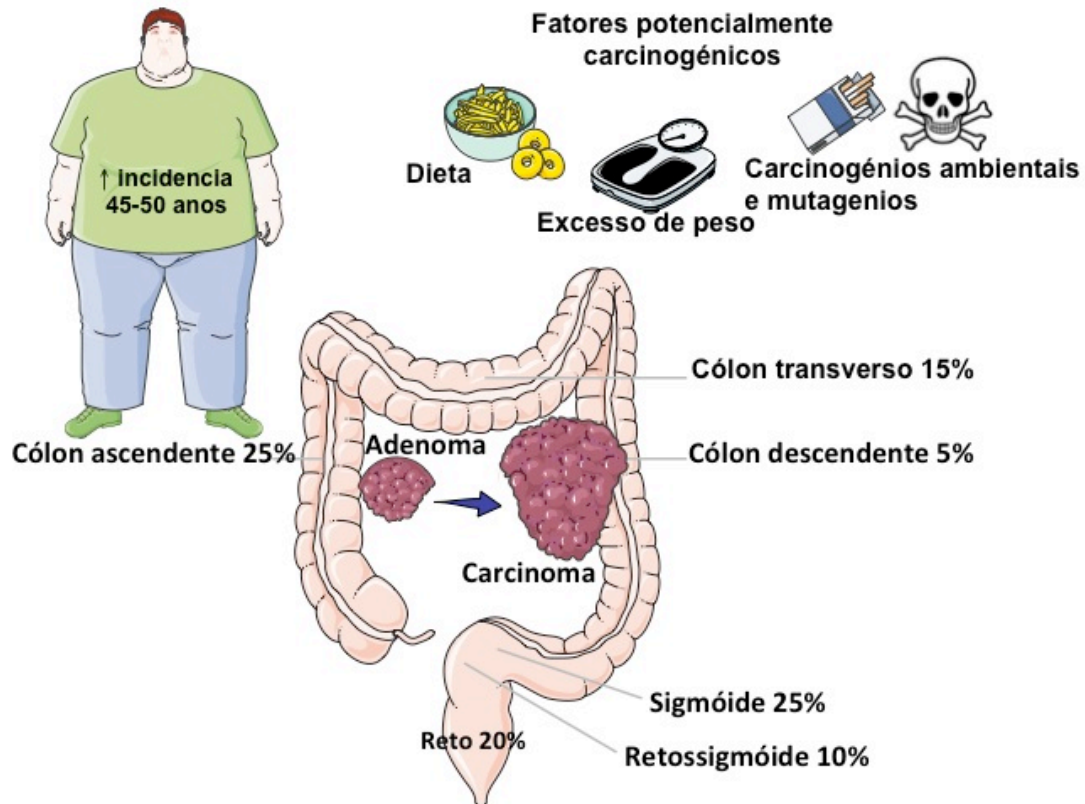
O grande consumo de carne vermelha, particularmente bem cozinhada (frita ou grelhada), está associado a um maior risco de CCR, nomeadamente de cancro do reto, mas não está provado que a ausência da sua ingestão diminua a sua incidência, apresentando os estudos alguns resultados contraditórios (Chan & Giovannucci, 2010).

O grande consumo de gorduras saturadas, nomeadamente a gordura da carne, pode constituir um promotor da proliferação epitelial do cólon, com origem em substâncias carcinogénicas através da ação das bactérias endoluminais (Kato, Majumdar, Land, Barnholtz-Sloan, & Severson, 2010).

A grande ingestão de proteínas pode aumentar a carcinogénese por acelerar a proliferação celular no cólon, mas não há provas definitivas (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

Pelo contrário, a dieta rica em fibras tem estado associada de forma significativa à diminuição do risco de CCR. Aceita-se que esta dieta dilua os carcinogénicos fecais,

acelere o trânsito intestinal e favoreça um ambiente luminal favorável. No entanto, vários estudos epidemiológicos em larga escala e com seguimento de doentes por longos períodos, não comprovaram esta associação protetora (Dahm *et al.*, 2010).



**Figura 2: Fatores que potencialmente contribuem para a incidência do cancro colorretal.**

O consumo regular de fruta, vegetais frescos e alho, tem sido relacionado com efeito protetor em relação ao CCR. Outros agentes como as vitaminas antioxidantes (E, C e A), os folatos, a dieta rica em leite e cálcio têm também sido relacionados com este efeito protetor, mas em estudos populacionais, estes factos não estão totalmente esclarecidos (Papaioannou *et al.*, 2011).

Segundo Edward Giovannucci (2006), estudos recentes confirmam o possível papel preventivo da vitamina D, associada à exposição solar, em relação ao risco de desenvolver CCR. Se a exposição ultravioleta-B solar for baixa será necessário um



consumo superior de Vitamina D. Contudo, é essencial proceder a investigação adicional para determinar os níveis médios necessários de ingestão desta vitamina para reduzir o risco de cancro.

**Tabela 2: Fatores potencialmente envolvidos na carcinogénese colorretal.**

| <b>Fatores de risco para o desenvolvimento do CCR</b>   |
|---|
| <p><b>Idade superior a 50 anos</b><br/> <b>Género masculino</b><br/> <b>História Pessoal de:</b><br/>             <b>Adenoma colorretal</b><br/>             <b>Carcinoma colorretal</b><br/> <b>História Familiar de:</b><br/>             <b>Polipose cólica</b><br/>             <b>Síndromes não associadas a polipose (S. Lynch)</b><br/>             <b>Familiares em 1º grau com CCR</b><br/> <b>Doença Inflamatória Intestinal:</b><br/>             <b>Colite ulcerosa</b><br/>             <b>Doença de Crohn</b><br/> <b>Bacteriémia por <i>Streptococcus bovis</i></b><br/> <b>Ureterossigmoidostomia</b><br/> <b>Colecistectomia</b><br/> <b>Acromegália</b></p> |
| <b>Fatores de risco preveníveis para o desenvolvimento do CCR</b>   |
| <p><b>Dieta:</b><br/>             <b>Rica em carne e gordura animal</b><br/>             <b>Pobre em vegetais e fibras</b><br/>             <b>Pobre em selénio</b><br/> <b>Sedentarismo / Inatividade física</b><br/> <b>Obesidade</b><br/> <b>Tabagismo</b><br/> <b>Alcoolismo:</b><br/>             <b>Consumo de cerveja (cancro do reto)</b></p>   |
| <b>Fatores protetores de desenvolvimento do CCR</b>   |
| <p><b>Anti-inflamatórios não esteróides</b><br/> <b>Inibidores seletivos da COX-2</b><br/> <b>Vegetais</b><br/> <b>Alimentos ricos em carotenos</b><br/> <b>Vitamina C e E</b><br/> <b>Vitamina D</b></p>   |

Adaptado de: Vincent T. DeVita (2011)

CCR: Cancro colorretal; COX-2: Ciclo oxigenase 2; S: Síndrome

Outros trabalhos recentes sugerem os potenciais benefícios da vitamina D noutros tipos de cancro digestivo e na sobrevivência de doentes com CCR, mas necessitam de confirmação (Giovannucci, 2006).

Tem-se demonstrado que a inflamação crónica predispõe ao aparecimento de diferentes tipos de cancro (Hanahan & Weinberg, 2011) e que o uso de anti-inflamatórios não esteróides (AINE) está associado a menor incidência da doença (Steven K.*et al.*, 2005). Vários estudos têm mostrado uma associação protetora entre o uso de aspirina e outros AINE e a incidência tanto de adenomas, como de CCR. A duração do consumo de AINE foi importante, mas foi independente o tipo de AINE utilizado. O cólon proximal beneficia mais da proteção dos AINE do que o cólon distal (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

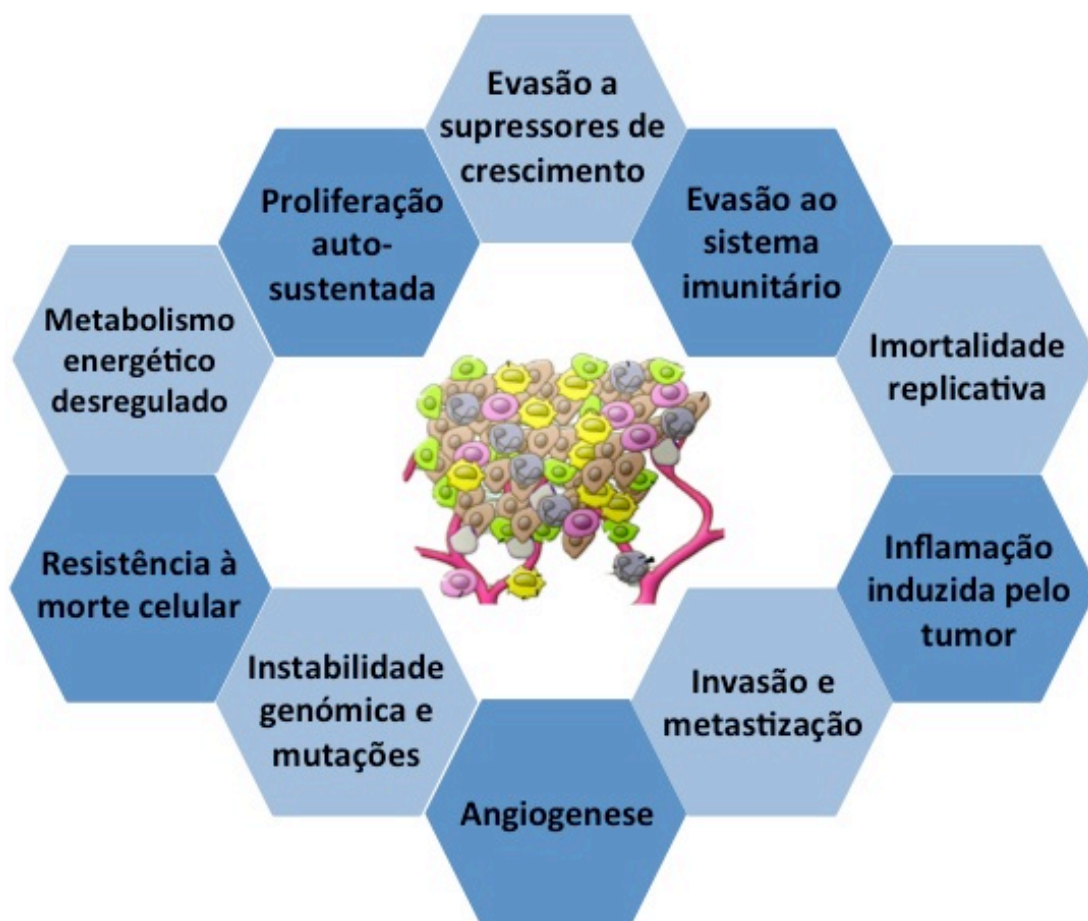
O estilo de vida, nomeadamente o sedentarismo, tem sido relacionado com o aumento do risco para o cancro do cólon e de forma menos significativa para o cancro do reto (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

Face ao exposto anteriormente, e resumido na Tabela 2, conclui-se, que os potenciais fatores de risco e de proteção para o desenvolvimento do CCR são múltiplos e variados.

### **1.3.BIOLOGIA DO CANCRO**

Em 2000, Douglas Hanahan e colaboradores propuseram a hierarquização de algumas capacidades biológicas adquiridas pela célula ao longo da sua evolução que permitisse melhor compreensão do processo de desenvolvimento tumoral, as chamadas “*Hallmarks of cancer*”. Estas incluíam a manutenção da capacidade proliferativa, a evasão a supressores de crescimento, a resistência à apoptose, a

aquisição de imortalidade replicativa, a indução da angiogénese e a capacidade de invasão e metastização (Hanahan & Weinberg, 2011). Contudo, estas características estão apenas centradas na célula neoplásica, o que não explica na totalidade o processo de desenvolvimento do cancro. De facto, o microambiente tumoral é fundamental para o desenvolvimento, manutenção e progressão das células neoplásicas, o que levou a que Hanahan & Weinberg (2011), reformulassem estes “hallmarks”, como se encontra representado na Figura 3.



**Figura 3: “Hallmarks of cancer”.**

A figura representa as várias características do cancro, descritas por Douglas Hanahan e Weinberg. Adaptado de Hanahan & Weinberg (2011).

Podemos observar nesta figura, a manutenção do estímulo proliferativo, a desregulação da energia celular, a resistência à apoptose, a mutação e instabilidade genómica, a indução da angiogénese, a ativação da invasão e metastização, a promoção da inflamação tumoral, a imortalidade replicativa, a destruição da imunidade e a evasão aos supressores tumorais, são os mecanismos envolvidos no cancro postulados por estes autores (Hanahan & Weinberg, 2011).

Além disso, a suscetibilidade individual é importante para determinar quais os indivíduos que, apesar da exposição a muitos destes fatores ao longo dos anos, terão maior risco de desenvolver cancro. Por outro lado, ao longo de vários anos estes fatores interagem determinando quais dos indivíduos suscetíveis irão ser afetados.

### **1.3.1. CARCINOGENÉSE COLORRETAL**

Nos últimos anos, o cancro tem sido considerado uma doença de genes, que quando alterados, estimulados ou desreprimidos conferem à célula características especiais podendo provocar um crescimento descontrolado e, ou resistência à morte celular (Rahman, 2014).

A carcinogénese do CCR é um fenómeno multifatorial e complexo envolvendo a ação combinada de fatores endógenos (genéticos e epigenéticos) e fatores exógenos nomeadamente ambientais (Gonullu *et al.*, 2010).

O adenoma e o carcinoma surgem habitualmente no contexto de instabilidade genómica, em que a aquisição de várias mutações genéticas e, ou epigenéticas são determinantes na evolução de tumor benigno para maligno. A desestabilização do genoma é, pois, uma condição necessária para a ocorrência do tumor. Admite-se a

existência de duas possibilidades para explicar a alteração da dinâmica celular: a primeira defende que apenas as células estaminais correm o risco de transformação maligna, uma vez que as células diferenciadas não vivem o tempo suficiente para acumularem o número de mutações necessário para originar o cancro; a outra perspectiva considera que todas as células correm esse risco uma vez que determinadas mutações em genes específicos podem impedir que as células sofram apoptose e, ou proliferem de forma desregulada (Vicente-Dueñas, Romero-Camarero, Cobaleda & Sánchez-García, 2013).

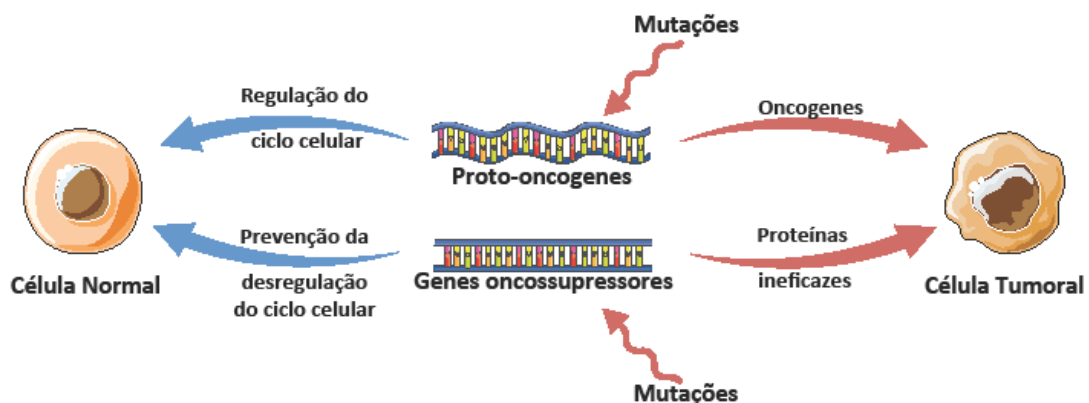
Ao longo dos últimos anos têm sido identificados genes com diferentes funções na carcinogénese: oncogenes, proto-oncogenes, genes supressores tumorais, genes de reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN), genes anti-apoptóticos e genes pró-apoptóticos.

Os oncogenes e proto-oncogenes (exemplo *c-MYC* e *c-RAS*) são genes indutores de cancro, que podem ser ativados por mutações, translocações, ou amplificações, induzidas pelos agentes carcinogénicos (virais, químicos, físicos ou biológicos). A alteração qualitativa e, ou quantitativa das proteínas codificadas pelos oncogenes, pode afetar o controlo do crescimento celular promovendo a formação tumoral (*Cell Biology and Cancer*). Os genes supressores tumorais (GST) (exemplo *PT53*, *pRB*, *p16*, *APC*), pelo contrário, têm um papel importante no controlo da proliferação celular pela sua ação inibidora do crescimento. Durante o processo de desenvolvimento do cancro, por ação dos agentes carcinogénicos, pode ocorrer perda de heterozigotia e, ou do perfil de metilação com perda de função dos GST (*Cell Biology and Cancer*)(Mohandas, 2001).

Os genes de reparação do ADN codificam proteínas envolvidas na reparação do ADN (exemplo MLH1 e MSH2), contribuindo assim para a manutenção da estabilidade e integridade do genoma.

Por fim, os genes pró-apoptóticos (exemplo *BCL-XL* e *BCL2*) estão envolvidos na regulação da morte celular por apoptose, codificando proteínas com funções de promoção da morte celular e controlo da proliferação celular exagerada. A perda de função destes genes ou o aumento de função dos genes anti-apoptóticos, nomeadamente da survivina e *B Cell Lymphoma 2 (BCL2)*, pode contribuir para a resistência à morte celular programada, um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral (Cell Biology and Cancer)(Zingde, 2001).

Neste contexto, o cancro surge em consequência da perda de equilíbrio entre os genes promotores e supressores da oncogénese, verificando-se aumento da expressão dos proto-oncogenes ou dos genes anti-apoptóticos ou diminuição da expressão dos GST e, ou dos genes pró-apoptóticos (Figura 4).



**Figura 4: O papel dos genes no aparecimento da célula tumoral.**

O cancro surge em consequência da perda de equilíbrio entre os genes promotores e supressores da oncogénese.

Adaptado de *Biology Images Unit 1*

Para além do papel dos genes na passagem de características biológicas de uma geração para outra, sabe-se hoje que variações não genéticas adquiridas durante a vida de um organismo podem ser passadas aos seus descendentes. Ao conjunto de modificações do genoma, que pode ser passado aos seus descendentes, sem alterar a sequência das bases do ADN, denomina-se de epigenética (Miranda *et al.*, 2006)

As alterações do epigenoma humano ocorrem no ADN, nas histonas e nos microRNAs [*ribonucleic acid* (RNA)].

As modificações epigenéticas do ADN são efetuadas por metiltransferases e desmetilases de ADN (DNMT), as modificações das histonas por metiltransferases ou desmetilases, a desacetilação das histonas por acetilases ou desacetilases das histonas. A metilação do ADN está habitualmente relacionada com a repressão génica, enquanto a desmetilação do ADN e a acetilação de histonas conduz à ativação da expressão genica (Markowitz & Bertagnolli, 2009).

Tendo em conta os vários fatores acima identificados, a célula, por alterações genéticas ou epigenéticas, pode adquirir a capacidade de se dividir de forma não controlada, de resistir à apoptose e de adquirir a capacidade de invadir os tecidos envolventes e de metastizar à distância (Hanahan & Weinberg, 2011).

A carcinogénese é, por estas razões, um processo multifatorial que ocorre em várias etapas: iniciação, promoção e progressão. A iniciação compreende um conjunto de alterações genéticas irreversíveis, habitualmente num só gene. A promoção está normalmente associada à proliferação das células “iniciadas”. A progressão é consequência da acumulação de novas alterações genéticas e, ou epigenéticas, que levam à aquisição de um fenótipo maligno ou invasivo (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

Estas alterações genéticas e epigenéticas ocorrem durante a carcinogénese do CCR, tendo sido identificadas várias mutações em genes que codificam proteínas reguladoras do ciclo celular, entre os quais os genes *APC*, *KRAS*, *DCC* e *TP53*. Estas mutações podem ocorrer na linha germinativa, manifestando-se por predisposição hereditária para cancro, ou em células somáticas isoladas levando ao aparecimento dos cancros esporádicos (Markowitz & Bertagnolli, 2009).

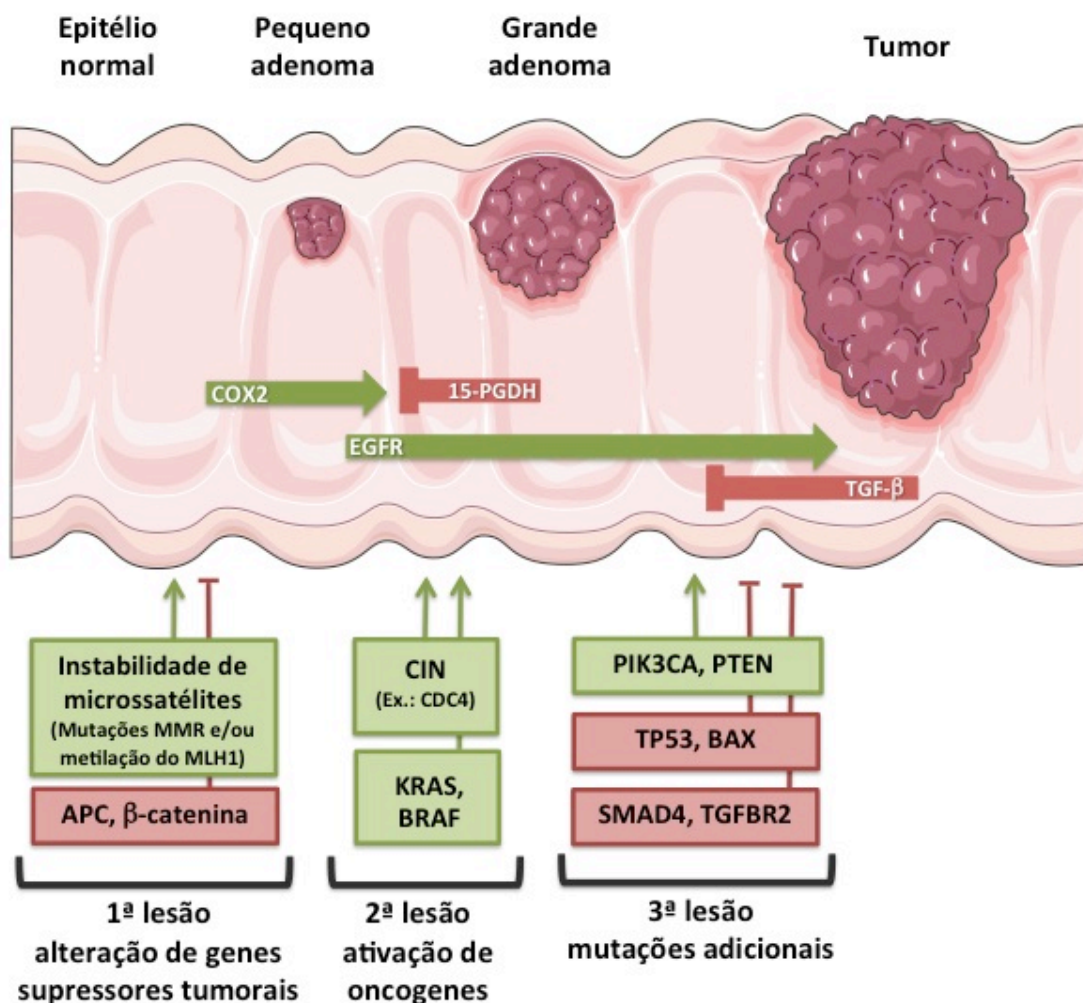
### **1.3.2.PATOGÉNESE DO CANCRO COLORRETAL ESPORÁDICO**

A identificação dos processos moleculares das vias de sinalização celular, nomeadamente dos mecanismos de regulação do ciclo celular, da proliferação, da apoptose e da angiogénese, revelou-se útil para um maior conhecimento do CCR.

O epitélio normal do cólon é um sistema dinâmico, estando preparado para uma rápida proliferação celular. Este está subdividido em  $10^7$  compartimentos, denominados criptas. Cada cripta contém entre 1.000 e 4.000 células. As células normais da mucosa do intestino migram do compartimento proliferativo das criptas, onde existem células estaminais, para se diferenciarem em células de superfície – os enterócitos, as células caliciformes e as entero-endócrinas (Reya & Clevers, 2005). Aproximadamente 1 a 10 das células que constituem as criptas são células estaminais e encontram-se na base. As células resultantes da sua divisão migram no sentido do topo da cripta e, quando atingem a sua porção média, param de se dividir, iniciando a sua diferenciação em células maduras. Quando atingem o topo da cripta sofrem apoptose sendo de seguida fagocitadas ou libertadas no lúmen intestinal. Este processo de migração dura entre 3 a 6 dias, sendo o epitélio intestinal renovado durante este período (Oba et al., 2006).



Na década de 80, Vogelstein e colaboradores, mostraram que os fatores genéticos têm um importante papel na origem, desenvolvimento e progressão do cancro. Estes fatores contribuem ao longo de vários anos, atuando em várias fases, para a evolução da doença desde a mucosa normal, doença pré-maligna, pólipo adenomatoso e CCR (Markowitz & Bertagnolli, 2009).



**Figura 5: Fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento do Cancro Colorretal.**

O cancro colorretal esporádico ocorre principalmente devido à ativação de oncogenes (verde) como o *KRAS* e o *BRAF*, à inativação dos genes supressores tumorais (rosa) como o *PT53* e *APC*, ou dos genes de reparação como o *mutL homolog 1 (MLH1)*.

*APC*: Adenomatous Polyposis Coli; *BRAF*: v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B1; *BAX*: bcl-2-like protein 4 gene; *CDC4*: cell division control protein 4; *CIN*: Instabilidade cromossômica; *COX-2*: Ciclo-oxigenase-2; *EGFR*: recetor do fator de crescimento epidérmico; *IMS*: Instabilidade de Microssatélites; *KRAS*: Kirsten rat sarcoma oncogene; *MMR*: Mismatch Repair; *PIK3CA*: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha; *PTEN*: Phosphatase and tensin homolog; *SMAD4*: Protein Mother Against Decepentaplegic; *TP 53*: gene supressor tumoral p53; *TGFβ*: Transforming Growth Factor, Beta; *TGFBR2*: Transforming Growth Factor, Beta Receptor II; *15-PGDH*: Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-Nicotinamide Adenine Dinucleotide

Adaptado de Markowitz & Bertagnolli (2009)

Como se pode ver nas Figuras 5 e 6, têm sido identificadas várias alterações moleculares na mucosa intestinal, desde a lesão inicial das criptas, passando pelo adenoma, carcinoma *in situ* até ao CCR metastizado.

A evolução da mucosa cólica normal para pólipos adenomatosos e posteriormente para CCR decorre em cerca de uma década. Quando uma célula normal sofre uma mutação, são ativados mecanismos moleculares de reparação, para evitar que essa célula se torne potencialmente maligna.

Estes mecanismos protetores levam à inibição da proliferação celular, à reparação da lesão do ADN e, na impossibilidade de reparação da lesão, à apoptose celular (Pritchard & Grady, 2011). Na maioria dos casos esta proteção é eficaz. No entanto, quando os mecanismos de reparação falham, ocorrem múltiplas mutações genéticas (6 a 10) numa célula previamente normal e se existe um ambiente compatível com o desenvolvimento de novas mutações, estas podem contribuir para o aumento do processo proliferativo com consequente desenvolvimento do fenótipo maligno (carcinoma *in situ*). O aparecimento de novas mutações que regulam genes envolvidos na invasão e metastização levaria à evolução para CCR metastizado (Pritchard & Grady, 2011).

Como se pode ver na Tabela 3, todas estas alterações genéticas conduzem à instabilidade genómica, tendo sido identificados no cancro colorretal esporádico: a instabilidade cromossómica (IC) e a instabilidade de microssatélites (IMS) (Pino & Chung, 2010).

Na IC há acumulação de alterações cromossómicas, tanto estruturais como numéricas, como a perda ou ganho de cromossomas ou parte deles durante a

divisão celular, enquanto na IMS há uma disfunção no processo de reconhecimento e reparação de bases ao nível dos nucleótidos, durante a replicação do ADN.

**Tabela 3: Padrões de Instabilidade Genómica no Cancro Colorretal.**

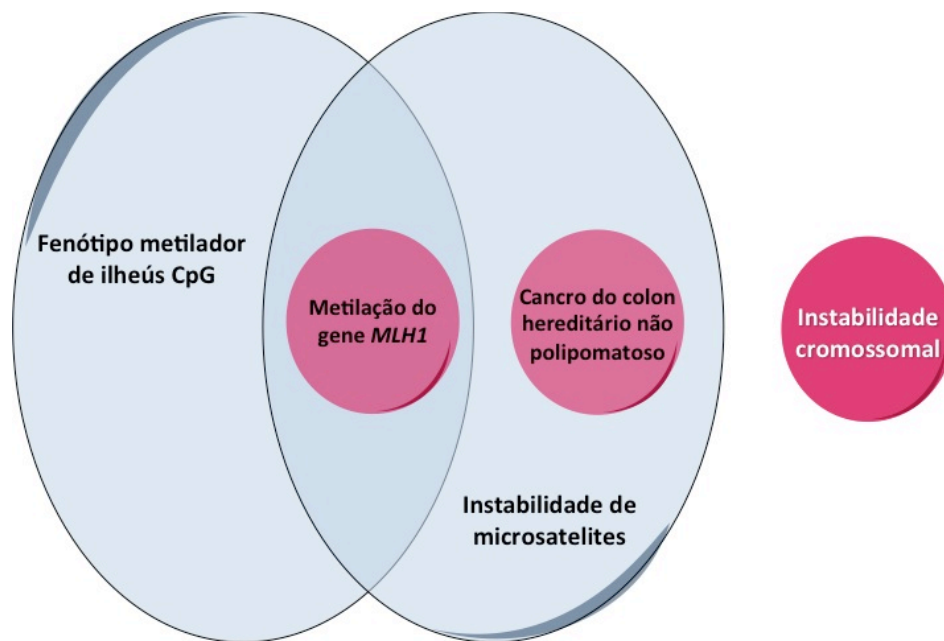
| Tipo de Instabilidade e Síndrome  | Tipo de alteração  | Genes envolvidos  | Fenótipo   |
|---|--------------------|---|--|
| <b>Instabilidade Cromossómica – Perda de heterozigotia em múltiplos Loci</b>                        | Somático           | Perda de heterozigotia no <i>APC</i> , <i>TP53</i> , <i>SMAD4</i> | Característico de 80 a 85% do cancro colorretal esporádico, dependente do estágio  |
| <b>ADN mismatch</b>   | Célula germinativa | Mutações <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> ,                | Cancro colorretal primário múltiplo, progressão tumoral acelerada e aumento do risco de tumores do endométrio, gástrico ou do urotélio   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Cancro do cólon hereditário não polipótico</b></li> </ul> |                    |   |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Cancro colorretal esporádico</b></li> </ul>               | Somático           | Metilação do <i>MLH1</i>  | Cancro colorretal com aumento do risco de pouca diferenciação, mais comum localização no cólon direito, comportamento clínico menos agressivo do que tumores sem défice <i>mismatch-repair</i> |
| <b>Fenótipo metilador – metilação loci alvo</b>   | Somático           | <i>MLH1</i> , <i>MINT1</i> , <i>MINT2</i> , <i>MINT3</i>          | Característica de 15% dos cancros colorretais, com a maioria a mostrar défice <i>mismatch-repair</i> , por perda da expressão tumoral de <i>MLH1</i>   |
| <b>Falta de bases por defeito de reparação</b>  | Célula germinativa | <i>MYH</i>  | Desenvolvimento de 15 ou mais adenomas colorretais com aumento do risco de cancro colorretal   |

*APC*: Adenomatous Polyposis Coli; *MINT*: Msx2 interacting nuclear target protein; *MLH1*: MutL homolog 1; *MSH2*: MutS homolog 2; *MSH6*: MutS homolog 6; *MYH*: mutY Homolog; *SMAD4*: Protein Mother Against Deceptaplegic; TP 53: gene supressor tumoral p53  
Adaptado de Markowitz & Bertagnolli (2009)

A IC foi identificada em cerca de 85% dos casos, enquanto a IMS foi identificada nos restantes 15% dos casos, e corresponde na maior parte dos casos a doentes jovens, com idade inferior a 45 anos (Markowitz & Bertagnolli, 2009; Pritchard & Grady, 2011).

A instabilidade cromossómica é responsável pela perda de heterozigotia, considerado um importante mecanismo de inativação dos genes supressores tumorais. Alguns destes genes estão envolvidos no metabolismo cromossómico, na

dinâmica da cadeia de ADN e na regulação do ciclo celular, nomeadamente na mitose.



**Figura 6: Tipos de instabilidade genómica identificada no cancro colorretal.**

As vias de instabilidade genómica no cancro colorretal relacionam-se através da instabilidade cromossómica e da instabilidade de microssatélites. As alterações observadas nos genes *Mismatch Repair* (MMR) herdadas como lesões na célula germinativa, como no cancro do cólon hereditário não polipóptico, ou adquiridas na célula somática, nomeadamente por metilação e consequente silenciamento do gene *MutLhomolog 1 (MLH1)*, relacionam-se com o fenótipo metilador dos ilhéus dinucleótido citosina-fosfato-guanina (CpG).

Adaptado de Markowitz & Bertagnolli, 2009

A classificação do tipo de alteração cromossómica aplica-se consoante um alelo do gene seja inativado ou perdido (CIN I), sofra mutação (CIN II) ou ocorra mutação de ambos os alelos (CIN III).

As alterações resultantes de mutações genéticas e, ou epigenéticas de genes supressores tumorais como o *APC*, o *DCC*, o *SMAD2*, o *SMAD4* e o *TP53*, ou de mutações em proto-oncogenes como o *KRAS* e o *N-RAS*, têm sido responsabilizadas pela génese do CCR, como referido nas Figuras 4 e 5. O *DCC*, o *SMAD2* e o *SMAD4* estão localizados no cromossoma 18 e a perda alélica tem sido encontrada numa grande percentagem de doentes com CCR (60%). O *SMAD2* e *SMAD4* estão

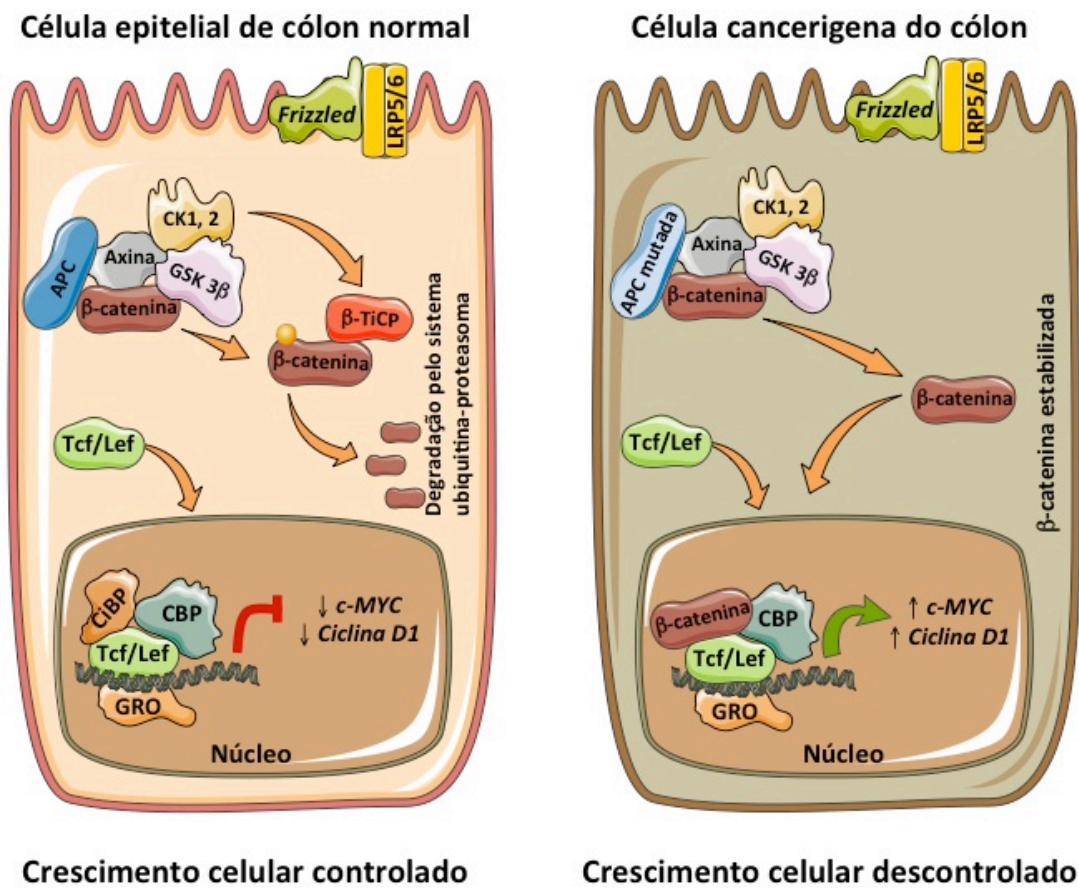
envolvidos na via de sinalização do TGF- $\beta$  o que é importante na regulação da proliferação e morte celular. O *DCC* é promotor da apoptose e mutações neste gene, assim como no *SMAD2*, são eventos raros no CCR (Zingde, 2001).

A proteína p53 é um fator de transcrição, que atua na reparação do ADN, caso exista uma lesão genética, induzindo a expressão de genes apoptóticos quando a lesão é muito grande e impossível de reparar. As alterações no gene *TP53*, através da perda do braço curto do cromossoma 17 (17p), marcam a passagem da doença para uma fase mais invasiva. Vários estudos têm demonstrado que o número e a frequência das alterações do gene *TP53* aumentam à medida que a doença vai progredindo. Estas alterações foram encontradas em 4 a 26% dos adenomas, em 50% dos adenomas com focos de carcinoma e em 50 a 75% dos CCRs (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

Existem duas vias patogênicas envolvidas no desenvolvimento do CCR, a via da IC - *APC*/ $\beta$ -catenina, também conhecida como a via tradicional ou via supressora e a via da IMS, ou via mutadora. A primeira reconhece a existência de mutações genéticas no gene *APC*, conduzindo à disfunção da proteína APC o que contribui para a instabilidade cromossômica. O gene *APC* é um gene de grandes dimensões, contendo 15 exões, com vários domínios funcionais. As alterações nos genes *APC* ou *Mismatch Repair (MMR)* podem ser hereditárias (atingindo a linha germinativa), no caso da FAP e do CCNPH, ou podem ser adquiridas após o nascimento (mutações somáticas). Cerca de 80% dos pólipos adenomatosos apresentam mutações no gene *APC*. A mutação ou hipermetilação neste gene, e a sua consequente disfunção, conduz à instabilidade cromossômica, iniciando o processo de carcinogênese do CCR (DeVita, Hellman, & Rosenberg, 2005).

A alteração da via de sinalização mediada pela proteína WNT (*Wingless*), envolvendo a  $\beta$ -catenina nuclear, é a principal via envolvida no crescimento, diferenciação e apoptose celular que ocorre no intestino ao longo do eixo cripta, vilosidade (Figura 7).

Além da via WNT, a sinalização mediada pela via *Notch* desempenha também um papel importante no desenvolvimento e homeostase do intestino normal.



**Figura 7: Um modelo para a via de sinalização Wnt.**

À esquerda observa-se a célula epitelial do cólon normal com um crescimento celular controlado, através da via de regulação da  $\beta$ -catenina.

À direita observar-se uma célula cancerígena do cólon com o seu crescimento descontrolado, induzido pela mutação no gene APC.

APC: Adenomatous Polyposis Coli; CBP - CREB-binding protein; CK 1 e 2: Casein Kinase 1 e 2; cMYC: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian); GRO: chemokine growth-regulated protein; GSK3B: glycogen synthase kinase 3 beta; LRP5/6: Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6; Tcf/LEF: Transcription factor/Lymphoid enhancer-binding factor 1

Adaptado de Satya Narayan and Deo dutta Roy, (2003)

Estas vias de sinalização regulam os fatores promotores do crescimento celular e a expansão de células epiteliais (epitélio hiperproliferativo e, ou displasia) podendo levar ao aparecimento de um adenoma. A progressão do tumor é desencadeada pela ativação do oncogene *RAS*.

A inativação do gene supressor tumoral *TP53*, leva ao desenvolvimento de carcinoma *in situ* e, na presença de alterações genéticas adicionais, este torna-se um carcinoma invasivo com capacidade de metastizar (Pritchard & Grady, 2011; Reya & Clevers, 2005).

Os tumores colorretais apresentam uma percentagem elevada de mutação na via APC, de cerca de 60% para o cancro do cólon e de 82% para o cancro do reto. Nos adenomas também podemos encontrar esta mutação em cerca de 80% dos casos, semelhante à que se verifica para o gene *TP53*, que ronda os 95%. As mutações somáticas presentes quando há alterações na via *RAS/RAF*, surgem em cerca de 70% dos casos de CCR.

Para além dos fatores mencionados anteriormente, polimorfismos e mutações em outros genes, bem como fatores ambientais e a obesidade podem modular a expressão fenotípica do genótipo tumoral.

À semelhança das células tumorais em geral, as células do CCR expressam antigénios que levam a uma resposta do sistema imune, com infiltração do tumor por Linfócitos T citotóxicos e macrófagos e a uma reação de hipersensibilidade retardada (Baier, Wolff-Vorbeck, Eggstein, Baumgartner, & Hopt, 2005).

Os macrófagos, células derivadas dos monócitos, diferenciam-se nos vários tecidos do organismo, em resposta ao ambiente tecidual, em dois tipos de células com atividade diferente: os macrófagos tipo 1 (M1) e os macrófagos tipo 2 (M2). Os M1

são células capazes de exercer atividade citotóxica sobre as células tumorais, fagocitando restos de células necróticas ou apoptóticas, apresentando antígenos para as células T. Os M2 têm capacidade para promover a angiogénese e a progressão tumoral. Vários estudos têm demonstrado a presença de numerosos macrófagos nos tecidos tumorais, os chamados macrófagos associados ao tumor (TAM), relacionando a alta densidade destas células com pior prognóstico para vários tipos de cancro. (Honda, Inagawa, & Yamamoto, 2011). Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que a via de sinalização do fator nuclear NF- $\kappa$ B, nos tumores associados aos macrófagos, é importante para a iniciação e crescimento tumoral (Honda *et al.*, 2011).

Além do mencionado, o impacto da Síndrome Metabólica (SM), do IMC e outros dados antropométricos no aparecimento do CCR têm sido investigados em vários estudos epidemiológicos (Danese *et al.*, 2012), demonstrando uma associação entre obesidade e CCR, tanto no género masculino como no feminino (Gonullu *et al.*, 2010). Estes estudos salientam que o aumento do peso parece ter um papel na carcinogénese do CCR, pelo menos no contexto da insulinoresistência e hiperinsulinismo (Gonullu *et al.*, 2010).

Por outro lado, quando o tecido adiposo se expande, os adipócitos sofrem hipertrofia e aumentam a produção de fatores que atraem monócitos para o interior dos tecidos, os TAM, promovendo um estado inflamatório local (van Kruijsdijk, van der Wall, & Visseren, 2009). Este microambiente inflamatório do tecido adiposo é caracterizado por hipoxia e diminuição da glicemia, aumento das citocinas inflamatórias, das espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de nitrogénio (NOS), o que contribui para a instabilidade cromossómica e de



microsatélites Característica do cancro. Um dos principais fatores ativados pela hipoxia é o fator de transcrição induzido pela hipoxia (HIF-1), um importante regulador da homeostase do oxigénio, da proliferação celular e da angiogénese, e por conseguinte da metastização e progressão tumoral (Guilherme, Virbasius, Puri, & Czech, 2008; van Kruijsdijk et al., 2009).

As alterações do tecido adiposo, nomeadamente a hipertrofia dos adipócitos, aumentam a produção de adipocitocinas e de citocinas pró-inflamatórias. (van Kruijsdijk *et al.*, 2009). A inflamação crónica é comum a muitos tipos de cancro, nomeadamente cancro do cólon, fígado, estômago e mama. Os componentes da inflamação estão presentes no microambiente tumoral, promovendo os processos de iniciação do cancro.

### **1.3.3.CANCRO COLORRETAL HEREDITÁRIO**

As causas de CCR são múltiplas e complexas, como referido anteriormente, podendo ser hereditárias e não hereditárias. Os fatores genéticos têm um papel importante na iniciação, desenvolvimento e progressão do pólipo adenomatoso até CCR. Cerca de 20 a 30% dos doentes com CCR tem uma história familiar de doença, sugerindo uma predisposição hereditária, independentemente do seu enquadramento em síndromes conhecidas (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

A neoplasia do cólon associada à hereditariedade pode ser dividida em 2 grandes grupos: as síndromes com polipose e as síndromes não polipóides. No primeiro grupo incluem-se as síndromes que envolvem os pólipos adenomatosos (FAP, a Síndrome de Gardner, a Síndrome de Turcot e a Polipose Cólica Adenomatosa

atenuada) e aqueles em que predominam os pólipos hamartomatosos (Síndrome de Peutz-Jeghers e a Polipose Familiar Juvenil). No segundo grupo, as síndromes hereditárias não polipóides, incluem-se a síndrome de Lynch ou o CCNPH, que representam cerca de 3% de todos os cancros do intestino grosso.

As mais frequentes destas síndromes hereditárias são a FAP e o CCNPH, sendo o risco de desenvolver CCR nestes doentes de 70% e 90%, respetivamente.

A FAP é uma doença autossómica dominante em que existe uma mutação no gene *APC*, herdado com cerca de 100% de penetrância.

A mutação no gene *APC* ocorre em cerca de 82% das famílias. Esta síndrome é caracterizada pela presença de centenas ou milhares de pólipos adenomatosos ao longo do cólon, ou em qualquer parte do aparelho digestivo. Os adenomas desenvolvem-se aproximadamente 10 anos antes do aparecimento do cancro e, provavelmente, todos os indivíduos portadores desta síndrome, que não sejam submetidos a colectomia, desenvolverão CCR. A probabilidade destes indivíduos apresentarem CCR a partir da quarta década de vida é de quase 100%. Contudo, esta síndrome contribui apenas para cerca de 1% de todos os casos de CCR. Geralmente, o aparecimento do primeiro pólipo ocorre na terceira década da vida, manifestando-se os primeiros sintomas na quarta década da vida. O diagnóstico é feito habitualmente depois dos 40 anos. As manifestações extra-intestinais incluem osteomas mandibulares, pólipos gástricos, adenomas da supra-renal e hipertrofia congénita do epitélio pigmentar da retina.

O CCNPH é uma doença associada a mutações de genes de reparação do ADN, que ocorrem na linha germinativa nomeadamente do sistema *Mismatch Repair* (MMR). A incidência da mutação do gene *MMR* é de aproximadamente 1 em cada 1000

---

indivíduos. Este tipo de cancro do cólon surge precocemente, habitualmente no cólon direito, frequentemente com múltiplas lesões. Apesar de ser mais frequente o aparecimento deste cancro antes dos 45 a 50 anos, é possível que surja em idades mais avançadas. O CCNPH contribui para cerca de 3% de todos os casos de CCR. Associa-se a tumores de outros órgãos, como o estômago, intestino delgado, ovário, endométrio e urotélio. Os doentes com síndrome de Lynch, apresentam também adenomas, embora em percentagens idênticas às da população geral e habitualmente em idades mais precoces.

## 1.4. BIOMARCADORES TUMORAIS NO CANCRO COLORRETAL

Ao longo dos anos têm-se procurado determinar substâncias segregadas pelo tecido tumoral e detetáveis em células ou produtos orgânicos, nomeadamente no sangue periférico, na saliva, na urina ou nas fezes, que constituam marcadores capazes de detetar uma neoplasia, os chamados marcadores tumorais. Mais recentemente incluíram-se nesta pesquisa os tecidos normais ou tumorais.

A utilização destes marcadores ultrapassa a deteção precoce, podendo ser utilizados na estratificação de risco para o desenvolvimento de uma neoplasia, para estabelecimento do prognóstico e para a instituição de determinadas estratégias terapêuticas e sua monitorização.

Para que estes marcadores tumorais sejam úteis devem ser capazes de indicar a presença da neoplasia, o seu grau de evolução e, ou progressão, a resposta à terapêutica e o aparecimento de recidiva.

Os marcadores tumorais podem ser múltiplos: hormonas, proteínas, enzimas, antigénios, anticorpos, citocinas, genes entre outros.

Ao longo dos anos, tem havido tentativas para identificar um ou mais marcadores tumorais para o CCR. Entre estes marcadores, destacam-se os mais conhecidos: o CEA, o CA19.9 e o KRAS.

O Antígeno Carcinoembrionário (CEA), descoberto na década de 1960, é uma glicoproteína envolvida na adesão celular e produzida na mucosa intestinal do embrião e feto. Habitualmente não está presente, ou está presente numa pequena quantidade, no sangue do adulto saudável, com excepção dos indivíduos com hábitos tabágicos acentuados, em que se podem encontrar níveis significativamente elevados. Pode ser avaliado em amostras do sangue periférico, constituindo o

marcador mais usado na prática clínica, nas neoplasias colorretais. Também pode estar elevado noutra tipo de cancro, como o do pulmão. É um marcador com baixa sensibilidade para lesões iniciais (20 a 40%) pelo que é inútil para rastreio ou diagnóstico precoce. Tem-se revelado bastante útil nos doentes em que se encontra elevado ao diagnóstico, para o estabelecimento de índices de prognóstico, no seguimento pós-operatório e monitorização da resposta à terapêutica onde tem mostrado uma alta sensibilidade (90%) e na deteção de recidivas locorregionais de progressão da doença ou de metastização à distância (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

O CA 19.9 é um antigénio carbohidrato produzido no epitélio do trato gastrointestinal do feto, em muitas células de mucosas e em carcinomas. É também conhecido como antigénio de Lewis. Está principalmente relacionado com o cancro do pâncreas e trato biliar, estando nesta situação indicado o seu doseamento ao diagnóstico para posterior monitorização da sua evolução. Encontra-se frequentemente elevado no CCR, mas apresenta uma baixa especificidade e sensibilidade. Quando se encontra elevado serve também para monitorização da evolução da doença, embora não exista indicação para o seu uso por rotina (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

Um outro tipo de teste não invasivo, que também tem sido investigado é a pesquisa de ADN do CCR nas fezes. A identificação no ADN fecal de mutações, nomeadamente nos genes *APC*, *KRAS*, *TP53*, que não sofrem transformação na sua passagem pelo tubo digestivo é bastante específica. No entanto não deteta muitas das mutações existentes. Além disso é um método muito caro, pouco disponível e que não é recomendado para a utilização na prática clínica. Nos Estados Unidos da

América existe comercializado um teste para pesquisa da Vimentina metilada nas fezes, que é um marcador validado para deteção precoce de CCR, que se baseia no facto de muitos dos CCR serem portadores de uma metilação aberrante do gene da Vimentina (Pritchard & Grady, 2011).

Nos últimos anos têm sido investigados vários marcadores moleculares, com o objetivo de estratificação do risco de CCR. Os marcadores com maior exatidão são as mutações nos genes das células germinativas responsáveis pelas síndromes de cancro do cólon hereditário como as mutações no gene *APC*, como indicador de risco de FAP, e a IMS, como indicador da possibilidade da síndrome de Lynch. No entanto, o diagnóstico de síndrome de Lynch requiere a pesquisa de múltiplas mutações nos genes das células germinativas, nomeadamente *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, pelo que é bastante dispendioso (Pritchard & Grady, 2011).

A IMS e a IC são também usadas como marcadores de prognóstico do CCR, sendo estabelecida uma melhor evolução para os CCR com IMS e uma evolução mais desfavorável para os que apresentam IC. Identicamente está estabelecida a relação de agravamento de prognóstico nos doentes com *KRAS* ou *BRAF* mutados em relação aos Wild-type que têm um melhor prognóstico, particularmente nos estádios mais avançados (Pritchard & Grady, 2011).

O valor prognóstico do *KRAS* é de particular interesse no CCR avançado, pelo que se faz a sua determinação por rotina, porque o *KRAS* mutado é um preditor da eficácia da terapêutica com anticorpos monoclonais anti-EGFR, condicionando a elegibilidade para tratamento com cetuximab ou panitumumab. Os estudos parecem apontar para resultados semelhantes aos do *KRAS* mutado, nos doentes com *BRAF* V600E mutado (Pritchard & Grady, 2011).

Contudo, ainda não foi identificado o marcador ideal, tendo em vista a prática clínica.

## 1.5. ADIPOCITOCINAS E CANCRO COLORRETAL

A obesidade é uma “epidemia” crescente que afeta tanto os países desenvolvidos como os países em vias de desenvolvimento, sendo uma das principais causas mundiais de mortalidade e morbidade. Está bem estabelecido que a obesidade induz aumento do risco para desenvolver doenças cardiovasculares, Diabetes *Mellitus* tipo 2, doença renal, problemas respiratórios, depressão e artrite. Nos últimos anos, múltiplos estudos têm demonstrado a associação entre a obesidade e o aumento da incidência de cancro, bem como, a obesidade e o aumento da mortalidade por cancro (Alexander J. Rodríguez, Claudio Mastronardi, 2013).

Durante a última década, o tecido adiposo tem vindo a ganhar importância, não só como um tecido para o armazenamento de energia, mas também como um órgão endócrino (Danese *et al.*, 2012). Várias hormonas e citocinas, denominadas adipocitocinas, são sintetizadas e libertadas pelo tecido adiposo (Alexander J. Rodríguez, Claudio Mastronardi, 2013). As adipocitocinas têm um papel importante na homeostase da energia, do metabolismo glucídico e lipídico e na regulação do peso corporal.

Desde que em 2002, Bray relacionou a obesidade com algumas formas de cancro, os investigadores têm tentado descobrir o possível papel das adipocitocinas na carcinogénese (Fazeli *et al.*, 2013; Housa, Housová, Vernerová, & Haluzík, 2006) nomeadamente o seu papel nas cascatas de sinalização de tecidos alvo (Danese *et*

*al.*, 2012). Tem sido sugerido que as adipocitocinas têm um papel na patogênese e evolução de determinados câncros (Nakajima *et al.*, 2010), promovendo a proliferação, a diferenciação e morte celular, pelo que poderão vir a constituir um marcador importante no cancro.

As adipocitocinas são um grupo de hormonas derivadas do tecido adiposo, descobertas há pouco mais de duas décadas. O primeiro membro da família, identificado em 1994 pelo grupo de Friedmann, foi a leptina (Housa *et al.*, 2006).

Podem ser divididas em 3 grupos: a) hormonas produzidas primariamente noutros tecidos ou órgãos, mas que são simultaneamente produzidas no tecido adiposo (exemplo TNF- $\alpha$ ); b) hormonas produzidas principalmente no tecido adiposo, mas podendo ser produzidas por outras células, nomeadamente células imunocompetentes (exemplo resistina); c) hormonas produzidas predominante ou exclusivamente nos adipócitos do tecido adiposo branco, exemplo leptina e adiponectina (Housa *et al.*, 2006).

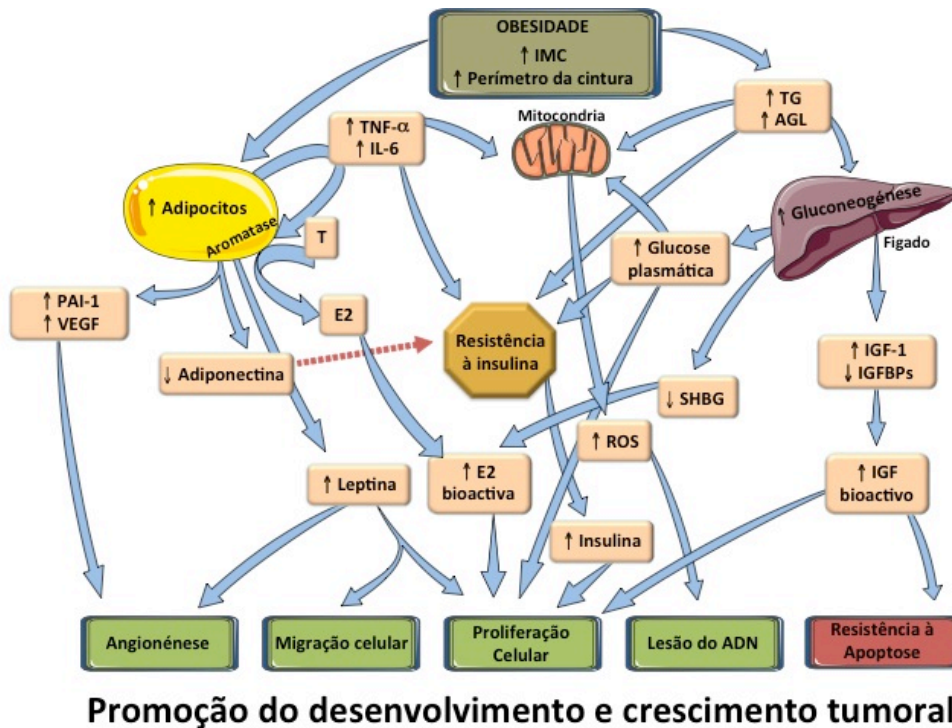
Até à presente data foram descritas cerca de 20 adipohormonas, classificadas em 2 grupos de acordo com o seu papel fisiológico: indutoras de insulinoresistência (resistina, TNF alfa e IL-6) e insulino sensibilizantes (leptina, adiponectina e, mais recentemente, a visfatina) (Housa *et al.*, 2006). O aumento da gordura abdominal (visceral) e consequente aumento das citocinas produz um estado inflamatório crónico, o que relaciona a obesidade com o risco de cancro (Tulubas, Mete, Oznur, & Topcu, 2013).

Além disso, a gordura visceral e as alterações metabólicas com ela relacionadas têm sido identificadas como tendo um importante papel na carcinogénese do CCR. O perímetro da cintura e a razão cintura-anca, como marcador de acumulação da



gordura abdominal, tem sido considerado como fator de risco de CCR em ambos os géneros. No entanto, o IMC como marcador genérico da obesidade foi identificado como fator de risco para CCR no homem, mas não na mulher (Aleksandrova *et al.*, 2013).

Como se pode ver na figura 8, existem outras alterações metabólicas que têm sido relacionadas com o aumento do risco de CCR, nomeadamente o hipersinsulinismo, a hiperglicémia, a dislipidémia, a inflamação crónica e o aumento dos radicais livres de oxigénio.



**Figura 8: Citocinas, obesidade e cancro.**  
Adaptado de Stephanie Cowey and Robert W. Hardy, 2006

Neste contexto, existem biomarcadores circulantes que podem ser avaliados e que têm sido validados em vários estudos, como por exemplo o peptídeo C, a hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>), o colesterol HDL, a proteína C reativa de alta

sensibilidade (PCR<sub>hs</sub>) e os *reactive oxygen metabolites* (ROM) (Aleksandrova *et al.*, 2013).

A insulina, para além do seu papel na regulação do metabolismo, é considerada uma hormona mitogénica que devido ao seu papel no crescimento celular e inibição da apoptose pode estar envolvida na carcinogénese do CCR. Estas ações da insulina podem ser mediadas pelo IGF-1, cujas concentrações séricas estão aumentadas na obesidade, o que poderá contribuir para a proliferação celular descontrolada (Aleksandrova *et al.*, 2013).

Por outro lado, a obesidade e a insulinoresistência podem estar associadas a alto risco de doenças humanas graves, tais como doenças cardiovasculares, diabetes, alterações na imunidade, na formação óssea e desenvolvimento de cancro em vários órgãos.

Inicialmente, pensou-se que as adipocitocinas eram produzidas apenas pelos adipócitos. No entanto, está bem documentada a sua produção por outros órgãos como a placenta, tecidos epiteliais do estômago, cólon, reto e mama.

As adipocitocinas que se irão abordar são a adiponectina, a leptina, a resistina, a visfatina, o *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) e o TNF- $\alpha$ .

### **1.5.1.ADIPONECTINA**

A adiponectina foi inicialmente identificada como uma proteína expressa numa linha celular de adipócito de rato (linha celular 3T3-L1). A adiponectina humana foi descrita um ano mais tarde por Kazuhisa Maeda tendo sido denominada apM-1 (*AdiPose Most abundant gene transcript 1*) (Nakajima *et al.*, 2010). Esta adipocitocina é também designada de GBP-28 (*gelatin binding protein-28*), adipoQ,

adipsina e Acrp30. É uma proteína com 30 kDa de peso molecular, produzida principalmente nos adipócitos maduros (Gulcelik *et al.*, 2012) e nos brancos (Nakajima *et al.*, 2010), embora também haja algumas referências à sua expressão no tecido adiposo castanho (Nakajima *et al.*, 2010). É produzida principalmente pela gordura abdominal visceral e em menor quantidade pelo tecido adiposo subcutâneo, perivascular e epicárdico. Pode ser ainda segregada por cardiomiócitos, hepatócitos e placenta, embora em concentrações inferiores. Esta hormona polipeptídica foi identificada em 1996 por Hu E. e colaboradores, é constituída por 244 aminoácidos, sendo codificada pelo gene *adipoQ* (adiponectina) (Hu, Liang, & Spiegelman, 1996). Este gene está localizado no braço longo do cromossoma 3 (3q27) (Abdul-Ghafar *et al.*, 2013; Gulcelik *et al.*, 2012) no *locus* de suscetibilidade para *Diabetes Mellitus* e doenças cardiovasculares.

Até ao momento foram descritos dois recetores para a adiponectina: o AdipoR1 e o AdipoR2, com 7 domínios transmembranares. Os genes para estes recetores localizam-se nos cromossomas 1q32 e 12p13, respetivamente. O primeiro é o recetor para a adiponectina globular, abundantemente expresso no músculo-esquelético e no fígado, o segundo interage com a adiponectina completa sendo principalmente expresso no fígado, estando também presente nos monócitos e macrófagos.

A adiponectina tem alguns efeitos conhecidos no processo metabólico, tal como a supressão da gluconeogenese, o aumento da utilização da glicose, a oxidação dos ácidos gordos, a *clearence* dos triglicerídeos, a proteção da disfunção endotelial, a sensibilidade à insulina e a perda de peso (Gulcelik *et al.*, 2012; Tulubas, Mete, Oznur, & Topcu, 2013).

Vários estudos têm estabelecido uma associação entre a adiponectina, a obesidade e o cancro. No entanto, pouco ou nenhum realce se tem dado à relação entre estas adipocitocinas em indivíduos com cancro e não obesos. Os níveis de adiponectina circulantes têm sido estudados por vários grupos que verificaram que se apresentam significativamente mais baixos em doentes com adenoma do cólon relativamente a indivíduos saudáveis (Erarslan et al., 2009; Tulubas et al., 2013). Assim, poderão constituir um fator de risco para o desenvolvimento e progressão de várias doenças malignas relacionadas com a obesidade.

Por outro lado, tem se verificado que os níveis desta adipocitocina se encontram inversamente correlacionados com a percentagem de gordura corporal, estando diminuídos na obesidade (Arita e tal., 1999)(Gulcelik et al., 2012). Abdul-Ghafar e colaboradores (2013), também observaram que os níveis de adiponectina se encontram inversamente correlacionados com o IMC, com situações de insulinoresistência, como a obesidade visceral e com a *Diabetes Mellitus* tipo 2. (Abdul-Ghafar et al., 2013), e que a perda de peso aumenta significativamente os seus níveis circulantes (Gulcelik et al., 2012).

De um modo geral, os níveis plasmáticos de adiponectina variam entre 5 e 30 µg/mL em indivíduos saudáveis, sendo mais elevados nas mulheres do que nos homens (Gulcelik et al., 2012) e mais baixos nos indivíduos diabéticos (Gulcelik et al., 2012). Nos casos de insulinoresistência a diminuição da adiponectina está positivamente relacionada com a sensibilidade à insulina. No entanto, outros estudos demonstram que os fumadores apresentam níveis mais baixos de adiponectina do que os não fumadores (Abdul-Ghafar et al., 2013) e que o consumo de álcool inibe diretamente a produção de adiponectina pelo tecido adiposo, sendo

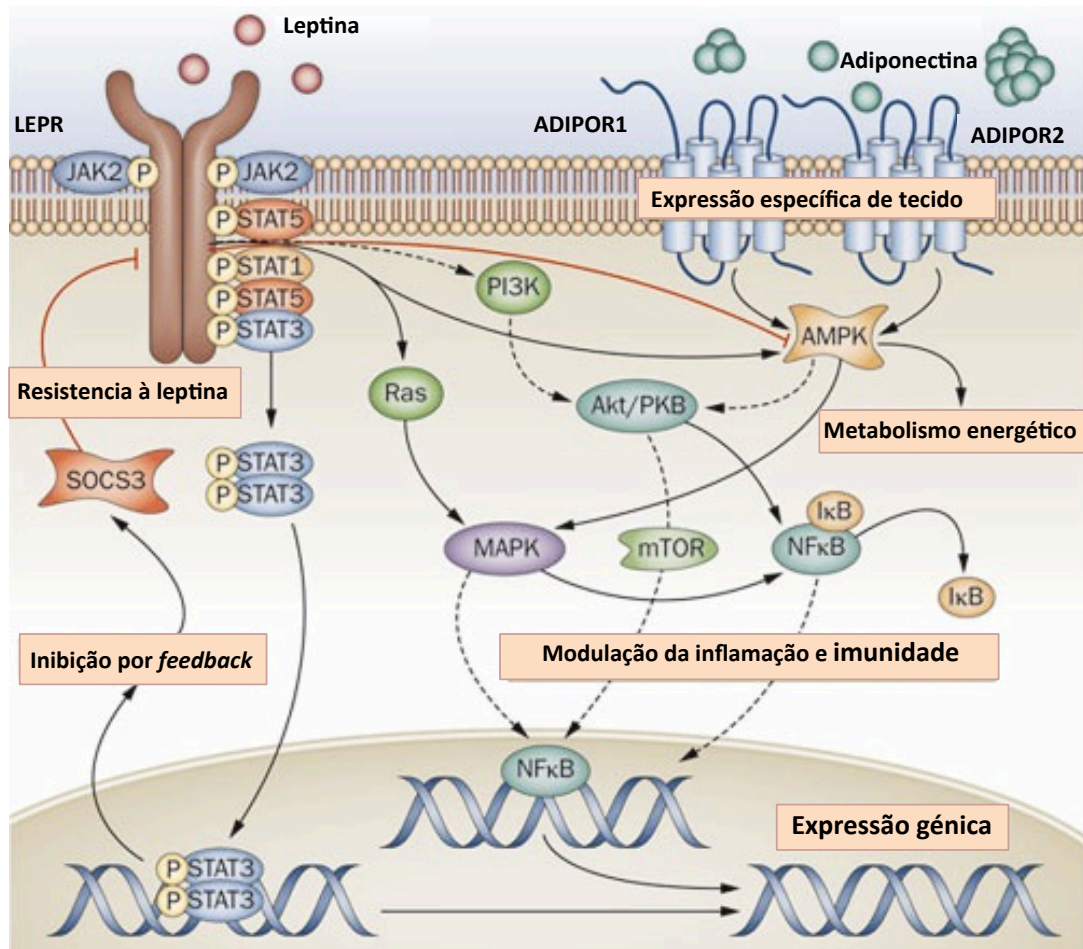
significativamente mais baixos nos grandes consumidores de álcool em relação aos consumidores ligeiros a moderados (Abdul-Ghafar *et al.*, 2013). A associação entre o aumento dos níveis séricos de adiponectina e o uso de tiazolidinedionas na *Diabetes Mellitus* tipo 2, está igualmente demonstrada, o que pode contribuir para ação anti-cancerígena deste fármaco (Abdul-Ghafar *et al.*, 2013).

Vários autores têm estabelecido uma correlação significativa entre os níveis baixos de adiponectina e o aumento de risco de cancro. Otake e colaboradores (2010) verificaram que níveis baixos de adiponectina constituíam um significativo fator de risco para o aparecimento precoce de CCR.

No entanto, nos doentes com cancro avançado esta correlação com baixos níveis de adiponectina não foi identificada (Otake *et al.*, 2010). Fazeli e colaboradores (2013) sugerem que a adiponectina pode controlar a proliferação celular no CCR por ativação da via AMPK. Quando os níveis circulantes de adiponectina são baixos suprimem a atividade da AMPK e do mTOR, ativando as outras vias, promovendo a proliferação das células do cólon e induzindo a carcinogénese colorretal (Fazeli *et al.*, 2013).

Por outro lado, Guadagni (2009) verificou num estudo caso-controlo que os níveis séricos de adiponectina e de leptina estão inversamente relacionados com o desenvolvimento de CCR, constatando que a relação Leptina/Adiponectina (L/A) no CCR é significativamente maior que nos controlos, constituindo um fator preditivo independente de final adverso (Guadagni *et al.*, 2009). Contudo, e apesar dos níveis baixos de adiponectina circulantes nos doentes com CCR, verifica-se que o tecido tumoral do cólon destes doentes apresenta maiores níveis de expressão dos recetores AdipoR1 e AdipoR2 comparativamente ao cólon normal (Figura 9).

Uma vez que os baixos níveis de adiponectina têm sido associados ao aumento do risco de desenvolver neoplasias, regista-se grande interesse em determinar se esta adipocitocina terá um efeito protetor da carcinogénese e qual o seu mecanismo.



**Figura 9: Vias de sinalização da Adiponectina e Leptina.**

*adipoR1*: recetor 1 da adiponectina; *adipoR2*: recetor 2 da adiponectina; AMPK: 5'-Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase; Akt/PKB: protein kinase B; JAK2: Janus kinase 2; LEPR: recetor da Leptina; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; mTor: serine/threonine protein kinase; KRAS: rat sarcoma oncogene; NF-κB fator nuclear κB; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase inhibitor; IκB: nuclear factor of kappa light polypeptide; STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription; SOCS: Suppressor of cytokine signaling

A investigação nesta área conduziu à identificação do seu efeito anti-inflamatório, anti-angiogénico, anti-proliferativo (Gulcelik *et al.*, 2012) e pró-apoptóico, tendo sido demonstrada a sua atividade antiproliferativa em células neoplásicas (Abdul-

Ghfar *et al.*, 2013). Apesar de alguns estudos correlacionarem o cancro do endométrio, da mama, da próstata, do cólon, do pâncreas, do pulmão não pequenas células e do esófago com os níveis de adiponectina, os mecanismos moleculares subjacentes ainda não foram completamente esclarecidos (Gulcelik *et al.*, 2012).

### 1.5.2.LEPTINA

A Leptina, do grego *leptos* (λεπτός) que significa magro, foi descoberta em 1994. É uma proteohormona, pertencente à família das citocinas, sintetizada quase exclusivamente no tecido adiposo branco durante a diferenciação dos adipócitos (Housa *et al.*, 2006). No entanto, verificou-se recentemente que esta adipocitocina também é produzida noutros tecidos, nomeadamente na placenta, no ovário, no músculo, no estômago, na glândula pituitária e no fígado (Koerner, Kratzsch, & Kiess, 2005).

A Leptina é uma proteína com peso molecular de 16 kDa constituída por quatro cadeias em hélice, sendo a adipocitocina mais abundante no organismo humano (Housa *et al.*, 2006). É codificada pelo gene *OB*, sendo estruturalmente semelhante à IL-6, IL-11, IL-12 e IL-2, o que indica a sua potencial atividade como importante mediador inflamatório. O seu nível de expressão bem como a sua concentração circulante são proporcionais à massa total de tecido adiposo do organismo, isto é, aumentada nos obesos e diminuída nos magros (Housa *et al.*, 2006). Sabe-se também que os valores séricos de leptina são cerca de duas a três vezes mais elevados nas mulheres que nos homens, mesmo quando ajustados à idade e ao IMC (Housa *et al.*, 2006).

No homem, o principal papel da leptina é a regulação da homeostase energética, particularmente no controlo da fome e da saciedade, regulando a ingestão de alimentos, o balanço energético e o peso corporal. A leptina circulante é ativamente transportada através da barreira hematoencefálica e atua no centro da saciedade localizado no hipotálamo, inibindo o apetite (Housa et al., 2006; Tulubas et al., 2013).

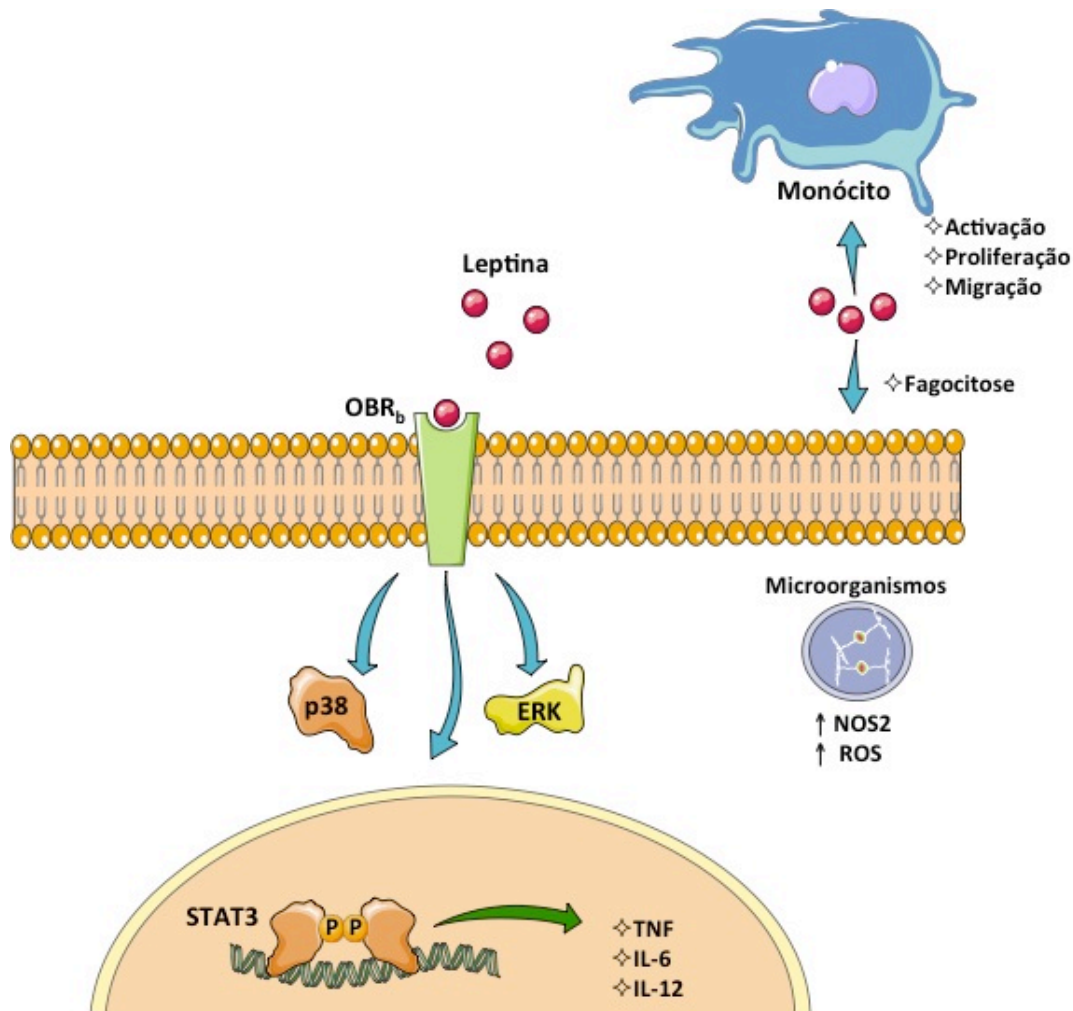
Apesar do envolvimento da leptina no metabolismo da glicose e dos lipídios, na angiogénese, na regulação da pressão arterial e na formação da massa óssea, o seu papel em circunstâncias fisiológicas é questionável (Housa *et al.*, 2006). Para além do seu papel no metabolismo lipídico e da glicose, a leptina é importante também para o sistema imune, para os eixos do sistema endócrino, como o gonadotrópico, tireotrópico, corticotrópico, para o tonus simpático, na estrutura e função cerebral, na hematopoiese e na cicatrização de feridas.

Vários autores referem o papel da leptina e do seu recetor Ob-R na iniciação, no crescimento celular, na progressão, na inibição da apoptose e na expressão de fatores angiogénicos em vários tipos de cancro, nomeadamente os relacionados com a obesidade (Nowakowska-Zajdel *et al.*, 2011). Este facto pode ser explicado pelo seu efeito na regulação de vias de sinalização intracelular específicas, que controlam o crescimento e diferenciação celular, a apoptose e angiogénese (Figura 9 e Figura 10).

A sua ação sobre a regulação do peso corporal, a inflamação, bem como a sua capacidade para estimular a secreção de outros fatores inflamatórios, contribui para a sua influência na patogénese e progressão do cancro, nomeadamente do cólon. A função da leptina é exercida através de quatro recetores específicos: a



isoforma longa (OB-Rb/Ob-Rl) e três isoformas curtas (huB219.1, huB219.2 e huB219.3), descritas na literatura coletivamente como OB-ra/Ob-Rt (Housa *et al.*, 2006).



**Figura 10: Vias de sinalização intracelular e Leptina.**

*ERK: Extracellular signal regulated kinases; IL-6: interleucina 6; IL-12: interleucina 12; NOS- espécies reativas de nitrogênio; OBRb: gene recetor da Leptina; p38: Mitogen activated protein kinase; ROS espécies reativas de oxigênio; STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3; TNF Fator de Necrose Tumoral*  
 Adaptado de Herbert Tilg and Alexander R. Moschen, 2006

Entre os recetores da leptina apenas a isoforma longa OB-R contém um domínio intracelular intacto com capacidade para ativar a proliferação celular através da via JAK-STAT intracelular, que ativa o STAT3, a ERK1/2 e o mTOR, como se pode observar na Figura 10 (Bartucci *et al.*, 2010). A segunda isoforma mais longa, a huB219.1, é uma potente ativadora da ERK1/2, mas não da STAT3. A leptina

também ativa a via da cinase terminal c-JunNH-2 (JNK) (Housa *et al.*, 2006). Igualmente, outros autores demonstraram o envolvimento da leptina no crescimento e sobrevivência celular tumoral através de vários mecanismos que incluem as vias de transdução MAPK, PI3K e JAK2, além das ERK2 cinases e da STAT3 (Nowakowska-Zajdel *et al.*, 2011). Estudos em linhas celulares mostram que a leptina aumenta a capacidade de migração de várias linhas celulares de carcinoma do cólon, como as SW480, SW620 e HTC116 (Nowakowska-Zajdel *et al.*, 2011).

No entanto, relativamente aos níveis séricos da leptina nos doentes com CCR não existe consenso. Alguns autores apontam para níveis mais baixos nos grupos com CCR do que nos grupos controlo (Kumor, Daniel, Pietruczuk, & Matecka-Panas, 2009; Tulubas *et al.*, 2013), outros indicam que níveis séricos elevados de leptina se associam a maior incidência de CCR (Stattin *et al.*, 2004). Existe ainda referência a níveis similares de leptina nos doentes com CCR e no grupo de controlo (Tessitore *et al.*, 2000).

### **1.5.3.RESISTINA**

A resistina é um membro da recém-descoberta família de proteínas ricas em cisteína chamada *resistina-like molecules* (RELMs). É uma proteína de 12,5 kDa com 108 aminoácidos, codificada pelo gene *RETN*, localizado no cromossoma 19. Esta adipocitocina circula no sangue na forma dimérica, constituída por 2 polipeptídeos de resistina ligados por uma ponte dissulfito, em dois estados distintos: um abundante hexâmero de alto peso molecular e um trímero, menos abundante, mas mais bioativo (Danese *et al.*, 2012).

A resistina é produzida pela fração estromovascular do tecido adiposo, pelos adipócitos do tecido adiposo branco, pela medula óssea, células pancreáticas, baço e músculos (Tiaka, Manolakis, Kapsoritakis, & Potamianos, 2011) sendo as principais fontes de produção os monócitos e macrófagos do sangue periférico (Tulubas, Mete, Ozgur, & Topcu, 2013). Inicialmente foi identificada no lavado broncoalveolar de roedores como uma hormona de ligação entre obesidade, resistência à insulina e à *Diabetes Mellitus* tipo 2. No entanto, essa associação não foi confirmada em estudos clínicos no homem (Danese et al., 2012; Tulubas et al., 2013).

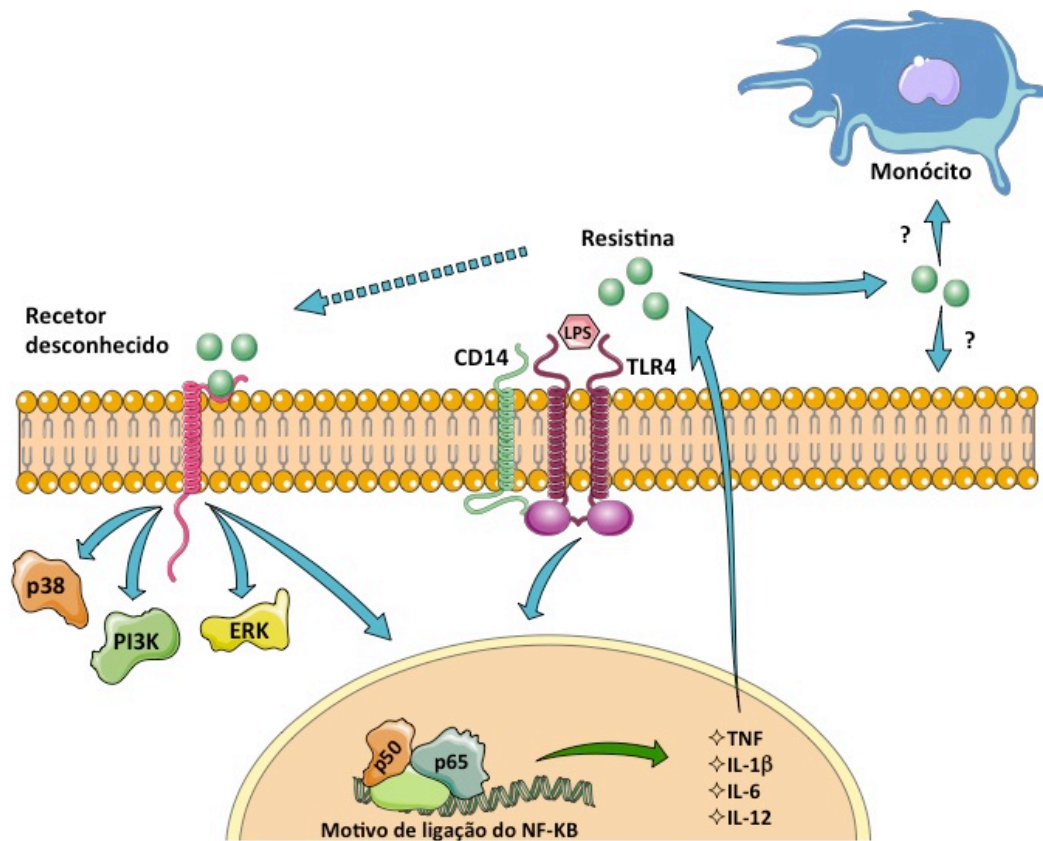
A associação entre resistina e recetores conhecidos ainda não foi estabelecida. A resistina pode ter um papel na insulinoresistência, pelo menos em modelos animais (Tiaka et al., 2011). A sua ausência pode levar à ativação do AMPK e conseqüentemente à diminuição da expressão de genes envolvidos na neoglicogenese, sugerindo que a resistina poderá ter um papel oposto ao da adiponectina (Tiaka et al., 2011).

Contudo, o papel da resistina nas alterações metabólicas permanece controverso. Alguns autores mostraram que o aumento dos níveis séricos de resistina está associado ao aumento da obesidade, da gordura visceral, da diabetes tipo 2 e da Síndrome Metabólica, enquanto outros não observaram tais correlações.

Nos últimos anos têm surgido cada vez mais evidências de que a resistina desempenha um importante papel regulador na doença inflamatória (Danese et al., 2012) e que é segregada em grandes quantidades pelas células mononucleares. Neste sentido, tem sido apontado o seu papel na inflamação como estímulo à produção de citocinas pró-inflamatórias nomeadamente IL-1b, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  e *Toll-like-receptor-2* (TLR-2) através da ativação do fator de transcrição NF-kB

(Tiaka *et al.*, 2011). A resistina parece reduzir a expressão de *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1), da *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) e da MCP-1. A resistina humana estimula a proliferação das células musculares dos vasos, aumenta a expressão de VEGF e dos seus recetores, ao mesmo tempo aumenta as MMP, possivelmente através da ativação da via NF- $\kappa$ B.

Além da sobre-expressão da resistina poder ser uma resposta fisiológica ao aumento do tecido adiposo e hipoxia, pode também contribuir para a angiogénese tumoral (Figura 11).



**Figura 11: Vias de sinalização de cancro e Resistina.**

CD14: cluster of differentiation14; ERK: Extracellular signal regulated kinases; IL-1 $\beta$ : interleucina 1 $\beta$ ; IL-6: interleucina 6; IL-12: interleucina 12; LPS: lipopolysaccharide; NF- $\kappa$ B fator nuclear  $\kappa$ B; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase inhibitor; p38: Mitogen activated protein kinase; p50: Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit; p65: Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit; TLR-4: Toll-like-receptor-2  
Adaptado de Herbert Tilg and Alexander R. Moshen, 2006

Vários estudos têm implicado a resistina na etiologia de cancro relacionado com a obesidade, nomeadamente do cancro da mama e do cólon, por influenciar significativamente o crescimento e a proliferação de células do estroma tumoral e de células malignas.

Assim, a resistina poderá ser uma molécula que estabeleça a ligação entre obesidade, inflamação, resistência à insulina e risco de cancro no homem.

A associação entre a resistina e o risco de cancro tem sido observada em vários estudos, nomeadamente através da relação entre níveis elevados de resistina em doentes com CCR (Danese et al., 2012; Gonullu et al., 2010; Sălăgeanu et al., 2010; Tulubas et al., 2013), em mulheres com cancro da mama, em doentes com linfoma e entre outras neoplasias, independentemente da sua relação com a obesidade.

No entanto, nenhuma associação foi encontrada entre os níveis séricos de resistina e a idade, o género, a localização do tumor no cólon, o tamanho ou a infiltração, o estágio, a presença de metástases hepáticas ou a invasão venosa. Relativamente a dados clínicos apenas foi observada uma correlação com o grau de diferenciação histológica e a presença de metástases ganglionares, não estando totalmente esclarecido o papel da resistina na carcinogénese colorretal (Tiaka *et al.*, 2011).

#### **1.5.4.VISFATINA**

A visfatina também conhecida como *pre-B cellenhancing fator* (PBEF) e *nicotinamide phosphoribosyl transferase* (NAMPT), é uma proteína com 491 aminoácidos e 52 KDa que é produzida primariamente pelo tecido adiposo visceral e secundariamente pelo fígado, músculo esquelético, linfócitos e medula óssea.

A visfatina tem uma ação insulino-mimética *in vitro* e *in vivo*, através da ligação e ativação do recetor da insulina (Tulubas, Mete, Oznur, & Topcu, 2013), ou seja, esta adipocitocina possui uma função endócrina semelhante à da insulina: fixa e ativa o recetor da insulina.

As suas propriedades insulino-miméticas com atuação sistémica e local, representam mais um elo da corrente que liga adiposidade intra-abdominal à síndrome metabólica, além da sua função autócrina, parácrina potencial na adipogénese.

Com o aumento da incidência da síndrome metabólica, especialmente da *Diabetes Mellitus* tipo 2 em indivíduos jovens, o esclarecimento do papel da visfatina tornou-se importante para melhor entendimento destas patologias.

Jiri Stastny e colaboradores (2012) sugerem que a visfatina interage diretamente com os recetores da insulina, tal como o *insulin-like growth factor receptor* (IGF-1R), promovendo a proliferação de células neoplásicas. Para além da atividade insulino-mimética, a visfatina contribui também para a biosíntese da nicotinamida adenina dinucleotido (NAD), afetando o metabolismo e a longevidade celular (Stastny, Bienertova-Vasku & Vasku, 2012). É também importante na regulação de vias de sinalização e na transcrição, na biosíntese do TNF- $\alpha$  e da IL-6 (Dalamaga *et al.*, 2012), assim como também está descrita a sua atividade pró-angiogénica.

Vários estudos têm indicado que os doentes com CCR apresentam níveis mais elevados de visfatina que os indivíduos saudáveis (Fazeli *et al.*, 2013). Outros estudos associam a expressão da visfatina a outras neoplasias, nomeadamente do esófago, estômago, mama, ovário, próstata, glioblastomas e astrocitomas (Dalamaga *et al.*, 2012; Nakajima *et al.*, 2010). Neste sentido, alguns autores têm

mostrado que a visfatina, tal como a resistina, podem constituir bons biomarcadores de evolução e progressão do CCR, independentemente do IMC (Fazeli et al., 2013; Nakajima et al., 2010).

#### **1.5.5.MCP-1**

A *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1) é um fator de quimioatração produzido pelos adipócitos, que recruta monócitos circulantes para o interior do tecido adiposo, ativando-os em macrófagos e promovendo o processo inflamatório local (Dwyer et al., 2007; van Kruijsdijk et al., 2009).

É uma quimiocitocina sintetizada sob a forma de uma proteína precursora de 99 aminoácidos que, após processamento pós-tradução, é segregada como uma proteína de 76 aminoácidos. É codificada pelo gene *CCL2* localizado no cromossoma 17 (17q11.2-q12) (Dwyer et al., 2007).

Inicialmente, a MCP-1 foi considerada uma ativadora de funções citotóxicas anti-tumorais de macrófagos. A posterior identificação de dois tipos de macrófagos associados a tumores (TAM) e a revelação do seu potencial angiogénico alterou a perspectiva da fisiologia da MCP-1 no cancro. Vários estudos têm encontrado níveis elevados de MCP-1, em neoplasias, especialmente em estádios avançados. No entanto, não está estabelecido se os níveis circulantes de MCP-1 são ou não um marcador sistémico de mau prognóstico (Matafome, Santos-Silva, Sena, & Seíça, 2013).

Diversas pesquisas têm demonstrado que o aumento da sua expressão está relacionado com o crescimento tumoral (Zhang, Lu, & Pienta, 2010). Para além de atuar sobre a célula tumoral, a MCP-1 pode também ser produzida pelas células

tumorais, pelas células do estroma do tumor (macrófagos e fibroblastos) (Matafome *et al.*, 2013), pelos leucócitos e pelas células endoteliais (Zhang *et al.*, 2010).

A MCP-1 ao participar na angiogénese aumenta a capacidade de migração das células tumorais promovendo a invasão, infiltração e metastização, através de processos relacionados com a neovascularização tumoral. A indução da angiogénese é efetuada por ativação direta do VEGF e do HIF-1 $\alpha$ . Por outro lado, promove o aumento da angiopietina-2 e das metaloproteinases dos monócitos, das células T e mesmo das células tumorais, o que contribui também para a angiogénese (Matafome *et al.*, 2013). Para além da função angiogénica, esta proteína estimula a migração promovendo, desta forma, a metastização. A MCP-1 e o TNF- $\alpha$  podem mobilizar e induzir diferenciação de monócitos periféricos em macrófagos ativos. No entanto, a MCP-1 pode também promover a diferenciação de pré-adipócitos em macrófagos. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a MCP-1 é a principal responsável pela mobilização de monócitos para a zona tumoral.

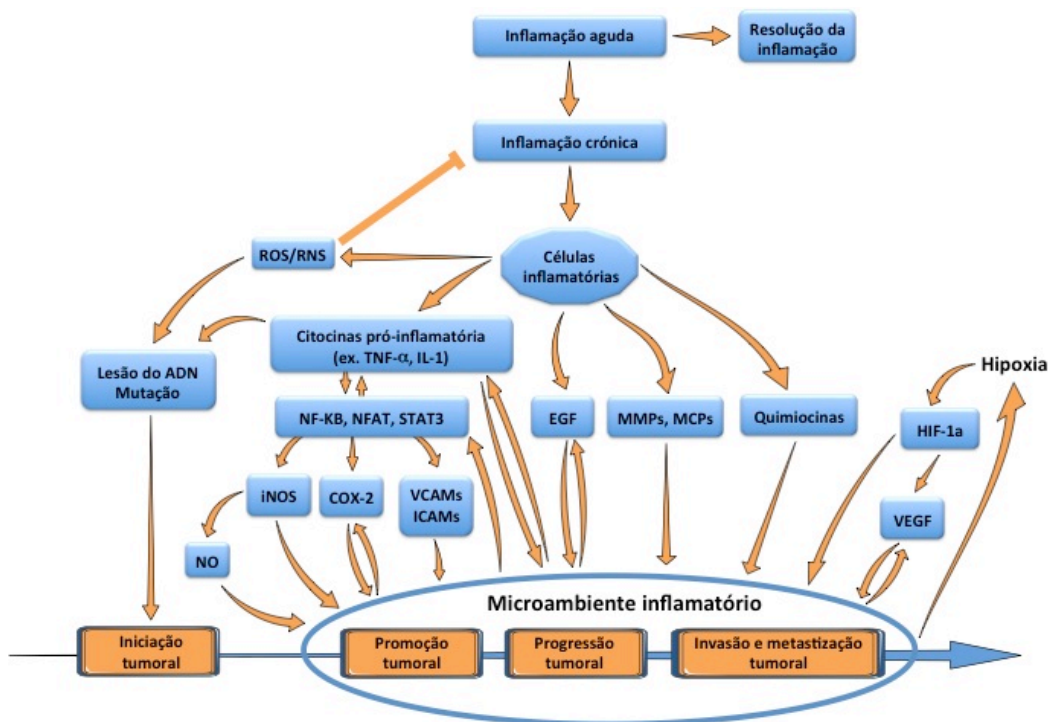
Associa-se, por isso, a um estágio mais avançado de doença e à progressão tumoral, podendo eventualmente constituir um marcador de prognóstico.

#### **1.5.6.TNF- $\alpha$**

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória, diretamente envolvida nas reações de fase aguda do processo de inflamação sistémica, sendo a mais importante e a mais estudada como fator de morte celular. É uma proteína transmembranar com 26 kDa produzida essencialmente pelos macrófagos ativados e também por células tumorais, que antes de ser libertada para a circulação sofre clivagem,



transformando-se numa molécula de 17 kDa, constituída por 154 aminoácidos. É uma proteína não glicosilada que além de ser produzida nos macrófagos, é também produzida em adipócitos e pré-adipócitos, estando por isso aumentada nos tecidos em que exista uma infiltração de macrófagos bem como no tecido adiposo e consequentemente na obesidade. Pode igualmente ser segregada no tecido muscular e linfóide. O TNF- $\alpha$  está sobre-expresso no tecido adiposo de indivíduos e animais obesos. Foram descritos dois recetores membranares para o TNF- $\alpha$ : o TNFR1 e o TNFR2. (Figura 12).



**Figura 12: Resumo dos mecanismos de participação da inflamação no desenvolvimento do cancro.**

ADN: ácido desoxirribonucleico; COX-2: Ciclo-oxigenase-2; EGF: fator de crescimento epidérmico; HIF1: Hypoxia-inducible factors; ICAMs: *Intercellular Adhesion Molecule*; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; IL-1: interleucina 1; MCPs: *membrane cofactor protein*; NFAT: *Nuclear factor of activated T-cells*; NF- $\kappa$ B fator nuclear  $\kappa$ B; ROS: espécies reativas de oxigénio; NO: óxido nítrico; STAT3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*; TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ; VCAMs: *Vascular Cell Adhesion Molecule*; MMP: Metaloproteinases da matriz; VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular  
Adaptado de Lu H et al. (2006).

De acordo com Flores e seus colaboradores, foi demonstrado que a inflamação crónica relacionada com a obesidade, com sobre-expressão de TNF- $\alpha$ , conduz ao aumento da expressão e atividade da cinase de c-jun N terminal (JNK) e do inibidor da cinase do fator nuclear kB (NF-kB).

O TNF- $\alpha$  tem um duplo papel no processo inflamatório: destruição tecidual e reparação de danos. Pode iniciar uma cascata inflamatória através do estímulo de outras citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e fatores de adesão endotelial, recrutando vários tipos de células ativadas para o local da lesão tecidual (Lu, Ouyang, & Huang, 2006).

Por outro lado, o TNF- $\alpha$  tem atividade anti-cancerígena e pró-cancerígena. Pode induzir alteração do ADN, inibir a sua reparação, atuando como um fator de crescimento para as células tumorais. Além disso, pode promover a angiogénese e o crescimento tumoral através da ativação de fatores angiogénicos como timidina fosforilase

## **1.6.ABORDAGEM CLÍNICA DO CANCRO COLORRETAL**

### **1.6.1.DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico do CCR passa por uma história clínica exaustiva, avaliação e observação clínica completas, realização de exames complementares de diagnóstico que permitam a identificação do tumor, realização de uma biopsia que leve à sua caracterização histológica e ao estabelecimento de uma estratégia terapêutica.

## Clínica

O diagnóstico deverá ser feito sobre uma detalhada informação clínica. Numa fase mais precoce, o CCR raramente provoca sintomas, os quais aparecem habitualmente quando a doença se encontra numa fase mais avançada. Quando surgem, os sintomas variam de acordo com a localização do tumor. Os tumores localizados no cólon direito, particularmente cego e cólon ascendente, tendem a ser formações polipóides exofíticas que, ao desenvolver-se, podem tornar-se volumosas e desencadear sintomas, nomeadamente, alterações do trânsito intestinal e, ou sintomas oclusivos. Dadas as dimensões que atingem, podem ulcerar e sofrer necrose, provocando hemorragias microscópicas crónicas e muitas vezes intermitentes, que não modificam o aspeto das fezes. Mais raramente podem surgir melenas. Com o desenvolvimento do quadro clínico aparecem sintomas como cansaço de esforço, fadiga permanente, palpitações, perda de peso e desconforto ou dor abdominal (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

As neoplasias localizadas no cólon esquerdo abrangem uma maior área da circunferência da parede intestinal, muitas vezes infiltram e ulceram, tendem a ser lesões circulares e constrictivas, produzindo estenoses intestinais em forma de anel. Originam frequentemente sintomas obstrutivos, como desconforto, dor, distensão abdominal e meteorismo, muitas vezes não valorizados na fase inicial. Quando a doença progride pode manifestar-se por quadro abdominal agudo, desde a obstrução intestinal até à oclusão completa ou perfuração intestinal. Este quadro ocorre com dor e distensão abdominal, náuseas e vômitos, por vezes fecalóides.

A alteração persistente dos hábitos intestinais, obstipação ou diarreia (ou uma alternância das duas), bem como a dor forte e persistente, sem outra razão associada, também são sintomas que nos podem sugerir a doença.

Os tumores da região retossigmoideia têm habitualmente outro tipo de sintomas dos quais se destacam hematoquésias ou perda de sangue misturado nas fezes, irritação, dor ou prurido local, tenesmo ou diminuição do calibre das fezes.

Uma das formas de apresentação do cancro do cólon é sob a forma de neoplasia oculta, chegando-se ao seu diagnóstico a partir do estudo de sintomas ou sinais de metástases.

O exame físico é também muito importante. Pode revelar-nos desde um doente desnutrido, com palidez cutâneo-mucosa ou icterícia, uma massa ou hepatomegalia à palpação abdominal, ou uma formação tumoral, retorragia ou melena no exame retal. Adenopatias ou alterações da auscultação pulmonar podem também ser evidenciadas na doença avançada (Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, 2011).

### **Exames complementares de diagnóstico**

Os exames laboratoriais podem mostrar anemia ferropénica com ou sem trombocitose, alterações eletrolíticas, alterações das provas da função hepática, de acordo com a localização da neoplasia e o estado evolutivo da doença.

O CEA pode estar elevado, sendo particularmente útil na avaliação pós-cirúrgica, permitindo assim a monitorização da evolução da doença e da resposta à terapêutica.

Sempre que existe uma suspeição clínica de tumor do cólon, em doentes com risco de CCR ou quando inseridos num programa de rastreio, deve ser efetuada uma avaliação endoscópica ou radiológica, com biopsia das lesões identificadas.

A colonoscopia é o exame de eleição para o diagnóstico, pois permite a identificação de adenomas infracentimétricos. O clister opaco com duplo contraste, deve ser reservado apenas para situações de indisponibilidade ou dificuldade de execução técnica da colonoscopia ou recusa do doente em realizá-la, pois não permite visualizar pequenos adenomas e cerca de 50% dos pólipos com dimensões superiores a 1 centímetro. Sempre que seja detetada uma lesão sugestiva de carcinoma, deverá ser efetuada uma colonoscopia total, para se excluir a existência de lesões síncronas. O conhecimento da existência de tumores síncronos é de extrema importância para o planeamento da terapêutica cirúrgica.

A maioria dos CCR são histologicamente adenocarcinomas, com diferenciação glandular e secreção de mucina variáveis. A mucina, uma proteína segregada pelas glândulas do tecido normal ou neoplásico, é identificada com a coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS).

Nas neoplasias pouco diferenciadas a produção de mucina está diminuída. Alguns tumores apresentam células com grandes vacúolos preenchidos por mucina que empurram o núcleo para a periferia e são chamadas *células em anel de sinete*.

Menos de 5% dos CCR têm outros tipos histológicos. Na junção anorretal podem existir carcinomas de células escamosas, carcinomas de células de transição, sarcomas, leiomiossarcomas ou melanomas. Os linfomas primários e os tumores carcinóides do cólon correspondem a menos de 0,1% do total.

Ao avaliar a neoplasia histologicamente podem encontrar-se alguns aspetos favoráveis, nomeadamente grau de diferenciação 1 ou 2, ausência de invasão angio-linfática e margens de ressecção negativas.

São considerados fatores de prognóstico desfavoráveis: o grau de diferenciação 3 ou 4, a presença de invasão angio-linfática e margens de ressecção positivas.

Para além da caracterização histológica, presentemente é obrigatória a pesquisa de mutações genéticas no tecido tumoral, nomeadamente as que já mostraram o seu papel na resistência a terapêuticas complementares. São estudadas as mutações nos codões 12, 13, 59, 61, 117 e 146, dos genes RAS (KRAS e NRAS) e identificadas as mutações que aumentem a probabilidade de resistência ao tratamento com inibidores do EGFR.

Sempre que se diagnostica um CCR deve ser feita uma avaliação complementar adequada com vista ao estadiamento. A Tomografia Computorizada (TC) abdominal e torácica deve ser efetuada para identificação de eventuais metástases (hepáticas e pulmonares), sua extensão e potencial ressecabilidade.

No caso específico do reto, devido à importância de uma boa avaliação locorregional, deverá ser efetuada uma ecoendoscopia retal ou uma Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da zona pélvica.

### **Diagnóstico diferencial**

O diagnóstico diferencial depende da forma de apresentação da doença. Perante uma massa observada durante a palpação abdominal, poder-se-á colocar a hipótese de tumor benigno do cólon (adenoma), processo inflamatório no contexto de

diverticulite, Doença Inflamatória do Intestino (DII), isquemia e doenças infecciosas do cólon como a tuberculose ou a amibíase.

No contexto clínico de oclusão intestinal, situação de doença em fase avançada, deve colocar-se a hipótese de neoplasia, mas também de bridas ou aderências, DII, diverticulose ou diverticulite, isquemia intestinal, volvo, colite radica, entre outras.

Se a sintomatologia for predominantemente hemorrágica, deve ser considerado o diagnóstico diferencial com DII, diverticulose ou diverticulite, colite infecciosa ou isquemica, úlcera solitária do reto e hemorróidas. Quando predominam as alteraoes dos hábitos intestinais deve excluir-se a patologia infecciosa e inflamatória intestinal e pensar também na síndrome do intestino irritável.

Na doença aguda com dor abdominal significativa, devem colocar-se em primeiro lugar patologias no neoplásicas como a apendicite, diverticulite, DII e isquémia do intestino.

### **Estudo familiar**

Existe um risco importante de CCR em três tipos de situaoes: nas síndromes hereditárias definidas e típicas, como a FAP e o CCNPH, nos indivíduos com suspeita de hereditariedade por maior incidência familiar e nos familiares de primeiro grau de doentes com CCR esporádico.

A síndrome de Lynch  uma doença autossomica dominante, que ocorre com mutaoes nos genes *MSH6*, *MSH2* e *MSH1*. Os doentes com esta patologia apresentam uma maior incidência de CCR entre os 40 e os 50 anos.

A aplicaao precoce e intensiva de programas de vigilância reduz a mortalidade por CCR. Com o objetivo de identificar os indivíduos candidatos  análise investigacional

de mutações em genes de reparação do ADN e ao seguimento em programas de vigilância intensiva, a *International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer* desenvolveu em 1991 um conjunto de critérios que são conhecidos como os critérios de Amesterdão clássicos (Tabela 4).

**Tabela 4: Critérios de Amesterdão clássicos.**

| <b>Critérios de Amesterdão clássicos</b>   |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• pelo menos 3 familiares com CCR, histologicamente confirmado, sendo um deles familiar de primeiro grau dos outros dois;</li><li>• pelo menos 2 gerações sucessivas afetadas;</li><li>• pelo menos 1 dos familiares com CCR, diagnosticado com menos de 50 anos de idade;</li><li>• exclusão de Polipose Adenomatosa Familiar do Cólon.</li></ul> |

Adaptado de Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence (2011)

Estes procuram identificar as famílias com risco de ter Síndrome de Lynch ou CCNPH, com base na sua história familiar. Com estes critérios apenas se identificam cerca de 40% dos portadores de CCNPH.

**Tabela 5: Critérios de Amsterdão modificados.**

| <b>Critérios de Amsterdão modificados</b>  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• pelo menos 3 familiares com cancro associado a CCNPH (cancro colorretal, do endométrio, intestino delgado e urotélio: rins e uretra), sendo um deles familiar de primeiro grau dos outros dois;</li><li>• pelo menos 2 gerações sucessivas afetadas;</li><li>• pelo menos 1 dos familiares com um cancro associado a CCNPH (colorretal, cancro do endométrio, intestino delgado e urotélio: rins e uretra), diagnosticado com menos de 50 anos de idade</li><li>• exclusão de Polipose Adenomatosa Familiar do Cólon</li></ul> |

Adaptado de Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence (2011)



Por se ter considerado que os critérios de Amesterdão clássicos eram restritivos, por não incluírem tumores extra-cólicos, em 1999, foram elaborados os Critérios de Amesterdão modificados (Tabela 5). Estes tinham como principal objetivo identificar um maior número de doentes portadores de CCNPH nos programas de rastreio.

Em 1997, foram estabelecidos os Critérios de Bethesda, revistos em 2004 (Tabela 6) com o objetivo de selecionar os doentes com CCR que devem ser submetidos a pesquisa de IMS, marcador para a análise mutacional da Síndrome de Lynch, uma vez que mais de 90% destes doentes apresentam IMS de alto grau. Com estes critérios consegue-se também um aumento significativo dos indivíduos em risco identificados.

**Tabela 6: Critérios de Bethesda.**

| <b>Critérios de Bethesda</b>  |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• diagnóstico de CCR em idade inferior a 50 anos</li><li>• CCR síncronos, metácronos ou outros tumores associados a CCNPH (colorretal, cancro do endométrio, intestino delgado e urotélio: rins e uretra), independentemente da idade</li><li>• CCR com características histológicas de MSI+ (Instabilidade de Microssatélites), diagnosticado antes dos 60 anos</li><li>• CCR diagnosticado e um familiar de 1º grau com um tumor associado a CCNPH, um deles diagnosticado antes dos 50 anos</li><li>• CCR diagnosticado em dois ou mais familiares de 1º grau ou de 2º grau com tumores associados a CCNPH, independentemente da idade</li></ul> |

Adaptado de Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence (2011)

### 1.6.2 RASTREIO

A evolução que tem havido nos métodos de rastreio do CCR, tem permitido a deteção de mais casos em estádios precoces de evolução, mesmo antes de existir qualquer sintoma ou sinal que faça suspeitar da doença. As estratégias de rastreio devem passar pela estratificação do risco da população alvo.

É atualmente recomendado que o rastreio seja efetuado a partir dos 50 anos, ou a partir dos 40 anos nos indivíduos com risco aumentado. A prevenção primária é uma estratégia efetiva e custo-eficaz na prevenção da incidência e mortalidade por CCR.

Têm sido referenciadas várias opções aceitáveis para uma boa prática do rastreio do CCR: a Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes (PSOF) anual ou bianual pelo método de guaiaco (HemmOccult) ou imunoquímico, a retostossigmoidoscopia flexível, o clister opaco com duplo contraste (enema baritado), a colonoscopia total e a colonoscopia virtual. No que diz respeito à PSOF, o método imunoquímico revela maior capacidade de deteção do CCR ou de adenomas avançados, quando comparado com o método do guaiaco.

Em 2008, os testes para o rastreio foram divididos em dois grupos segundo o seu objetivo: no primeiro grupo foram incluídos os testes em fezes, que permitiam apenas diagnosticar a possibilidade de carcinoma. No segundo grupo foram incluídos os exames radiológicos e endoscópicos, que permitem para além do diagnóstico de carcinoma, também as lesões precursoras, o adenoma.

Múltiplas normas têm sido publicadas para o rastreio do CCR. As últimas publicadas no início de 2012 pelo *The American College of Physicians*, definiram a PSOF anual, a

Sigmoidoscopia Flexível (SF) de 5 em 5 anos e a colonoscopia de 10 em 10 anos, como as melhores estratégias de rastreio do CCR.

Com estes rastreios, nomeadamente com a execução do teste PSOF, anual ou bianual, consegue-se uma redução na mortalidade de 15 a 33%. Com a realização da SF de 5 em 5 anos, obtém-se uma redução na mortalidade de 44 a 70% e na incidência de 55%.

Numa avaliação preliminar de um estudo para rastreio do CCR que decorreu em Portugal, no Porto, comparando o PSOF com a colonoscopia, foi demonstrado que a taxa de deteção de CCR foi semelhante nos dois grupos, não tendo sido encontradas diferenças significativas em relação ao estágio ou localização do tumor. No entanto a taxa de participação foi baixa em ambos os grupos, mas significativamente inferior para o grupo da colonoscopia (Forno, 2009).

Para que exista um programa de rastreio eficaz é necessário que a doença tenha uma história natural longa e conhecida, alta taxa de mortalidade, tratamento curativo, testes de rastreio eficazes e uma boa taxa de adesão ou utilização. (Levin B, 2008). Os estudos realizados têm revelado uma baixa taxa de participação, tanto para o rastreio com PSOF como para com os exames endoscópicos.

Em 31 de março do corrente ano, a DGS colocou em discussão pública a norma número 003/2014, cujo objetivo é precisamente o Rastreio Oportunístico do Cancro do Cólon e Reto na população assintomática entre os 50 e os 74 anos.

### **1.6.3 ESTADIAMENTO**

Após o estabelecimento do diagnóstico é importante determinar a extensão da doença localmente e à distância. O estadiamento do cancro pretende descrever

alguns aspetos da sua evolução, como localização no órgão, se existe ou não disseminação e se afeta funções de outros órgãos. Conhecer o estágio do tumor é importante na definição de estratégias de tratamento e no estabelecimento do prognóstico do doente.

Existem dois tipos de estadiamento para o CCR: o estadiamento clínico e o patológico (Figura 13).

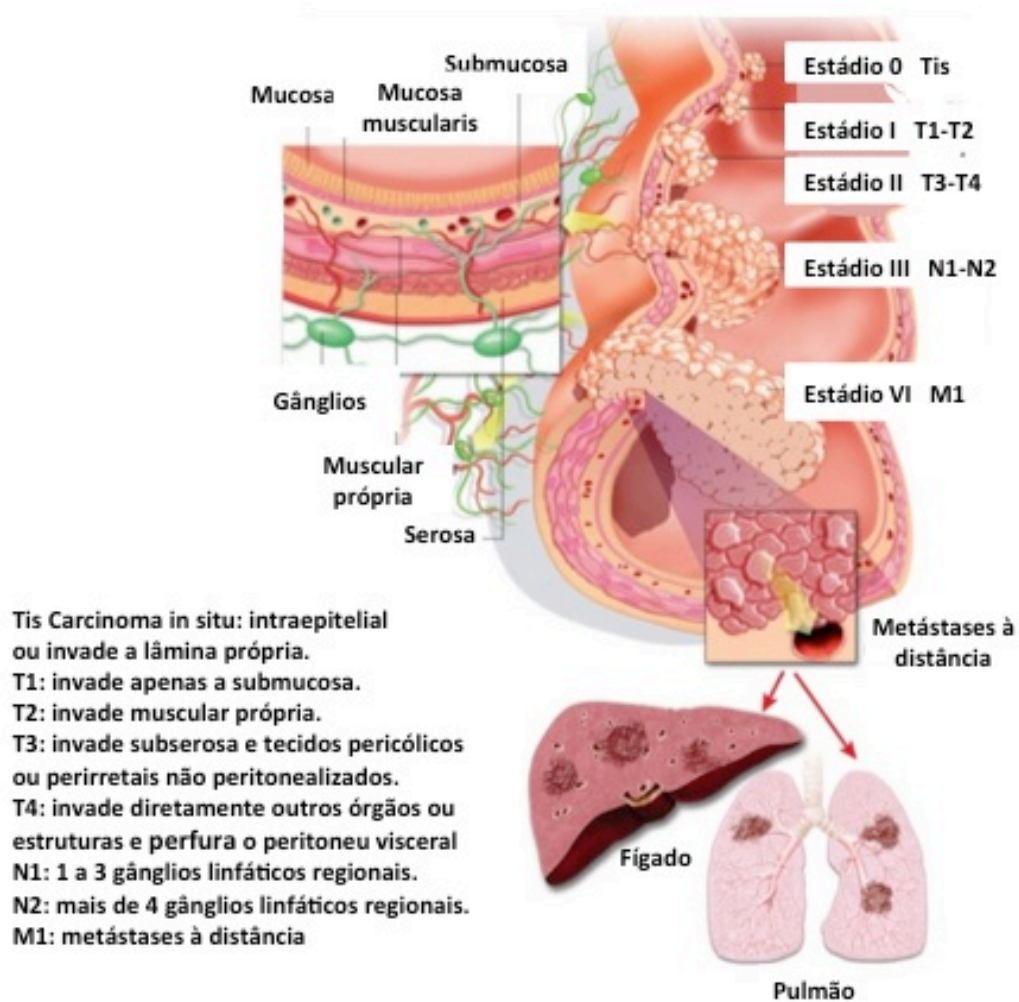


Figura 13: Estadiamento do cancro colorretal.

Os estádios clínico e patológico podem ser diferentes, uma vez que o primeiro usa fundamentalmente os exames de imagem, enquanto o segundo usa o estudo anatomopatológico da peça operatória. Durante o ato operatório o cirurgião pode objetivar doença em zonas que não foram identificadas nos exames de imagem, o que implica um estadiamento patológico mais avançado. A maioria dos doentes com CCR é submetida a cirurgia, pelo que o estadiamento patológico é o mais usado. O estadiamento patológico é também mais exato que o clínico, pois permite a obtenção de uma extensão mais correta da doença.

Existem várias classificações para avaliação da extensão do CCR: a classificação da *International Union Against Cancer* (UICC) e da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) que são idênticas, a classificação de Dukes e classificação de Astler-Coller. A classificação da UICC/AJCC baseia-se no sistema *Tumour-Node-Metastasis* (TNM), assenta nas características do tumor (Tumor – T), na invasão de gânglios loco-regionais (Nódulos - N) e na disseminação à distância (Metástases - M), como mostra a Tabela 7.

Para uma avaliação correta do envolvimento ganglionar, as boas práticas recomendam a obtenção durante o ato cirúrgico de pelo menos doze gânglios linfáticos para análise histológica. O fígado, pulmão e peritoneu são os órgãos mais frequentemente atingidos pelas metástases. Cerca de um terço dos doentes com CCR acabarão por desenvolver, no decurso da neoplasia, metástases hepáticas. No entanto, apesar da metastização para outros locais, nomeadamente a invasão pulmonar ou de outros órgãos ser mais rara, os doentes com carcinoma do reto podem sofrer disseminação pelo plexo venoso paravertebral, não atingindo o

sistema venoso portal e, por isso, podem apresentar metastização pulmonar, sem metastização hepática.

**Tabela 7: Classificação dos tumores malignos do cólon e reto.**

| <b>T – Tumor Primário</b>         |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>TX</b>                         | Tumor primário não avaliado.  |
| <b>Tis</b>                        | Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial ou invade a lâmina própria.   |
| <b>T0</b>                         | Sem evidência de tumor primário   |
| <b>T1</b>                         | Tumor invade apenas a submucosa.  |
| <b>T2</b>                         | Tumor invade muscular própria.  |
| <b>T3</b>                         | Tumor invade subserosa e tecidos pericólicos ou perirretais não peritonealizados.   |
| <b>T4</b>                         | Tumor invade diretamente outros órgãos ou estruturas e perfura o peritoneu visceral   |
| <b>T4a</b>                        | Tumor perfura o peritoneu visceral.   |
| <b>T4b</b>                        | Tumor invade diretamente outros órgãos ou estruturas.   |
| <b>N – Gânglios Regionais</b>     |   |
| <b>NX</b>                         | Gânglios regionais não avaliados.   |
| <b>N0</b>                         | Gânglios regionais não invadidos.   |
| <b>N1</b>                         | Metástases em 1 a 3 gânglios linfáticos regionais.  |
| <b>N1a</b>                        | Metástases em 1 gânglio linfático regional.   |
| <b>N1b</b>                        | Metástases em 2 a 3 gânglios linfáticos regionais.  |
| <b>N1c</b>                        | Metástases na subserosa ou nos tecidos pericólicos ou periretais não peritonealizados sem metástases nos gânglios linfáticos regionais. |
| <b>N2</b>                         | Metástases em mais de 4 gânglios linfáticos regionais.  |
| <b>N2a</b>                        | Metástases em 4 a 6 gânglios linfáticos regionais.  |
| <b>N2b</b>                        | Metástases em 7 gânglios linfáticos regionais.  |
| <b>M - Metástases à distância</b> |   |
| <b>M0</b>                         | Ausência de metástases à distância.   |
| <b>M1</b>                         | Metástases à distância.   |
| <b>M1a</b>                        | Metástases em um órgão (fígado, pulmão ou ovário) ou gânglios não regionais.  |
| <b>M1b</b>                        | Metástases em mais que um órgão ou peritoneu ou gânglios não regionais.   |

Adaptado de: Sobin L. Gospodarowicz M. Wittekind C. (2010).

Atendendo ao referido anteriormente os doentes com CCR podem ser estadiados em 10 grupos, de acordo com a Tabela 8.

O número de doentes diagnosticados com doença em estágio I tem vindo a aumentar, com uma incidência estimada de cerca de 30%, devido ao rastreio mais cuidadoso, aumentando assim a possibilidade de cura com uma resseção cirúrgica de tipo R0.

**Tabela 8: Estadiamento do cancro colorretal de acordo com o sistema de classificação da AJCC.**

| Grupos  | Estádio |
|---|---------|
| Tis, N0, M0                                   | 0       |
| T1-2, N0, M0                                  | I       |
| T3, N0, M0                                    | IIA     |
| T4a, N0, M0                                   | IIB     |
| T4b, N0, M0                                   | IIC     |
| T1-2, N1, M0 / T1, N2a, M0                    | IIIA    |
| T3-4a, N1, M0 / T2-3, N2a, M0 / T1-2, N2b, M0 | IIIB    |
| T4a, N2a, M0 / T3-4a, N2b, M0 / T4b, N1-2, M0 | IIIC    |
| T, N, M1a                                     | IVA     |
| T, N, M1b                                     | IVB     |

Adaptado de: Sobin L. Gospodarowicz M. Wittekind C. (2010).

A incidência do estágio II é de aproximadamente 27%, para o estágio III de 24% e para o estágio IV de 19%.

Na Tabela 9 estão representados os três sistemas de estadiamento mais utilizados no CCR, o da AJCC já referido, o de Dukes e o de Astler-Coller, bem como a comparação dos estádios nos diferentes sistemas de estadiamento.

**Tabela 9: Estadiamento AJCC, Dukes e Astler-Coller.**

| AJCC | Dukes | Astler-Coller |
|------|-------|---------------|
| 0    | —     | —             |
| I    | A     | A, B1         |
| IIA  | B     | B2            |
| IIB  | B     | B2            |
| IIC  | B     | B3            |
| IIIA | C     | C1            |
| IIIB | C     | C1, C2        |
| IIIC | C     | C2, C3        |
| IVA  | —     | D             |
| IVB  | —     | D             |

Outro fator que pode afetar o prognóstico é o grau de diferenciação histológica do cancro. Do ponto de vista histológico o grau representa a semelhança entre o tecido CCR e o tecido colorretal normal. Assim a escala utilizada para a classificação do CCR vai de G1, bem diferenciado (em que as células do CCR são histologicamente semelhantes às do tecido colorretal normal) a G4 indiferenciado (em que são significativamente diferentes).

Os tumores de baixo grau de diferenciação têm habitualmente uma evolução mais lenta do que os de alto grau. Na maior parte dos casos, o prognóstico é melhor para os tumores de baixo grau de diferenciação.

#### **1.6.4. TRATAMENTO**

A abordagem terapêutica do CCR depende em primeiro lugar do estágio da doença. O fluxograma de decisão terapêutica é baseado no seu potencial de cura e também na probabilidade de recorrência ou progressão (Figura 14). As três principais opções terapêuticas incluem a cirurgia (ou outras medidas invasivas), a terapêutica médica (quimioterapia, fármacos antiangiogénicos imunoterapia ou outras) e a radioterapia.

##### **Cirurgia**

A terapêutica principal do CCR é cirúrgica, independentemente da sua localização, tendo como objetivo a ressecção do tumor primário, com margens adequadas e a realização de linfadenectomia regional, de pelo menos 12 gânglios, para obter um correto estadiamento. Em aproximadamente 92% dos doentes com cancro do cólon



e 84% com cancro do reto é efetuada cirurgia, como primeira opção terapêutica, a maioria com intenção curativa.

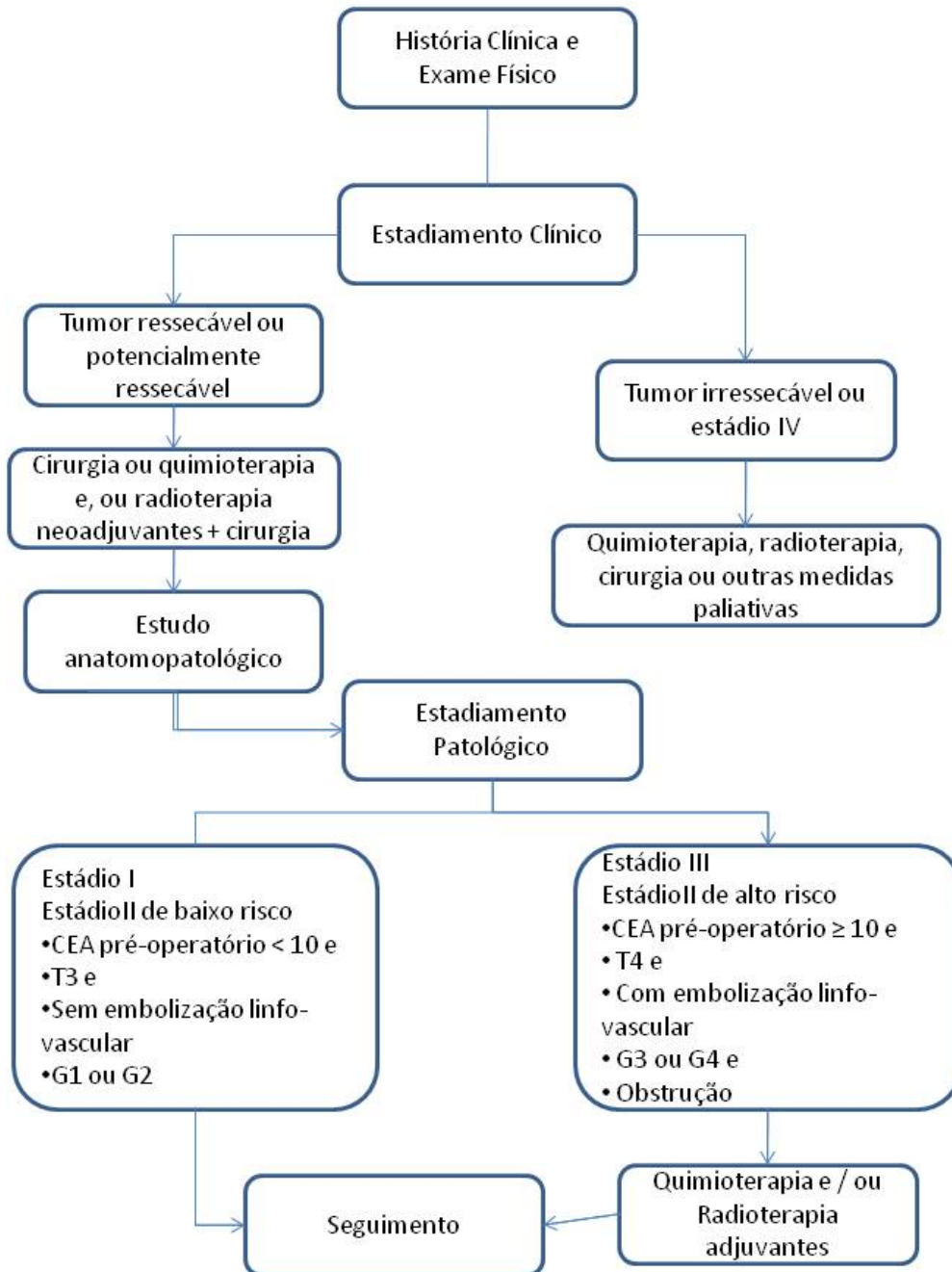


Figura 14: Fluxograma de decisão terapêutica.

Algumas técnicas minimamente invasivas, tais como a resseção laparoscópica e a microcirurgia endoscópica transanal (MET), poderão ser usadas com intenção curativa. A MET tem indicação em neoplasias em estágio 1, na região proximal do reto (National Comprehensive Cancer Network, 2014).

O tratamento do cancro do cólon e reto tem abordagens significativamente diferentes, embora com um objetivo comum: o planeamento de uma estratégia individualizada de modo a obter o melhor resultado.

O tratamento cirúrgico do cancro do cólon esporádico, inclui a hemicolectomia direita para as lesões à direita, a hemicolectomia esquerda ou sigmoidectomia para as lesões do lado esquerdo e por vezes a resseção segmentar do cólon.

O tratamento cirúrgico adequado para o CCR hereditário, como na síndrome de Lynch, é a colectomia total pelo risco de lesões metácronas. Para a FAP está indicada a proctocolectomia total ou a colectomia total nas formas atenuadas em que o reto é poupado.

A abordagem cirúrgica do tumor do reto depende da sua localização. Os tumores dos terços proximal, médio e distal, têm indicação para resseção anterior com anastomose primária, podendo ser necessário uma ileostomia ou colostomia temporária derivativa. Para os tumores do reto mais distal pode estar indicada a amputação abdominoperineal com colostomia definitiva. Uma pequena percentagem de tumores distais serão candidatos a excisão local.

Os doentes com CCR metastizado, também podem ter indicação para cirurgia com objetivo curativo. Doentes com metástases hepáticas ressecáveis têm indicação

para hepatectomia parcial, conseguindo-se assim um aumento da sua sobrevivência.

São também candidatos a cirurgia os doentes com metástases pulmonares uni ou bilaterais ressecáveis, na ausência de recorrência local ou de outras lesões primárias, e na ausência de doença extra-pulmonar, excepto metástases hepáticas prévias ou síncronas.

### **Ablação por radiofrequência (ARF)**

A ablação por radiofrequência é uma técnica que não tem o mesmo impacto na sobrevivência em relação à ressecção cirúrgica, no entanto ganhou espaço na abordagem das metástases hepáticas do CCR. Está indicada nos doentes sem indicação cirúrgica por co-morbilidades, ou como complemento da ressecção, permitindo a destruição completa das lesões. O objetivo é aquecer o tecido tumoral e a margem de parênquima normal até provocar necrose. Está indicada quando há no máximo 3 lesões, sendo a maior delas de dimensão inferior a 3 cm e a sua localização anatómica distante de grandes vasos.

### **Radioembolização arterial**

Nos doentes com metástases hepáticas de CCR não candidatos a cirurgia ou ablação, ou nos doentes resistentes a quimioterapia, poderá ser proposta a radioembolização arterial. Esta técnica utiliza microesferas de vidro ou de resina, que contêm um  $\beta$ -emissor de Yttrium-90, que se alojam preferencialmente nos

plexos venosos tumorais. Tem como principal vantagem poder ser usada independentemente do número e distribuição das metástases hepáticas.

### **Bombas de infusão intra-arterial**

As bombas de infusão intra-arterial podem ser utilizadas no tratamento do CCR metastizado porque permitem a administração regional de altas doses de quimioterapia no interior das metástases hepáticas, reduzindo-se os seus efeitos secundários. No entanto, é necessária uma cirurgia para colocação do cateter na artéria hepática comum, logo está associada a complicações precoces (perfusão extra-hepática, úlceras, trombose arterial/cateter, infecções).

### **Terapêuticas loco-regionais não cirurgicas**

Se a cirurgia não é possível pelo número de metástases ou pela presença de doença extra-hepática, existe a possibilidade de termo-ablação, radioembolização arterial (Radiologia de intervenção) ou o recurso às bombas de infusão intra-arterial (BIIa) anteriormente mencionadas.

Em doentes com doença avançada ou co-morbilidades importantes, se existir o risco de oclusão intestinal ou hemorragia, pode ser necessário outro tipo de abordagem. O tratamento endoscópico usando o laser *neodymium-yttrium-aluminum-garnet* (Nd:YAG) ou a coagulação com árgon plasma têm sido usados com o intuito de recanalizar o lúmen ou estancar a hemorragia de forma paliativa. O tratamento paliativo de algumas obstruções intestinais pode ser também efetuado, com a aplicação de próteses metálicas auto-expansíveis.

## Tratamento farmacológico

O tratamento do CCR tem como objetivo a indução da morte celular de todas as células cancerígenas existentes. Para que este objetivo possa ser alcançado, a investigação tem-se orientado para a pesquisa de fármacos que atuem em fases importantes do desenvolvimento tumoral.

Vários estudos têm demonstrado um aumento da sobrevivência global e da sobrevivência livre de doença nos doentes com CCR submetidos a quimioterapia.

Em 1957 foi desenvolvido o 5-Fluoracilo (5-FU), como fármaco capaz de interferir na evolução do CCR. O seu alvo é timidilatosintetase (TS), à qual se liga inativando-a de forma irreversível, impedindo assim a biosíntese do ADN. Durante muitos anos foi o único fármaco sistémico eficaz para o tratamento do CCR. Inicialmente usado em monoterapia, posteriormente associado à leucoverina ou ácido folínico, que parecem estabilizar a ligação do 5-FU ao seu alvo, a TS, com sinergia terapêutica. Nas décadas de 70 e 80 a investigação concentrou-se em melhorar as respostas ao 5-FU, através de alterações no esquema de administração (infusão versus bolus), aumento da intensidade da dose e associação com outros fármacos moduladores (LV, interferon- $\alpha$ , N-fosfo-acetil-L-aspartato – PALA ou Levamisol).

A associação de 5-FU com leucoverina ou ácido folínico (5-FU/LV) constituiu durante décadas a terapêutica padrão para o CCR tendo, apesar de tudo, uma eficácia limitada, com muito baixas taxas de resposta.

Nas décadas de 80 e 90 novos fármacos surgiram na prática clínica: o irinotecano, a oxaliplatina, a capecitabina, Uracilo-tegafur e o raltitrexato (Tabela 10).

O irinotecano é um inibidor da topoisomerase I, que bloqueia a reparação do ADN, enquanto a oxaliplatina é um inibidor da replicação do ADN.

**Tabela 10: Fármacos usados no tratamento do cancro colorretal.**

| <b>Fármaco</b>  | <b>Alvo</b>                                |
|-----------------|--|
| 5-fluoruracilo  | Timidilatosintetase                        |
| Capecitabina    | Timidilatosintetase                        |
| Uracilo-tegafur | Timidilatosintetase                        |
| Raltitrexato    | Timidilatosintetase                        |
| Oxaliplatina    | Nucleótidos de “crosslinking” do ADN       |
| Irinotecano     | Topoisomerase I                            |
| Bevacizumab     | Fator de crescimento endotelial            |
| Cetuximab       | Recetor do fator de crescimento epidérmico |
| Panitumumab     | Recetor do fator de crescimento epidérmico |
| Regorafenib     | Inibidor da tirosinacina                   |
| Ziv-aflibercept | Fator de crescimento endotelial            |

Os fármacos foram ensaiados quer em monoterapia quer em associação com 5-FU/LV. À combinação de 5-FU/LV com irinotecano chama-se FOLFIRI (ácido folínico, 5-fluoruracilo, irinotecano) e com a oxaliplatina chama-se FOLFOX (ácido folínico, 5-fluoruracilo, oxaliplatina).

Os estudos que compararam estas associações com o regime padrão com 5-FU, mostraram aumento na sobrevivência média de 12 para 20 meses nos doentes com CCR avançado, tratados com as associações.

Mais recentemente, os estudos realçam uma maior eficácia com os novos fármacos biológicos dirigidos quando associados ao FOLFOX ou FOLFIRI, nomeadamente o Bevacizumab, o Cetuximab, o Panatimumab e Regorafenib.

O bevacizumab é um anticorpo (Ac) monoclonal com ação sobre o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), inibindo a angiogénese.

O cetuximab e panatimumab são Ac monoclonais que inibem o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), uma glicoproteína transmembranar que interage com diversas vias de sinalização intracelulares envolvidas na carcinogénese.

Verificou-se entretanto que os doentes em que os tumores contêm mutações no gene *KRAS* (detetada em cerca de 40% dos casos) e mais recentemente *NRAS*, são responsáveis pela falência da inibição do EGFR e portanto pela resistência à terapêutica.

Alguns investigadores tentaram a associação do Ac monoclonal inibidor do EGFR com o Ac monoclonal inibidor do VEGF à terapêutica com FOLFOX ou FOLFIRI, mas a sobrevivência média foi inferior, pelo que se coloca a hipótese de uma interação negativa entre estes Ac monoclonais.

### **Radioterapia**

A radioterapia está indicada no tratamento pré-operatório de doentes com cancro do reto, incluídos nos estádios clínicos II e III. Com objetivo neoadjuvante recomenda-se a sua associação à quimioterapia nomeadamente com 5-FU ou capecitabina, esperando-se uma melhor abordagem cirúrgica com objetivo curativo. Por outro lado, pode estar indicada no pós-operatório de CR com estágio patológico pT2-4 com N0-2, M0, para diminuir o risco de recorrência local.

Ocasionalmente pode ser útil como terapêutica paliativa, nomeadamente em doentes com doença localmente avançada para controlo de dor ou hemorragia ou nos doentes metastizados para redução de volume de metástases hepáticas, pulmonares, cerebrais ou cutâneas.

## **Estratégias Terapêuticas**

A nível internacional existem algumas orientações para a abordagem dos doentes com CCR nomeadamente, as da *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*, que são atualizadas anualmente, com o resultado de novas evidências identificadas.

Se ao diagnóstico, o tumor do cólon se apresenta como um pólipó pediculado ou séssil, cuja biopsia revele um adenoma tubular, tubuloviloso ou viloso, ou carcinoma invasivo, deverá fazer-se o estadiamento clínico que inclua a colonoscopia com marcação da localização do pólipó no momento ou nas duas semanas seguintes. Se nesta avaliação se encontrar um único pólipó, completamente removido, com achados histológicos favoráveis e margens livres, o doente deve ser mantido em observação. Se for um pólipó pediculado ou se o pólipó for séssil o doente poderá ser mantido em observação ou fazer colectomia com a remoção em bloco dos gânglios linfáticos regionais. Se os achados da revisão histológica revelarem tecidos fragmentados, margens não acessíveis ou com achados histológicos desfavoráveis, o doente deverá ser submetido a colectomia com a remoção em bloco dos gânglios linfáticos regionais.

Se após um correto estadiamento clínico que inclua a colonoscopia, hemograma, perfil bioquímico, CEA, TC toraco-abdomino-pélvica, o cancro do cólon for passível de remoção e não estiver metastizado, independentemente de causar ou não obstrução, a técnica recomendada deverá ser a colectomia com a remoção em bloco dos gânglios linfáticos regionais. Nos doentes com neoplasia do cólon localmente irressecável, com contra-indicação médica para cirurgia ou que recusem a cirurgia, a estratégia será semelhante à dos doentes com CCR metastizado.



O tratamento do cancro do reto apresenta algumas diferenças em relação ao cólon, embora com alguns protocolos comuns nomeadamente no que diz respeito à quimioterapia.

Nos doentes com pólipos do reto a estratégia de tratamento é igual à do tratamento do cólon na mesma condição, exceto no que diz respeito à técnica cirúrgica, que será de acordo com os critérios abaixo referenciados.

Em primeiro lugar efetuar um estadiamento clínico do tumor do reto que inclua exame endoscópico com biopsia, CEA, TC toraco-abdomino-pélvica e eco-endoscopia retal ou RM pélvica.

Quando o tumor se apresenta como cT1, Nx/0, M0, a primeira abordagem recomendada é a cirurgia podendo ser uma resseção transanal ou transabdominal. Para se poder efetuar uma resseção transanal é necessário satisfazer as seguintes condições: que o tumor afete menos de 30% do lúmen do intestino, a sua dimensão seja inferior a 3 cm, que haja mais de 3 mm de margem livre, que o tumor seja móvel e não fixo aos planos profundos, que se encontre a menos de 8 cm de distância da margem anal, que seja T1, que haja ausência de invasão linfovascular e perineural, que o tumor seja bem diferenciado ou um pólipó que tenha sido previamente removido com cancro ou com histologia indeterminada,.

Se a peça de resseção cirúrgica apresenta T1-2, Nx com margens positivas ou invasão linfovascular ou tumor mal diferenciado, recomenda-se a resseção transabdominal seguida de vigilância.

Após a resseção cirúrgica a peça operatória é submetida a exame histológico para estadiamento definitivo. Nesta altura a opção terapêutica manter-se-á apenas pela

vigilância se o estadiamento for pT1-2, N0, M0. Se o estadiamento for pT3, N0, M0 ou pT1-3, N1-3, M0 está indicado o uso a título adjuvante de quimioterapia concomitante com radioterapia, ou quimioterapia ou radioterapia.

Quando o estadiamento clínico revela um tumor cT3, N0, M0 ou cT1-3, N1-2, M0 está indicado o uso de quimioterapia concomitante com radioterapia, como terapêutica neoadjuvante.

Quando o estadiamento clínico revela um cT4, N0-2, M0 ou um tumor localmente irressecável está indicado iniciar com quimioterapia e ou radioterapia neoadjuvantes, com o objetivo de diminuir as dimensões e se possível o estadiamento do tumor, para a sua posterior eventual ressecção.

A maioria dos doentes com doença metastática é candidata a quimioterapia sistémica para alívio dos sintomas e prolongamento da vida. Os doentes com carcinoma do cólon, em estágio III, deverão efetuar quimioterapia adjuvante, pois esta diminui a mortalidade em cerca de 33%.

No estágio II a realização de quimioterapia é questionável, não sendo recomendada. Alguns doentes incluídos neste estágio II, com tumor T4 ou tumor com perfuração, obstrução intestinal na apresentação, com menos de 12 gânglios isolados na cirurgia, com adenocarcinoma pouco diferenciado ou indiferenciado, poderão beneficiar de quimioterapia adjuvante.

A nível de tratamento médico tem havido significativos avanços. O principal agente utilizado é o 5-Fluoracilo (5-FU), um inibidor da timidilato sintetase. O 5-FU é habitualmente associado ao ácido folínico ou levofolinato de cálcio (LV), o que aumenta a afinidade deste agente ao seu alvo terapêutico. Há evidência que,

quando comparado à administração isolada de 5-FU, a associação aumenta a resposta terapêutica com ligeira melhoria na sobrevivência. Entre os doentes com CCR metastizado, em cerca de 20%, registar-se-á uma redução de 50% nas dimensões do tumor, com aumento da sobrevivência de 6 para 12 meses. O 5-FU é normalmente administrado por via endovenosa, sendo a infusão melhor tolerada do que o bólus, com menor incidência de efeitos adversos como diarreia e neutropenia. Existe uma forma oral, a Capecitabina, com eficácia semelhante ao 5-FU endovenoso.

A Oxaliplatina é um análogo da platina, que leva à replicação errada do ADN e à apoptose celular. A sua principal reação adversa é a neuropatia sensitiva dose dependente, que desaparece após a suspensão do fármaco. Nos doentes com doença metastática deve ser usado em associação com o 5-FU e LV, que revelou aumentar a resposta ao tratamento.

O Irinotecano, um inibidor da topoisomerase I, é outro dos fármacos usados no tratamento da doença metastática. Os efeitos secundários mais comuns incluem diarreia, alopecia e mielossupressão.

As recomendações indicam o uso de uma associação de fármacos na quimioterapia de primeira linha, havendo evidência de um maior benefício terapêutico com a combinação de 5-FU, LV e Oxaliplatina ou irinotecano, quando comparados com a administração isolada de 5-FU e LV. O esquema terapêutico FOLFOX inclui a combinação de Oxaliplatina, 5-FU em bólus e infusão contínua e LV constituindo a terapêutica padrão na abordagem à doença em estágio III e com boa atividade no estágio IV. O esquema FOLFIRI combina o irinotecano, ao LV e 5-FU em bólus e

infusão contínua. Inicialmente, pensou-se que esta associação aumentava a sobrevivência livre de doença, no entanto, estudos recentes demonstraram que o FOLFIRI aumenta a toxicidade terapêutica sem melhoria significativa dos resultados da sobrevivência.

Os tumores com instabilidade de microssatélites têm uma baixa resposta à quimioterapia, mas o tratamento com irinotecano pode ser benéfico.

Os avanços no campo da biologia molecular, nomeadamente o conhecimento de recetores para o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR) e para o fator de crescimento epidérmico (EGFR), levaram ao desenvolvimento de novas terapêuticas dirigidas contra os seus principais alvos, tendo surgindo assim os anticorpos monoclonais.

Os citostáticos são fármacos eficazes nos tumores de crescimento rápido, enquanto os agentes antiangiogénicos atuam tanto nestes como naqueles com crescimento lento e indolente, muito ou pouco vascularizados. Na verdade, quanto menor a vascularização do tumor, maior a sua susceptibilidade aos agentes antiangiogénicos.

O Bevacizumab é um fármaco anti-VEGF, que se liga a esta molécula, impedindo a interação com o seu recetor e inibindo desta forma a angiogénese.

Estudos demonstraram que a sua associação aos regimes contendo irinotecano e, ou oxaliplatina levam ao aumento do tempo livre de doença e da sobrevivência. O Bevacizumab é bem tolerado sendo os seus principais efeitos laterais a hipertensão, proteinúria, bem como o aumento do risco de fenómenos tromboembólicos .

O EGFR é uma proteína transmembranar reguladora das vias de sinalização que afetam o crescimento e proliferação das células neoplásicas. A expressão desta molécula pode ser detectada em cerca de 70% dos doentes com CCR e confere-lhe um pior prognóstico.

O Cetuximab e o Panitumumab são dois fármacos anti-EGFR eficazes no tratamento do CCR. Há a evidência de que o Cetuximab apresenta sinergia terapêutica com citostáticos, nomeadamente com o irinotecano, o que sugere que este anti-EGFR pode reverter a resistência celular ao irinotecano. O principal efeito colateral é o exantema acneiforme, cuja gravidade parece estar relacionado com a sua eficácia.

O Panitumumab tem eficácia semelhante ao Cetuximab como agente único no tratamento do CCR metastizado, apresentando uma menor percentagem de efeitos adversos.

Inicialmente considerou-se necessário a deteção da expressão desta molécula na superfície das células tumorais, para a terapêutica anti-EGFR, no entanto verificou-se que o grau da sua expressão não estava relacionado com a resposta ao tratamento, havendo tumores nos quais não tinha sido detetado através da imunohistoquímica e que beneficiaram do tratamento.

Cada vez é mais evidente que a presença de mutações dos oncogenes *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*, detetadas em cerca de 40% dos CCR esporádicos, ajudam a determinar que doentes beneficiam da administração de agentes anti-EGFR. Esta mutação leva a uma ativação independente e permanente do EGFR, resultando na proliferação e migração de células tumorais. Os doentes portadores desta mutação parecem ser resistentes à terapêutica anti-EGFR.

O reforafenibe é um inibidor de várias cinases, que inibe o crescimento e proliferação do tumoral. Tem a vantagem de ser um fármaco para uso oral, aprovado nos doentes com CCR metastizado, que progrediram após as várias terapêuticas padrão.

#### **1.6.5. VIGILÂNCIA APÓS TERAPÊUTICA**

Após a conclusão da terapêutica planeada, o doente deve ser mantido em seguimento independentemente do estágio inicial da doença. O doente em remissão e assintomático após o tratamento deverá ser avaliado a cada 3 meses nos primeiros 2 anos, semestralmente nos 3 anos seguintes e depois anualmente.

O plano de seguimento deverá contemplar, para além do interrogatório e exame físico, a realização de exames complementares de diagnóstico que permitam o diagnóstico precoce de uma recidiva ou progressão da doença. (National Comprehensive Cancer Network, 2014)

#### **1.6.6. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA**

A monitorização da resposta tumoral à terapêutica instituída é fundamental. Existe um conjunto de regras criadas pela OMS e publicadas pela primeira vez em 2000, que se baseiam em exames de imagem, que padronizam a avaliação da resposta dos tumores sólidos, sendo denominados os critérios de RECIST, *Evaluation Criteria In Solid Tumours* (RECIST). Estes critérios, baseados em exames de imagem unidimensional, visam obter medidas que permitam uma correta obtenção de dados como resposta objetiva, remissão completa, remissão parcial, doença estável,

doença em progressão, duração de resposta ou tempo livre de progressão (Eisenhauer *et al.*, 2009).

Os exames de imagem habitualmente usados incluem o exame radiológico convencional, a Tomografia Computorizada (TC), a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Tomografia de Emissão de Positrões (PET) (Eisenhauer *et al.*, 2009).

Para realizar esta avaliação é necessário definir doença mensurável ou doença não mensurável, lesão alvo ou lesão não alvo e nova lesão. Assim, a lesão foi definida como lesão mensurável, com pelo menos 2 cm na TC, 1 cm na TC helicoidal ou  $\geq 2$  cm na RMN. Nas lesões não mensuráveis incluem-se lesões com menos de 2 cm na TC, 1 cm na TC helicoidal ou  $\leq 2$  cm na RMN. Considera-se progressão da doença se existir um aumento superior ou igual a 20% no somatório dos maiores diâmetros, usando como referência o somatório dos valores mais baixos registados inicialmente (Eisenhauer *et al.*, 2009).

### **1.6.7. PROGNÓSTICO**

Para o CCR existem vários marcadores de prognóstico, uns relacionados com o doente, nomeadamente idade, sintomas, capacidade funcional, co-morbilidades e estado sócio-económico, outros relacionados com o tumor como a localização reto *versus* cólon, estadiamento do tumor primário se metacrono, extensão da doença metastática, apresentação da metastização síncrona *versus* metacrona, recidiva precoce após quimioterapia adjuvante com oxaliplatina e linhas prévias de tratamento. Fatores relacionados com o centro onde o doente é tratado,

nomeadamente a nível da experiência, do volume de doentes e da prática de acordo com os padrões, podem ser também influentes.

Dentro dos fatores de prognóstico bioquímicos destacam-se o hemograma, a fosfatase alcalina, a Lactato Desidrogenase (LDH), a bilirrubina, a albumina e o CEA. Mutações no KRAS, NRAS, BRAF são preditivas de resistência à terapêutica com anticorpos anti-EGFR, diminuindo as possibilidades terapêuticas e conferindo assim um pior prognóstico.

Os marcadores preditivos de resultados incluem a capacidade funcional, a grande extensão das metástases com várias localizações, carcinomatose peritoneal, particularmente se sintomática, o seguimento das normas para a terapêutica e o número de linhas de tratamento.

Do mesmo modo, a toxicidade da terapêutica, nomeadamente, as lesões acneiformes secundárias dos anticorpos monoclonais, a hipertensão arterial e a proteinúria do bevacizumab, bem como a cardiotoxicidade e os fenómenos tromboembólicos são marcadores preditivos.

De acordo com os dados do estudo epidemiológico internacional European Cancer Registry-based 5 (EUROCARE 5), realizado em 29 países da Europa, englobando 9 milhões de doentes adultos a quem foi diagnosticado CCR entre 2000 e 2007, verificou-se que as taxas de sobrevivência global aos 5 anos para este tipo de cancro têm vindo a subir, embora com diferenças significativas entre os vários países. Como exemplo dos dados revelados por esse estudo, as taxas de sobrevivência para o cancro do reto, aos 5 anos, são mostrados na Tabela 11.



**Tabela 11: Sobrevivência do cancro do reto.**

| Estádio     | Sobrevivência aos 5 anos |
|-------------|--------------------------|
| Estádio I   | 90%                      |
| Estádio II  | 60% a 85%                |
| Estádio III | 27% para 60%             |
| Estádio IV  | de 5% a 7%               |

Segundo os dados da Direção Geral de Saúde (DGS) publicados em 2013, os indicadores de mortalidade em Portugal, entre 2007 e 2011, dados pelo Instituto Nacional de Estatística (INE), por 100000 habitantes, códigos Classificação Internacional de Doenças (CID) 10, para o cancro do cólon, Tabela 12, têm vindo globalmente a aumentar, embora a taxa padronizada se tenha mantido estável.

**Tabela 12: Taxa de mortalidade no cancro do cólon.**

| Tumor maligno do cólon               |       |       |       |       |       |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                      | 2007  | 2008  | 2009  | 2010  | 2011  |
| Número de óbitos                     | 2424  | 2474  | 2496  | 2570  | 2668  |
| Taxa de mortalidade                  | 24,2  | 24,6  | 24,8  | 25,5  | 26,6  |
| Taxa de mortalidade padronizada      | 15,4  | 15,5  | 15,2  | 15,2  | 15,4  |
| Taxa de mortalidade padronizada <65  | 5     | 5,1   | 5     | 5,2   | 5,1   |
| Taxa de mortalidade padronizada ≥ 65 | 99,6  | 99,1  | 98,2  | 96,7  | 99    |
| Taxa de mortalidade padronizada <70  | 7,1   | 7,3   | 7     | 7     | 7     |
| Taxa de mortalidade padronizada ≥ 70 | 125,6 | 124,4 | 124,7 | 124,9 | 127,2 |

Fonte: INE,IP(2013)

Adaptado de: (Direção Geral de Saúde, 2013)

No que respeita às taxas de mortalidade para o cancro do reto, Tabela 13, verifica-se um aumento muito ligeiro, embora com uma diminuição de 3,1% na taxa padronizada acima dos 65 anos.

Cinquenta por cento dos doentes desenvolvem recidiva, que pode ser local, à distância ou ambas. A recidiva local é mais comum no cancro do reto do que no cancro do cólon.

**Tabela 13: Taxa de mortalidade no cancro do reto.**

| <b>Tumor maligno do reto</b>         |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------|------|------|------|------|------|
|                                      | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 |
| Número de óbitos                     | 851  | 916  | 878  | 923  | 881  |
| Taxa de mortalidade                  | 8,5  | 9,1  | 8,7  | 9,2  | 8,8  |
| Taxa de mortalidade padronizada      | 5,5  | 6    | 5,4  | 5,8  | 5,3  |
| Taxa de mortalidade padronizada <65  | 2    | 2,3  | 2    | 2,2  | 2,1  |
| Taxa de mortalidade padronizada ≥ 65 | 34,1 | 35,5 | 33   | 34,9 | 31   |
| Taxa de mortalidade padronizada <70  | 2,7  | 3,2  | 2,6  | 3,1  | 2,6  |
| Taxa de mortalidade padronizada ≥ 70 | 42,6 | 42,8 | 42,5 | 42   | 39,9 |

Fonte: INE, IP

Adaptado de: (Direção Geral de Saúde, 2013)

A doença recidiva em cerca de 5-30% dos doentes, ocorre geralmente durante o primeiro ano após a cirurgia. Fatores que influenciam o desenvolvimento de recorrência incluem variabilidade do cirurgião, o grau histológico, o estágio e a localização do tumor primário, bem como a capacidade de obtenção de margens negativas.

O tratamento cirúrgico pode ser usado para a recorrência e inclui a exenteração pélvica em doentes que tiveram um procedimento poupador de esfíncter.

A radioterapia geralmente é usada como tratamento paliativo em doentes que têm doença localmente irrecorrível.

Tendo em conta que o CCR é uma patologia muito frequente no nosso país e para a qual é necessário ainda muita investigação, este trabalho pretende contribuir para o estudo e avaliação da importância clínica de vários marcadores relacionados com a etiopatogenia do CCR e sua relevância, no diagnóstico precoce, na definição de novos grupos de risco e no prognóstico, bem como pela identificação de eventuais novos alvos terapêuticos.

### 1.6.8. SEGUIMENTO

As recomendações para vigilância em doentes no estágio I, II e III incluem a história e exame físico cada 3-6 meses durante 2 anos e cada 6 meses até aos 5 anos. O CEA deve ser avaliado inicialmente e depois a cada 3-6 meses durante 2 anos e a cada 6 meses até aos 5 anos. Além disso, a colonoscopia dentro do primeiro ano após a cirurgia (ou nos primeiros 3 a 6 meses se não tiver sido realizada previamente), repetida aos 3 anos se normal e depois cada 5 anos é relevante no seguimento destes doentes. Caso a colonoscopia identifique pólipos, deve ser repetida passado um ano. A realização de uma TAC tóraco-abdomino-pélvica anual está preconizada até aos 3 anos para doentes no estágio III e para os doentes no estágio II com elevado risco de recidiva. A PET não é recomendada por rotina.

As recomendações para vigilância de doentes no estágio IV submetidos a cirurgia com intenção curativa e quimioterapia adjuvante incluem a TAC toraco-abdomino-pélvica cada 3-6 meses nos primeiros 2 anos após tratamento adjuvante, a cada 6-12 meses até aos 5 anos, e se o CEA for elevado antes da cirurgia, repetir cada 3 meses nos primeiros 2 anos e cada 6 meses nos 3-5 anos seguintes.



## 2. OBJETIVOS



## 2.OBJETIVOS

### Objetivos gerais:

O principal objetivo deste estudo é a avaliação da importância clínica de várias citocinas, como as adipocitocinas e citocinas pro-inflamatórias, no desenvolvimento e progressão do cancro colorretal (CCR) de modo a contribuir para um melhor conhecimento da etiopatogenia do CCR. Além disso, pretende-se pesquisar novos marcadores tumorais que, de um modo não invasivo, permitam melhorar a estratificação e o diagnóstico precoce e definir o prognóstico dos doentes com CCR.

### Objetivos específicos:

- i. Avaliar a potencial utilização dos níveis séricos das adipocitocinas (Adiponectina, Leptina, Resistina e Visfatina, e das citocinas inflamatórias, MCP-1 e TNF- $\alpha$ , como marcadores de desenvolvimento e progressão do CCR.
- ii. Avaliar a importância clínica dos níveis séricos e de expressão génica destas adipocitocinas e citocinas inflamatórias na eventual utilização como novos marcadores tumorais que, de um modo não invasivo, permitam fazer um diagnóstico precoce e avaliar o prognóstico dos doentes com CCR, definindo novos grupos de risco.
- iii. Estudar a relação dos níveis séricos das adipocitocinas e citocinas inflamatórias com a sua expressão génica no tecido normal e tumoral, de modo a encontrar marcadores periféricos relevantes que permitam avaliar o risco de desenvolver CCR.

- iv. Avaliar a relevância das adipocitocinas e citocinas inflamatórias como marcadores preditivos do prognóstico em doentes com CCR.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

1  
2

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram selecionados 89 doentes com o diagnóstico histológico de adenocarcinoma do cólon ou reto e 73 controlos em pessoas sem doença neoplásica conhecida.

#### 3.1. SELEÇÃO DE DOENTES E CONTROLOS

Os critérios para o diagnóstico de neoplasia do cólon e reto basearam-se na existência de identificação histológica de adenocarcinoma em tecido tumoral obtido por biópsia, durante exame endoscópico ou proveniente da peça operatória em doentes operados em situação urgente. Todos os doentes foram selecionados no Serviço de Cirurgia do Hospital Distrital da Figueira da Foz, EPE (HDFE, EPE) e na Consulta de Oncologia Médica do mesmo hospital.

A seleção da população controlo foi efetuada entre utentes ou acompanhantes da Consulta de Medicina Interna do HDFE, EPE e indivíduos portadores de défice cognitivo ligeiro, seguidos na Consulta de Neurologia do CHUC, não portadores de doença neoplásica, de doença inflamatória do intestino ou que tivessem feito previamente tratamento de quimioterapia.

O projeto de investigação e os consentimentos informados para doentes e controlos foram apresentados à Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) que os aprovou. Foram igualmente apresentados ao Conselho de Administração e Comissão de Ética do HDFE, EPE e aprovados por ambos.

A todos os doentes e controlos selecionados foi feito um convite para participação no estudo, o qual foi explicado, e dado o consentimento informado para assinar. Foi efetuada uma entrevista pessoal com vista à obtenção de dados epidemiológicos, clínicos e patológicos.

Na entrevista foram recolhidos dados demográficos (data de nascimento, género, naturalidade, residência, profissão, prática de exercício físico e estilo de vida), hábitos alimentares (alcoólicos, tabágicos, cafeínicos, teínicos, consumo de leite, carne vermelha, vegetais e fruta), medidas antropométricas (peso, altura e perímetro da cintura), dados relacionados com a doença (sintomas, tempo de evolução dos sintomas, antecedentes pessoais patológicos e cirúrgicos, hábitos medicamentosos, estado de saúde com base no inquérito de capacidade funcional ECOG), diagnóstico da doença e evolução (resposta completa, recidiva, progressão, morte), com uma avaliação final de toda a população doente estudada em 28 de fevereiro de 2014.

Todos os indivíduos da amostra, doentes e controlos, foram classificados segundo o IMC e o perímetro da cintura.

Nas amostras de sangue, foram avaliados os seguintes parâmetros: hemograma completo, glicémia em jejum, azoto ureico, creatinina, transaminase glutâmico-oxalacética (GOT), transaminase glutâmico pirúvica (GPT), fosfatase alcalina, colesterol total, colesterol LDL (Lipoproteína de baixa densidade) e colesterol HDL (Lipoproteína de alta densidade), triglicédeos, LDH, CEA, Ca19.9.

Procedeu-se à análise da localização topográfica do cancro no cólon ou reto e efetuado o estadiamento clínico ou patológico segundo a classificação de Tumor, Nódulo, Metástase (TNM) para cancro colorretal definida pelo *The American Joint*

*Committee on Cancer (AJCC), 7th edition, revised in 2010*, e os critérios de RECIST versão 1.1 para definir a resposta completa e a progressão, tendo sido calculados: o tempo até à recidiva, o tempo até à progressão e o tempo de sobrevivência global.

### **3.2. RECOLHA DE AMOSTRA**

Os estudos foram efetuados no sangue periférico de doentes com CCR selecionados no HDFS, EPE segundo os critérios internacionais de classificação e diagnóstico deste tipo de cancro e em indivíduos sem patologia neoplásica. Aos doentes foram colhidas amostras de sangue, tecido tumoral e tecido do cólon normal. Aos controlos foram colhidas amostras de sangue e tecido de cólon normal. As amostras de sangue foram colhidas no dia da cirurgia, antes da entrada no Bloco Operatório, estando todos num jejum de cerca de 16 horas. Os doentes selecionados através da Consulta de Oncologia Médica e os controlos estavam num jejum de 12 horas.

Aos doentes que não foram operados, ou que fizeram primeiro terapêutica neoadjuvante, as amostras de sangue foram colhidas no dia da consulta de decisão terapêutica. 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 projeto e dos seus potenciais riscos e benefícios, e assinaram voluntariamente o consentimento informado, como mencionado anteriormente.

O sangue foi recolhido em tubos BD Vacutainer (para soro) e tubos BD Vacutainer K3E com EDTA 5,4 mg (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. As amostras de tecido tumoral e tecido do cólon normal foram colocados em solução conservante de ARN (*RNAlater*) e conservados a -20°C até ao seu processamento.

### 3.3. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

#### 3.3.1 Determinação das medidas antropométricas

O Índice de Massa Corporal foi calculado segundo a fórmula,  $IMC = \text{Peso}/\text{Altura}^2$  ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), tendo sido feita a determinação do peso e da altura no dia da colheita das amostras. As unidades utilizadas foram o quilograma (kg) no peso e o metro (m) na estatura. Distribuiu-se a população em estudo de acordo com a orientação número 017/2013 da Direção Geral de Saúde (Tabela 14), datada de 05 de dezembro de 2013, para o IMC, cuja fonte é a Organização Mundial da Saúde (1995, 2000).

**Tabela 14: Índice de Massa Corporal de acordo com Organização Mundial da Saúde**

| Designação                  | IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) | Classe               |
|-----------------------------|--------------------------------|----------------------|
| <b>Classe de Baixo Peso</b> |                                |                      |
| Magreza severa              | < 16,00                        | III                  |
| Magreza média               | 16,00–16,99                    | II                   |
| Magreza moderada            | 17,00–18,49                    | I                    |
| Normal                      | 18,50–24,99                    | <b>Peso normal</b>   |
| Pré-obesidade               | 25,00–29,99                    | <b>Pré-obesidade</b> |
| <b>Classe de Obesidade</b>  |                                |                      |
| Obesidade                   | 30,00–34,99                    | I                    |
| Obesidade                   | 35,00–39,99                    | II                   |
| Obesidade                   | $\geq 40,00$                   | III                  |

Fonte: anexo à orientação número 017/2013 da Direção Geral de Saúde, datada de 05 de dezembro de 2013, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (1995, 2000)

Tendo em atenção esta orientação, os doentes foram distribuídos em quatro grupos: baixo peso, peso normal, pré-obesidade e obesos.

O perímetro da cintura foi medido na zona mais estreita do abdómen, conhecida por cintura natural e foi considerado normal se inferior a 94 cm para o homem e 80 cm para a mulher, elevado entre 94 e 102 cm para o homem e 80 e 88 cm para a mulher e muito elevado se maior que 102 cm para o homem e maior que 88 cm para a mulher.

### **3.2.2. Avaliação do estado funcional**

A avaliação da capacidade funcional do doente é uma medida importante no doente oncológico, pois constitui um fator de prognóstico. Existem várias escalas para a sua avaliação, sendo a mais antiga e mais usada a de Karnofsky, que classifica a capacidade funcional do doente entre 0 e 100%, dividindo-os em 10 classes correspondentes a níveis de 10% cada.

Em 1982 Oken e colaboradores publicaram uma escala mais simples do *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), que classifica os doentes em 6 classes, que variam desde a classe 0 em que o doente está completamente ativo, capaz de realizar todas as suas atividades sem restrições, até à classe 5 que corresponde à morte.

Na Tabela 15 pode observar-se a equivalência entre a escala ECOG e a escala de Karnofsky. No presente estudo foi usada a escala ECOG, classificando os doentes entre a classe 0 e a classe 4 em que o doente está completamente incapaz de realizar autocuidados básico, totalmente confinado ao leito ou à cadeira.

**Tabela 15: Escalas de capacidade funcional**

| ECOG | Capacidade funcional   | Karnofsky |
|------|--|-----------|
| 0    | Completamente ativo; capaz de realizar todas as suas atividades sem restrição  | 90-100%   |
| 1    | Restrição a atividades físicas rigorosas; é capaz de trabalhos leves e de natureza sedentária  | 70-80%    |
| 2    | Capaz de realizar todos os autocuidados, mas incapaz de realizar qualquer atividade de trabalho; em pé aproximadamente 50% das horas em que o doente está acordado | 50-60%    |
| 3    | Capaz de realizar somente autocuidados limitados, confinado ao leito ou cadeira mais de 50% das horas em que o doente está acordado                                | 30-40%    |
| 4    | Completamente incapaz de realizar autocuidados básico, totalmente confinado ao leito ou à cadeira  | < 30%     |
| 5    | Morto  | 0         |

Adaptado de Oken et al. (1982)(Oken et al., 1982)

### 3.2.3. Avaliação dos níveis séricos de adipocitocinas e fatores inflamatórios

Os níveis séricos de Adiponectina, Leptina, Resistina, TNF $\alpha$ , Visfatina e *MCP-1* foram determinados por técnicas de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), um método imunológico desenvolvido para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos que apresenta elevada sensibilidade e especificidade. Esta metodologia desenvolve-se normalmente em dois passos, sendo o primeiro a reação entre o anticorpo e o antígeno e o segundo a reação de revelação através de hidrólise enzimática que ocorre entre o complexo antígeno-enzima e o substrato.

Os níveis de TNF- $\alpha$  e MCP-1 foram determinados em amostras de soro, através dos *kits* comerciais Human TNF ELISA Set and Human MCP-1 ELISA Set, BD Biosciences Pharmigen (CA, EUA), respetivamente, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de sangue periférico colhido em tubos sem preparação foram centrifugadas durante 10 minutos a 1000 xg. O soro obtido foi imediatamente aliquoteado e guardado a -20°C até posterior utilização. Assim, resumidamente, aos poços da respetiva placa de ELISA adicionou-se 100  $\mu$ L de amostra não diluída e de

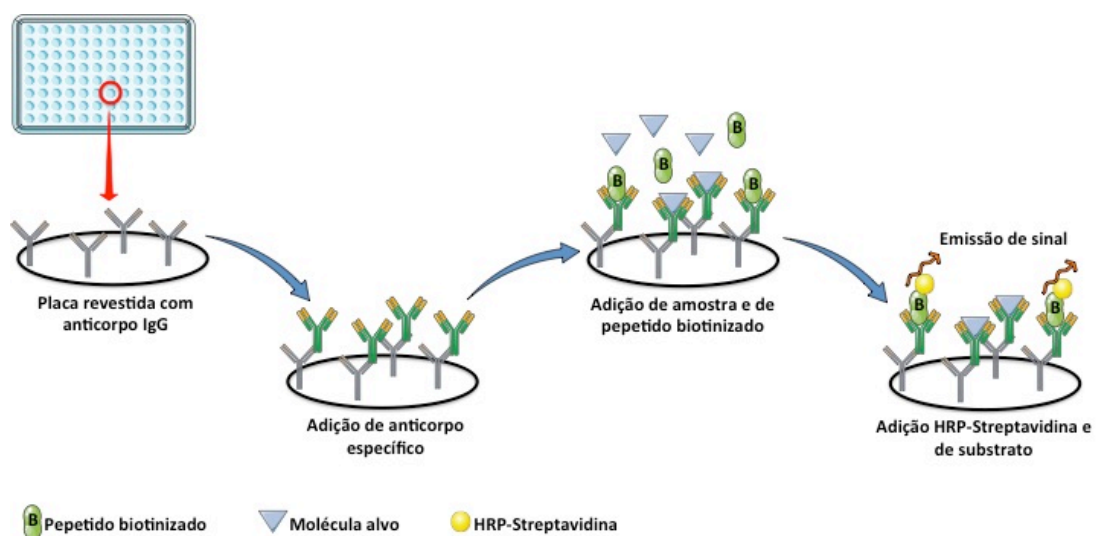


padrões de diferentes concentrações (TNF: 250 pg/mL, 125 pg/mL; 62,5 pg/mL, 31,3 pg/mL, 15,6 pg/mL e 7,8 pg/mL; MCP-1: 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL; 62,5 pg/mL, 31,3 pg/mL e 15,6 pg/mL) e incubou-se durante 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem (*Wash Buffer* dos respetivos kits), por adição e remoção do tampão de lavagem. Seguidamente, adicionou-se 100 µL de *Working Detector*, incubando-se durante 1 hora à temperatura ambiente. Procedeu-se a novas lavagens das placas e adicionou-se 100 µL de *TMB One-Step Substrate Reagent* a cada poço. As placas foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente e, após este período de tempo, adicionou-se 50 µL de *Stop Solution*. Por fim, procedeu-se à leitura da placa, num espectrofotómetro leitor de placas, no comprimento de onda de 450 nm, a correção deste através da subtração da densidade ótica a 570 nm.

Os níveis séricos de adiponectina, leptina e resistina foram determinados utilizando os kits, *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), respetivamente. O procedimento efetuado para estas determinações foi similar ao anteriormente descrito para a determinação do TNF e do MCP-1, no entanto as amostras foram diluídas 20x para a quantificação dos níveis plasmáticos de resistina, 100x para a determinação dos níveis plasmáticos de leptina e 5000x para a quantificação da adiponectina plasmática.

Na determinação dos níveis plasmáticos de visfatina foi utilizado o *Ray Bio Human/Mouse/Rat Visfatin Enzyme Immunoassay Kit*, RayBiotech, Inc, GA, EUA. Esta adipocitocina foi determinada através de um ensaio ELISA competitivo (Figura 15), sendo o procedimento experimental ligeiramente diferente. A determinação

dos níveis plasmáticos da visfatina iniciou-se pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de anticorpo anti-visfatina a cada poço de ELISA seguida de incubação durante a noite a 4°C. Findo este período de incubação, a placa foi lavada com o respetivo *Wash Buffer*, de modo a eliminar o anticorpo não ligado à placa. Seguidamente adicionou-se, em duplicado, 100  $\mu\text{L}$  de plasma não diluído e de padrões de diferentes concentrações (1000 ng/mL; 100 ng/mL; 10 ng/mL; 1 ng/mL e 0,1 ng/mL) e incubou-se a placa durante 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se a novas lavagens e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução HRP-Streptavidina incubando-se a placa durante 45 minutos à temperatura ambiente com agitação ligeira. No final deste período a placa foi lavada quatro vezes e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de *TMB One-Step Substrate Reagent* a cada poço. As placas foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente, com ligeira agitação, ao abrigo da luz e após este período de tempo adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de *Stop Solution*. Por fim, procedeu-se à leitura da placa no comprimento de onda de 450 nm.



**Figura 15:** Esquema representativo de um ensaio *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA competitivo).

A leitura das absorvâncias foi efetuada num espectrofotómetro leitor de placas (*Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments*). A quantidade das diferentes adipocitocinas e fatores inflamatórios foi determinada através da comparação das suas absorvâncias com a respetiva curva padrão das amostras padrão. Todas as amostras apresentaram um coeficiente de variação inferior a 10%. Os resultados representam a mediana e a distância interquartil, sendo apresentados em mg/mL no caso da adiponectina, em ng/mL no caso da leptina, resistina e visfatina, e em pg/mL no caso do TNF-  $\alpha$  e do MCP-1.

#### **3.3.4. Avaliação dos níveis de expressão génica de adipocitocinas e fatores inflamatórios em tecidos de cólon tumoral e normal**

Tal como referido anteriormente, foram obtidos tecidos de cólon tumoral e respetivo cólon normal (margens de segurança das peças operatórias) de 61 doentes com CCR e tecido de cólon normal proveniente de 6 indivíduos saudáveis. Estas amostras foram conservadas em RNA $\text{later}$  até à extração de ARN.

##### **3.3.4.1. Extração de ARN**

A extração de ARN dos tecidos em estudo foi efetuada utilizando NZYol (NZYtech). Este produto, constituído à base de fenóis, permite lisar membranas celulares expondo o conteúdo celular e conservando a integridade do ARN.

Assim, colocou-se aproximadamente 30 mg de tecido tumoral ou normal em 1 mL de NZYol, sendo depois efetuada a lise mecânica das células através de agitação intensa com pequenas esferas de vidro e sucessivas pipetagens. De seguida, as amostras foram incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, adicionou-se 200  $\mu$ L de clorofórmio e agitou-se os tubos manualmente durante 15 seg. Seguiu-se nova incubação de 2 a 3 min à temperatura ambiente. Depois, centrifugou-se os lisados a 4°C durante 15 min a 12.000 xg. Durante esta centrifugação originam-se duas fases na amostra, ficando o ARN na fase aquosa (superior). Removeu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se 500  $\mu$ L de isopropanol gelado a cada amostra de modo a precipitar o ARN. As amostras foram novamente incubadas à temperatura ambiente durante 10 min e centrifugadas a 12.000 xg durante 10 min, a 4°C. Posteriormente, removeu-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol a 75%, por centrifugação 7.500 xg durante 5 min a 4°C. O sedimento foi deixado à temperatura ambiente de modo a permitir a evaporação do etanol e posteriormente ressuspenso em água livre de RNases.

As amostras de ARN, assim obtidas, foram quantificadas e o grau de pureza avaliado recorrendo-se a espectrofotometria de absorção (NanoDrop® 1000 Spectrophotometer). O grau de pureza do ARN foi determinado através da razão 260nm/280nm, tendo sido utilizadas apenas as amostras com grau de pureza entre 1.95 e 2.05, e com concentração superior a 50 ng/ $\mu$ l. As amostras foram posteriormente armazenadas a -20°C.

#### **3.3.4.2. Conversão de ARN em cADN**

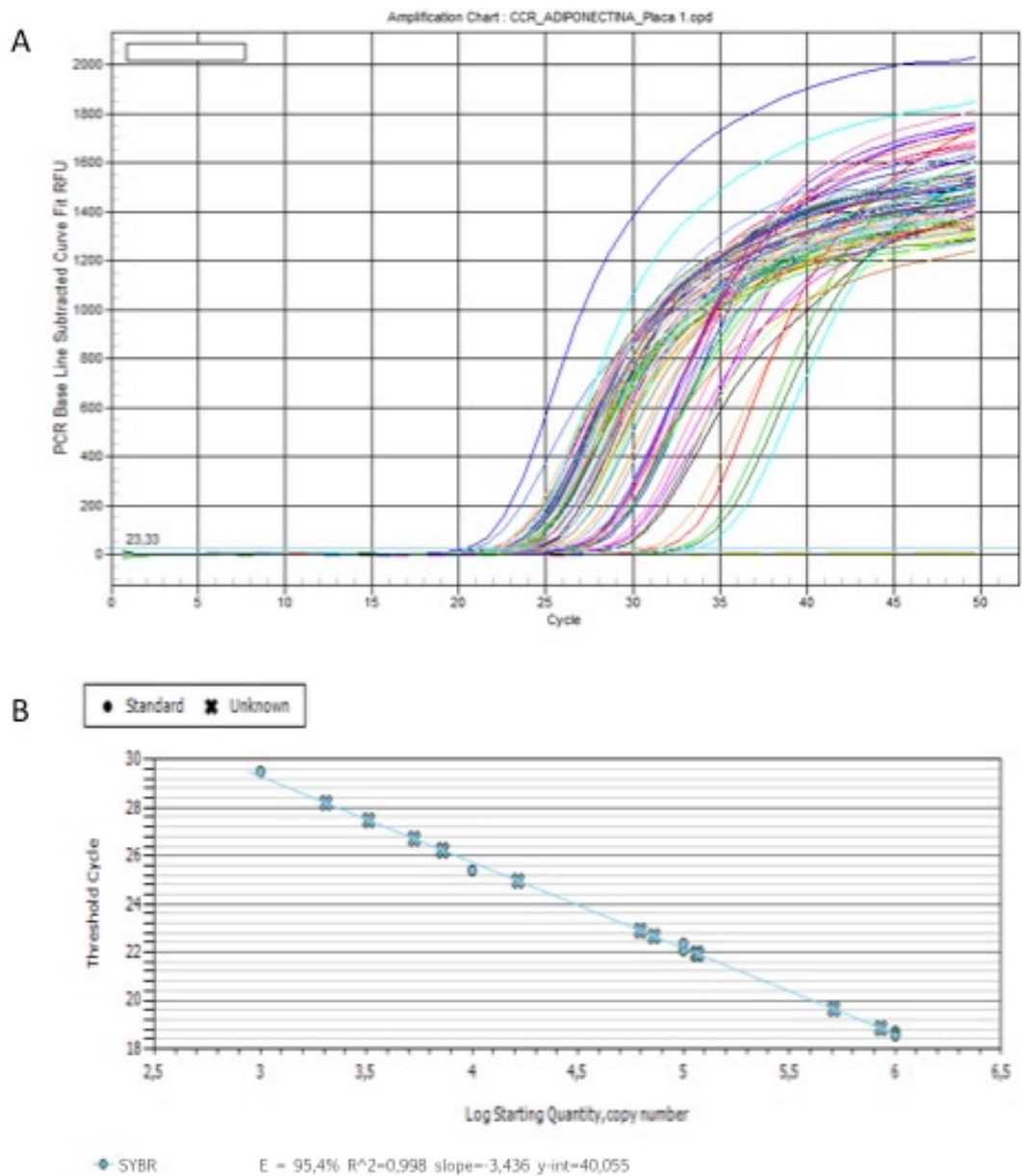
Seguidamente, procedeu-se à conversão do ARN para cADN através do kit comercial *Superscript III* (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, num tubo adicionou-se OligodT (Invitrogen) a uma concentração de 500  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g de ARN, uma mistura de dNTPs (desoxinucleotidos trifosfatados de adenina,

guanina, citosina e timina) (Invitrogen) a uma concentração de 10 mM e água destilada livre de RNases. A mistura foi aquecida a 65°C durante 5 min, sendo de seguida colocada em gelo. Posteriormente, foi adicionado tampão de síntese de cADN (Invitrogen), 5 vezes concentrado, DTT a uma concentração de 0,1 M (Invitrogen), um inibidor das RNases, *RNase OUT<sup>TM</sup>* (Invitrogen), e a transcriptase reversa *Superscript III* (Invitrogen). A mistura final foi incubada a 50°C durante 50 min, seguida de nova incubação a 85°C durante 5 min. Por fim adicionou-se *RNase H* e procedeu-se a nova incubação durante 20 min a 37°C. Estas incubações foram realizadas no termociclador *MyCycler<sup>TM</sup>BioRad*, e o cADN foi guardado a -20°C até posterior utilização.

#### **3.3.4.3. Quantificação da expressão génica das adipocitocinas e fatores inflamatórios por PCR em tempo real quantitativo**

A quantificação da expressão génica das citocinas nos tecidos de cólon tumoral e normal foi efetuada por RT-PCR em tempo real (qPCR). Esta técnica utiliza um sistema de deteção de fluorescência para determinar os níveis de expressão génica, e apresenta como principal vantagem uma quantificação fiável e reproduzível da quantidade de ARN inicial. O método recorre à utilização de corantes fluorescentes, como o SYBR Green, e a termocicladores equipados com módulos com detetores de fluorescência, que permitem a quantificação e registo simultâneo dos produtos amplificados ao longo da reação. Assim, a medida da fluorescência traduz a quantidade de produto amplificado em cada ciclo, que pode ser representada graficamente. O gráfico obtido é uma curva exponencial seguida de um *plateau*, em que o número de ciclos da PCR está representado no eixo dos X e a fluorescência

acumulada no eixo dos Y (Figura 16-A). Na fase exponencial, a quantidade de produto amplificado duplica aproximadamente a cada ciclo e o número do ciclo de amplificação para o qual a fluorescência ultrapassa a linha de base, o Ct, é



**Figura 16: Exemplo representativo de uma reta de amplificação (A) e de uma curva padrão (B) de PCR em tempo real (qPCR).**

Em cada placa de PCR gerou-se uma reta padrão usando diluições seriadas (10 vezes) do alvo de amplificação de modo a calcular a eficiência da reacção (E). Neste exemplo a eficiência de amplificação foi de 95,4%.

proporcional à quantidade inicial das moléculas alvo. Assim, quanto mais baixo for o Ct de uma amostra, maior o número de moléculas alvo inicial.

A expressão génica foi avaliada por quantificação relativa com recurso ao sistema de deteção de amplificação *EvaGreen* da Bio-Rad utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Este método de quantificação relativa baseia-se na normalização dos resultados por comparação com a quantificação da expressão de um gene constitutivamente expresso (*housekeeping gene* ou controlo endógeno). Uma vez que este método é apenas válido quando os genes alvo e genes de referência apresentam eficiências de amplificação (E) semelhantes, aplicou-se a fórmula  $R = E_{(\text{gene alvo})}^{\Delta Ct} / E_{(\text{gene alvo controlo})}^{\Delta Ct}$ , em que  $\Delta Ct = C_{T(\text{gene alvo})} - C_{T(\text{gene referência})}$  quando as eficiências de amplificação não foram semelhantes. A aplicação desta fórmula permite uma análise mais fidedigna dos resultados obtidos (Livak et al., 2001; Pfaffl, 2004).

Assim, o cADN de cada uma das amostras foi amplificado e quantificado através do uso de primers *forward* e *reverse* (Tabela 16), a uma concentração de 500 nM, a que se juntou uma mistura de reação contendo DNTP's (desoxinucleotidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina) e *EvaGreen*, o fluoróforo que se incorpora na dupla cadeia de ADN emitindo fluorescência. A qPCR foi realizada no termociclador *iQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time PCR* da BioRad. A reação de amplificação iniciou-se por um primeiro ciclo de desnaturação inicial a 95°C durante 30 segundos, seguida de 40 ciclos de amplificação, composto por uma fase de desnaturação a 95°C durante 5 segundos e um período de emparelhamento a 60°C durante 10 segundos. Por fim, efetuou-se uma curva *melting* através de um ciclo de desnaturação que decorreu entre 65°C e 95°C, com incremento de 0.5°C a cada 10 segundos. Para além dos genes de interesse, foi também utilizado o gene GADPH,

como controlo endógeno, e todas as amostras foram quantificadas em duplicado. Para cada gene em estudo e em cada placa de amplificação foi efetuada uma reta padrão, obtida através de diluições seriadas de uma mistura de amostras positivas. A obtenção deste parâmetro permite determinar a eficiência da reação, calculada através do declive da reta. Foram consideradas para o estudo as placas de amplificação cuja eficiência se encontrava entre os 90% e os 105%, garantindo assim uma análise fidedigna dos resultados (Figura 16-B) (Livak KJ e Schmittgen TD., 2001).

**Tabela 16: Genes e respetivos primers de qPCR**

| <b>GENES</b>  | <b>Primer Foward</b>     | <b>Primer Reverse</b>  |
|---------------|--------------------------|------------------------|
| <b>ADIPOQ</b> | CTGTCTTGGAAGGACTACTACTCA | AGTTCGGCACTTAGAGATGGA  |
| <b>NAMPT</b>  | GCCTTCGGTTCTGGTGGAG      | CCTGCTGGCGTCCTATGTAA   |
| <b>LEP</b>    | AAACGCAAAGGGCTGAAAG      | GACCGTCACTCCATGATAGG   |
| <b>RETN</b>   | GGTCGCCGGCTCCCTA         | GGAGGTGACGCTCTGGCA     |
| <b>CCL2</b>   | ACCCAAACTCCGAAGACTTGAACA | ACAGGGTGTCTGGGGAAAGC   |
| <b>TNF</b>    | TAAGAGGGAGAGAAGCAACT     | CAGTATGTGAGAGGAAGAGAAC |
| <b>GAPDH</b>  | AGCCACATCGCTCAGACAC      | GAGGCATTGCTGATGATCTTG  |

*ADIPOQ*, adiponectin, *C1Q* and collagen domain containing (*Adiponectina*); *NAMPT*, nicotinamide phosphoribosyltransferase (*Visfatina*); *LEP*, leptin (*Leptina*); *RETN* resistin (*Resistina*); *CCL2*, chemokine (*C-C motif*) ligand 2 (*MCP-1*); *TNF*, tumor necrosis fator; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Os nomes dos genes encontram-se de acordo com o aprovado pelo HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*).

### 3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado utilizando os programas SPSS, versão 21 (Statistical Package for Social Sciences), e GraphPad, versão 5.



Iniciou-se a análise estatística pela determinação da Normalidade com recurso ao teste de Kolmogorov-Smirnov. Uma vez que a distribuição dos parâmetros analisados não era normal, utilizou-se a mediana e a amplitude interquartil para descrever as variáveis quantitativas, nomeadamente os níveis séricos e a expressão génica das adipocitocinas e fatores inflamatórios. Na análise estatística destes parâmetros entre dois grupos, por exemplo controlos e CCR, recorreu-se ao teste não paramétrico de Mann-Whitney. Na análise estatística de 3 ou mais grupos em simultâneo, por exemplo entre as diferentes localizações tumorais, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. Seguidamente foram efetuadas curvas ROC para os parâmetros estatisticamente diferentes, calculando-se a área debaixo da curva (AUC) que corresponde ao poder discriminatório das quantificações em distinguir controlos de doentes. Por fim, foi determinado o *cut-off* que maximiza a sensibilidade e especificidade de cada parâmetro através do cálculo do índice de Youden. Os *cut-offs* foram posteriormente utilizados na análise da sobrevivência segundo o método de Kaplan-Meier.



## **4. RESULTADOS**

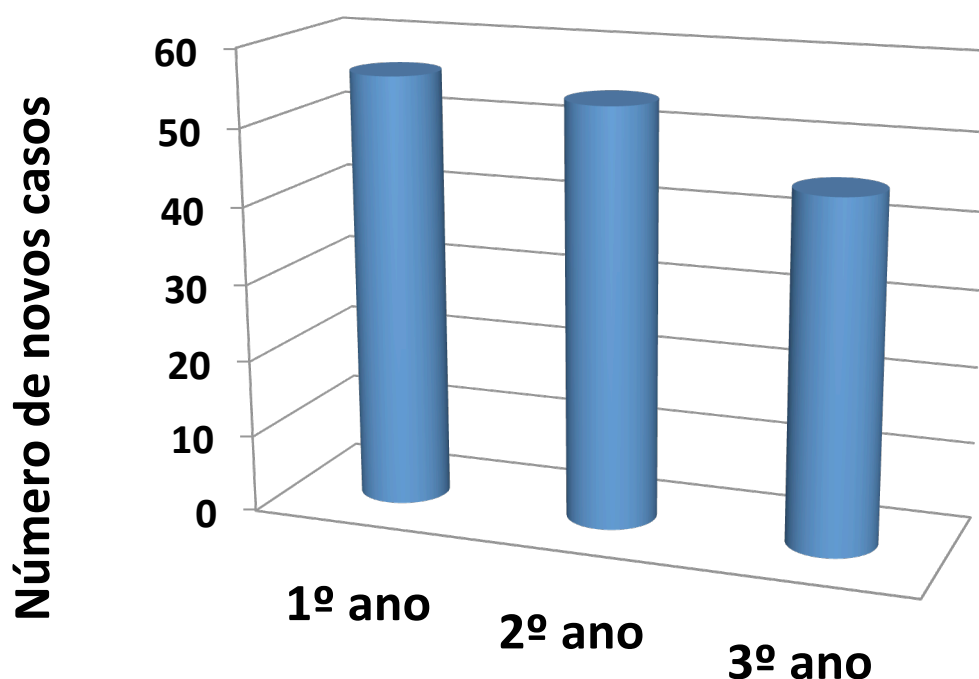


## 4. RESULTADOS

### 4.1. ENQUADRAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DO ESTUDO

Entre 1 de março de 2010 e 28 de fevereiro de 2013, foram seguidos no Serviço de Cirurgia e Medicina Interna (Oncologia Médica) do HDFS, EPE, 156 novos casos de doentes com mais de 18 anos, com o diagnóstico de cancro colorretal esporádico, confirmados histologicamente como adenocarcinomas.

Como podemos observar na Figura (17), o número de novos casos de CCR por 100.000 habitantes diminuiu ligeiramente ao longo dos três anos em que decorreu o estudo. Contudo, o número médio de doentes diagnosticados está de acordo com o previsto quando foi proposta a realização deste trabalho. Foi deste conjunto de doentes que seleccionámos a população alvo do presente estudo.



**Figura 17: Incidência anual de cancro colorretal no período de 1 de março de 2010 a 28 de fevereiro de 2013.**

A incidência foi calculada tendo por base os doentes com CCR seguidos no HDFS, EPE.

## **4.2. COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

### **4.2.1. COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA**

O estudo envolveu 153 indivíduos, dos quais 89 eram portadores de cancro colorretal esporádico, sem antecedentes de doença neoplásica, doença inflamatória do intestino ou outra doença inflamatória aguda ou crónica conhecida, a qual se designou por população doente, e 73 indivíduos não portadores de doença oncológica, a qual se designou por população controlo.

### **4.2.2. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DA AMOSTRA**

As características gerais da amostra estão representadas na Tabela 17, verificando-se que não existem diferenças significativas no que diz respeito à idade, IMC e ao perímetro da cintura (PC) entre o grupo de doentes e o grupo controlo, quer globalmente quer quando divididos por género.

No que diz respeito à distribuição por género, a população doente é predominantemente do género masculino, constituindo 65,2% do total de doentes com CCR, enquanto os indivíduos controlos são predominantemente do género feminino, compreendendo 58,9% do total desta população. Ou seja, dos 89 doentes com CCR, 58 são do género masculino e 31 do género feminino.

A idade mediana ao diagnóstico da população de doentes com CCR é de 72,09 anos e amplitude interquartil (IQR) de 15, com uma distribuição etária entre 29 e 91 anos, dos quais 5,16% (n=5) tinham menos de 50 anos (Tabela 17 e Figura 18).

A distribuição dos doentes de acordo com a idade ao diagnóstico e estratificada por décadas evidencia um pico de maior incidência na década de 70, seguida da década de 60.

Tabela 17: Caracterização global da amostra

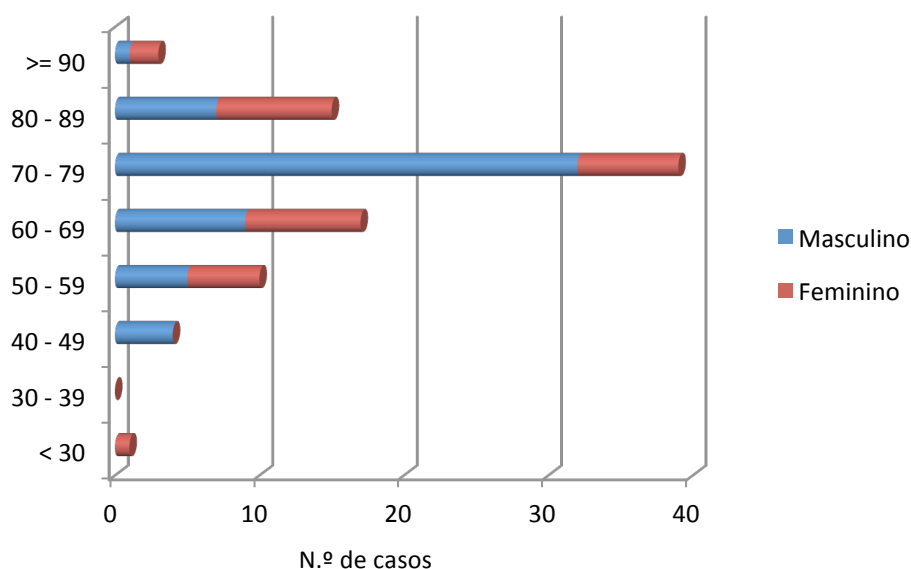
| VARIÁVEIS<br>(mediana e IQR)           | Controlos<br>(n = 73) | Doentes CCR<br>(n = 89)    | Valor<br>de p* |
|--|-----------------------|----------------------------|----------------|
| <b>Género<br/>(Feminino/Masculino)</b> | 43(58,9%)/30(41,1%)   | <b>31(38,8%)/58(65,2%)</b> | 0,020          |
| <b>Idade (anos)</b>                    | 71 (IQR: 11)          | 72,09 (IQR: 15)            | 0,420          |
| <b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>          | 27,05 (IQR: 6)        | 27,00 (IQR: 6)             | 0,900          |
| <b>PC (cm)</b>                         | 102 (15)              | 97 (16)                    | 0,330          |
| <b>Glicémia em Jejum (mg/L)</b>        | 91 (19,5)             | <b>106 (26)</b>            | 0,000          |
| <b>Insulina (mUI/mL)</b>               | 5,27 (2,73)           | 4,03 (3,54)                | 0,066          |
| <b>HbA1c%,</b>                         | 6 (0,53)              | 5,8 (0,6)                  | 0,642          |
| <b>HOMA-IR</b>                         | 1,31 (1,27)           | 1,1 (1,37)                 | 0,567          |
| <b>QUICKI</b>                          | 0,27 (0,98)           | 0,08 (0,99)                | 0,652          |
| <b>Colesterol Total (mg/L)</b>         | 199 (60,75)           | 201 (57,75)                | 0,278          |
| <b>Colesterol HDL (mg/L)</b>           | 51 (19)               | 47 (20)                    | 0,063          |
| <b>Colesterol LDL (mg/L)</b>           | 127 (56,7)            | 122 (45)                   | 0,270          |
| <b>Triglicérideos (mg/dL)</b>          | 104,5 (54,5)          | 94 (73)                    | 0,477          |
| <b>LDH (U/L)</b>                       | 303 (118)             | 343 (118)                  | 0,137          |
| <b>CEA (ng/mL)</b>                     | ND                    | 3,3 (7,2)                  | ND             |
| <b>CA 19.9 (U/mL)</b>                  | ND                    | 7,37 (18,7)                | ND             |

IQR, distância interquartil; ND, Não Determinado; \*Significado estatístico para p < 0.05.

De salientar que abaixo dos 50 anos apenas havia um doente com CCR do género feminino. Também aqui se pode verificar que há um desvio da década do pico de incidência, habitualmente referenciado entre os 60 e os 69 anos.

Dos doentes incluídos no estudo, 49 indivíduos (55,06%) eram naturais do concelho da Figueira da Foz e 73 (82,02%) residiam no mesmo concelho, maioritariamente nas freguesias urbanas de Buarcos, S. Julião e Tavadre (Figura 19). Os restantes doentes eram naturais dos concelhos limítrofes (Pombal, Montemor-o-Velho, Soure

e Cantanhede), sendo um número mais pequeno oriundo de vários pontos dispersos pelo país, residindo 3,3% no concelho de Soure, pertencente à área de atração do HDFF, EPE.



**Figura 18: Distribuição dos doentes com cancro colorretal segundo a idade estratificada por décadas.**

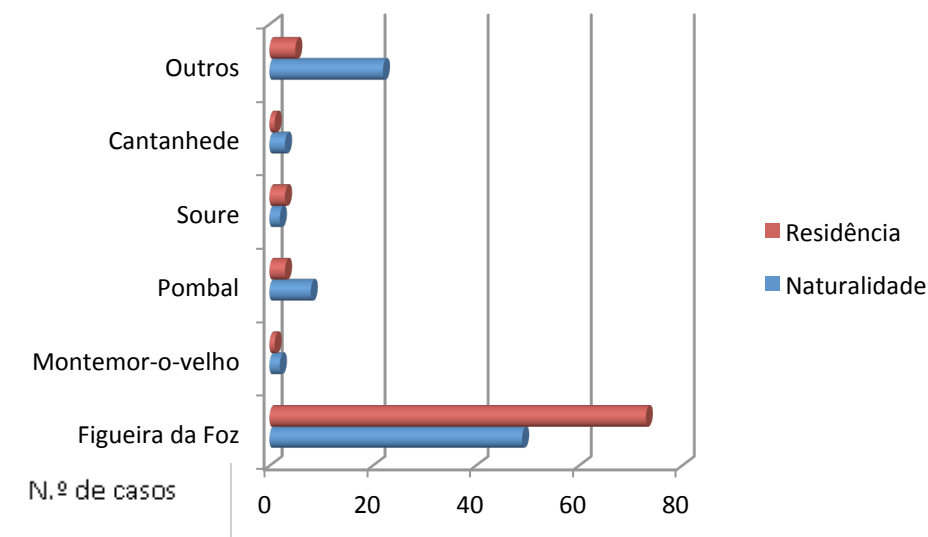
Da análise do estado civil dos doentes verificou-se que 61 (70,8%) eram casados ou viviam em união de facto, havendo 11 viúvos (12,4%), a maioria dos quais homens (54,5%).

Relativamente ao grau de escolaridade, verificou-se que 9,2% dos doentes eram analfabetos, 72,3% tinham frequentado o ensino básico, 17% o ensino secundário e apenas 1,5% frequentou o ensino superior.

Analisada a profissão dominante ao longo da vida, verificou-se que 47% dos doentes dividia a sua atividade por profissões pesadas, entre as quais a agricultura e pescas (21%), operários e artífices (14%), trabalhadores não qualificados (14%), sendo 22% prestadores de serviços e vendedores. Além disso, verificou-se que



22,9% (14) dos doentes trabalhava por turnos, quase todos homens 92,4% (13), os quais estavam submetidos a este tipo de trabalho em média 15,5 anos. Na altura do diagnóstico, 77,6% dos doentes estavam reformados.



**Figura 19: Naturalidade e residência da população de doentes com cancro colorretal.**

No que concerne aos hábitos alimentares, verificou-se que o perfil de ingestão de carne vermelha foi elevado, sendo que 51,8% dos doentes consumia carne vermelha mais de 3 vezes por semana, apesar de apenas uma pequena percentagem o fizesse diariamente, como representado na Figura 20. A maioria dos doentes bebia leite diariamente (64%), 56% consumia diariamente vegetais e saladas e 85% consumia diariamente fruta.

Ao analisar os hábitos alcoólicos verificou-se que 57% dos doentes tinham hábitos alcoólicos regulares, dos quais 11,1% tinham hábitos alcoólicos superiores a 60 g etanol por dia. Quanto ao consumo de café verificou-se que 66,6% dos doentes tinham hábitos cafeínicos regulares, 51,6% dos quais o fazia diariamente.

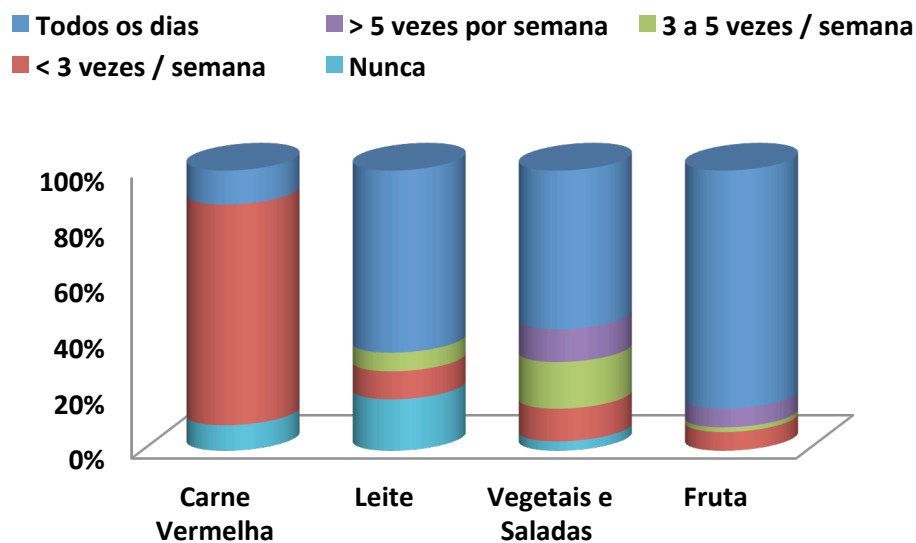


Figura 20: Hábitos alimentares dos doentes com cancro colorretal.

Analisados os hábitos tabágicos verificou-se que 4% tinham hábitos tabágicos ativos e 29% eram ex-fumadores, concluindo-se que a maioria da população em estudo (67%) nunca fumou. Cerca de 46% dos homens tinham antecedentes de tabagismo com uma carga tabágica média de 22 UMA, enquanto só 17% das mulheres apresentavam estes antecedentes, mas com uma carga tabágica ligeiramente superior, 25 UMA. De referir que em 21,3% dos casos havia uma história familiar de tabagismo, com maior incidência (16,4%) nos últimos cinco anos.

Por fim, cerca de 12% dos doentes praticava exercício físico, mais de 30 minutos por dia e superior a 3 vezes por semana.

Para além do estilo de vida, foram também analisados os hábitos medicamentosos dos doentes, tendo-se verificado que apenas 14,3% dos doentes não tomava regularmente qualquer tipo de fármaco (Figura 21).

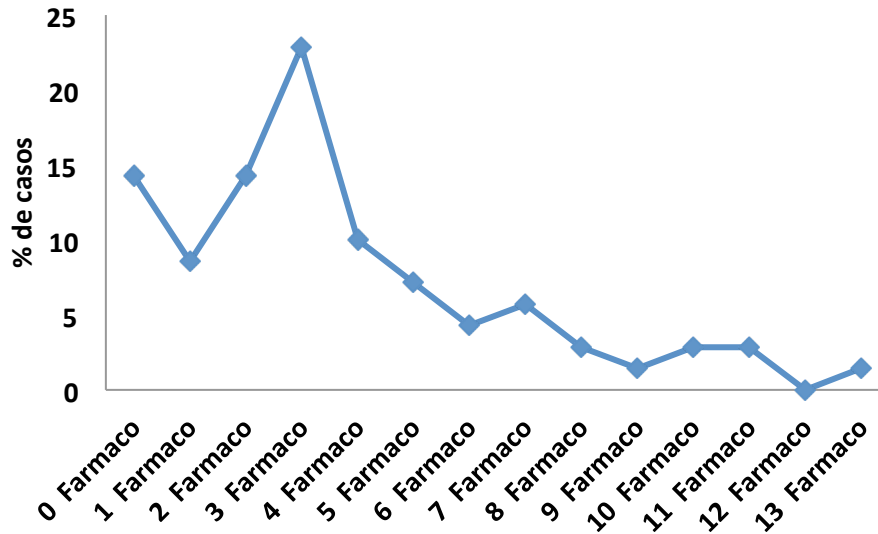


Figura 21: Hábitos farmacológicos dos doentes com cancro colorretal.

Os restantes doentes tomavam regularmente fármacos, verificando-se que 21% tomava mais de 5 fármacos por dia. Entre os fármacos que os doentes tomavam habitualmente destaca-se o uso de AINE em 22,4% dos casos. Cerca de 70% dos doentes apresentavam uma doença crónica concomitante, sendo principalmente a doença cardiovascular (40,74%) e dentro desta a hipertensão arterial, seguida da patologia osteoarticular degenerativa crónica (25,93%) e em terceiro lugar a *Diabetes Mellitus* em 19,75% dos casos.

Os sintomas mais frequentes, à data do diagnóstico, foram a hemorragia digestiva baixa (44,74%), seguida da dor abdominal e da anemia (25 e 17,11%, respetivamente) (Tabela 18). A mediana do intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 2 meses com uma amplitude interquartil de 5 meses.

**Tabela 18: Sintomatologia ao diagnóstico dos doentes com cancro colorretal.**

| Sintomatologia                    | N.º casos | %     |
|-----------------------------------|-----------|-------|
| Retorragias                       | 40        | 44,74 |
| Dor abdominal                     | 22        | 25,00 |
| Anemia                            | 15        | 17,11 |
| Rastreo oncológico                | 5         | 5,26  |
| Obstipação                        | 7         | 7,89  |
| Alteração dos hábitos intestinais | 6         | 6,58  |
| Emagrecimento                     | 6         | 6,58  |
| Oclusão                           | 5         | 5,26  |
| Astenia, Anorexia                 | 4         | 3,95  |
| Outros                            | 12        | 13,16 |

No que respeita ao estado de saúde na data do diagnóstico, estratificada pela escala de capacidade funcional da OMS/ECOG, verificou-se que cerca de três quartos dos doentes na altura do diagnóstico, apresentavam uma boa capacidade funcional, estando assintomáticos ou com sintomas ligeiros, sem grande interferência com a sua qualidade de vida (Figura 22).

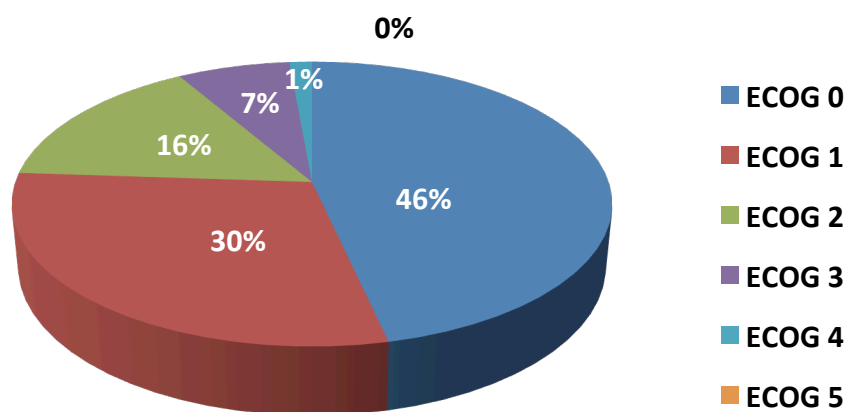
**Figura 22: Capacidade funcional dos doentes com cancro colorretal avaliada pelo sistema ECOG da Organização Mundial de Saúde.**

Tabela 19: Caracterização da amostra em função do género

| Variável                           | Homens                |                       |               | Mulheres              |                     |               |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|-----------------------|---------------------|---------------|
|                                    | Controlos<br>(n = 30) | Doentes<br>(n = 58)   | Valor<br>de p | Controlos<br>(n = 43) | Doentes<br>(n = 31) | Valor<br>de p |
| <b>Mediana<br/>(IQR)</b>           |                       |                       |               |                       |                     |               |
| <b>Idade, anos</b>                 | 70,5<br>(14)          | 73,05<br>(13)         | 0,277         | 72<br>(10)            | 71<br>(19)          | 0,952         |
| <b>IMC, Kg/m<sup>2</sup></b>       | 27<br>(4)             | 26<br>(5)             | 0,706         | 27,15<br>(8)          | 28 (7)              | 0,323         |
| <b>PC, cm</b>                      | 99,5<br>(17,75)       | 99<br>(17,5)          | 0,91          | 108,5<br>(4,75)       | 94<br>(16,25)       | 0,096         |
| <b>Glicémia em<br/>Jejum, mg/L</b> | 90,5<br>(29)          | <b>106<br/>(22,5)</b> | 0,002         | 91,5<br>(17,5)        | <b>105<br/>(30)</b> | <b>0,002</b>  |
| <b>HbA1c, %</b>                    | 6,00<br>(0,7)         | 5,8<br>(0,7)          | 0,735         | 6,1<br>(0,2)          | 5,85<br>(0,92)      | 0,559         |
| <b>Insulina,<br/>mUI/mL</b>        | 4,83<br>(2,56)        | 4,03<br>(7,05)        | 0,58          | 5,43<br>(4,24)        | 4,06<br>(2,59)      | 0,76          |
| <b>HOMA</b>                        | 1,31<br>(1,39)        | 1,08<br>(2,18)        | 0,929         | 1,32<br>(1,29)        | 1,29<br>(0,92)      | 0,398         |
| <b>Colesterol<br/>Total, mg/L</b>  | 194,5<br>(41,25)      | 189<br>(68,5)         | 0,488         | 199,25<br>(92,5)      | 208<br>(45)         | 0,788         |
| <b>Colesterol<br/>HDL, mg/L</b>    | 48,5<br>(17)          | 44<br>(15,75)         | 0,321         | 56<br>(21)            | 53<br>(30)          | 0,561         |
| <b>Colesterol<br/>LDL, mg/L</b>    | 126,5<br>(38,05)      | 118,5<br>(56,5)       | 0,423         | 127<br>(74)           | 128<br>(24,5)       | 0,802         |
| <b>Triglicérideos,<br/>mg/dL</b>   | 100,5<br>(55)         | 80,5<br>(78)          | 0,301         | 108,5<br>(56)         | 117<br>(59)         | 0,48          |
| <b>PCR, mg/L</b>                   | 3,32<br>(36)          | 7,42<br>(74)          |               | 9,29<br>(45)          | 15,33<br>(75,6)     |               |
| <b>LDH, U/L</b>                    | 314 (128,5)           | 326,5<br>(119,5)      | 0,309         | 297<br>(42,5)         | 352<br>(99)         | 0,153         |
| <b>CEA, ng/mL</b>                  | ND                    | 3,3<br>(6,38)         |               | ND                    | 4,6<br>(9,6)        |               |
| <b>CA 19.9, U/mL</b>               | ND                    | 6,74<br>(15,2)        |               | ND                    | 9,81<br>(27,3)      |               |

ND, Não Determinado

Dentro dos parâmetros bioquímicos avaliados, verificou-se que a glicemia em jejum estava mais elevada nos doentes em relação aos controlos, tanto no género

feminino como no género masculino, e que essa diferença tinha significado estatístico ( $p < 0,05$ ) quer globalmente, quer quando analisado por género.

A Hb A1c estava globalmente mais baixa nos doentes em relação aos controlos e em ambos os géneros, mas essa diferença não apresentava significado estatístico. Apesar de sabermos que 20% dos doentes do estudo eram diabéticos, não houve evidência de significativa descompensação metabólica, pois apresentaram uma mediana da glicemia em jejum inferior a 116 mg/mL e da Hb A1c inferior a 6,5%, portanto dentro dos valores de referência.

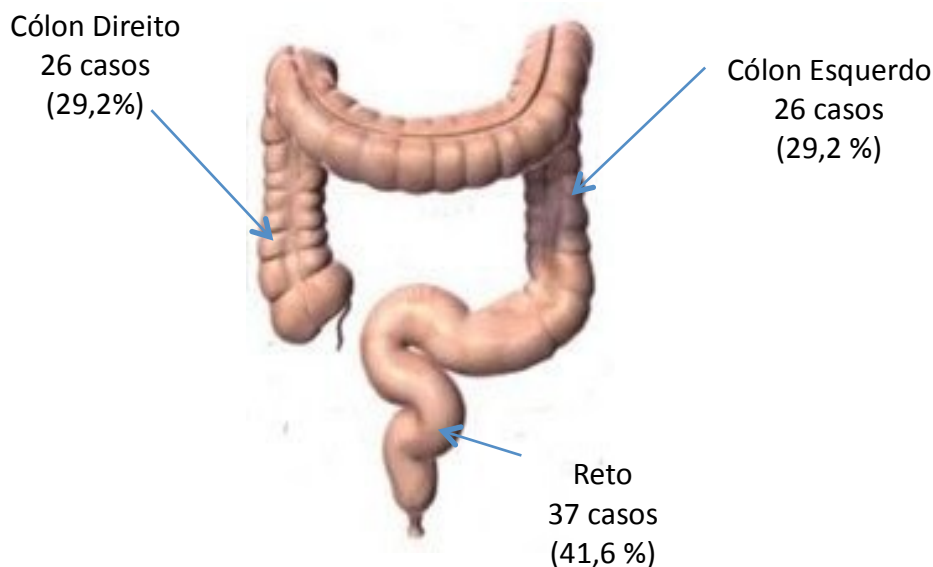
A análise do perfil lipídico (colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e triglicéridos) dos doentes com CCR e controlos mostrou valores muito próximos do limite considerado normal para a população, mas sem que houvesse nenhuma diferença significativa nos quatro parâmetros avaliados entre doentes e controlos, quer globalmente quer quando distribuídos por géneros.

#### **4.2.3. CARACTERÍSTICAS DO TUMOR, TERAPÊUTICA E SOBREVIVÊNCIA GLOBAL**

Seguidamente, apresentamos as características do tumor quanto à localização e estadiamento, características anatomo-patológicas e moleculares, bem como as estratégias terapêuticas instituídas e a sobrevivência global.

##### **4.2.3.1. Características do tumor – Localização e estadiamento**

Como se pode ver na Figura 23, a localização mais comum do tumor primário foi no cólon, representando 58% dos casos, sendo aproximadamente metade dos casos localizados no cólon direito e outra metade no esquerdo. Nos 42% restantes o tumor localizava-se no reto.



**Figura 23: Distribuição da localização tumoral primária nos doentes com cancro colorretal.**

Avaliou-se qual a localização topográfica do tumor a nível do cólon e reto nos doentes com CCR, tendo-se verificado que isoladamente o reto foi a localização com maior número de casos (Tabela 20).

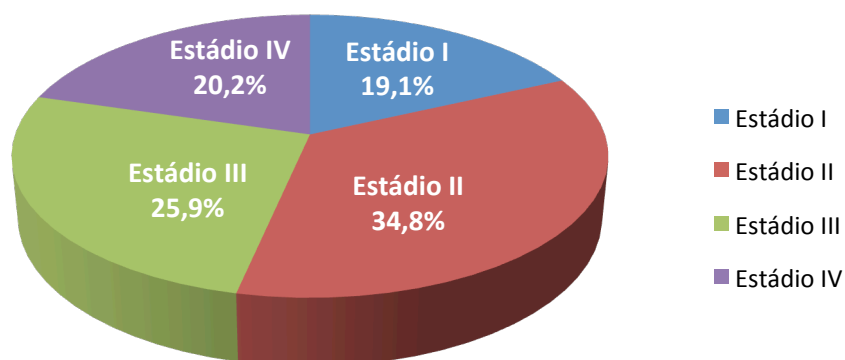
Tabela 20: Distribuição topográfica da neoplasia

| LOCALIZAÇÃO DA NEOPLASIA              | N.º CASOS | PERCENTAGEM  |
|---------------------------------------|-----------|--------------|
| Cego                                  | 8         | 9,0%         |
| Cólón ascendente                      | 11        | 12,4%        |
| Ângulo Hepático                       | 5         | 5,6%         |
| Cólón transverso proximal             | 2         | 2,2%         |
| <b>Hemicólón direito (sub-total)</b>  | <b>26</b> | <b>29,2%</b> |
| Cólón transverso distal               | 2         | 2,2%         |
| Ângulo esplénico                      | 2         | 2,2%         |
| Cólón descendente                     | 3         | 3,4%         |
| Cólón Sigmóide                        | 15        | 16,9%        |
| Retossigmóide                         | 4         | 4,5%         |
| <b>Hemicólón esquerdo (sub-total)</b> | <b>26</b> | <b>29,2%</b> |
| <b>Reto</b>                           | <b>37</b> | <b>41,6%</b> |
| <b>Total de casos</b>                 | <b>89</b> | <b>100%</b>  |

Como se pode observar nesta tabela, o CCR encontra-se distribuído por todo o cólon, sendo o cólon sigmóide e o ascendente, os locais preferenciais (16,9% e 12,4% respetivamente). Apenas 4,5% dos casos se localiza na região retossigmóide, localizando-se 41,6% dos casos no reto.

Avaliou-se inicialmente o estadiamento clínico ao diagnóstico de acordo com a classificação TNM (revisão de 2010), tendo-se verificado que 34% estava no estágio III, 29% no II, 17% no IV e 9% no I.

A Figura 24 representa o reestadiamento dos doentes após a cirurgia, que engloba o estágio patológico dos que foram operados. Como se pode observar nesta figura, cerca de 19% dos doentes encontrava-se no estágio I, 35% no estágio II, 26 % no estágio III e 20% no estágio IV.



**Figura 24: Estadiamento patológico dos doentes com cancro colorretal.**

A Tabela 21 representa o estadiamento dos doentes de acordo com a classificação da AJCC (2010), com a sua distribuição pelos vários subgrupos, verificando-se que no estágio II, 83,9% estavam no subgrupo IIA, no estágio III, 65,2% pertenciam ao



subgrupo IIIB e no estágio IV, 66,7% eram do subgrupo IVA. Dos doentes em estágio IV verificou-se que 14,30% apresentavam metástases hepáticas, 5,96% metástases pulmonares, 3,57% metástases peritoneais, enquanto a metastização ganglionar e óssea foi muito pouco frequente.

**Tabela 21: Estadiamento ao diagnóstico de acordo com a AJCC (2010).**

| Estádio      | Casos     | %            |
|--------------|-----------|--------------|
| I            | 17        | 19,1         |
| IIA          | 26        | 29,2         |
| IIB          | 1         | 1,1          |
| IIC          | 4         | 4,5          |
| IIIA         | 3         | 3,4          |
| IIIB         | 15        | 16,9         |
| IIIC         | 5         | 5,6          |
| IVA          | 12        | 13,5         |
| IVB          | 6         | 6,7          |
| <b>Total</b> | <b>89</b> | <b>100,0</b> |

#### 4.2.3.2. Características anatomopatológicas e moleculares do tumor

O estudo anatomopatológico da biópsia ou peça operatória revelou que o tipo de cancro predominante era histologicamente adenocarcinoma, sendo 8,98% (8) do tipo invasor, 4,49% (4) do tipo mucinoso, 1,12% (1) de células em anel de sinete e 2,25% (2) foram consideradas neoplasias com displasia sem melhor especificação. Em relação ao grau de diferenciação histológica, 60 (67,42%) eram bem diferenciados, 19 (21,35%) moderadamente diferenciados e 4 (4,49%) eram pouco diferenciados. Não houve nenhum caso identificado de indiferenciação, mas em 6,74% (6) não se conseguiu obter o grau de diferenciação.

Foram avaliadas as mutações do gene *KRAS* nas peças operatórias de todos os doentes em estágio III e IV e em alguns em estágio II, para decisão da possível indicação para a associação à quimioterapia do fármaco anti-EGFR. Dos 38 doentes a quem foi efetuada a pesquisa de mutações, 50% (19) tinham mutações, 44,74% (17) eram do tipo selvagem e em 7,89% (3) foram indeterminadas.

#### 4.2.3.3. Tratamento e sobrevivência global

Os doentes foram tratados de acordo com os protocolos aprovados para o tipo de neoplasia, ajustados à *performance status* e decisão do doente em relação à proposta efetuada pela equipa (Tabela 22).

Tabela 22: Tratamento cirúrgico e farmacológico dos doentes com cancro colorretal.

| TIPO DE CIRURGIA            | Casos     | %            |
|-----------------------------|-----------|--------------|
| Hemicolectomia direita      | 22        | 24,72        |
| Resseção segmentar do cólon | 10        | 11,24        |
| Hemicolectomia esquerda     | 2         | 2,25         |
| Sigmoidectomia              | 11        | 12,36        |
| Resseção anterior do reto   | 26        | 29,21        |
| Amputação abdominoperineal  | 11        | 12,36        |
| Colostomia                  | 3         | 3,37         |
| Laparotomia exploradora     | 1         | 1,12         |
| <b>Total de Cirurgias</b>   | <b>86</b> | <b>96,63</b> |
| Não efetuada                | 3         | 3,37         |
| TIPO DE QUIMIOTERAPIA       | Casos     | %            |
| Neoadjuvante                | 12        | 13,48        |
| Adjuvante                   | 18        | 20,22        |
| Paliativa                   | 17        | 19,10        |
| Não efetuada                | 42        | 47,19        |
| <b>Total</b>                | <b>89</b> | <b>100,0</b> |

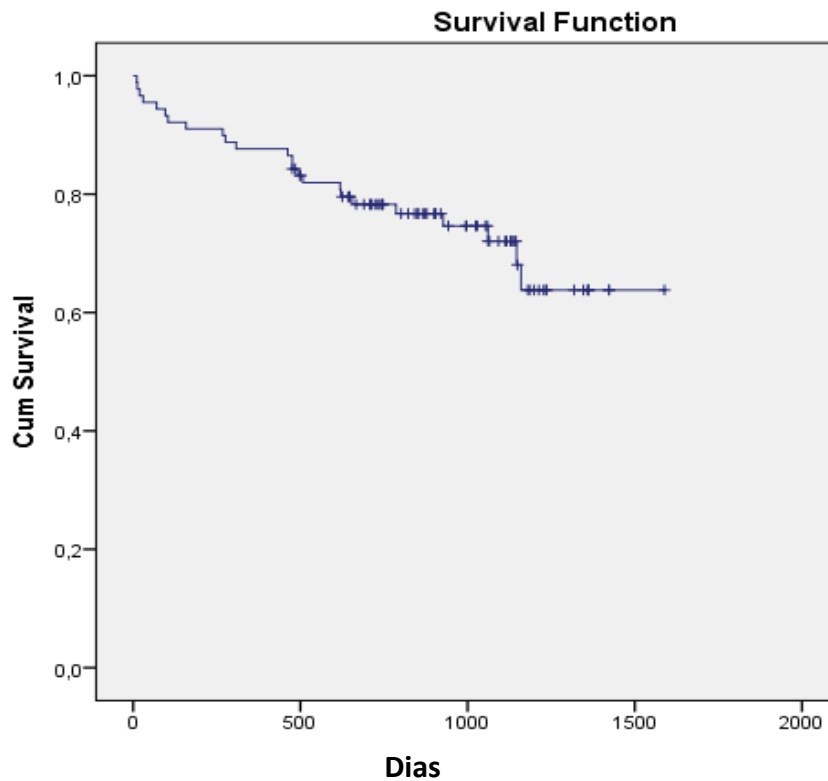
A análise dos dados mostra que 96,63% (86) dos doentes foram submetidos a cirurgia, 47,19% (42) a quimioterapia e 17,98% (16) a radioterapia. Os doentes efetuaram quimioterapia com objetivo neoadjuvante em 20,2% dos casos, sendo todos com neoplasia do reto. A quimioterapia adjuvante foi efetuada em 13,5% dos casos, sendo a maioria do estágio III e uma percentagem mais pequena de doentes no estágio IIB e IIC e com objetivo paliativo em 19,10% dos doentes.

Os esquemas terapêuticos mais usados estão de acordo com as orientações nacionais e internacionais, adaptadas ao doente, tendo em atenção as suas preferências pessoais em vias de administração e o tipo de efeitos secundários. Na Tabela 23 estão representados os esquemas terapêuticos usados nos 47 (52,81%) doentes tratados com quimioterapia.

**Tabela 23: Tratamento de quimioterapia efetuado aos doentes com cancro colorretal.**

| <b>PROTOCOLO DE QUIMIOTERAPIA</b>     | <b>Casos</b>    |
|---------------------------------------|-----------------|
| 5-FU infusão + Radioterapia (45Gy/25) | 16              |
| Capecitabina                          | 4               |
| CAPIRI                                | 2               |
| FOLFIRI                               | 12              |
| FOLFIRI+Bevacizumab                   | 2               |
| FOLFIRI+Cetuximab                     | 1               |
| FOLFOX                                | 5               |
| GRAMONT                               | 5               |
|                                       | <b>Total</b> 47 |
| Sem quimioterapia                     | 42              |

De salientar que a maioria dos doentes, 73% (65), se encontrava vivo na avaliação final do estudo, tendo-se verificado que 13,5% (12) tiveram recidiva da doença. A sobrevivência global aos 12 meses foi de 87,6% e a sobrevivência global estimada aos 48 meses foi de 63,8% (Figura 25).



**Figura 25: Sobrevivência global dos doentes com cancro colorretal.**

Ao analisarmos a sobrevivência dos doentes com CCR, segundo o estágio ao diagnóstico, verificamos que a maioria dos doentes que faleceram tinham sido classificados nos estádios III e IV. A sobrevivência global aos 12 meses foi de 100% para o estágio I e II, de 87% para o estágio III e de 55,6% para o estágio IV. A sobrevivência global estimada aos 48 meses foi de 85,7% para o estágio I, de 80,2%

para o estágio II e de 72,1% para o estágio III. Para o estágio IV a sobrevivência global aos 40 meses foi de 13,3% (Figura 26).

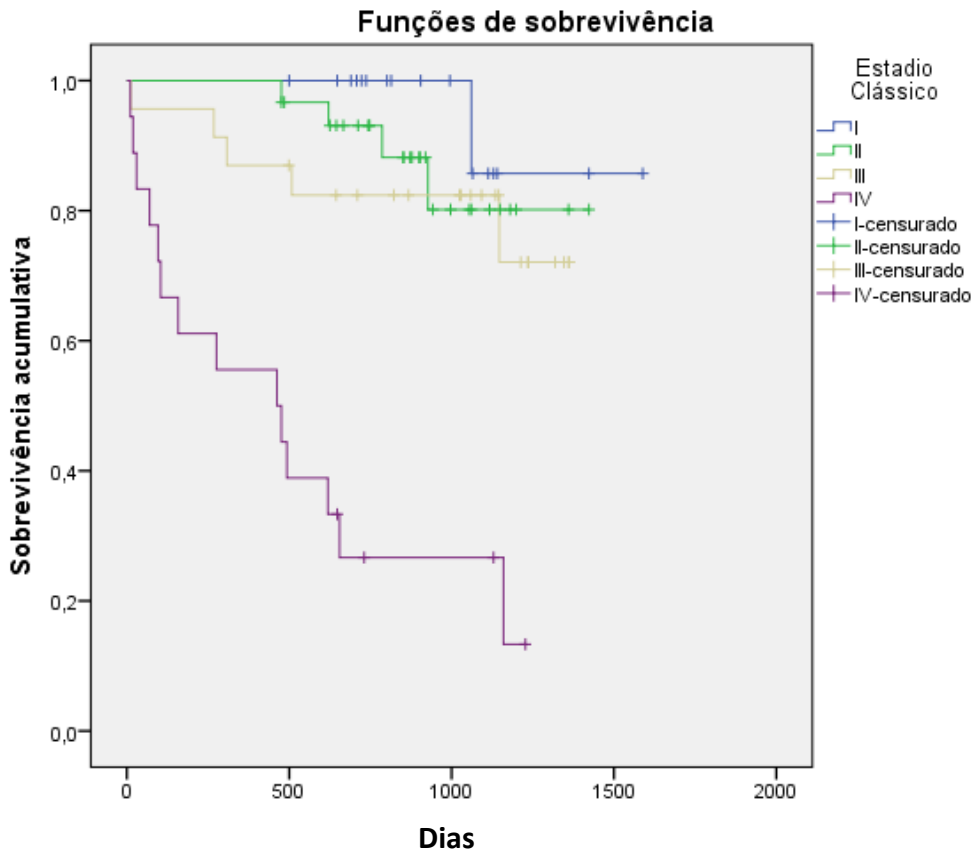


Figura 26: Sobrevivência global dos doentes com cancro colorretal em função do estágio ao diagnóstico.

### 4.3.AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM DOENTES COM CANCRO COLORRETAL

A avaliação da participação das citocinas, adipocitocinas e fatores inflamatórios, na etiopatogenia e progressão do cancro do cólon foi efetuada pelo doseamento no sangue periférico e pela avaliação da expressão génica na mucosa normal e tecido tumoral.

#### 4.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A avaliação das adipocitocinas, adiponectina, leptina, resistina e visfatina, e dos fatores inflamatórios, MCP-1 e TNF- $\alpha$  no sangue periférico, foi efetuada em 82 doentes com CCR diagnosticado de novo, sendo 26 mulheres (31,7%) e 56 homens (68,3%). A idade mediana dos doentes é de 72,05 anos [amplitude interquartil (IQR) = 14], variando entre 29 e 91 anos (Tabela 24).

**Tabela 24: Caracterização da amostra de doentes e controlos**

| Variáveis: mediana<br>(Amplitude interquartil - IQR) | Controlos<br>(n=73) | CCR<br>(n=82)  | Valor de p* |
|--|---------------------|----------------|-------------|
| Feminino/Masculino                                   | 43/30               | 26/56          | 0,002       |
| Idade (anos)   | 71 (IQR=11)         | 72,05 (IQR=14) | 0,414       |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> )                             | 27,05 (IQR=6)       | 27,00 (IQR=6)  | 0,896       |
| Perímetro cintura (cm)                               | 97 (IQR=16)         | 102 (IQR=15)   | 0,330       |
| Insulina (mUI/mL)                                    | 5,27 (2,73)         | 4,03 (3,54)    | 0,066       |

Valores em mediana; IQR: amplitude interquartil; Teste Mann-Whitney; significado estatístico para p<0.05.

Como se pode observar na Tabela 24 não se verificaram diferenças significativas no que respeita à idade e IMC entre o grupo dos doentes e dos controlos, mas existem diferenças significativas em relação à distribuição por géneros.

A distribuição da gordura abdominal foi avaliada através da medida do perímetro da cintura (PC), tendo-se verificado que no grupo de doentes a mediana do PC era de 97 cm enquanto a mediana do PC dos controlos era de 104 cm. No entanto, esta diferença não apresenta significado estatístico.

Relativamente à distribuição anatómica, 32 (39%) casos localizam-se no reto e 50 (61%) no cólon, igualmente distribuídos entre o cólon direito e esquerdo.

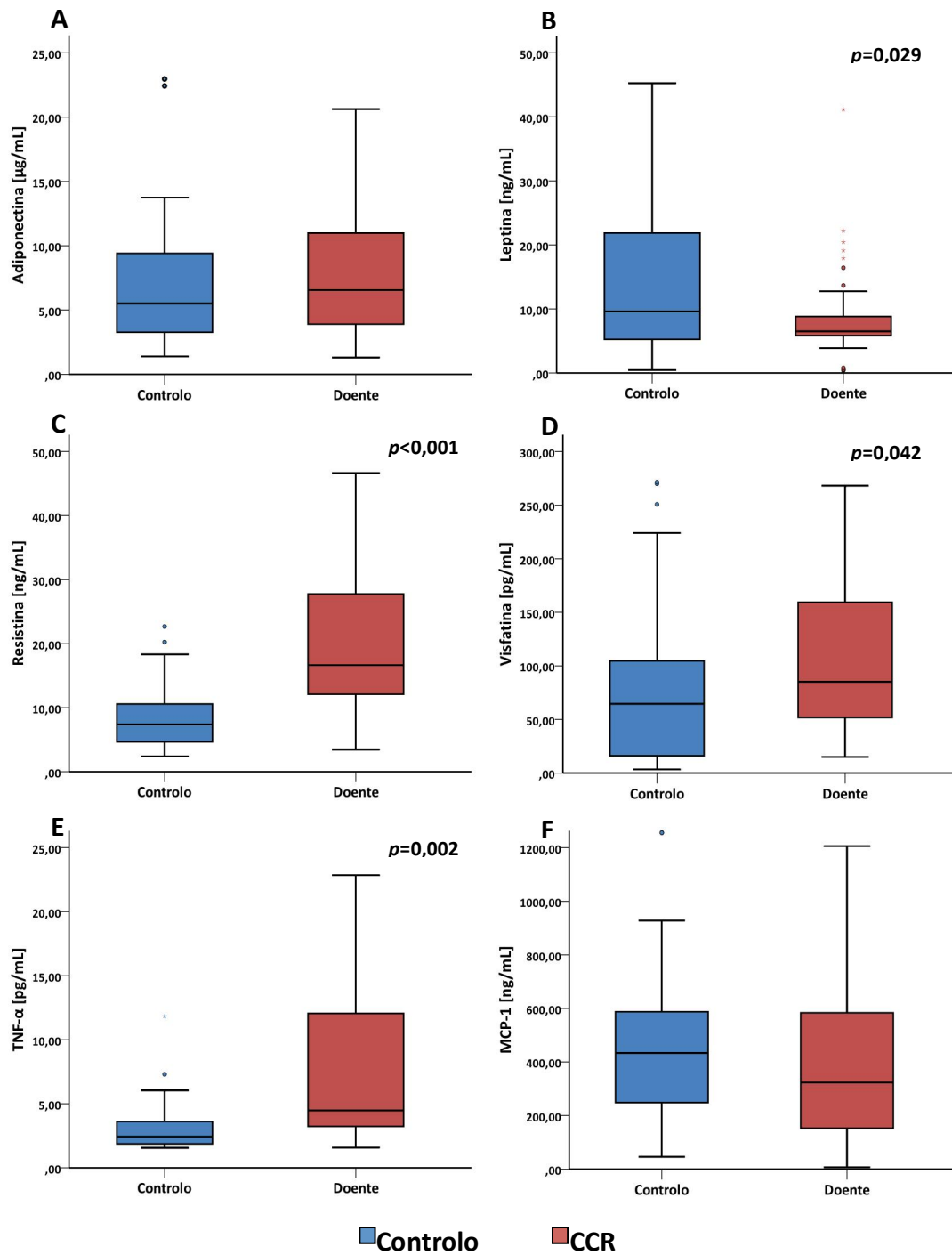
#### 4.3.2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS EM DOENTES COM CANCRO COLORRETAL E CONTROLOS

Como se pode ver na Tabela 25 e na Figura 26, os valores medianos da adiponectina, resistina, visfatina e TNF- $\alpha$  séricos são mais elevados nos doentes com cancro colorretal do que nos controlos. Os doentes com cancro colorretal apresentam valores medianos de resistina e de TNF- $\alpha$  (resistina: 16,71 ng/mL; TNF- $\alpha$ : 4 pg/mL, respetivamente), cerca de duas vezes superior aos controlos (resistina: 7,41 ng/mL; TNF- $\alpha$ : 2,42 pg/mL, respetivamente), sendo estas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Relativamente à visfatina, apesar do aumento do valor mediano nos doentes ser de apenas 1,3 vezes, verificou-se que a diferença observada entre doentes e controlos também é estatisticamente significativa ( $p = 0,042$ ).

**Tabela 25: Análise dos níveis séricos de citocinas e de fatores inflamatórios em doentes com cancro colorretal e controlos**

| Variáveis   | Controlo<br>Mediana (IQR) | CCR<br>Mediana (IQR)  |             |
|---|---------------------------|-----------------------|-------------|
| <b>Adiponectina (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | 5,50 (6,18)               | 6,55 (7,10)           | $p = 0,280$ |
| <b>Leptina (ng/mL)</b>                            | 9,61 (16,55)              | <b>6,51 (3,05)</b>    | $p = 0,029$ |
| <b>Resistina (ng/mL)</b>                          | 7,41 (5,82)               | <b>16,71 (16,19)</b>  | $p < 0,001$ |
| <b>Visfatina (pg/mL)</b>                          | 64,54 (91,18)             | <b>85,10 (108,85)</b> | $p = 0,042$ |
| <b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>            | 2,42 (1,01)               | <b>4,47 (7,31)</b>    | $p = 0,002$ |
| <b>MCP-1 (ng/mL)</b>                              | 444,17 (321,76)           | 310,89 (427,37)       | $p = 0,089$ |

Valores em mediana; IQR: amplitude interquartil; Teste Mann-Whitney; significado estatístico para  $p < 0,05$ ; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocytocolony-stimulating factor 1*



**Figura 26: Análise dos níveis séricos de adiponectina (A), leptina (B), resistina (C), visfatina (D), TNF-α (E) e MCP-1 (F) em doentes com cancro colorretal e em controlos.**

TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocyte colony-stimulating factor 1*

Por outro lado, verificou-se que os doentes com CCR apresentam valores medianos de leptina e de MCP-1 séricos inferiores (6,51 ng/mL e 310,89 ng/mL,



respetivamente) aos observados no grupo controlo (9,61 ng/mL e 444,17ng/mL). Contudo, apenas a diferença observada nos níveis séricos de leptina é significativa.

#### **4.3.2.1. Análise dos níveis séricos de citocinas em doentes com cancro colorretal e controlos de acordo com o género**

Uma vez que na análise global da amostra se verificaram diferenças significativas no género entre o grupo de doentes e o grupo de controlo, analisaram-se os valores medianos das várias citocinas em função desta variável (Tabela 27).

Os níveis séricos de adiponectina em função do género dos doentes e controlos, apresentam valores medianos superiores para o grupo dos doentes em relação ao grupo de controlos, independentemente do género, no entanto, estas diferenças não são estatisticamente significativas. No entanto, se analisarmos as diferenças nos doentes do género masculino, verificamos que o nível sérico mediano desta adipocitocina no grupo dos doentes é superior em relação aos controlos [6,35 µg/mL (IQR=6,36) e 4,22 µg/mL (IQR=3,27), respetivamente], sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,011$ ). Verificou-se ainda haver diferenças estatisticamente significativas na adiponectina entre os controlos do género feminino [7,56 µg/mL (IQR=5,53)] e os do género masculino [4,22 µg/mL (IQR=3,27)].

A análise da leptina sérica revelou também diferenças significativas quando se compararam os seus valores medianos em doentes e controlos do género feminino, verificando-se diminuição desta adipocitocina nos doentes em relação aos controlos [8,58 ng/mL (IQR=8,24) vs 16,23 ng/mL (IQR=21,60), respetivamente] (Tabela 27 e Figura 27). Por outro lado, na população do género masculino não se observaram

diferenças estatisticamente significativas. No entanto, nos indivíduos controlo verificou-se uma diferença significativa nos níveis de leptina de modo dependente do género, sendo de 16,23 ng/mL (IQR=21,60) no género feminino e de 5,46 ng/mL (IQR=5,36) no masculino, não se tendo verificado esta diferença no grupo dos doentes. Estes resultados sugerem que os níveis de leptina além de dependerem do género podem estar relacionados com o CCR (Tabela 27 e Figura 27).

**Tabela 27: Nível sérico das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios nos doentes com cancro colorretal e nos controlos de acordo com o género.**

| Variáveis                     | Controlo                |                    | p                | Doente                |                    | p            |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|--------------------|--------------|
|                               | Feminino                | Masculino          |                  | Feminino              | Masculino          |              |
|                               | Mediana (IQR)           |                    |                  | Mediana (IQR)         |                    |              |
| <b>Adiponectina<br/>µg/mL</b> | <b>7,56</b><br>(5,53)   | 4,22<br>(3,27)     | <b>0,003</b>     | 7,82<br>(10,03)       | 6,35<br>(6,36)     | 0,331        |
|                               | n = 43                  | n = 29             |                  | n = 22                | n = 56             |              |
| <b>Leptina<br/>ng/mL</b>      | <b>16,23</b><br>(21,60) | 5,46<br>(5,36)     | <b>&lt;0,001</b> | <b>8,58</b><br>(8,24) | 6,27<br>(1,97)     | <b>0,002</b> |
|                               | n = 43                  | n = 29             |                  | n=22                  | n=56               |              |
| <b>Resistina<br/>ng/mL</b>    | 6,71<br>(5,93)          | 7,45<br>(5,17)     | 0,319            | 15,14<br>(11,43)      | 16,89<br>(20,36)   | 0,470        |
|                               | n = 41                  | n = 29             |                  | n=22                  | n=55               |              |
| <b>Visfatina<br/>pg/mL</b>    | 68,03<br>(98,49)        | 61,48<br>(85,00)   | 0,970            | 63,92<br>(101,51)     | 102,67<br>(182,42) | 0,099        |
|                               | n = 18                  | n = 14             |                  | n=10                  | n=31               |              |
| <b>TNF-α<br/>pg/mL</b>        | 2,34<br>(1,80)          | 2,56<br>(2,53)     | 0,935            | 5,54<br>(13,28)       | 4,4<br>(11,25)     | 0,722        |
|                               | n = 10                  | n = 9              |                  | n=11                  | n=24               |              |
| <b>MCP-1<br/>ng/mL</b>        | 468,79<br>(321,81)      | 404,19<br>(382,45) | 0,757            | 434,73<br>(359,72)    | 295,56<br>(447,83) | 0,865        |
|                               | n = 15                  | n = 17             |                  | n=27                  | n=16               |              |

Valores em mediana; IQR: amplitude interquartil; Teste Mann-Whitney; significado estatístico para  $p < 0.05$ ; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocytecolony-stimulating factor 1*

Relativamente aos valores medianos da resistina, observa-se que os níveis séricos da resistina nas mulheres doentes são cerca de duas vezes superior aos observados

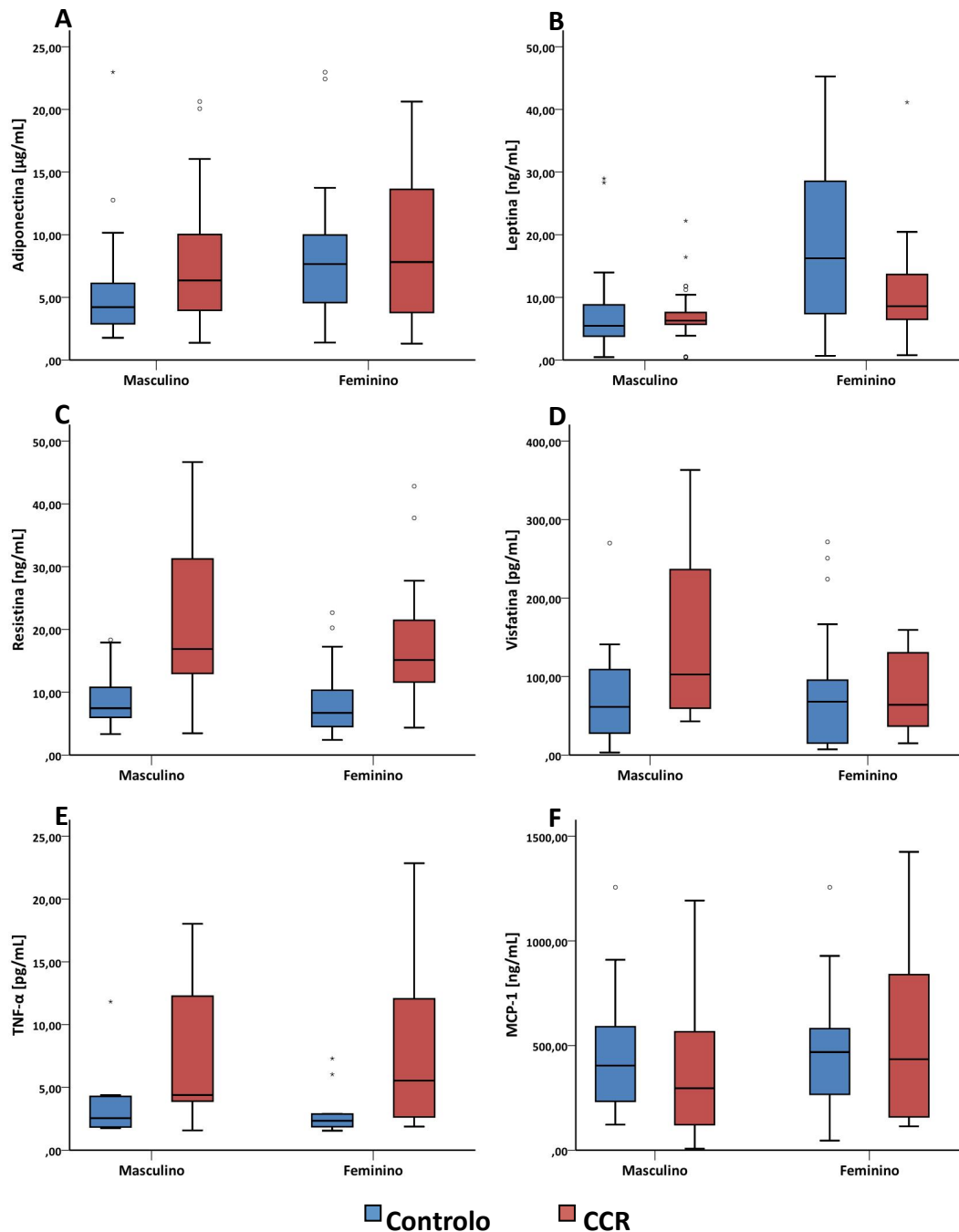


Figura 27: Análise dos níveis séricos de adiponectina (A), leptina (B), resistina (C), visfatina (D), TNF-α (E) e MCP-1 (F) em doentes com cancro colorretal e em controlos de acordo com o género.

TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocytecolony-stimulating factor 1*

nas mulheres do grupo controlo, sendo estas diferenças estatisticamente significativas [doentes 15,14 ng/mL (IQR= 11,43) e controlos 6,71 ng/mL (IQR=5,93);  $p<0,001$ ].

O mesmo se verifica no caso da população do género masculino, em que os níveis séricos de resistina são cerca de 2,3 vezes superiores nos homens com CCR [16,89 ng/mL (IQR=20,36)] comparativamente aos homens do grupo controlo [7,45 ng/mL (IQR=5,17)], sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p<0,001$ ). Ao comparar por género o grupo controlo e o grupo doente, não se observam diferenças significativas. Assim, as alterações séricas encontradas nos níveis desta adipocitocina, são independentes do género, embora dependentes da existência de CCR.

Quando se procedeu à análise dos níveis séricos de visfatina, de acordo com o género, verificou-se que os homens do grupo de doentes com CCR apresentam valores mais elevados desta adipocitocina, relativamente aos homens do grupo controlo [102,67 pg/mL (IQR=182,42) e 61,48 pg/mL (IQR=85,00), respetivamente], embora estas diferenças não sejam estatisticamente significativas. No entanto, no grupo dos doentes com CCR observou-se uma diferença significativa dos níveis séricos de visfatina dependendo do género dos doentes, sendo inferior no género feminino relativamente ao masculino [63,92 pg/mL (IQR=101,51) e 102,67 pg/mL (IQR=182,42) respetivamente]. De salientar que esta diferença não foi observada no grupo controlo, o que sugere que os níveis de visfatina poderão estar relacionados com o CCR, podendo ser influenciados pelo género doente.

A mesma análise foi efetuada para os citocinas inflamatórias, TNF- $\alpha$  e MCP-1. Assim, os níveis séricos de TNF- $\alpha$  são cerca de duas vezes superiores nas doentes

com CCR, relativamente aos níveis das mulheres controlos [5,54 pg/mL (IQR=13,28) e 2,34 pg/mL (IQR=1,80), respetivamente;  $p=0,036$ ]. Quando se procedeu à mesma análise nos indivíduos do género masculino, verificou-se igualmente aumento deste parâmetro nos homens com CCR em comparação com os homens do grupo controlo [4,4 pg/mL (IQR=11,25) e 2,56 pg/mL (IQR=2,53), respetivamente,  $p=0,029$ ]. Quando se compararam os valores desta citocina para os dois géneros, tanto para os doentes como para os controlos, não foram encontradas diferenças significativas.

Relativamente ao MCP-1, e como se pode ver na Tabela 27, não se observam diferenças significativas deste parâmetro inflamatório entre doentes e controlos, independentemente do género de cada uma das populações.

#### **4.3.2.2. Análise dos níveis séricos de citocinas em doentes com cancro colorretal de acordo com os hábitos alimentares e perfil metabólico**

Uma vez que os hábitos alimentares e o estilo de vida podem influenciar os níveis séricos das várias adipocitocinas e dos fatores inflamatórios, relacionaram-se os resultados obtidos com os do inquérito epidemiológico aplicado aos doentes.

Apesar de se terem analisado os níveis das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios de acordo com o consumo de carne vermelha, leite, vegetais e saladas, fruta, exercício físico e hábitos alcoólicos, só foram encontradas diferenças relativamente ao consumo de vegetais e saladas, frutas e hábitos alcoólicos.

Assim, observou-se diminuição dos níveis séricos de resistina no grupo de doentes que não ingeria fruta, em relação aos doentes cuja ingestão era superior a 3 vezes por semana [16,64 ng/mL (IQR=8,59) e 13,18 ng/mL (IQR=5,96), respetivamente,

$p=0,021$ ]. Foi também observada diminuição dos níveis séricos de MCP-1 no grupo que comia vegetais três a cinco vezes por semana em relação ao grupo que comia vegetais mais do que 5 vezes por semana [251,80ng/m (IQR=309,53) e 468,39ng/mL (IQR=477,37), respetivamente;  $p=0,016$ ]. Por fim, verificou-se que o grupo de doentes sem hábitos alcoólicos apresentava níveis séricos de MCP-1 superiores em relação ao grupo de doentes com hábitos alcoólicos ligeiros [475,05ng/mL (IQR=465,10) e 268,36ng/mL (IQR=417,92), respetivamente].

Uma vez que o IMC e o perfil metabólico dos doentes e controlos podem afetar o nível das adipocitocinas e citocinas inflamatórias, analisamos estas citocinas em função destes parâmetros metabólicos. A distribuição do IMC por grupos foi efetuada de acordo com o descrito na secção material e métodos e indicado na Tabela 28. Para tal, foram distribuídos os doentes e controlos em três grupos: grupo de peso normal (IMC inferior a 25), grupo com excesso de peso (IMC ente 25 e 30) e grupo com obesidade (IMC superior a 30).

Como se pode verificar na Tabela 28 e na Figura 28, os valores séricos medianos da adiponectina são independentes do IMC, verificando-se valores semelhantes entre si, com exceção dos doentes de CCR de peso normal (IMC < 25). Neste grupo de doentes observaram-se valores medianos ligeiramente superiores aos dos doentes com excesso de peso ( $25 < \text{IMC} < 30$ ) e com obesidade (IMC < 30), bem como em relação aos controlos de peso normal.

Relativamente à leptina, verifica-se que os níveis séricos desta adipocitocina aumentam significativamente no grupo de indivíduos de peso normal em relação ao grupo com obesidade, tanto nos controlos como nos doentes com CCR. No entanto, este aumento é muito mais acentuado nos controlos do que nos doentes

verificando-se apenas, diferenças significativas entre os doentes e controlos nos grupos que apresentam obesidade.

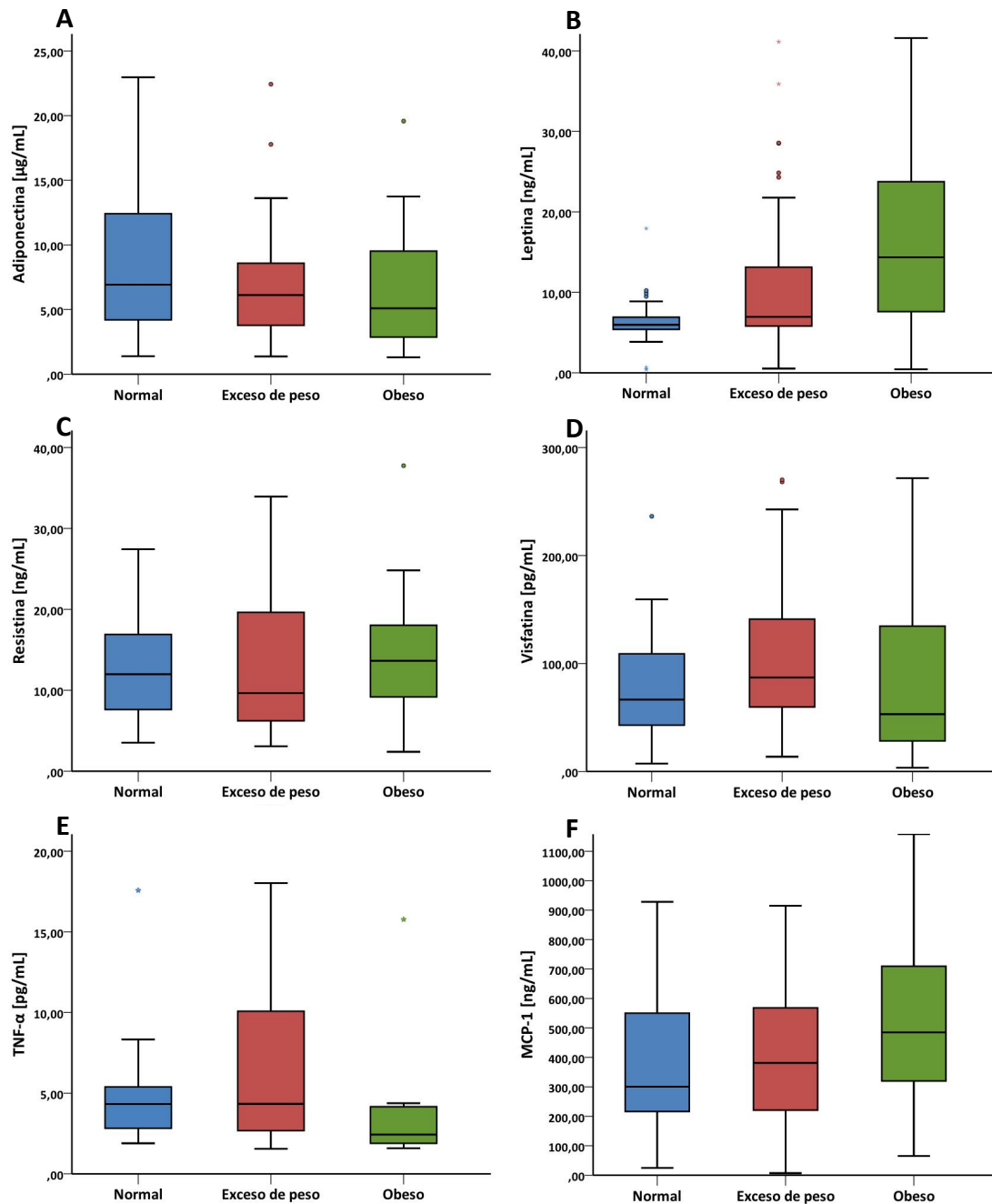
**Tabela 28: Níveis séricos das adipocitocinas e citocinas inflamatórias de acordo com o Índice de Massa Corporal**

| Variáveis                           | Grupo Controlo     |                                |                    | Grupo Doentes CCR  |                              |                    |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
|                                     | IMC < 25           | 25<IMC<30                      | IMC > 30           | IMC < 25           | 25<IMC<30                    | IMC > 30           |
| <b>Adiponectina</b><br><b>µg/mL</b> | 6,57<br>(6,81)     | 6,07<br>(5,90)                 | 6,57<br>(6,18)     | 7,80<br>(9,31)     | 6,35<br>(5,9)                | 6,55<br>(7,1)      |
| <b>p</b>                            | n = 18<br>0,724    | n = 33<br>0,581                | n = 18<br>0,800    | n = 22<br>0,724    | n = 34<br>0,581              | n = 18<br>0,800    |
| <b>Leptina</b><br><b>ng/mL</b>      | 5,81<br>(3,16)     | <b>10,36</b><br><b>(19,37)</b> | 21,84<br>(35,05)   | 5,96<br>(1,04)     | <b>6,49</b><br><b>(2,45)</b> | 9,61<br>(10,3)     |
| <b>p</b>                            | n = 18             | n = 33<br>< 0,001              | n = 18             | n = 22             | n = 34<br>0,013              | n = 18             |
| <b>Resistina</b><br><b>ng/mL</b>    | 7,62<br>(4,64)     | 7,01<br>(3,91)                 | 10,36<br>(13,07)   | 16,63<br>(10,09)   | 17,27<br>(21,09)             | 13,81<br>(28,45)   |
| <b>p</b>                            | n = 18             | n = 32<br>0,345                | n = 17             | n = 21             | n = 34<br>0,858              | n = 18             |
| <b>Visfatina</b><br><b>pg/mL</b>    | 46,72<br>(81,28)   | 66,52<br>(64,10)               | 50,94<br>(196,51)  | 107,22<br>(160,34) | 121,92<br>(151,94)           | 52,97<br>(52,42)   |
| <b>p</b>                            | n = 9              | n = 10<br>0,407                | n = 12             | n = 8              | n = 16<br>0,477              | n = 7              |
| <b>TNF α</b><br><b>pg/mL</b>        | 2,40<br>(0,95)     | 2,21<br>(3,50)                 | 2,34<br>(2,47)     | 4,94<br>(6,63)     | 5,04<br>(51,86)              | 3,39<br>(8,01)     |
| <b>p</b>                            | n = 4              | n = 8<br>0,938                 | n = 6              | n = 10             | n = 16<br>0,107              | n = 9              |
| <b>MCP-1</b><br><b>ng/mL</b>        | 499,47<br>(455,43) | 380,01<br>(283,09)             | 491,04<br>(295,79) | 292,92<br>(337,17) | 401,06<br>(504,01)           | 459,31<br>(540,40) |
| <b>p</b>                            | n = 18             | n = 30<br>0,221                | n = 17             | n = 21             | n = 33<br>0,100              | n = 18             |

Valores em mediana; IQR: amplitude interquartil; Teste Mann-Whitney; significado estatístico para  $p < 0,05$ ; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocyte colony-stimulating factor 1*

Por outro lado, podemos também verificar que os níveis séricos de resistina, de visfatina e de TNF- $\alpha$  estão aumentados em todos os grupos de doentes distribuídos de acordo com o IMC, comparativamente aos respetivos grupos controlo. No entanto, não se observam diferenças estatisticamente significativas, em relação ao

IMC, quer nos três grupos de doentes com CCR quer nos três grupos de controlos (Tabela 28).



**Figura 28: Análise dos níveis séricos de adiponectina (A), leptina (B), resistina (C), visfatina (D), TNF-α (E) e MCP-1 (F) em doentes com cancro colorretal de acordo com o Índice de Massa Corporal.**

Normal, IMC<25; Exceso de peso, 25<IMC<30; Obeso, IMC>30; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocytocolony-stimulating factor 1*



Relativamente ao MCP-1, os níveis séricos desta citocina encontram-se diminuídos nos doentes de peso normal e obesos relativamente aos controlos com o mesmo IMC. Contrariamente ao observado nestes dois grupos, os doentes com excesso de peso apresentam valores séricos de MCP-1 mais elevados do que os indivíduos controlos com excesso de peso. No entanto, não se observam diferenças estatisticamente significativas entre doentes com CCR e controlos, tal como não se observam quando se analisam os três grupos de IMC nos doentes e nos controlos.

Seguidamente analisou-se se existia ou não alguma correlação entre os níveis séricos das adipocitocinas e das citocinas inflamatórias entre si e com outras características clínicas e laboratoriais dos doentes, como o HOMA, IMC, CEA, PCR e insulina. Na Tabela 29 e na Figura 29 estão representadas as correlações mais relevantes.

Observou-se uma correlação inversa da adiponectina sérica com o IMC, ou seja, verificou-se que o aumento do IMC é acompanhado de diminuição da adiponectina sérica ( $R=-0,181$ ;  $p<0,05$ ). Esta correlação inversa foi também observada entre os níveis séricos do MCP-1 e da adiponectina ( $R=-0,177$ ;  $p=0,035$ ).

Para além das correlações negativas com o IMC já mencionadas, verificou-se também que a leptina sérica se correlaciona positivamente com o IMC, ou seja, o aumento do IMC é acompanhado de aumento da leptina nos doentes com CCR ( $R=0,279$ ;  $p=0,001$ ).

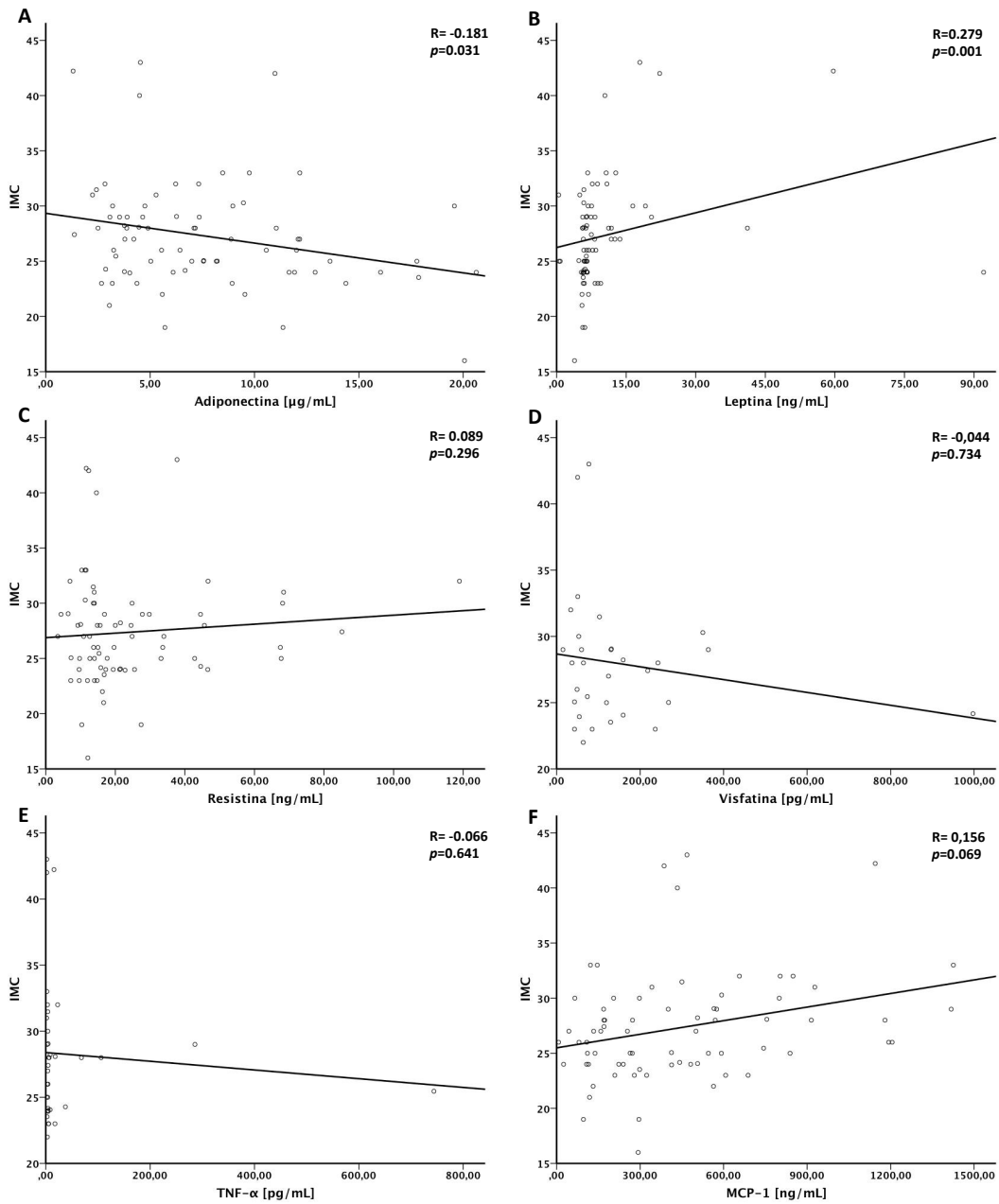
Analisou-se igualmente se o *perímetro da cintura* poderia influenciar os níveis séricos das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios. Deste modo, os doentes e controlos foram distribuídos em três grupos de risco de acordo com o *perímetro da cintura*, como descrito na secção material e métodos.

**Tabela 29: Correlação entre os níveis séricos de adipocitocinas e fatores inflamatórios entre si e com outras características dos doentes com cancro coloretal.**

|                                      | Adiponectina<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Leptina<br>( $\text{ng/ml}$ ) | Resistina<br>( $\text{ng/ml}$ ) | Visfatina<br>( $\text{pg/ml}$ ) | TNF- $\alpha$<br>( $\text{pg/ml}$ ) | MCP-1<br>( $\text{ng/mL}$ ) |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| HOMA                                 | ,120                                 | -,008                         | -,058                           | ,031                            | -,079                               | -,066                       |
|                                      | (,193)                               | (,934)                        | (,535)                          | (,838)                          | (,630)                              | (,485)                      |
| IMC                                  | -,181*                               | ,279**                        | ,089                            | -,044                           | -,066                               | ,156                        |
|                                      | (,031)                               | (,001)                        | (,296)                          | (,734)                          | (,641)                              | (,069)                      |
| Dimensões                            | ,106                                 | -,022                         | ,378**                          | -,022                           | -,192                               | ,012                        |
|                                      | (,389)                               | (,860)                        | (,002)                          | (,914)                          | (,276)                              | (,924)                      |
| CEA                                  | -,011                                | ,026                          | ,072                            | ,036                            | -,060                               | -,010                       |
|                                      | (,927)                               | (,822)                        | (,536)                          | (,846)                          | (,733)                              | (,931)                      |
| PCR                                  | -,142                                | ,063                          | ,084                            | -,112                           | ,427*                               | ,032                        |
|                                      | (,222)                               | (,586)                        | (,472)                          | (,555)                          | (,012)                              | (,791)                      |
| Insulina<br>( $\text{mU/L}$ )        | ,162                                 | ,005                          | -,056                           | -,058                           | -,057                               | -,058                       |
|                                      | (,070)                               | (,953)                        | (,536)                          | (,684)                          | (,707)                              | (,526)                      |
| Adiponectina<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | 1                                    | ,093                          | -,039                           | -,050                           | -,103                               | -,177*                      |
|                                      |                                      | (,256)                        | (,642)                          | (,699)                          | (,461)                              | (,035)                      |
| Leptina<br>( $\text{ng/ml}$ )        | ,093                                 | 1                             | -,013                           | -,004                           | -,054                               | ,037                        |
|                                      | (,256)                               |                               | (,875)                          | (,974)                          | (,697)                              | (,663)                      |
| Resistina<br>( $\text{ng/ml}$ )      | -,039                                | -,013                         | 1                               | ,041                            | ,006                                | ,072                        |
|                                      | (,642)                               | (,875)                        |                                 | (,756)                          | (,968)                              | (,397)                      |
| Visfatina<br>( $\text{pg/ml}$ )      | -,050                                | -,004                         | ,041                            | 1                               | -,076                               | -,218                       |
|                                      | (,699)                               | (,974)                        | (,756)                          |                                 | (,625)                              | (,094)                      |
| TNF- $\alpha$<br>( $\text{pg/ml}$ )  | -,103                                | -,054                         | ,006                            | -,076                           | 1                                   | ,047                        |
|                                      | (,461)                               | (,697)                        | (,968)                          | (,625)                          |                                     | (,741)                      |
| MCP-1<br>( $\text{ng/mL}$ )          | -,177*                               | ,037                          | ,072                            | -,218                           | ,047                                | 1                           |
|                                      | (,035)                               | (,663)                        | (,397)                          | (,094)                          | (,741)                              |                             |

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocytecolony-stimulating factor 1*

Apesar dos valores medianos de adiponectina, resistina e TNF- $\alpha$  nos doentes serem ligeiramente superiores aos dos controlos, e os de leptina, visfatina e MCP-1 ligeiramente inferiores, o perímetro da cintura não influenciou significativamente os níveis medianos destas moléculas nos subgrupos de doentes com CCR e nos controlos (Tabela 31).



**Figura 29: Análise das correlações entre os níveis séricos das adipocitocinas e citocinas inflamatórias e o Índice de massa corporal em doentes com cancro colorretal.**

TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocyte colony-stimulating factor 1*

Por fim analisou-se a potencial influência da síndrome metabólica nos parâmetros em estudo. Contudo, não se verificou qualquer influência desta síndrome nos níveis

séricos das adipocitocinas e das citocinas inflamatórias tanto nos doentes com CCR como nos controlos.

#### 4.3.2.3. Análise dos níveis séricos de citocinas em doentes com cancro colorretal de acordo com as características do tumor

Analisaram-se os níveis séricos das citocinas e dos fatores inflamatórios de acordo com a localização topográfica do tumor, cólon direito, cólon esquerdo e reto (Tabela 30).

**Tabela 30: Níveis séricos das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios em doentes com CCR de acordo com a topografia do tumor**

| Variáveis                    | Grupo Doentes CCR         |                           |                           |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                              | Cólon direito             | Cólon esquerdo            | Reto                      |
| <b>Adiponectina</b><br>µg/mL | 7,35 (6,55)<br>n = 23     | 5,13 (4,30)<br>n = 25     | 8,15 (8,06)<br>n = 30     |
| <b>p</b>                     | 0,187                     |                           |                           |
| <b>Leptina</b><br>ng/mL      | 6,56 (4,5)<br>n = 23      | 6,53 (4,06)<br>n = 25     | 6,47 (1,3)<br>n = 30      |
| <b>p</b>                     | 0,796                     |                           |                           |
| <b>Resistina</b><br>ng/mL    | 16,88 (17,43)<br>n = 23   | 17,90 (31,74)<br>n = 24   | 15,80 (9,71)<br>n = 30    |
| <b>p</b>                     | 0,836                     |                           |                           |
| <b>Visfatina</b><br>pg/mL    | 65,11 (138,23)<br>n = 10  | 124,37 (176,62)<br>n = 11 | 111,07 (121,13)<br>n = 10 |
| <b>p</b>                     | 0,818                     |                           |                           |
| <b>TNF α</b><br>pg/mL        | 3,71 (5,71)<br>n = 8      | 4,44 (7,71)<br>n = 14     | 4,51 (23,79)<br>n = 13    |
| <b>p</b>                     | 0,210                     |                           |                           |
| <b>MCP-1</b><br>ng/mL        | 296,62 (272,78)<br>n = 22 | 532,29 (546,25)<br>n = 24 | 223,36 (463,41)<br>n = 29 |
| <b>p</b>                     | 0,237                     |                           |                           |

Existem algumas variações nos níveis de adipocitocinas em relação à localização do tumor, sendo de salientar uma tendência para o aumento dos níveis de visfatina e MCP-1, nos tumores localizados ao cólon esquerdo [124,37pg/mL (IQR=176,62)] e

[532,29ng/mL (IQR=546,25)]. Contudo, estas diferenças não apresentam significado estatístico. Para além destas alterações, os doentes com tumor no cólon direito, apresentam níveis séricos de visfatina próximos dos observados nos indivíduos controlo e mais baixos que os doentes com tumor no cólon esquerdo ou reto.

Como se pode ver na Tabela 31 foram também analisados os níveis séricos

**Tabela 31: Níveis séricos das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios em doentes com CCR de acordo com o perímetro da cintura**

| Variáveis             | Grupo Controlo |                |                    | Doentes CCR        |                    |                    |
|-----------------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                       | PC normal      | PC elevado     | PC muito elevado   | PC normal          | PC elevado         | PC muito elevado   |
| Adiponectina<br>µg/mL | 2,48<br>(ND)   | 4,47<br>(ND)   | 3,04<br>(7,03)     | 6,35<br>(4,37)     | 5,69<br>(8,12)     | 5,55<br>(5,19)     |
|                       | n = 2          | n = 3          | n = 10             | n = 10             | n = 14             | n = 27             |
| p                     | 0,298          |                |                    | 0,877              |                    |                    |
| Leptina<br>ng/mL      | 4,53<br>(ND)   | 9,33<br>(ND)   | 26,79<br>(40,61)   | 5,74<br>(1,59)     | 5,82<br>(2,4)      | 7,69<br>(6,09)     |
|                       | n = 2          | n=3            | n =10              | n = 10             | n=14               | n = 27             |
| p                     | 0,075          |                |                    | <b>0,001</b>       |                    |                    |
| Resistina<br>ng/mL    | 7,89<br>(ND)   | 4,38<br>(ND)   | 5,47<br>(12,34)    | 12,1<br>(12,21)    | 17,07<br>(23,33)   | 15,62<br>(21,29)   |
|                       | n = 2          | n = 3          | n = 9              | n = 9              | n= 14              | n= 27              |
| p                     | 0,585          |                |                    | 0,386              |                    |                    |
| Visfatina<br>pg/mL    | 165,27<br>(ND) | 100,47<br>(ND) | 96,91<br>(187,86)  | 63,76<br>(NA)      | 73,66<br>(137,91)  | 70,71<br>(89,88)   |
|                       | n = 2          | n= 3           | n= 9               | n = 3              | n = 5              | n= 14              |
| p                     | 0,834          |                |                    | 0,860              |                    |                    |
| TNF α<br>pg/mL        | (ND)           | 2,94<br>(ND)   | 3,35<br>(2,96)     | 4,38<br>(11,71)    | 4,51<br>(371,06)   | 4,55<br>(17,57)    |
|                       | n = 2          | n= 3           | n= 9               | n = 10             | n = 14             | n = 26             |
| p                     | ND             |                |                    | 0,825              |                    |                    |
| MCP-1<br>ng/mL        | 524,53<br>(ND) | 404,19<br>(ND) | 491,04<br>(251,49) | 309,49<br>(495,22) | 431,76<br>(545,67) | 417,49<br>(468,35) |
|                       | n = 2          | n= 3           | n= 9               | n = 10             | n= 14              | n= 26              |
| p                     | 0,764          |                |                    | 0,734              |                    |                    |

Valores em mediana; IQR: amplitude interquartil; ND, Não determinado; Teste Kruskal-Walli significado estatístico para  $p < 0.05$ ; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocyte chemoattractant protein 1*

das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios de acordo com o perímetro da cintura, tendo-se verificado que havia uma diferença estatisticamente significativa nos valores medianos da leptina entre os doentes com PC normal e PC muito elevado [5,74ng/mL (IQR=1,59)] e [7,69ng/mL (IQR=6,09) respetivamente; p=0,001]. Seguidamente, foram analisados os níveis séricos medianos das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios de acordo com os estádios da classificação TNM (Figura 30 e Tabela 32).

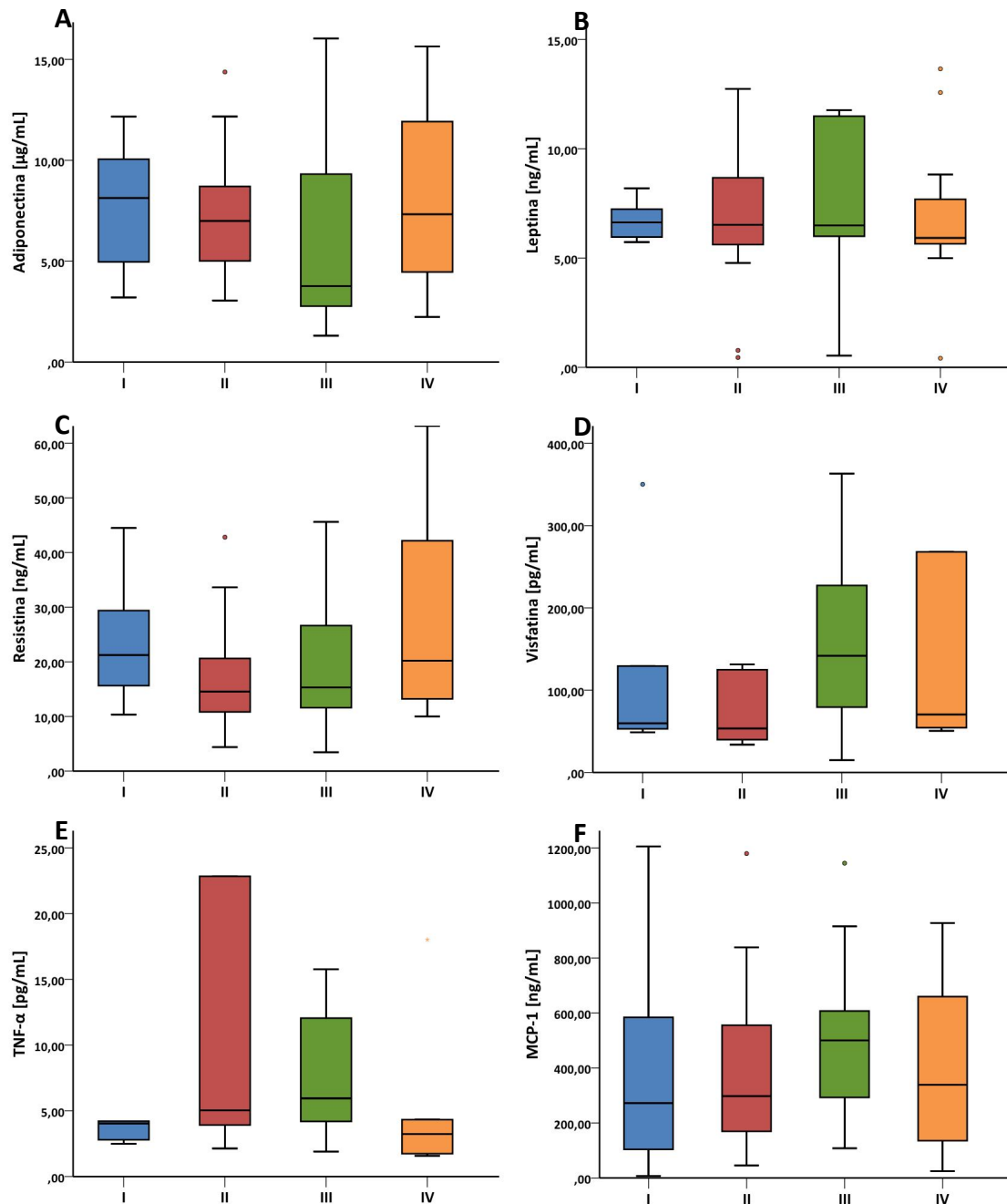
**Tabela 32: Níveis séricos das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios em doentes com CCR de acordo com o estágio do tumor**

| Variáveis                    | I                           | II                          | III                         | IV                        | Valor de p |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------|
|                              | Mediana (IQR)<br>n=         | Mediana (IQR)<br>n=         | Mediana (IQR)<br>n=         | Mediana (IQR)<br>n=       |            |
| <b>Adiponectina</b><br>µg/mL | 8,14<br>(6,35)<br>n= 15     | 7,00<br>(4,04)<br>n= 27     | 3,77<br>(7,08)<br>n= 19     | 7,33<br>(7,72)<br>n=17    | 0,564      |
| <b>Leptina</b><br>ng/mL      | 6,63<br>(1,57)<br>n= 15     | 6,53<br>(3,27)<br>n= 27     | 6,49<br>(5,9)<br>n=19       | 5,92<br>(2,62)<br>n=17    | 0,937      |
| <b>Resistina</b><br>ng/mL    | 21,25<br>(18,95)<br>n= 15   | 14,57<br>(10,89)<br>n= 27   | 15,31<br>(16,18)<br>n= 19   | 20,22<br>(31,41)<br>n=16  | 0,059      |
| <b>Visfatina</b><br>pg/mL    | 59,67<br>(188,83)<br>n= 5   | 53,52<br>(89,24)<br>n= 8    | 141,92<br>(155,26)<br>n= 12 | 70,50<br>(396,99)<br>n= 6 | 0,380      |
| <b>TNF α</b><br>pg/mL        | 4,04<br>(142,44)<br>n= 5    | 5,04<br>(30,55)<br>n= 10    | 5,95<br>(9,86)<br>n= 12     | 3,23<br>(2,66)<br>n= 8    | 0,391      |
| <b>MCP-1</b><br>ng/mL        | 271,87<br>(499,46)<br>n= 15 | 370,95<br>(396,76)<br>n= 27 | 500,68<br>(417,45)<br>n= 17 | 338,7<br>(573,19)<br>n=16 | 0,564      |

Valores em mediana; IQR: amplitude interquartil; Teste Kruskal-Wallis; significado estatístico para p<0.05; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocytecolony-stimulating factor 1*

Verificou-se que a adiponectina apresenta valores mais baixos nos doentes no estágio III [3,77 µg/mL (IQR=7,08)], enquanto nos estádios I, II e IV estes valores são mais elevados [8,14 µg/mL(IQR=6,35), 7,00 µg/mL(IQR=4,04) e 7,33

µg/mL(IQR=7,72), respetivamente], embora as diferenças não tenham significado estatístico.



**Figura 30: Análise dos níveis séricos de adiponectina (A), leptina (B), resistina (C), vistatina (D), TNF-α (E) e MCP-1 (F) em doentes com cancro colorretal de acordo com o estadiamento do tumor.**

TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocyte colony-stimulating factor 1*

Contrariamente, os doentes com tumores no estágio III apresentam uma tendência para aumento dos níveis de visfatina e MCP-1, contudo as diferenças não são estatisticamente significativas.

Como referido anteriormente, analisaram-se também os níveis séricos das citocinas e dos fatores inflamatórios em relação à progressão do tumor em função da sua evolução na mucosa do cólon (estadiamento T) (Tabela 33). Para fazer esta análise os doentes com CCR foram divididos por 4 níveis de progressão na mucosa, de acordo com a Classificação TNM, T1 a T4, sendo posteriormente comparados entre si.

Para analisar se existe alguma correlação entre os níveis de adipocitocinas e de fatores inflamatórios com as características do tumor, avaliámos a sua expressão em função da localização topográfica e dimensão do tumor, do estadiamento clássico (TNM) e da sua evolução na mucosa (T).

Como se pode verificar na Tabela 33, de um modo geral, os doentes com CCR com tumores mais superficiais (T1) são os que apresentam níveis mais baixos de TNF- $\alpha$ , enquanto os níveis séricos de visfatina e MCP-1 se encontram tendencialmente mais elevados nos doentes com tumores T2 e T4, respetivamente.

Seguidamente, tentou-se avaliar se os níveis das adipocitocinas (adiponectina, leptina, resistina e visfatina) e do TNF- $\alpha$  e MCP-1, apresentavam diferenças entre tumores mais superficiais, T1 e T2, em relação aos doentes com tumores mais profundos, T3 e T4. Os resultados mostram que os doentes com tumores mais superficiais apresentam níveis séricos de resistina significativamente mais elevados em relação aos doentes com tumores mais profundos [T<sub>1-2</sub>: 21,58 ng/mL (IQR=34,19); T<sub>3-4</sub>:14,82 ng/mL (IQR=15,19); p=0,037].



**Tabela 33: Valores medianos das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios segundo a dimensão T do Tumor**

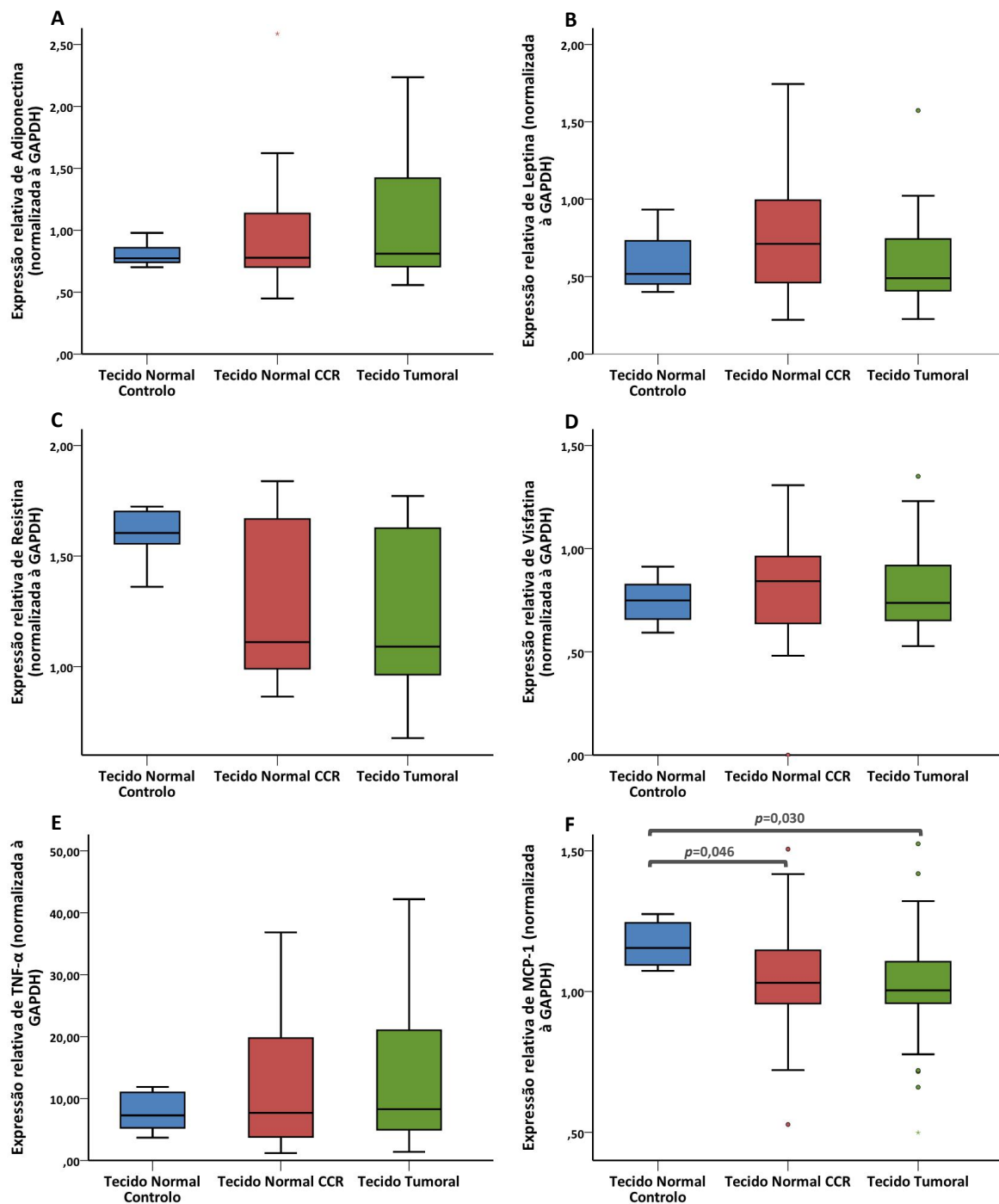
| Variáveis                    | T1                    | T2                         | T3                         | T4                         | Valor de p |
|------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------|
|                              | Mediana (IQR)<br>n    | Mediana (IQR)<br>n         | Mediana (IQR)<br>n         | Mediana (IQR)<br>n         |            |
| <b>Adiponectina</b><br>µg/mL | 8,14<br>(NA)<br>n=3   | 7,56<br>(8,81)<br>n=11     | 6,70<br>(6,58)<br>n=41     | 4,53<br>(5,54)<br>n=17     | 0,505      |
| <b>Leptina</b><br>ng/mL      | 7,06<br>(NA)<br>n=3   | 6,49<br>(1,02)<br>n=11     | 6,49<br>(3,86)<br>n=41     | 7,69<br>(5,62)<br>n=17     | 0,552      |
| <b>Resistina</b><br>ng/mL    | 19,63<br>(NA)<br>n=3  | 24,82<br>(51,17)<br>n=11   | 15,81<br>(13,42)<br>n=41   | 13,13<br>(25,51)<br>n=16   | 0,112      |
| <b>Visfatina</b><br>pg/mL    | NA<br>n=1             | 73,66<br>(NA)<br>n=3       | 130,75<br>(174,36)<br>n=4  | 81,17<br>(102,42)<br>n=24  | 0,599      |
| <b>TNF α</b><br>pg/mL        | NA<br>n=1             | 2,79<br>(512,88)<br>n=5    | 4,53<br>(6,93)<br>n=18     | 4,84<br>(14,01)<br>n=10    | 0,97       |
| <b>MCP-1</b><br>ng/mL        | 295,56<br>(NA)<br>n=3 | 271,87<br>(629,87)<br>n=11 | 307,43<br>(408,80)<br>n=40 | 459,31<br>(386,15)<br>n=16 | 0,486      |

Valores em mediana; IQR: amplitude interquartil; ND, Não determinado; Teste Kruskal-Wallis; significado estatístico para  $p < 0.05$ ; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocyte colony-stimulating factor 1*

#### 4.3.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÉNICA DAS ADIPOCITOCINAS E DE FATORES INFLAMATÓRIOS EM DOENTES COM CANCRO COLORRETAL E CONTROLOS

Além dos níveis séricos das adipocitocinas (adiponectina, leptina, resistina e visfatina) e do TNF- $\alpha$  e MCP-1, avaliamos a expressão dos genes que codificam estas proteínas no cólon normal de controlos e em cólon normal e tumoral dos doentes com cancro colorretal, por PCR em tempo real.

Como se pode observar na Figura 31, os níveis de expressão relativa dos genes da adiponectina, resistina, visfatina, TNF- $\alpha$  e MCP-1, no tecido de cólon normal e tumoral dos doentes com CCR apresentam valores medianos semelhantes.



**Figura 31: Avaliação da expressão dos genes das adipocitocinas e citocinas inflamatórias por PCR em tempo real.**

A figura representa a expressão génica da adiponectina (A), leptina (B), resistina (C), visfatina (D) e de TNF- $\alpha$  (E) e MCP-1 (F) em cólon normal de controlos (barra azul), em cólon normal (barra vermelha) e tumoral (barra verde) de doentes com cancro colorretal.

Apesar da expressão génica mediana da adiponectina e do TNF- $\alpha$  ser semelhante no tecido normal e tumoral dos doentes e no tecido normal dos controlos, observa-se

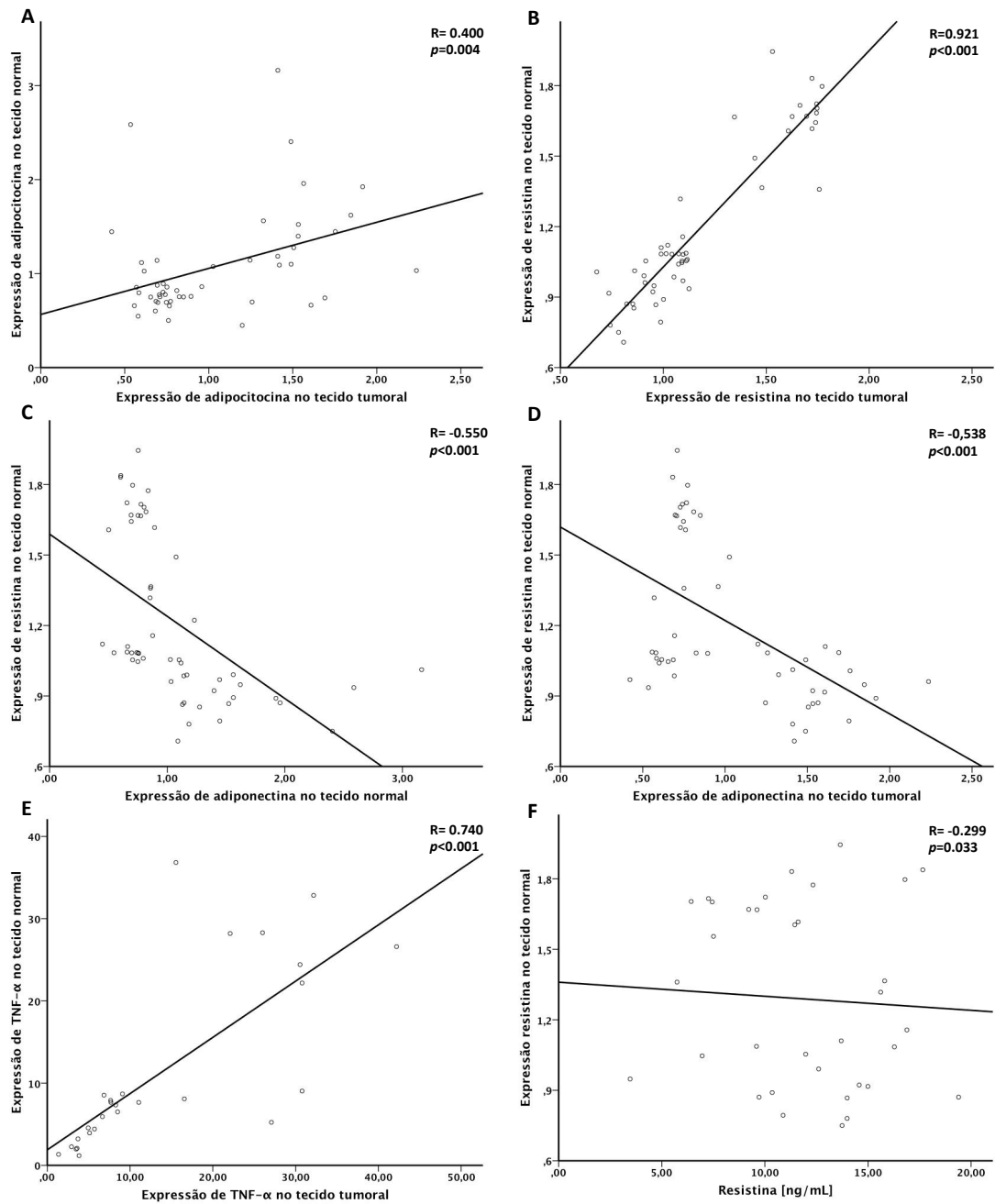
tendência para aumento da expressão génica destas citocinas nos tecidos dos doentes com CCR. Para além desta alteração nos tecidos normal e tumoral dos doentes, observa-se diminuição da expressão génica da resistina e de MCP-1, relativamente ao tecido normal dos controlos.

No entanto, apenas para o MCP-1 as diferenças encontradas são estatisticamente significativas ( $p=0,046$  e  $0,03$ , respetivamente).

Para verificar se os níveis séricos das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios poderiam refletir de algum modo os níveis tumorais destes parâmetros procedeu-se à análise comparativa dos níveis séricos destas moléculas com a expressão génica no cólon.

Assim, verificou-se que os valores séricos da adiponectina, da visfatina e do TNF- $\alpha$  apresentam um perfil convergente ao da expressão génica tumoral, com tendência para aumento nos doentes com cancro e valores mais baixos nos controlos. Por outro lado, a expressão sérica da leptina e do MCP-1 são divergentes em termos de expressão sérica e tecidual, ou seja, os doentes que apresentam valores séricos medianos mais baixos tem expressão génica mais elevada. Observam-se também divergências entre os valores séricos da resistina e a sua expressão génica tecidual, com valores séricos desta adipocitocina mais elevados nos doentes com CCR e expressão genica mais baixa.

Seguidamente analisou-se se existia uma correlação entre os níveis de expressão génica tecidual, os níveis séricos das adipocitocinas e do TNF- $\alpha$  e MCP-1 (Figura 32).



**Figura 32: Análise das correlações entre a expressão génica de adipocitocinas e fatores inflamatórios nos tecidos normal e tumoral de doentes com cancro colorretal.**

TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocyte colony-stimulating factor 1*

Como referido anteriormente, os níveis séricos de MCP-1 correlacionam-se negativamente com os níveis séricos de adiponectina, mas também com a expressão génica da adiponectina na mucosa normal ( $R = -0,378$ ;  $p = 0,007$ ) e com a expressão génica da visfatina na mucosa normal ( $R = -0,372$ ;  $p = 0,007$ ).

Por outro lado, constatou-se que os níveis séricos de MCP-1 se correlacionam positivamente com a expressão génica da resistina na mucosa normal ( $R=0,304$ ;  $p=0,030$ ) e com a expressão génica da leptina ( $R=0,345$ ;  $p=0,024$ ) e da resistina ( $R=0,316$ ;  $p=0,037$ ) na mucosa tumoral.

A expressão génica da adiponectina na mucosa normal está também correlacionada com a expressão génica da leptina ( $R=0,434$ ;  $p=0,001$ ) e da visfatina ( $R=0,741$ ;  $p<0,001$ ) na mucosa do cólon normal. Verificou-se ainda que expressão génica da adiponectina na mucosa normal se correlacionou inversamente com a expressão génica da resistina tanto na mucosa normal ( $R=-0,550$ ;  $p=0,000$ ) como no tecido tumoral ( $R=0,476$ ;  $p=0,001$ ).

Para além das correlações entre os níveis séricos e tecidulares das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios entre si, observaram-se correlações entre a expressão génica tecidual e os parâmetros clínico-laboratoriais dos doentes. A expressão génica da leptina na mucosa normal correlaciona-se positivamente com o CEA ( $R=0,280$ ;  $p=0,047$ ) e com os níveis de resistina circulante ( $R=0,307$ ;  $p=0,038$ ), e inversamente com a expressão génica de resistina no cólon normal ( $R=-0,550$ ;  $p=0,000$ ) e no cólon tumoral ( $R=-0,109$ ;  $p=0,478$ ).

#### **4.3.4. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E TECIDULARES DAS ADIPOCITOCINAS E DE FATORES INFLAMATÓRIOS COMO MARCADORES TUMORAIS DE CANCRO COLORRETAL E DE PROGNÓSTICO**

Tendo como objetivo, avaliar a capacidade discriminatória dos níveis séricos e da expressão génica tecidual das adipocitocinas e do TNF- $\alpha$  e MCP-1 como eventuais marcadores no diagnóstico do cancro colorretal foram construídas curvas *Receiver*

*Operating Characteristic* (ROC) (Figura 33). Estas curvas foram também utilizadas na identificação de pontos de corte para a determinação da sua potencial utilização como marcadores de prognóstico (Figura 34). O tempo médio de sobrevivência dos doentes foi depois avaliado pelo método de Kaplan-Meier (Figuras 36 e 37).

Na Figura 34 estão representadas as curvas ROC construídas de forma a analisar a capacidade discriminatória das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios como marcadores de diagnóstico de cancro colorretal (Tabela 34).

**Tabela 34: Capacidade discriminatória das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios na identificação de doentes com cancro colorretal**

|                       | Adiponectina<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Leptina<br>( $\text{ng/mL}$ ) | Resistina<br>( $\text{ng/mL}$ ) | Visfatina<br>( $\text{pg/mL}$ ) | TNF- $\alpha$<br>( $\text{pg/mL}$ ) | MCP-1<br>( $\text{ng/mL}$ ) |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| <b>AUC</b>            | 0,561                                | <b>0,603</b>                  | <b>0,850</b>                    | <b>0,649</b>                    | <b>0,759</b>                        | 0,570                       |
| <b>(IC 95%)</b>       | (0,469-<br>0,653)                    | (0,506-<br>0,700)             | (0,787-<br>0,913)               | (0,513-<br>0,785)               | (0,625-<br>0,894)                   | (0,476-<br>0,664)           |
| <b>Ponto de corte</b> | 10,97                                | 12,85                         | 10,83                           | 31,20                           | 3,01                                | 188,37                      |
| <b>Sensibilidade</b>  | 24,6%                                | 88,5%                         | 83,1%                           | 96,8%                           | 77,1%                               | 32%                         |
| <b>Especificidade</b> | 87,5%                                | 44,4%                         | 77,1%                           | 34,4%                           | 73,7%                               | 89,7%                       |
| <b>VPP</b>            | 69%                                  | 63%                           | <b>80%</b>                      | <b>59%</b>                      | <b>84%</b>                          | 77%                         |
| <b>VPN</b>            | 52%                                  | 78%                           | <b>81%</b>                      | <b>92%</b>                      | <b>64%</b>                          | 54%                         |
| <b>p</b>              | 0,198                                | <b>0,029</b>                  | <b>&lt;0,001</b>                | <b>0,042</b>                    | <b>0,002</b>                        | 0,149                       |

AUC - área abaixo da curva; IC - Intervalo de confiança; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocytecolony-stimulating factor 1*

Na Tabela 34, verifica-se que a leptina, a resistina, a visfatina e o TNF- $\alpha$  são as citocinas que apresentam capacidade discriminatória para a identificação de doentes com cancro colorretal, sendo a área abaixo da curva (AUC) de 0,603 (IC 95%: 0,506-0,700) para a leptina, de 0,850 (IC 95%: 0,787-0,913) para a resistina, de 0,649 (IC 95%: 0,513-0,785) para a visfatina e de 0,759 (IC 95%: 0,625-0,894) para o

TNF- $\alpha$ . No entanto, os resultados mostram que níveis séricos de resistina constituem o parâmetro com maior exatidão discriminatória, uma vez que apresentam a maior AUC (0,850), sugerindo bom potencial como biomarcador de diagnóstico.

Uma vez que estes parâmetros apresentam valor preditivo determinou-se o ponto de corte (*cut-off*) que maximiza a sensibilidade e especificidade de cada molécula como “biomarcador” através do cálculo do Índice de Youden.

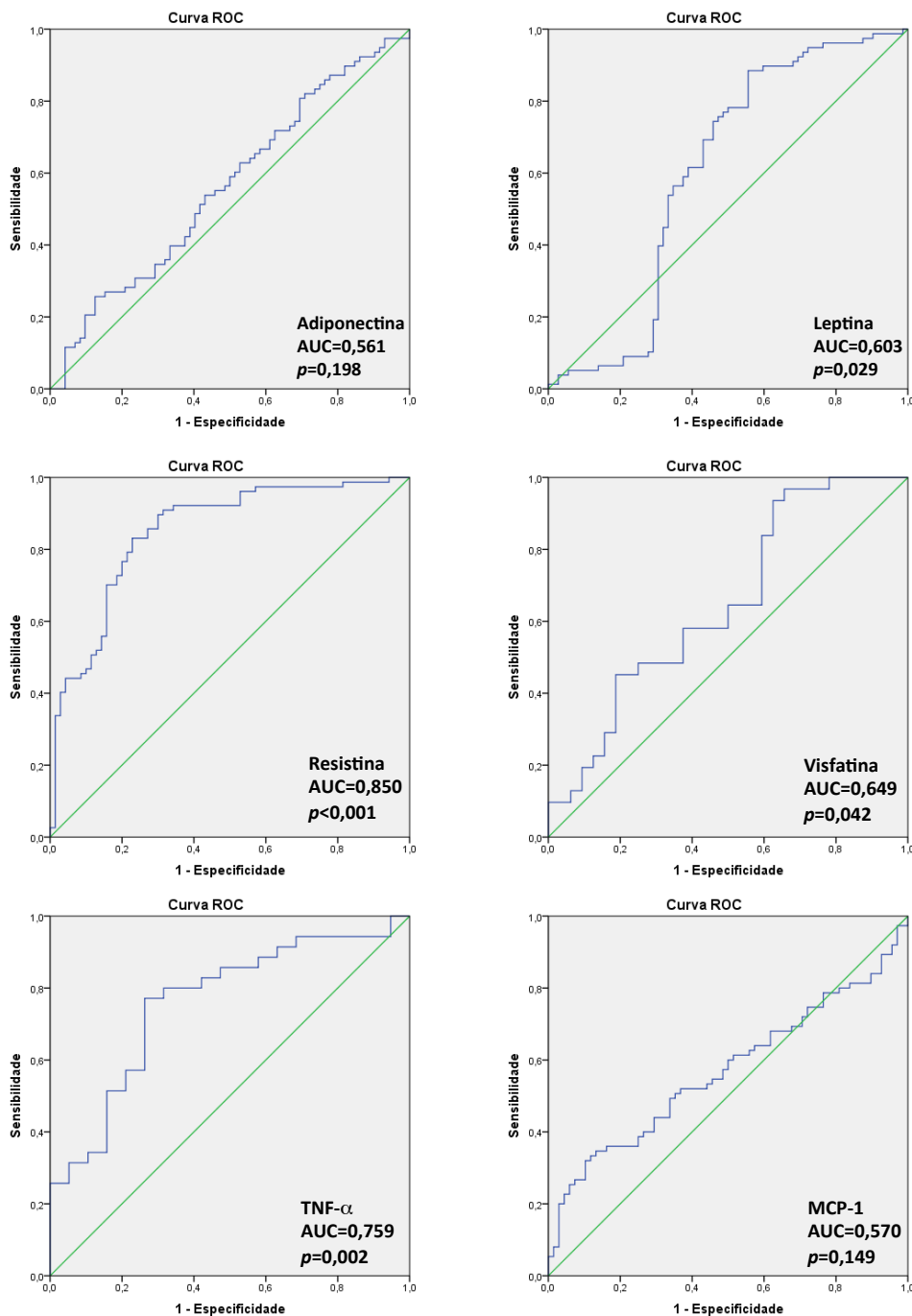
Assim, o ponto de corte ótimo da leptina para a identificação de doentes com CCR foi de 12,85 ng/mL (sensibilidade: 88,5% e especificidade: 55,6%), para a resistina de 10,83 ng/mL (sensibilidade: 96,8% e especificidade: 65,6%), de 31,20 pg/mL para a visfatina (sensibilidade: 83,1% e especificidade: 22,9%) e de 3,01 pg/mL para o TNF- $\alpha$  (sensibilidade: 77,1% e especificidade: 26,3%).

Posteriormente, avaliou-se o papel das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios na sobrevivência dos doentes com cancro colorretal, através da análise do seu valor discriminatório. Para tal, construíram-se curvas ROC de modo a calcular os pontos de corte que permitissem estratificar os doentes em termos de sobrevivência global (Figura 36).

Assim, o tempo médio de sobrevivência dos doentes foi avaliado utilizando os pontos de corte calculados através das curvas ROC para estratificar os doentes com cancro colorretal.

Como se pode verificar na Tabela 35 e na Figura 36, a estratificação dos doentes com CCR pelos pontos de corte calculados para os níveis séricos de adiponectina, de leptina e para a visfatina permite discriminar os doentes em dois grupos de risco

distintos. Os doentes com níveis séricos de adiponectina ou visfatina superiores a



**Figura 33: Avaliação dos níveis de citocinas séricas como potenciais marcadores de diagnóstico em doentes com cancro colorretal através da análise de curvas Receiver Operating Characteristic (ROC).**

A figura representa a área abaixo da curva (AUC) da adiponectina (A), leptina (B), resistina (C), visfatina (D), TNF- $\alpha$  (E) e MCP-1 (F), a qual permite identificar a citocina que possui maior poder de discriminação entre controlos e doentes com cancro colorretal. IC – Intervalo de confiança; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocytelony-stimulating factor 1*.

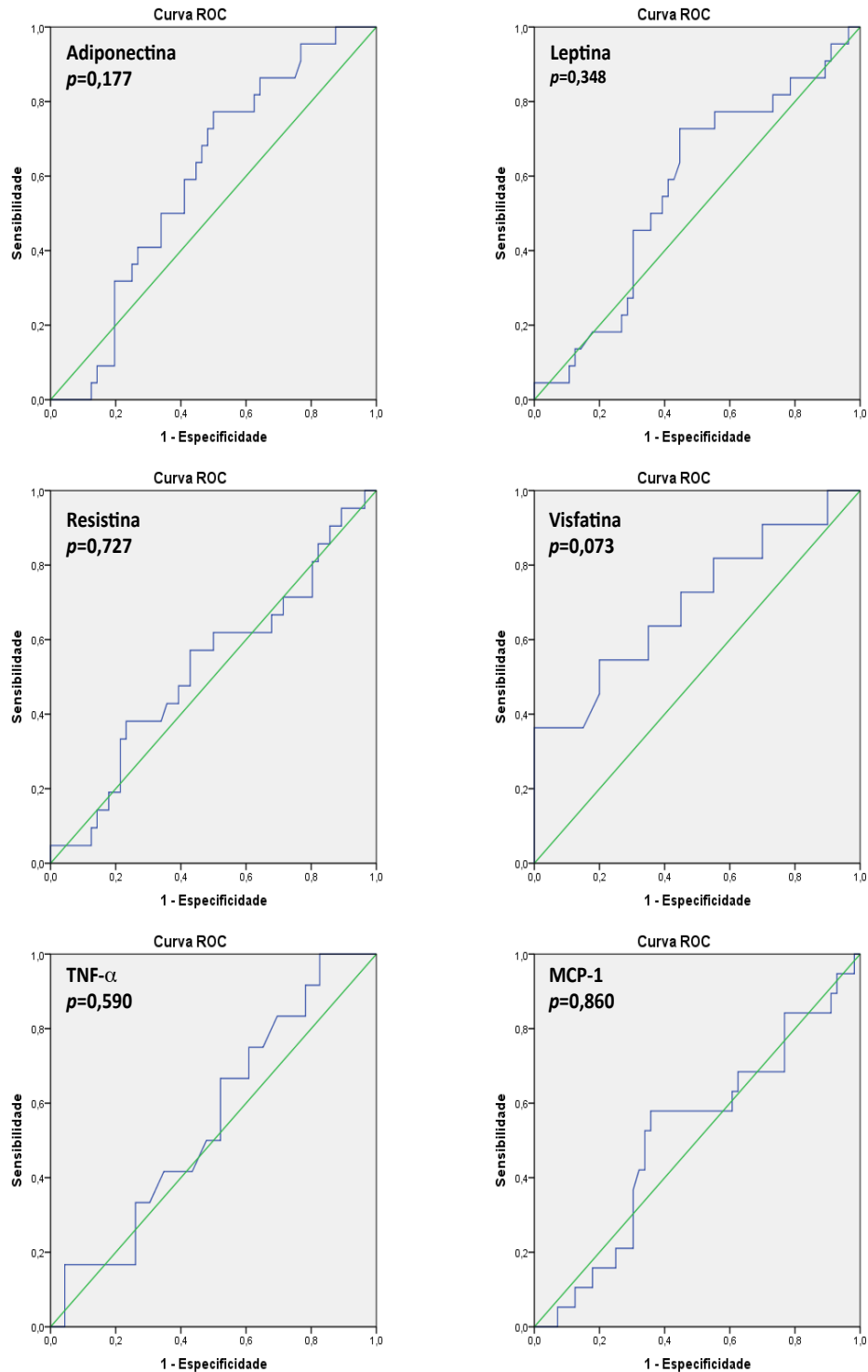


**Tabela 35: Capacidade discriminatória das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios na sobrevivência de doentes com cancro colorretal**

| Níveis séricos                              | Adiponectina<br>(µg/mL) | Leptina<br>(ng/mL) | Resistina<br>(ng/mL) | Visfatina<br>(pg/mL) | TNF-α<br>(pg/mL) | MCP-1<br>(ng/mL) |
|---|-------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|
| <b>AUC</b>                                  | 0,599                   | 0,569              | 0,526                | 0,698                | 0,556            | 0,514            |
| <b>(IC 95%)</b>                             | (0,470-0,727)           | (0,430-0,708)      | (0,378-0,674)        | (0,494-0,901)        | (0,360-0,753)    | (0,362-0,665)    |
| <b>Ponto de corte</b>                       | 5,56                    | 6,56               | 26,47                | 255,38               | 53,01            | 438,08           |
| <b>Sensibilidade</b>                        | 77,3%                   | 72,7%              | 38,1%                | 36,4%                | 100%             | 57,9%            |
| <b>Especificidade</b>                       | 50%                     | 55,4%              | 76,8%                | 100%                 | 17,4%            | 64,3%            |
| <b>VPP</b>                                  | 38%                     | 38%                | 38%                  | 100%                 | 39%              | 35%              |
| <b>VPN</b>                                  | 85%                     | 83%                | 77%                  | 74%                  | 100%             | 82%              |
| <b>p</b>                                    | 0,177                   | 0,348              | 0,727                | 0,073                | 0,590            | 0,860            |
| Expressão tumoral<br>(normalizado ao GAPDH) | Adiponectina            | Leptina            | Resistina            | Visfatina            | TNF-α            | MCP-1            |
| <b>AUC</b>                                  | 0,587                   | 0,537              | <b>0,698</b>         | 0,603                | 0,515            | <b>0,690</b>     |
| <b>(IC 95%)</b>                             | (0,402-0,773)           | (0,350-0,723)      | (0,521-0,876)        | (0,400-0,806)        | (0,338-0,692)    | (0,536-0,845)    |
| <b>Ponto de corte</b>                       | 0,99                    | 0,51               | 1,09                 | 0,71                 | 24,96            | 1,02             |
| <b>Sensibilidade</b>                        | 75%                     | 58,3%              | 75%                  | 66,7%                | 100%             | 75%              |
| <b>Especificidade</b>                       | 50%                     | 65,9%              | 69%                  | 61,9%                | 27,3%            | 73,8%            |
| <b>VPP</b>                                  | 30%                     | 32%                | <b>41%</b>           | 33%                  | 26%              | <b>45%</b>       |
| <b>VPN</b>                                  | 88%                     | 84%                | <b>91%</b>           | 87%                  | 91%              | <b>91%</b>       |
| <b>p</b>                                    | 0,360                   | 0,702              | <b>0,037</b>         | 0,279                | 0,886            | <b>0,046</b>     |

AUC - área abaixo da curva; IC – Intervalo de confiança; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocyte colony-stimulating factor 1*

5,56 µg/mL ou a 255,38 pg/mL, respetivamente, e, ou com valores séricos de leptina inferiores a 6,56 ng/mL apresentam menor sobrevivência global.



**Figura 34: Avaliação dos níveis de citocinas séricas como potenciais marcadores de prognóstico em doentes com cancro colorretal através da análise de curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC).**

A figura representa a área abaixo da curva (AUC) da adiponectina, leptina, resistina, visfatina, TNF- $\alpha$  e MCP-1, a qual permite identificar a citocina que possui maior poder de discriminação da sobrevivência em doentes com cancro colorretal. IC – Intervalo de confiança; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocytecolony-stimulating factor 1*.

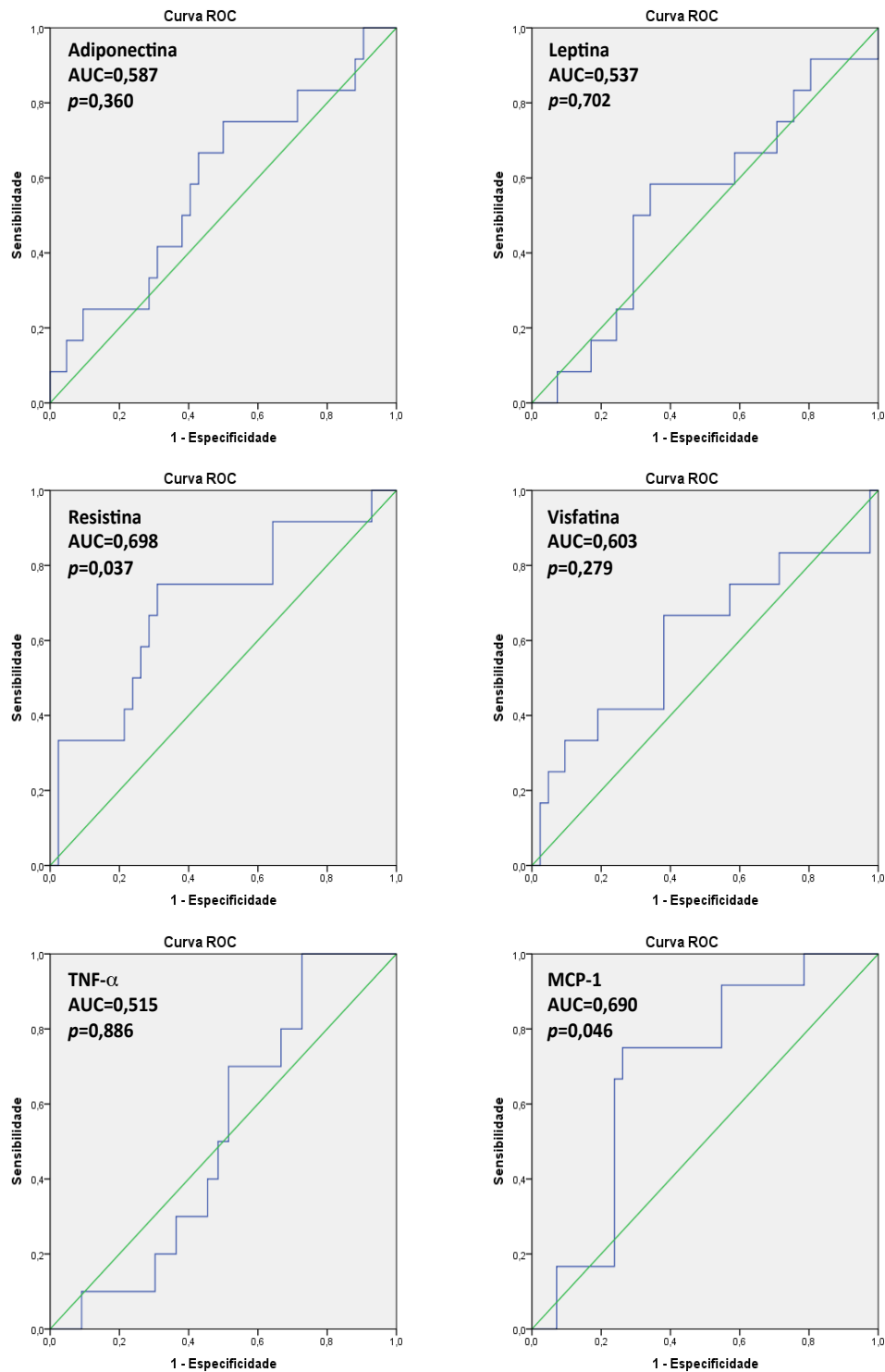


Figura 35: Avaliação dos níveis de expressão génica das citocinas no tecido tumoral como potenciais marcadores de prognóstico em doentes com cancro colorretal através da análise de curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC).

A figura representa a área abaixo da curva (AUC) da adiponectina, leptina, resistina, visfatina, TNF- $\alpha$  e MCP-1, a qual permite identificar a citocina que possui maior poder de discriminação da sobrevivência em doentes com cancro colorretal. IC – Intervalo de confiança; TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocyte colony-stimulating factor 1*.

A análise da sobrevivência global estratificada pelos níveis séricos da adiponectina, leptina e visfatina permitiu verificar que existe uma maior sobrevivência dos doentes que apresentam níveis séricos de adiponectina inferiores a 6,56 µg/mL de leptina superior a 6,56 ng/mL e de visfatina inferiores a 255,36 pg/mL.

No entanto, a análise da sobrevivência global estratificada pelos níveis séricos de resistina, de TNF- $\alpha$  e de MCP-1, permitiu apenas verificar uma tendência para menor sobrevivência e, ou pior prognóstico dos doentes que apresentavam níveis séricos de resistina e de MCP-1 superiores a 26,47 ng/mL e 438,08 ng/mL, respetivamente, e para os doentes que apresentavam valores séricos de TNF- $\alpha$  inferiores a 53,01 pg/mL.

A mesma análise de sobrevivência foi efetuada para os níveis de expressão génica das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios no tecido tumoral. Como se pode verificar na Figura 37, a estratificação dos doentes com CCR pelos pontos de corte resistina, MCP-1 superiores a 1,09 e 1,02, respetivamente, e para os doentes que apresentavam valores séricos de TNF- $\alpha$  inferiores a 5,02 calculados para os níveis expressão génica das adipocitocinas e dos fatores inflamatórios apenas permitiu discriminar os doentes em dois grupos de risco distintos, estatisticamente significativos entre si, com base na expressão do gene MCP-1. Assim, os doentes com níveis de expressão génica de MCP-1 superior a 1,02 apresentam menor sobrevivência relativamente aos doentes com valores mais baixos deste parâmetro inflamatório. Relativamente à análise da sobrevivência global estratificada pelos níveis de expressão génica no tecido tumoral das restantes adipocitocinas e fatores inflamatórios, verificou-se que apenas os doentes que apresentam baixos níveis de expressão dos genes da adiponectina e da visfatina no tecido tumoral e altos níveis

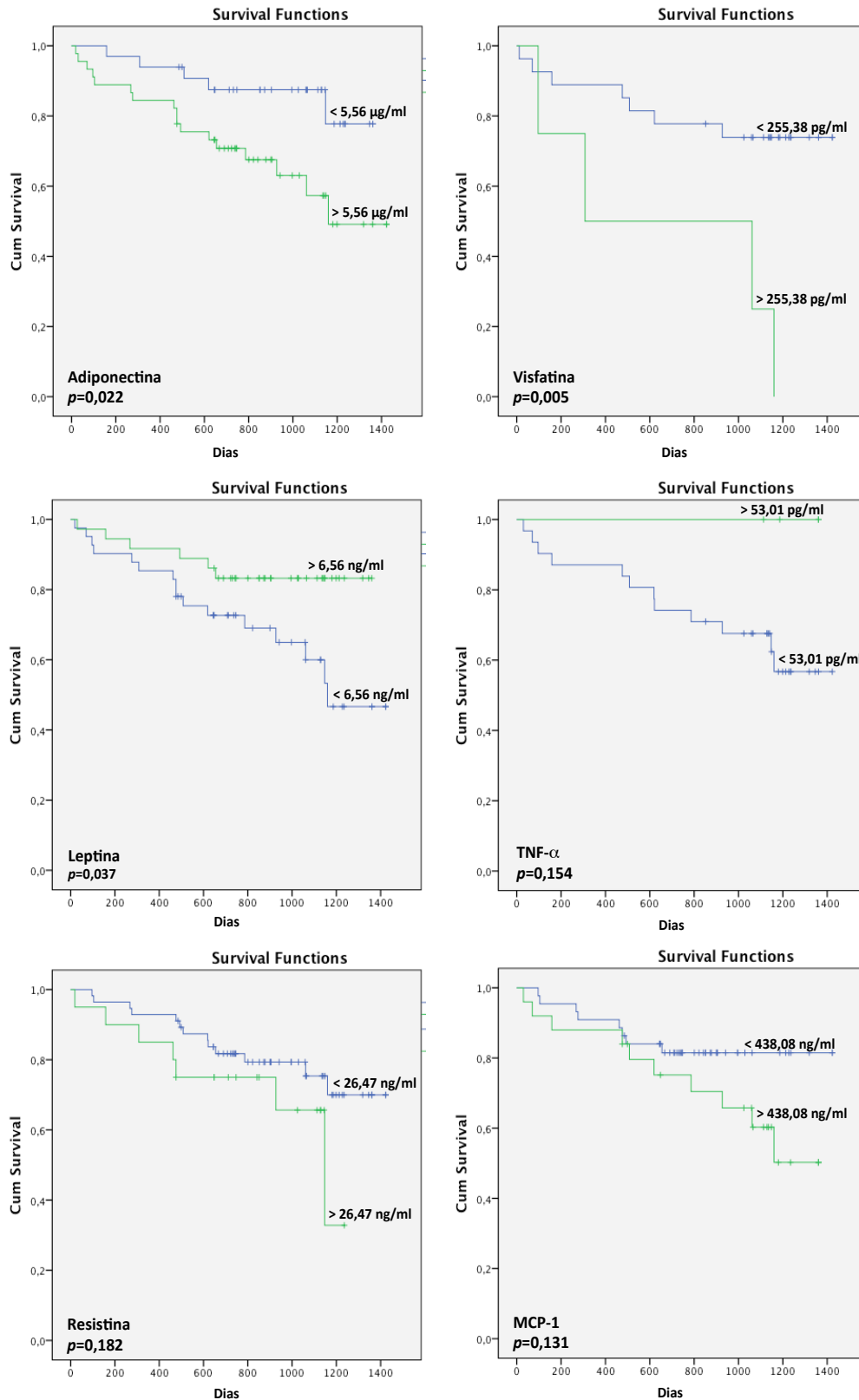
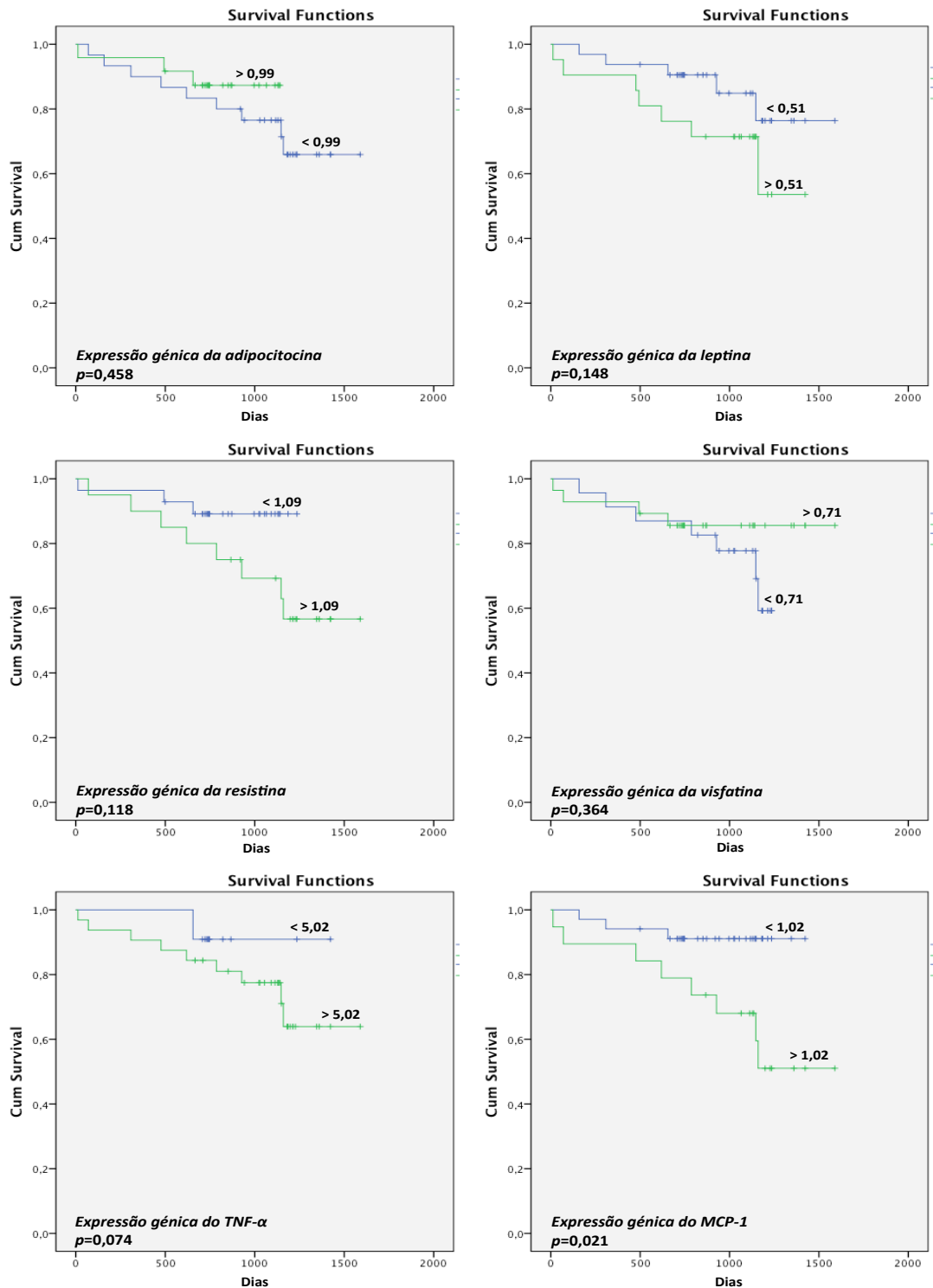


Figura 36: Análise da sobrevivência global de doentes com cancro colorretal em função dos níveis séricos da adiponectina, da leptina, da resistina, da visfatina, do TNF- $\alpha$  e do MCP-1.

TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocyte colony-stimulating factor 1*

de expressão dos genes da leptina, da resistina e do TNF- $\alpha$ , mostram uma tendência para maior sobrevivência global.



**Figura 37: Análise da sobrevivência global de doentes com cancro colorretal em função dos níveis de expressão genica no tecido tumoral da adiponectina, da leptina, da resistina, da visfatina, do TNF- $\alpha$  e do MCP-1.**

TNF, Factor de necrose tumoral; MCP-1, *Monocyte colony-stimulating factor 1*

## 5. DISCUSSÃO

1



## 5. DISCUSSÃO

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na carcinogênese, no desenvolvimento e na progressão do CCR são múltiplos, ocorrendo em várias etapas, desde a lesão inicial nas criptas (pólipos adenomatosos), ao carcinoma *in situ*, até à sua progressão e metastização. Para além das múltiplas alterações genéticas e epigenéticas conhecidas, vários estudos têm demonstrado a associação entre obesidade, o aumento da incidência e da mortalidade por cancro. Durante a última década, o tecido adiposo tem ganho importância, pois para além do seu papel no armazenamento de energia, tem-se mostrado um órgão endócrino onde são produzidas várias hormonas e, ou citocinas, denominadas adipocitocinas, com um papel importante na homeostase energética, no metabolismo glucídico e lipídico e na regulação do peso corporal. O aumento da gordura abdominal (visceral) e as alterações metabólicas com ela relacionadas, nomeadamente a insulinoresistência, o hipersinsulinismo, a hiperglicémia, a dislipidémia, a inflamação crónica e o aumento dos radicais livres de oxigénio, levam à maior produção das citocinas produzindo um estado inflamatório crónico, o que relaciona a obesidade com o risco de cancro. As adipocitocinas têm sido relacionadas com vários tipos de cancro, pela sua capacidade de promover a proliferação, a diferenciação e a morte celular. Todavia, o seu papel no desenvolvimento e progressão do CCR, bem como a sua potencial utilização como marcadores tumorais, não estão totalmente clarificados.

## 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

### 5.1.1. Caracterização epidemiológica e clínica dos doentes com CCR

O estudo envolveu 89 doentes com o diagnóstico histológico de adenocarcinoma do cólon ou reto, seguidos no HDFS, EPE, e 73 controlos sem doença neoplásica conhecida. Foi efetuada uma entrevista para recolha de dados demográficos, hábitos alimentares, medidas antropométricas, e dados relacionados com a história da doença, diagnóstico e evolução. Todos os participantes foram classificados segundo o Índice de Massa Corporal (IMC) e o perímetro da cintura (PC), tendo ainda em atenção a localização topográfica do tumor e o seu estadiamento clínico ou patológico.

Os resultados observados, relativamente às características epidemiológicas e distribuição das variáveis clínicas e patológicas, são apresentados em confronto com os dados gerais da literatura internacional, do FOCCO (Bretes L., 2010), do ROR centro 2010 (Instituto Português de Oncologia, 2010) e da Direção Geral de Saúde (Direção Geral de Saúde, 2013).

Embora os dados apresentados pela Direção Geral de Saúde no seu registo “Portugal doenças oncológicas em números – 2013” refiram uma taxa de incidência bruta para o CCR de 66,8 novos casos por 100.000 habitantes no ano de 2007 e a da publicação ROR centro 2010 para o distrito de Coimbra refira 76,78 novos casos por 100.000 habitantes no ano de 2010, o presente trabalho revela que o cálculo da taxa de incidência bruta efetuado com base no ROR de 2010 e no Censos de 2011 para o concelho da Figueira da Foz, daria entre 44,17 e 51,43 novos casos de CCR por ano. Estes achados estão de acordo com o facto de, segundo os mesmos

Censos, a população residente no concelho da Figueira da Foz ser uma população mais envelhecida e a idade constituir um fator de risco para esta doença.

Segundo o FOCCO a distribuição nacional dos doentes por género é maior para o género masculino do que para o feminino, 61% e 39% respetivamente. O ROR centro apresenta também um predomínio de doentes do género masculino, com um rácio masculino/feminino de 1,84. O presente trabalho apresenta o mesmo tipo de distribuição por género.

A idade média ao diagnóstico da população do nosso trabalho foi de 70,6 anos (mediana 72,09) ou seja ligeiramente superior à do estudo FOCCO, mostrando uma população em estudo ligeiramente mais envelhecida. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na mediana de idades entre os dois géneros. No FOCCO a idade média no momento do diagnóstico foi de 66,5 anos, com 50% das neoplasias a ocorrerem entre os 58 e os 75 anos. No ROR centro não há registo da idade média ao diagnóstico, mas em relação às faixas etárias verifica-se que 59,52% são diagnosticados antes dos 75 anos, com maior incidência nos escalões etários dos 70 aos 79, seguido dos 60 aos 69 anos.

No que diz respeito aos hábitos alimentares verificou-se que o perfil de ingestão de carne vermelha é semelhante nos doentes do estudo e nos doentes analisados no FOCCO, com 51,8% dos doentes do estudo e 51% da população do FOCCO a consumir carne vermelha mais de 3 vezes por semana.

Em conclusão, os doentes avaliados no presente trabalho têm as mesmas características epidemiológicas que os doentes registados nas bases nacionais de dados do cancro, no que diz respeito à sua distribuição por género e por escalão etário. Contudo, em relação à média de idades dos doentes com CCR seguidos no

HDFE, EPE no período em que decorreu o estudo, verifica-se um ligeiro aumento (cerca de 4 anos) em relação aos outros dados registados.

Em relação ao número de novos casos de CCR para o concelho da Figueira da Foz, o que seria espectável era que fossem diagnosticados cerca de 41,31 novos casos de CCR por 100.000 habitantes e por ano, mas constatou-se que o número foi ligeiramente superior em todos os anos em que decorreu o recrutamento, com exceção do último ano em que o número de casos de CCR se aproximou da estimativa de incidência para este tipo de cancro.

Em relação à naturalidade e residência verificou-se que a maioria dos doentes era natural do concelho da Figueira da Foz e que cerca de 95% residia na Figueira da Foz ou nos concelhos limítrofes, pelo que a variável geográfica não terá influenciado os resultados encontrados.

Em relação à profissão e atividade laboral, não foram encontrados registos destes dados nas séries consultadas. No que diz respeito ao horário de trabalho verificou-se no presente estudo que os doentes do género masculino trabalhavam menos por turnos do que no estudo FOCCO (22% vs 38%, respetivamente), enquanto 3% das mulheres incluídas neste trabalho trabalhavam por turnos e no FOCCO estas representavam 16% dos casos. A duração em anos do trabalho por turnos foi de 15,5 no presente trabalho e no FOCCO de 15,9 e 16,4 para homens e mulheres, respetivamente.

### **5.1.2. Variáveis patológicas**

A localização do CCR nos doentes incluídos neste estudo foi predominantemente no cólon (58,4%). Estes resultados são idênticos aos do ROR centro de 2010.

No FOCCO o CCR distribuiu-se predominantemente pelo cólon com 71% dos casos, enquanto 16% estavam localizados ao reto e 2% à região retossigmoideia. Nos registos do ROR centro em 2010, a localização, embora idêntica na sua distribuição topográfica (cólon 63,38%, reto 31,15% e região retossigmoideia 5,47%), mostrou uma tendência para um aumento do número de casos da região terminal do intestino. No FOCCO, o rácio da localização cólon/reto era de 3,87, no ROR era de 1,73 e neste trabalho foi de 1,17.

Relativamente ao estadiamento clínico, no presente trabalho verificou-se que na altura do diagnóstico a maior parte dos doentes estava no estágio III, seguido do II, mas quando se efetuou o estadiamento patológico a percentagem de doentes em estágio II passou a ser dominante. No FOCCO, a maior percentagem dos doentes também de encontrava no estágio III, seguida do II (38% e 34%, respetivamente), enquanto 21% estão no IV e apenas 7% estão no I.

Neste estudo, a sobrevivência global dos doentes foi de 87,6% aos 12 meses e de 63,8% aos 48 meses, no entanto, não encontramos referências bibliográficas de comparação para uma população com estas mesmas características.

## 5.2. CITOCINAS E FATORES INFLAMATÓRIOS

A exposição a carcinogénicos ambientais em consequência do estilo de vida, dos hábitos alimentares, assim como o envelhecimento, têm sido associados à lesão da mucosa do cólon e sua evolução para CCR. Do mesmo modo, tem sido relacionado o desenvolvimento e progressão do CCR com a disfunção do tecido adiposo possivelmente acompanhado por alterações na produção de adipocitocinas e

citocinas inflamatórias (Hillenbrand et al., 2012). Por um lado, a participação das citocinas poderá refletir um estado inflamatório crônico de baixo grau associado à obesidade. Além disso, poderá estar relacionado com um estado de insulinoresistência. A relação da obesidade com a gordura visceral ou subcutânea parece ser a primeira e a mais relacionada com estas alterações. Assim, o IMC não deve ser considerado para avaliar a distribuição visceral da gordura (Tsukada et al., 2011).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o papel das citocinas, adiponectina, visfatina, leptina, resistina, TNF- $\alpha$  e MCP-1, na etiopatogenia do CCR, bem como a sua eventual utilização como biomarcadores de diagnóstico e, ou prognóstico. Para isso, foram avaliados os níveis séricos e a expressão génica tumoral das adipocitocinas e das citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e MCP-1) em doentes com diagnóstico de novo de CCR e em controlos, correlacionando-se os dados com as características epidemiológicas, clínicas e patológicas dos tumores, bem como a sua influência na sobrevivência global dos doentes.

Vários investigadores têm tentado estabelecer a correlação entre a adiponectina e o CCR, tendo verificado que a diminuição de adiponectina promoveria a proliferação das células epiteliais do cólon, ativando a carcinogénese. (Tulubas, Mete, Oznur, & Topcu, 2013). No entanto, Lukanova e colaboradores (2006) não encontraram associação entre os níveis séricos de adiponectina e o risco elevado de CCR (Lukanova, Söderberg, Kaaks, Jellum, & Stattin, 2006). A associação entre as concentrações de adiponectina e o risco de CCR, mantém-se ainda controversa, nomeadamente devido à existência de diferentes frações da adiponectina (total, alto peso molecular e peso molecular mais baixo), com diferentes atividades

biológicas. A fração de alto peso molecular estará mais relacionada com a insulino-sensibilidade, e a fração de baixo peso molecular terá um maior potencial anti-inflamatório, com a diminuição de risco de CCR (Aleksandrova et al., 2013). Também se tem verificado que o nível de adiponectina é variável com o tipo de tumor, referenciando-se níveis mais elevados no cancro do pâncreas do que no CCR (Jean Marc Phelip et al., 2011).

Muitos investigadores têm encontrado valores baixos de adiponectina em grupos de doentes com cancro, considerando este facto como um fator de risco independente para o desenvolvimento do adenoma do cólon e do CCR (Otake et al., 2010)(Gulcelik et al., 2012)(Erarslan et al., 2009). No entanto, no presente trabalho verificou-se que os níveis de adiponectina eram ligeiramente mais elevados na população doente do que no grupo controlo. No entanto, quando a população foi estratificada por grupos de IMC verificou-se que no grupo dos obesos (IMC >30) os valores da adiponectina eram ligeiramente mais baixos nos doentes que no grupo controlo. De igual modo, Hillenbrand e colaboradores (2012) encontrou níveis mais elevados no grupo de doentes com CCR (14,2 µg/mL) do que num grupo de doentes benévolos de sangue (11,8 µg/mL), não encontrando correlação entre a concentração plasmática de adiponectina e o CCR (Hillenbrand et al., 2012).

Foi demonstrado que baixos níveis de adiponectina estão associados a um risco aumentado para desenvolver cancro gástrico (Tsukada et al., 2011).

Segundo alguns autores o CCR em idades mais jovens está associado a doença mais avançada, com características histológicas mais agressivas, pior sobrevivência livre de doença e maior mortalidade relacionada com a doença, do que os doentes mais velhos (Chou et al., 2011). Este será também um aspeto a ter em conta no presente

trabalho, uma vez que a mediana de idades é cerca de 4 anos maior que noutras séries.

Outra adipocitocina avaliada foi a leptina uma proteína com múltiplas funções, principalmente a nível do sistema nervoso central, onde participa na regulação do apetite (anorexígena) e na reprodução, além de ser pró-angiogénica, participa também na formação do osso. É inibidora do apetite e promotora da oxidação lipídica.

No presente trabalho, verificou-se que a mediana de valores da leptina sérica era significativamente mais baixa no grupo de doentes que no grupo de controlos ( $p=0,029$ ), sendo superior no género feminino tanto no grupo de doentes como no grupo de controlos, o que é consistente com os resultados de outros autores (Hillenbrand et al., 2012).

No nosso estudo observamos que os níveis séricos de resistina estavam significativamente aumentados nos doentes com CCR quando comparados com o grupo de controlo ( $p<0,001$ ). Estes resultados estão de acordo com grande parte dos estudos publicados, nos quais se verificou igualmente níveis mais elevados de resistina nestes doentes (Gonullu et al., 2010; Sălăgeanu et al., 2010; Tulubas et al., 2013). Além disso, os níveis séricos de visfatina eram mais elevados no grupo de doentes com CCR quando comparados com o grupo de controlo, resultados estes igualmente com significado estatístico ( $p=0,042$ ).

O tecido adiposo tem na sua composição macrófagos. O MCP-1 é uma proteína com intervenção nos tumores associados aos macrófagos, quer por recrutamento de monócitos para os tecidos afetados (Honda et al., 2011) quer por estímulo ou inibição de fatores de crescimento celular. O aumento de infiltrado de macrófagos



nos tecidos afetados, tem sido relacionada com a presença de metástases e de mau prognóstico em vários tipos de cancro. O MCP-1 está também associado à angiogénese por indução direta da VEGF e HIF-1 ou por ação da angiopoetina-2, fator importante na promoção da angiogénese. No presente trabalho encontraram-se valores mais baixos de MCP-1 nos doentes que nos controlos, embora essas diferenças não sejam consideradas significativas.

Em conclusão, existem diferenças significativas nos valores séricos de algumas adipocitocinas avaliadas em doentes com CCR em relação aos controlos particularmente evidentes para a resistina, visfatina, TNF- $\alpha$  e leptina. Estas alterações são sugestivas do papel destas adipocitocinas e do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento do CCR.

Uma vez que as variações observadas nos níveis de adipocitocinas poderiam ser influenciadas pelo género, hábitos alimentares e perfil metabólico dos doentes, avaliaram-se posteriormente estes parâmetros em controlos e doentes com CCR.

### **5.2.1. INFLUÊNCIA DO GÉNERO NOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS E FATORES INFLAMATÓRIOS EM DOENTES COM CANCRO E CONTROLOS**

Para avaliar se os níveis de adipocitocinas e das citocinas inflamatórias, MCP-1 e TNF- $\alpha$  eram dependentes do género, determinaram-se os níveis destas citocinas em função desta variável.

Assim, no presente trabalho verificou-se que a mediana de valores da adiponectina era superior no género feminino tanto no grupo de doentes como no grupo de controlos, sendo no género feminino mais baixa nos doentes, o que é consistente com os resultados de outros autores. Contudo, as diferenças não foram

significativas, o que sugere que estas alterações não parecem influenciar o risco de desenvolvimento de CCR. Apesar de existir variabilidade dos valores séricos de adiponectina em relação ao género, sendo mais elevados no género feminino em relação ao masculino (Hillenbrand et al., 2012; Song et al., 2013; Wolf et al., 2006), Mingyang Song (2013) não sendo encontrada qualquer associação entre os níveis de adiponectina, o género feminino e risco de CCR (Song et al., 2013). Pelo contrário, os estudos de Mingyang Song (2013) mostraram que a relação entre os níveis séricos de adiponectina e o risco de cancro pode ser influenciado pelas hormonas sexuais endógenas, como os estrogéneos e a testosterona. Estes resultados foram demonstrados pela administração de testosterona tanto no homem como em modelos animais (Song et al., 2013).

A concentração sérica de leptina está igualmente relacionada com o género feminino sendo significativamente mais baixa no grupo de mulheres doentes em relação ao grupo de mulheres controlos, o que está de acordo com os resultados de *Hillenbrand* e colaboradores (2012). Estes autores, encontraram diferenças significativas nos valores da leptinémia nos doentes do género masculino com carcinoma do cólon em relação ao carcinoma do reto (Hillenbrand et al., 2012).

Igualmente se constatou que as concentrações séricas da leptina se associam a aumento de risco de adenoma do cólon no homem e não na mulher, o que pode ser explicado pelas hormonas endógenas, estilo de vida e fatores exógenos, como o uso de terapêutica hormonal de substituição (Chia et al., 2007). No entanto, no presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas nos valores da leptinémia quando se efetuou a comparação entre as neoplasias do cólon e do reto quer globalmente, quer estratificadas por género.

Relativamente à visfatina, verificou-se que os doentes com CCR apresentaram valores significativamente mais elevados do que nos controlos, sendo esta diferença mais evidente no género masculino. De facto, os homens com CCR apresentam valores mais elevados relativamente aos controlos, o que não se verificou no grupo das mulheres com cancro em relação aos respectivos controlos. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que mostram que os doentes com CCR têm aumento significativo dos valores da visfatina, quando comparados com a população controlo e esses valores têm sido relatados como fator independente da adiposidade (Fazeli et al., 2013; Nakajima et al., 2010).

A associação entre obesidade e CCR tem sido descrita como sendo influenciada pelo género e eventualmente pela localização do tumor. Xu P e colaboradores (2011) demonstraram que os níveis de mRNA da IL-8 no tecido adiposo visceral dos doentes com obesidade mórbida estão relacionados com o IMC, facto este que também se verifica no género feminino, enquanto no masculino existe uma correlação inversa (Xu P., Hillenbrand A., Knippschild U., 2012).

Os níveis séricos de adipocitocinas, adiponectina, leptina e visfatina são influenciados pelo género, pelo que quando avaliados no contexto de doentes com CCR este parâmetro deve ser tido em conta.

Em conclusão, encontraram-se diferenças estatisticamente significativas em relação à adiponectina e género masculino, à leptina e género feminino, para a visfatina entre o género feminino e masculino, sugerindo que estas citocinas também dependem do género. Pelo contrário, a resistina, o TNF- $\alpha$  e o MCP-1 não mostraram diferenças significativas entre os géneros, pelo que as alterações observadas são apenas dependentes do processo tumoral.

### **5.2.2. ANÁLISE DOS VALORES SÉRICOS DE CITOCINAS E FATORES INFLAMATÓRIOS EM DOENTES COM CANCRO E CONTROLOS DE ACORDO COM OS HÁBITOS ALIMENTARES E PERFIL METABÓLICO.**

O *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC) é um estudo projetado para investigar as relações entre dieta, estado nutricional, estilo de vida, fatores ambientais e a incidência de cancro e outras doenças crónicas (Aleksandrova et al., 2012).

O estudo EPIC foi efetuado ao longo de onze anos tendo em conta a ingestão total de cereais, frutas e fibra vegetal, após ajustes variados, tendo-se verificado que a ingestão total de fibra alimentar se correlacionou inversamente com o CCR e que esta correlação era semelhante para o cólon e reto, não tendo relação com a idade, género e estilo de vida. De igual modo, a ingestão de fruta e legumes foi também inversamente associado ao risco de cancro de cólon, mas não do reto. Estes resultados reforçam a evidência do papel da ingestão de fibra alimentar na prevenção do CCR.

Apesar do estudo EPIC ter mostrado que a ingestão de fibra alimentar está inversamente associada ao risco de CCR, os resultados de outros grandes estudos não suportaram esta conclusão.

No presente estudo, os resultados sugerem que os hábitos alimentares não parecem constituir um fator determinante para o risco de desenvolver CCR. Apenas se observou uma correlação inversa, com diferenças estatisticamente significativas, entre os níveis de MCP-1 nos doentes que ingerem vegetais relativamente aos que não ingerem, assim como nos doentes com hábitos alcoólicos em relação com os abstémios.

Segundo um estudo europeu EPIC, o IMC e o aumento de peso, estão relacionados com o cancro do cólon, não existindo nenhuma relação entre o cancro do reto, o IMC e o ganho ou a perda de peso (Steins Bisschop et al., 2014).

A adiponectina é uma proteína principalmente sintetizada a nível do tecido adiposo e daí a sua relação com a obesidade. No presente trabalho, embora não se observem diferenças significativas no valor sérico no global da amostra, quando se estratificou a população em função do IMC, a adiponectina correlacionou-se inversamente com o IMC ( $R=-0,181$ ;  $p<0,05$ ), o que igualmente tem sido referido por outros autores (Aleksandrova et al., 2013). Doentes com anorexia nervosa, tal como indivíduos que voluntariamente perderam peso, apresentaram níveis séricos mais elevados de adiponectina (Wolf et al., 2006). Num estudo efetuado por Ido Wolf (2006) em doentes com caquexia neoplásica por cancro da mama e do cólon, os níveis de adiponectina estavam inversamente correlacionados com a perda de peso. Também Mustafa Kerem e colaboradores (2008) concluíram que os doentes com cancro gástrico, com a progressão da doença tendem a entrar em caquexia com consequente aumento dos níveis de adiponectina (Kerem et al., 2008). Isto poderia explicar em parte o aumento dos níveis de adiponectina observados no presente trabalho, uma vez que existe uma perda progressiva de peso em cerca de 10% dos doentes com CCR avançado, com emagrecimento e astenia como queixas principais ao diagnóstico, e 21% dos doentes está em estágio IV.

Tal como se pôde observar no EPIC vários biomarcadores do processo metabólico têm estado associados com o aumento do risco de cancro, entre estes é de salientar peptídeo C, como marcador de hiperinsulinémia, a HbA1c, como marcador de

hiperglicémia, os níveis de colesterol HDL, como marcador de dislipidémia e a PCR, como marcador de inflamação crónica de baixo grau (Aleksandrova *et al.*, 2013).

No presente estudo foram analisados os resultados de alguns destes biomarcadores em doentes e controlos, tendo-se verificado não existirem diferenças significativas nestes parâmetros entre os dois grupos, com exceção para os valores de glicemia em jejum e de PCR, que apresentaram valores significativamente mais elevados nos doentes em relação aos controlos. Verifica-se que existe uma tendência para valores mais baixos de colesterol HDL no grupo de doentes, que se mantém quando estratificados por género, o que está de acordo com o estudo EPIC que mostrou achados semelhantes (Aleksandrova *et al.*, 2013).

A adiponectina tem efeitos insulinosensibilizantes e anti-inflamatórios, pelo que os seus níveis elevados deverão ser “protetores”. Os níveis sistémicos de adiponectina estão diminuídos em doentes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 e em indivíduos obesos, devido à inibição da sua produção em consequência da ativação de vias inflamatórias e fatores pró-inflamatórios, como é o caso do TNF- $\alpha$ . No presente trabalho confirmou-se um aumento significativo do TNF- $\alpha$  no grupo de doentes com CCR em relação aos controlos ( $p=0,002$ ).

Outra adipocitocina que está aumentada na obesidade é a leptina à qual têm sido atribuído um papel importante na patofisiologia do cancro relacionado com a obesidade, ao promover o crescimento celular, a apoptose e a angiogénese (Alexander J. Rodríguez, Claudio Mastronardi, 2013). Os resultados do presente trabalho mostram que a leptina apresenta diferenças significativas entre doentes com CCR e indivíduos controlos, sendo os seus níveis séricos mais baixos nos doentes. Estas diferenças acentuam-se de forma significativa quando se estratificou

a população em estudo por grupos IMC, estando significativamente aumentada no grupo de controlos obesos em relação aos de peso normal e com excesso de peso e nos doentes com peso normal quando comparados com os obesos. Andreas Hillenbrand e colaboradores (2012) também encontraram níveis mais baixos de leptina nos doentes com CCR (2,6 ng/mL) do que na população de dadores benévolos de sangue (10,9 ng/mL), o que se acentua ainda mais nos controlos com obesidade mórbida (45 ng/mL)(Hillenbrand et al., 2012).

A resistina é uma hormona produzida não só pelo tecido adiposo mas também pelos macrófagos que aí se encontram, que aliás constituem a sua maior fonte de produção. Correlaciona-se com os parâmetros inflamatórios, como a PCR, e com os níveis de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e a IL-6, constituindo assim um marcador de atividade inflamatória dessas células (Gonullu et al., 2010). A resistina tem sido associada a várias doenças metabólicas e inflamatórias, provavelmente por aumento da insulinoresistência, atuando como um mediador inflamatório e estimulando a produção de citocinas inflamatórias. Segundo Daniel Schwartz e colaboradores (2011) alguns estudos em ratos obesos mostram que as concentrações nestes animais são mais elevadas, no entanto, não se pode extrapolar os resultados encontrados em ratos, para o homem, uma vez que a produção da resistina no homem é principalmente a nível dos macrófagos e não nos adipócitos, como acontece naqueles animais (Daniel R. Schwartz, 2011). Outros autores verificaram que a resistina se correlaciona com alguns tipos de cancro, nomeadamente com o cancro da mama e do endométrio, independentemente da idade, do IMC e da glicemia (Gonullu et al., 2010; Hlavna et al., 2011; Lee et al., 2012). Como referido, no presente trabalho os níveis de resistina sérica são

significativamente mais elevados nos doentes, quando comparados com os controlos, não se encontrando qualquer correlação com a idade ou o IMC. Os dados mostram que os doentes com CCR e IMC normal ou excesso de peso apresentam níveis significativamente mais elevados que os grupos controlo, sugerindo a participação da resistina neste tipo de cancro, de forma independente do tecido adiposo. Estes factos corroboram a opinião de alguns autores que afirmam que a resistina é um preditor independente de prognóstico, nomeadamente para o cancro da mama, podendo constituir um eventual alvo terapêutico (Lee *et al.*, 2012). Aliás neste trabalho a análise das curvas ROC mostrou que a resistina é a citocina com maior poder discriminatório (AUC=0,850) podendo constituir um marcador de diagnóstico em doentes de CCR.

Para confirmar se as alterações na resistina estavam relacionadas com o CCR, não sendo influenciadas por outros parâmetros como o estado de insulinoresistência, foi avaliada a correlação desta citocina com o HOMA e a PCR, não se tendo observado nenhuma correlação. Gonullu e colaboradores (2010) também não encontraram nenhuma associação com o estado de insulinoresistência.

De uma forma global, a visfatina apresentou valores mais elevados nos doentes que nos controlos, diferenças estas que se mantinham mesmo quando a amostra foi estratificada pelo IMC. Os valores eram mais elevados para os grupos com peso normal e excesso de peso, no entanto para os obesos os valores eram semelhantes.

Em conclusão no presente trabalho observaram-se diferenças entre os níveis séricos de leptina nos diferentes grupos de estratificação de IMC, e que esta relação se verifica igualmente no grupo dos doentes e no grupo dos controlos, embora essas diferenças só tenham significado estatístico no grupo dos obesos. Em relação às



restantes citocinas e fatores inflamatórios estudados não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de IMC. Verificou-se também uma correlação positiva entre a leptina e o IMC e correlação inversa entre a adiponectina, o MCP-1 e o IMC.

### **5.2.3. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS E FATORES INFLAMATÓRIOS EM DOENTES COM CANCRO E CONTROLOS DE ACORDO COM OS POTENCIAIS BIOMARCADORES TUMORAIS.**

As adipocitocinas têm sido relacionadas com vários tipos de cancro, pela sua capacidade de promover a proliferação, a diferenciação e a morte celular. No entanto, o seu papel no desenvolvimento e progressão do CCR, bem como a sua potencial utilização como marcadores tumorais não está estabelecida neste tipo de cancro.

A adiponectina poderia ser um bom marcador de risco de CCR associado à obesidade, uma vez que ela própria está associada à obesidade. No entanto, é ainda controverso o aumento do risco de cancro nos indivíduos obesos (Carvajal-Carmona et al., 2009).

Alguns estudos têm demonstrado que a adiponectina poderá inibir diretamente o crescimento e proliferação celular e induzir a apoptose das células endoteliais no CCR (Song *et al.*, 2013).

Um dos mecanismos que tem sido sugerido para justificar este efeito está relacionado com o facto da adiponectina inibir a via mTOR, por fosforilação da AMP- proteína cinase ativada pelo AMP (AMPK), resultando, assim, na supressão da atividade proliferativa celular (Tulubas, Mete, Oznur, & Topcu, 2013). Tsukada e

colaboradores (2011) concluíram que a adiponectina possa ter um efeito antiproliferativo, no entanto o seu recetor, AdipoR1, terá um papel ainda mais importante pelo menos na evolução do cancro gástrico.

Os resultados deste trabalho indicam uma tendência para aumento da adiponectina nos doentes com CCR em relação aos controlos. De igual modo, Carvajal-Carmona e colaboradores (2009), não encontraram relação entre a adiponectina e o risco de CCR, justificando o facto pelas diferenças étnicas e ambientais entre a sua população e a investigada nos EUA por Kaklamani e colaboradores (Carvajal-Carmona *et al.*, 2009).

Além disso, alguns estudos têm demonstrado o aumento dos valores da adiponectina em doentes com doença inflamatória intestinal. Também Otake (2010) observou aumento do nível sérico de adiponectina no adenoma e no CCR precoce, não encontrando a mesma relação no CCR avançado e metastizado (Otake *et al.*, 2010).

Alguns autores referem também que os valores de adiponectina dependem da localização tumoral, sendo mais elevados no cólon do que no reto.

A relação entre os níveis de leptina séricos e o CCR também tem sido controversa, pois enquanto alguns estudos têm referido aumento dos níveis de leptina relacionados com estádios mais avançados da doença, outros estudos ou mostraram diminuição destes níveis ou não encontram nenhuma diferença significativa. A expressão da leptina e do seu recetor solúvel têm sido correlacionadas com o grau de invasão do tumor na parede do intestino (T) da classificação TNM, com o estágio e com o aparecimento de metástases à distância, sugerindo que a ligação da leptina ao seu recetor promove a proliferação celular e

progressão da doença (Tutino, Notarnicola, Guerra, Lorusso, & Caruso, 2011). No presente trabalho, além da diminuição significativa dos níveis séricos de leptina nos doentes com CCR em relação aos controlos, encontrou-se uma correlação inversa entre os níveis de leptina e vários parâmetros convencionais de prognóstico como o estadiamento e a profundidade do tumor, apresentando os tumores T<sub>3-4</sub> valores mais elevados do que os T<sub>1-2</sub>, embora em nenhum dos casos houvesse diferenças significativas.

Alguns autores demonstraram que a leptina pode regular a proliferação e a apoptose das células do CCR, ativando a via PI3K/Akt/mTOR (Guadagni *et al.*, 2009) ou as vias JAK/STAT e MAPK (Wang *et al.*, 2012).

Fiorella Guadagni (2009) encontrou valores de leptina significativamente mais elevados nos doentes que nos controlos, os quais se relacionam de forma inversa com a adiponectina. De acordo com este estudo, a relação leptina/adiponectina poderá constituir um preditor independente de mau prognóstico da doença (Guadagni *et al.*, 2009).

Vários estudos têm sido efetuados tanto em modelos animais como em linhas celulares de cancro do cólon que demonstram que a leptina é um mitógeno, um fator de sobrevivência celular, promotor do crescimento, migração e invasão. Também a análise dos tecidos tumorais confirmam que a leptina e o seu recetor estão presentes nos tecidos (E. S. and M. Koda, 2009). No homem o seu papel é mais complexo, nomeadamente pela ativação de uma resposta inflamatória local, por estímulo direto das células da mucosa cólica, tendo como alvo nos tecidos o recetor da leptina (Ob-R). A ativação deste recetor pode induzir a expressão do NF- $\kappa$ B, o que leva à proliferação celular, à produção de citocinas e quimiocinas pró-

inflamatórias, ao estímulo de linfócitos e consequente ativação do desenvolvimento, diferenciação, proliferação e, ou citotoxicidade celular (Uddin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). A investigação tem mostrado que a leptina e o seu recetor estão expressos nos tecidos do cancro do cólon e também da mama e que esta expressão poderá ser induzida pela obesidade e pela hipoxia. No cólon a leptina está expressa em níveis mais elevados nas células tumorais do que nas não tumorais (E. S. and M. Koda, 2009).

O aumento dos valores da resistina relacionou-se, nalguns estudos, com o nível de desenvolvimento do tumor, um maior grau histológico e pior prognóstico (Gonullu *et al.*, 2010). Neste estudo não parece haver relação entre os níveis séricos de resistina e o estágio do cancro, a não ser entre o estágio I e II em que se encontrou uma diferença significativa ( $p=0,049$ ). Já no que diz respeito às dimensões do tumor encontrou-se uma correlação positiva entre os níveis de resistina e as dimensões macroscópicas do tumor. Em relação à relevância do grau histológico, verificou-se que os valores medianos desta citocina são tendencialmente mais elevados de acordo com o grau. No entanto, o facto de a quase totalidade dos doentes estar classificada nos graus 1 ou 2, existindo apenas 3 doentes no grau 3 e nenhum no grau 4, não permitiu tirar conclusões em relação a este dado (Hillenbrand *et al.*, 2012).

A visfatina não parece ser segregada pela gordura visceral e que atua por mecanismos ainda pouco conhecidos, mas provavelmente mediados pelo dinucleótido de nicotinamida e adenina, NAD, estando envolvida na inflamação, na diferenciação celular e na progressão tumoral (Fazeli *et al.*, 2013).

Alguns autores relataram um aumento dos níveis de visfatina com a progressão tumoral, nomeadamente no cancro do endométrio (Tian et al., 2013), mas Fazeli e colaboradores (2013), não encontraram correlação entre os níveis de visfatina e o estadiamento TNM da AJCC.

Os resultados de um estudo em CCR em mulheres sauditas mostraram também valores mais elevados da visfatina sérica no grupo de doentes em relação aos controlos, mas não encontraram relação com o estágio de progressão da doença (Al-Harithy, 2013).

Neste trabalho, embora se tenham constatado valores aumentados de visfatina no estágio III, não se verificaram diferenças dos seus níveis quando comparados os vários estádios entre si.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida pelos monócitos e pelos macrófagos, envolvida no processo inflamatório e autoimune. É também produzida no tecido adiposo pelos adipócitos, mas sobretudo pelos macrófagos associados ao tumor (TAM). Frequentemente esta citocina está elevada nos doentes obesos, diminuindo com a perda de peso. Em níveis fisiológicos, esta promove a proliferação celular e inibe a apoptose. Os níveis séricos de TNF- $\alpha$  foram positivamente relacionados com a existência de adenomas colorretais e carcinomas (Kim et al., 2008).

Em conclusão, não se encontraram diferenças significativas no que diz respeito à comparação entre os níveis séricos de citocinas e fatores inflamatórios nas diferentes localizações do CCR no intestino ou da sua evolução na mucosa. Verificou-se apenas que os valores da resistina eram significativamente mais elevados nos tumores mais superficiais (T<sub>1-2</sub>) do que nos mais profundos (T<sub>3-4</sub>).

### **5.3. EXPRESSÃO GÉNICA DAS CITOCINAS E FATORES INFLAMATÓRIOS EM DOENTES COM CANCRO COLORRETAL E EM CONTROLOS**

Para avaliar se os níveis séricos das citocinas em estudo se correlacionavam com a respetiva expressão génica avaliou-se a expressão destes genes nos tecidos do cólon normal e tumoral de doentes e de controlos.

Mariusz Koda e colaboradores (2007) constataram que em estudos por imunohistoquímica, a expressão da leptina era menor na mucosa normal e nos adenomas do cólon do que no tecido tumoral e que os valores se correlacionavam com o tipo e o grau histológicos do CCR (M. Koda, Sulkowska, Kanczuga-Koda, Surmacz, & Sulkowski, 2007). Alguns estudos têm mostrado que a alta expressão da relação leptina/Ob-R correspondem a estádios mais avançados do tumor, com metastização e pouca diferenciação, o que indica uma significativa relação desta com a progressão do CCR (Wang et al., 2012). No presente trabalho, a expressão genica da leptina na mucosa do tecido tumoral, na mucosa normal do cólon de doentes e na mucosa de cólon de controlos mostrou o mesmo perfil que as suas concentrações séricas com valores de expressão mais baixos para os doentes e mais elevados para os controlos, sugerindo que a expressão sérica de leptina reflete a expressão desta citocina no tumor. Não se encontraram correlações com significado estatístico entre a leptinémia e a sua expressão génica nos tecidos.

Yi-Chen Lee (2012) verificou que a expressão génica da resistina era elevada nos tecidos tumorais do cancro da mama e que estes se correlacionam com os seus níveis séricos muito elevados (Lee et al., 2012). Demonstrou ainda que a alta expressão de resistina era um fator associado a mau prognóstico, com menor intervalo livre de doença e pior sobrevivência global (Lee et al., 2012). No presente

trabalho encontrou-se menor expressão da resistina no tecido tumoral e na mucosa normal do cólon dos doentes e uma maior expressão nos controlos.

#### **5.4. ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS E TECIDULARES DAS CITOCINAS COMO MARCADORES TUMORAIS DE DOENÇA E DE PROGNÓSTICO**

Os avanços tecnológicos têm aumentado muito a nossa compreensão da base molecular dos tumores, sua progressão e resposta ao tratamento. Durante os últimos 10 anos, estes avanços levaram à identificação de numerosos biomarcadores tumorais (Sabrina Hundt *et al.*, 2007; Sunali Mehta, *et al.*, 2010). Estes podem incluir uma grande variedade de entidades bioquímicas, tais como ácidos nucleicos, proteínas, açúcares, lípidos, e pequenos metabolitos, bem como células tumorais circulantes (Bhatt A N, *et al.*, 2010).

Todos estes estudos têm como objetivo investigar moléculas relacionadas com os tumores que permitam detetar a neoplasia numa fase precoce de desenvolvimento. Os marcadores tumorais conhecidos e utilizados atualmente, não são sensíveis o suficiente para serem usados em triagem populacional ou para o estabelecimento de diagnóstico primário de cancro. Entre estes o Antígeno Carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína expressa fisiologicamente na superfície de células mucosas, que tem sido associada a alguns tipos de cancro, como o CCR. No entanto, o CEA pode estar elevado em situações benignas como polipose retal, úlcera péptica, doença mamária benigna, entre outras. A baixa sensibilidade e especificidade limitam o uso do CEA no diagnóstico do CCR podendo, contudo, ser utilizado na monitorização da terapêutica. Além disso, e apesar de existirem

diferentes métodos disponíveis para triagem do CCR, a morbidade e mortalidade deste cancro são ainda elevadas, em parte devido à baixa adesão aos métodos de rastreio habituais.

Assim, é necessário que se identifiquem novos marcadores úteis na estratificação de risco, no estabelecimento do prognóstico e para a instituição de determinadas estratégias terapêuticas e sua monitorização no CCR.

Neste trabalho verificou-se que a leptina, a resistina, a visfatina e o TNF- $\alpha$  eram as citocinas que apresentavam capacidade discriminatória para a identificação de doentes com cancro colorretal, embora a resistina sérica tenha sido o parâmetro que apresentou maior valor discriminatório como marcador associado a mau prognóstico, com menor intervalo livre de doença e pior sobrevivência global.

Yi-Chen Lee (2012) verificou que a expressão génica da resistina era elevada nos tecidos tumorais do cancro da mama e que os doentes tinham valores séricos de resistina também muito elevados (Lee et al., 2012). Este estudo também demonstrou que a alta expressão de resistina era um fator de mau prognóstico para o cancro da mama, conferindo-lhe uma pior sobrevivência. Estes autores concluíram que a resistina poderá constituir um marcador de prognóstico independente, um marcador para estratificação da terapêutica hormonal e um possível alvo terapêutico (Lee et al., 2012). O mesmo autor verificou que o aumento significativo da expressão da visfatina nos tecidos tumorais é indicador de pior prognóstico (Lee et al., 2011).

Neste estudo verificou-se também que os doentes que apresentam níveis séricos mais elevados de resistina e de MCP-1 e mais baixos de TNF- $\alpha$  tinham menor sobrevivência global e, por conseguinte, pior prognóstico.



---

Pelo contrário, os doentes que apresentavam baixos níveis de expressão dos genes da adiponectina e da visfatina no tecido tumoral e altos níveis de expressão dos genes da leptina, da resistina e do TNF- $\alpha$ , apresentavam uma tendência para maior sobrevivência global.

Estes resultados sugerem que o nível sérico de resistina poderá constituir um potencial biomarcador de CCR e que a adiponectina, a visfatina e a leptina poderão influenciar a evolução e sobrevivência dos doentes, podendo contribuir para a identificação de novos grupos de risco.

1

## **6.CONCLUSÃO**

1

## 6. CONCLUSÃO

O CCR tem uma etiologia multifatorial e os vários fatores que interferem no seu desenvolvimento e progressão devem ser tidos em consideração. Além disso, o cancro do cólon desenvolve-se e progride ao longo de várias décadas, pelo que a intervenção nas mudanças do estilo de vida podem ser um importante auxílio às terapêuticas médicas, para o efetivo tratamento da doença, com supressão do seu desenvolvimento e metastização.

As adipocitocinas têm sido relacionadas com vários tipos de cancro, pela sua capacidade de promover a proliferação, a diferenciação e morte celular, podendo desempenhar um papel relevante no risco de desenvolvimento e progressão do CCR.

O presente estudo sugere que as citocinas, nomeadamente a resistina, a visfatina, o TNF- $\alpha$  e a leptina, constituem fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento do CCR ou ser secundárias a alterações metabólicas que se vão acumulando neste tipo de cancro.

A análise das curvas ROC indica que a leptina, a visfatina, o TNF- $\alpha$  e a resistina são citocinas que apresentam um potencial valor preditivo de CCR, podendo constituir potenciais novos marcadores preditivos de diagnóstico e, ou de prognóstico, embora apenas a resistina seja aquela que apresenta maior poder discriminatório.

Além disso, os doentes que apresentam níveis mais elevados de adiponectina e visfatina e, ou níveis mais baixos de leptina são os que apresentam menor sobrevivência global.

Em suma, o nível sérico de resistina poderá constituir um potencial biomarcador de CCR e a adiponectina, a visfatina e a leptina poderão influenciar a evolução e sobrevivência dos doentes, podendo constituir eventuais novos marcadores de prognóstico e contribuir para a identificação de novos grupos de risco em doentes com cancro colorretal. Contudo, estes estudos necessitam de ser validados através de estudos multicêntricos que englobem um maior número de doentes.

## **7. BIBLIOGRAFIA**





## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Ghafar, J., Oh, S. S., Park, S.-M., Wairagu, P., Lee, S. N., Jeong, Y., ... Jung, S.-H. (2013). Expression of adiponectin receptor 1 is indicative of favorable prognosis in non-small cell lung carcinoma. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 229, 153–62. doi:10.1620/tjem.229.153. Correspondence
- Adams, D. H. (2007). Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. *Gut*, 56, 1175. doi:10.1136/gut.2007.121533
- Aleksandrova, K., Boeing, H., Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, H. B., Jansen, E., van Duijnhoven, F. J. B., ... Pischon, T. (2012). Leptin and soluble leptin receptor in risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Cancer Research*, 72(20), 5328–37. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0465
- Aleksandrova, K., Drogan, D., Boeing, H., Jenab, M., Bas Bueno-De-Mesquita, H., Jansen, E., ... Pischon, T. (2013). Adiposity, mediating biomarkers and risk of colon cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *International Journal of Cancer*, 134, 612–621. doi:10.1002/ijc.28368
- Alexander J. Rodríguez, Claudio Mastronardi, G. P.-F. (2013). Leptin as a risk factor for the development of colorectal cancer. *Translational Gastrointestinal Cancer*, 2 (4). doi:doi: 10.3978/j.issn.2224-4778.2013.10.04
- Al-Harithy, R. N. (2013). Implication of visfatin levels in patients with colon cancer. *American Journal of Research Communication*, 1(11), 3544.
- Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., ... Coglianò, V. (2007). Carcinogenicity of alcoholic beverages. *The Lancet Oncology*, 8, 292–293. doi:10.1016/S1470-2045(07)70099-2
- Baier, P. K., Wolff-Vorbeck, G., Eggstein, S., Baumgartner, U., & Hopt, U. T. (2005). Cytokine expression in colon carcinoma. *Anticancer Research*, 25, 2135–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16158955>
- Bartucci, M., Svensson, S., Ricci-Vitiani, L., Dattilo, R., Biffoni, M., Signore, M., ... Surmacz, E. (2010). Obesity hormone leptin induces growth and interferes with the cytotoxic effects of 5-fluorouracil in colorectal tumor stem cells. *Endocrine-Related Cancer*, 17, 823–833. doi:10.1677/ERC-10-0083
- Bretes L., Sanches E., Sá A., Fidalgo I., Coutinho C., Martins A., Guedes F., Monteiro A., Barroso S., Timóteo T., Alves J., Mansinho H., Sottomayor C., Resende R.,

- Marques F., M. C. S. (2010). FOCCO - Fotografia do cancro colo-retal em Portugal: análise intermédia II. *FOCCO Newsletter*, 4, 1–4.
- Carvajal-Carmona, L. G., Spain, S., Kerr, D., Houlston, R., Cazier, J. B., & Tomlinson, I. (2009). Common variation at the adiponectin locus is not associated with colorectal cancer risk in the UK. *Human Molecular Genetics*, 18, 1889–1892. doi:10.1093/hmg/ddp109
- Chan, A. T., & Giovannucci, E. L. (2010). Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138, 2029–2043.e10. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.057
- Chia, V. M., Newcomb, P. a, Lampe, J. W., White, E., Mandelson, M. T., McTiernan, A., & Potter, J. D. (2007). Leptin concentrations, leptin receptor polymorphisms, and colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16(12), 2697–703. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0467
- Chou, C. L., Chang, S. C., Lin, T. C., Chen, W. S., Jiang, J. K., Wang, H. S., ... Lin, J. K. (2011). Differences in clinicopathological characteristics of colorectal cancer between younger and elderly patients: An analysis of 322 patients from a single institution. *American Journal of Surgery*, 202, 574–582. doi:10.1016/j.amjsurg.2010.10.014
- Dahm, C. C., Keogh, R. H., Spencer, E. A., Greenwood, D. C., Key, T. J., Fentiman, I. S., ... Rodwell, S. A. (2010). Dietary fiber and colorectal cancer risk: A nested case-control study using food diaries. *Journal of the National Cancer Institute*, 102, 614–626. doi:10.1093/jnci/djq092
- Dalamaga, M., Archondakis, S., Sotiropoulos, G., Karmaniolas, K., Pelekanos, N., Papadavid, E., & Lekka, A. (2012). Could serum visfatin be a potential biomarker for postmenopausal breast cancer? *Maturitas*, 71, 301–308. doi:10.1016/j.maturitas.2011.12.013
- Danese, E., Montagnana, M., Minicozzi, A. M., Bonafini, S., Ruzzenente, O., Gelati, M., ... Guidi, G. C. (2012). The role of resistin in colorectal cancer. *Clinica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.cca.2012.01.019
- Daniel R. Schwartz, M. A. L. (2011). Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(7), 249–294. doi:10.1016/j.tem.2011.03.005
- DeVita, V. T., Hellman, S., & Rosenberg, S. A. (2005). Cancer : Principles and Practice of Oncology Collections : In *Clinical Medicine* (p. 3120).
- Dwyer, R. M., Potter-Beirne, S. M., Harrington, K. A., Lowery, A. J., Hennessy, E., Murphy, J. M., ... Kerin, M. J. (2007). Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells.

- Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13, 5020–5027. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0731
- Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., ... Verweij, J. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, 45, 228–247. doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026
- Erarslan, E., Turkay, C., Kokter, A., Koca, C., Uz, B., & Bavbek, N. (2009). Association of visceral fat accumulation and adiponectin levels with colorectal neoplasia. *Digestive Diseases and Sciences*, 54, 862–868. doi:10.1007/s10620-008-0440-6
- Fazeli, M. S., Dashti, H., Akbarzadeh, S., Assadi, M., Aminian, A., Keramati, M. R., & Nabipour, I. (2013). Circulating levels of novel adipocytokines in patients with colorectal cancer. *Cytokine*, 62(1), 81–5. doi:10.1016/j.cyto.2013.02.012
- Forno, S. E. A. do. (2009). *O Cancro Colorretal e o rastreio: conhecimentos e atitudes dos portuenses*.
- Giovannucci, E. (2006). The epidemiology of vitamin D and colorectal cancer: recent findings. *Current Opinion in Gastroenterology*, 22, 24–29. doi:10.1097/01.mog.0000196150.36701.c2
- Gonullu, G., Kahraman, H., Bedir, A., Bektas, A., & Yücel, I. (2010). Association between adiponectin, resistin, insulin resistance, and colorectal tumors. *International Journal of Colorectal Disease*, 25, 205–212. doi:10.1007/s00384-009-0828-6
- Guadagni, F., Roselli, M., Martini, F., Spila, A., Riondino, S., D'Alessandro, R., ... Ferroni, P. (2009). Prognostic significance of serum adipokine levels in colorectal cancer patients. *Anticancer Research*, 29, 3321–3327.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V, Puri, V., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9, 367–377. doi:10.1038/nrm2391
- Gulcelik, M. A., Colakoglu, K., Dincer, H., Dogan, L., Yenidogan, E., & Gulcelik, N. E. (2012). Associations between Adiponectin and Two Different Cancers: Breast and Colon. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. doi:10.7314/APJCP.2012.13.1.395
- H Salim, O. E., Hamid, H. K. S., Mekki, S. O., Suleiman, S. H., & Ibrahim, S. Z. Colorectal carcinoma associated with schistosomiasis: a possible causal relationship. , 8 *World journal of surgical oncology* 68 (2010). doi:10.1186/1477-7819-8-68

- Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hillenbrand, A., Fassler, J., Huber, N., Xu, P., Henne-Bruns, D., Templin, M., ... Knippschild, U. (2012). Changed adipocytokine concentrations in colorectal tumor patients and morbidly obese patients compared to healthy controls. *BMC Cancer*, *12*(1), 545. doi:10.1186/1471-2407-12-545
- Hlavna, M., Kohut, L., Lipkova, J., Bienertova-Vasku, J., Dostalova, Z., Chovanec, J., & Vasku, A. (2011). Relationship of resistin levels with endometrial cancer risk. *Neoplasma*, *58*, 124–128. doi:10.4149/neo\_2011\_02\_124
- Honda, T., Inagawa, H., & Yamamoto, I. (2011). Differential Expression of mRNA in Human Monocytes following Interaction with Human Colon Cancer Cells. *Anticancer Research*, *31*, 2493–2497.
- Housa, D., Housová, J., Vernerová, Z., & Haluzík, M. (2006). Adipocytokines and cancer. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, *55*(3), 233–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16238454>
- Hu, E., Liang, P., & Spiegelman, B. M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*, 10697–10703. doi:10.1074/jbc.271.18.10697
- Jean Marc Phelip, Serban Bageacu, Mathieu Baconnier, Gabriele Barabino (University of Saint Etie, F. (2011). Comparison of adiponectin concentration between pancreatic cancer and colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, *2*, 232–239. doi:10.3978/
- Johnson, I. T., & Lund, E. K. (2007). Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *26*(2), 161–81. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03371.x
- Kato, I., Majumdar, A. P., Land, S. J., Barnholtz-Sloan, J. S., & Severson, R. K. (2010). Dietary fatty acids, luminal modifiers, and risk of colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, *127*, 942–951. doi:10.1002/ijc.25103
- Kerem, M., Ferahkose, Z., Yilmaz, U. T., Pasaoglu, H., Ofluoglu, E., Bedirli, A., ... Akin, M. (2008). Adipokines and ghrelin in gastric cancer cachexia. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *14*, 3633–3641. doi:10.3748/wjg.14.3633
- Kim, S., Keku, T. O., Martin, C., Galanko, J., Woosley, J. T., Schroeder, J. C., ... Sandler, R. S. (2008). Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *Cancer Research*, *68*, 323–328. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2924

- Koda, E. S. and M. (2009). Leptin as a Novel Marker in Breast and Colorectal Cancer. In A. Gertler (Ed.), *Leptin and Leptin Antagonists* (pp. 63–72). Landes & Bioscience.
- Koda, M., Sulkowska, M., Kanczuga-Koda, L., Surmacz, E., & Sulkowski, S. (2007). Overexpression of the obesity hormone leptin in human colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*, *60*, 902–906. doi:10.1136/jcp.2006.041004
- Koerner, A., Kratzsch, J., & Kiess, W. (2005). Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, *19*, 525–546. doi:10.1016/j.beem.2005.07.008
- Kumor, A., Daniel, P., Pietruczuk, M., & Małeczka-Panas, E. (2009). Serum leptin, adiponectin, and resistin concentration in colorectal adenoma and carcinoma (CC) patients. *International Journal of Colorectal Disease*, *24*, 275–281. doi:10.1007/s00384-008-0605-y
- Lee, Y.-C., Chen, Y.-J., Wu, C.-C., Lo, S., Hou, M.-F., & Yuan, S.-S. F. (2012). Resistin expression in breast cancer tissue as a marker of prognosis and hormone therapy stratification. *Gynecologic Oncology*, *125*, 742–750. doi:10.1016/j.ygyno.2012.02.032
- Lee, Y.-C., Yang, Y.-H., Su, J.-H., Chang, H.-L., Hou, M.-F., & Yuan, S.-S. F. (2011). High visfatin expression in breast cancer tissue is associated with poor survival. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *20*, 1892–1901. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0399
- Livak KJ e Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 – ΔΔCt method. *Methods.*, *25*, 402–408.
- Lu, H., Ouyang, W., & Huang, C. (2006). Inflammation, a key event in cancer development. *Molecular Cancer Research: MCR*, *4*, 221–233. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0261
- Lukanova, A., Söderberg, S., Kaaks, R., Jellum, E., & Stattin, P. (2006). Serum adiponectin is not associated with risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *15*(2), 401–2. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0836
- Lukas, M. (2010). Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, *28*, 619–624. doi:10.1159/000320276
- Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular Basis of Colorectal Cancer.

- Matafome, P., Santos-Silva, D., Sena, C. M., & Sei??a, R. (2013). Common mechanisms of dysfunctional adipose tissue and obesity-related cancers. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. doi:10.1002/dmrr.2395
- Mehta, R. S., Ennis, P., & Whitten, J. (2012). Ureterosigmoidostomy associated signet ring colon cancer presenting as hip pain. In *Journal of Gastrointestinal Cancer* (Vol. 43, pp. 122–127). doi:10.1007/s12029-010-9184-6
- Miranda, E., Destro, A., Malesci, A., Balladore, E., Bianchi, P., Baryshnikova, E., ... Roncalli, M. (2006). Genetic and epigenetic changes in primary metastatic and nonmetastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 95, 1101–1107. doi:10.1038/sj.bjc.6603337
- Nakajima, T. E., Yamada, Y., Hamano, T., Furuta, K., Matsuda, T., Fujita, S., ... Shimada, Y. (2010). Adipocytokines as new promising markers of colorectal tumors: adiponectin for colorectal adenoma, and resistin and visfatin for colorectal cancer. *Cancer Science*, 101, 1286–1291.
- Nowakowska-Zajdel, E., Mazurek, U., Stachowicz, M., Niedworok, E., Fatyga, E., & Muc-Wierzgoń, M. (2011). Cellular signal transduction pathways by leptin in colorectal cancer tissue: preliminary results. *ISRN Endocrinology*, 2011, 575397. doi:10.5402/2011/575397
- Oba, S., Shimizu, N., Nagata, C., Shimizu, H., Kametani, M., Takeyama, N., ... Matsushita, S. (2006). The relationship between the consumption of meat, fat, and coffee and the risk of colon cancer: A prospective study in Japan. *Cancer Letters*, 244, 260–267. doi:10.1016/j.canlet.2005.12.037
- Oken, M. M. M. D. a, Creech, R. H. M. D. b, Tormey, D. C. M. D. P. D. c, Horton, J. M. D. C. B. d, Davis, T. E. M. D. c, McFadden, E. T. e, & Carbone, P. P. M. D. c. (1982). Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *American Journal of Clinical Oncology*, 5, 649–656.
- Otake, S., Takeda, H., Fujishima, S., Fukui, T., Orii, T., Sato, T., ... Kawata, S. (2010). Decreased levels of plasma adiponectin associated with increased risk of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 1252–1257. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L358534879> \n <http://www.wjgnet.com/1007-9327/16/1252.pdf> \n <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v16.i10.1252> \n <http://sfxhosted.exlibrisgroup.com/dal?sid=EMBASE&issn=10079327&id=doi:10.3748/wjg.v16.i10.1252&atitle=Decreased+levels+of+plasma+adiponectin+associated+with+increased+risk+of+colorectal+cancer&stitle=World+J.+Gastroenterol.&title=World+Journal+of+Gastroenterology&volume=16&issue=10&spage=1252&epage=1257&aulast=Otake&aufirst>

- Papaioannou, D., Cooper, K. L., Carroll, C., Hind, D., Squires, H., Tappenden, P., & Logan, R. F. (2011). Antioxidants in the chemoprevention of colorectal cancer and colorectal adenomas in the general population: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, *13*, 1085–99. doi:10.1111/j.1463-1318.2010.02289.x
- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology*, *138*, 2059–2072. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.065
- Prashant Kant & Mark A. Hull. (2011). Excess body weight and obesity—the link with gastrointestinal and hepatobiliary cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *8*, 224–238. doi:10.1038/nrgastro.2011.23
- Pritchard, C. C., & Grady, W. M. (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*, *60*, 116–129. doi:10.1136/gut.2009.206250
- Rahman, N. (2014). Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature*, *505*, 302–8. doi:10.1038/nature12981
- Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, *434*(7035), 843–50. doi:10.1038/nature03319
- Sălăgeanu, A., Tucureanu, C., Lerescu, L., Caraș, I., Pitica, R., Gangurà, G., ... Neagu, S. (2010). Serum levels of adipokines resistin and leptin in patients with colon cancer. *Journal of Medicine and Life*, *3*(4), 416–20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3019064&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sanchez, N. F., Stierman, B., Saab, S., Mahajan, D., Yeung, H., & Francois, F. (2012). Physical activity reduces risk for colon polyps in a multiethnic colorectal cancer screening population. *BMC Research Notes*. doi:10.1186/1756-0500-5-312
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *63*, 11–30. doi:10.3322/caac.21166
- Song, M., Zhang, X., Wu, K., Ogino, S., Fuchs, C. S., Giovannucci, E. L., & Chan, A. T. (2013). Plasma adiponectin and soluble leptin receptor and risk of colorectal cancer: a prospective study. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, *6*, 875–85. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0169
- Stastny, J., Bienertova-Vasku, J., & Vasku, A. (2012). Visfatin and its role in obesity development. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. doi:10.1016/j.dsx.2012.08.011
- Stattin, P., Lukanova, A., Biessy, C., Söderberg, S., Palmqvist, R., Kaaks, R., ... Jellum, E. (2004). Obesity and colon cancer: does leptin provide a link? *International*

- Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 109, 149–152. doi:10.1002/ijc.11668
- Steins Bisschop, C. N., van Gils, C. H., Emaus, M. J., Bueno-de-Mesquita, H. B., Monninkhof, E. M., Boeing, H., ... May, A. M. (2014). Weight change later in life and colon and rectal cancer risk in participants in the EPIC-PANACEA study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 139–47. doi:10.3945/ajcn.113.066530
- Tessitore, L., Vizio, B., Jenkins, O., De Stefano, I., Ritossa, C., Argiles, J. M., ... Mussa, A. (2000). Leptin expression in colorectal and breast cancer patients. *International Journal of Molecular Medicine*, 5, 421–426.
- Tiaka, E. K., Manolakis, A. C., Kapsoritakis, A. N., & Potamianos, S. P. (2011). The implication of adiponectin and resistin in gastrointestinal diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.04.002
- Tian, W., Zhu, Y., Wang, Y., Teng, F., Zhang, H., Liu, G., ... Xue, F. (2013). Visfatin, a potential biomarker and prognostic factor for endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 129, 505–512. doi:10.1016/j.ygyno.2013.02.022
- Tsukada, T., Fushida, S., Harada, S., Terai, S., Yagi, Y., Kinoshita, J., ... Ohta, T. (2011). Adiponectin receptor-1 expression is associated with good prognosis in gastric cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. doi:10.1186/1756-9966-30-107
- Tulubas, F., Mete, R., Oznur, M., & Topcu, B. (2013). the Role of Adipocytokines in Colon Cancer and Adenomas / Uloga Adipocitokina U Kanceru I Adenomima Debelog Creva. *Journal of Medical Biochemistry*, 33(2), 1–8. doi:10.2478/jomb-2013-0001
- Tutino, V., Notarnicola, M., Guerra, V., Lorusso, D., & Caruso, M. G. (2011). Increased soluble leptin receptor levels are associated with advanced tumor stage in colorectal cancer patients. *Anticancer Research*, 31(10), 3381–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21965750>
- Uddin, S., Bavi, P. P., Hussain, A. R., Alsbeih, G., Al-Sanea, N., Abduljabbar, A., ... Al-Kuraya, K. S. (2009). Leptin receptor expression in Middle Eastern colorectal cancer and its potential clinical implication. *Carcinogenesis*, 30, 1832–1840. doi:10.1093/carcin/bgp145
- Van Kruijsdijk, R. C. M., van der Wall, E., & Visseren, F. L. J. (2009). Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18, 2569–2578. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0372



- Vicente-Dueñas, C., Romero-Camarero, I., Cobaleda, C., & Sánchez-García, I. (2013). Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. *The EMBO Journal*, *32*, 1502–13. doi:10.1038/emboj.2013.97
- Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, S. A. R. (2011). *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. (LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, Ed.) (Ninth, Nor.).
- Walsh, J. M. E. (2003). Colorectal Cancer Screening: Scientific Review. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, *289*(10), 1288–1296. doi:10.1001/jama.289.10.1288
- Wang, D., Chen, J., Chen, H., Duan, Z., Xu, Q., Wei, M., ... Zhong, M. (2012). Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *Journal of Biosciences*. doi:10.1007/s12038-011-9172-4
- Wolf, I., Sadetzki, S., Kanety, H., Kundel, Y., Pariente, C., Epstein, N., ... Shimon, I. (2006). Adiponectin, ghrelin, and leptin in cancer cachexia in breast and colon cancer patients. *Cancer*, *106*(4), 966–73. doi:10.1002/cncr.21690
- Xu P., Hillenbrand A., Knippschild U., W. A. M. (2012). cytokine and adipocytokine expression profiling in visceral adipose tissue of patients with colorectal cancer and morbid obesity. *Conference Abstract*, *21*(8), 1138.
- Zhang, J., Lu, Y., & Pienta, K. J. (2010). Multiple roles of chemokine (C-C Motif) ligand 2 in promoting prostate cancer growth. *Journal of the National Cancer Institute*. doi:10.1093/jnci/djq044
- Zingde, S. M. (2001). *Cancer genes*, *81*(5).