

**IMPACTO DA EXPRESSÃO DE FATORES
RELACIONADOS À HIPÓXIA (HIF1A E VEGF) E
METABOLISMO LIPÍDICO (LXRA, LXRB E
PPARG) EM TUMORES DE CÓLON ESTÁDIO
CLÍNICO II E III**

ADRIANO CARNEIRO DA COSTA

**Dissertação para obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

**Co-Orientadores: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de
Lima e Dra. Maria Dirlei Begnami**

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Costa, Adriano Carneiro da

Impacto da expressão de fatores relacionados à hipóxia (HIF1A e VEGF) e metabolismo lipídico (LXRA, LXRβ e PPARG) em tumores de cólon estágio clínico II e III / Adriano Carneiro da Costa – São Paulo, 2012.

80p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Dr. Ademar Lopes

Descritores: 1. NEOPLASIAS DO COLO. 2. CÂNCER DE CÓLON. 3. HIPÓXIA. 4. FATOR 1 INDUZÍVEL POR HIPÓXIA. 5. FATORES DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR. 6. LIPÍDEOS/metabolismo.

DEDICATÓRIA

À minha mãe Auri Ferreira da Costa, exemplo de mãe e que sempre influenciou os filhos a carreira médica (in memorium).

Ao meu irmão mais velho Tarcísio Carneiro, que me introduziu no estudo da cirurgia e que sempre orientou todos os irmãos mais jovens.

Ao Meu Pai, Deocleciano Carneiro e Aos meus irmãos, Francisco Eudes, Ítalo, Livaldino e Leolina.

Ao Meu Tio, Lauri Ferreira e minha avó Leolina Ferreira (in memorium), pessoas que sempre foram muito presentes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Hospital A.C. Camargo, por me oferecer, de maneira integrada, ensino, assistência e pesquisa, dentro do mais alto nível padrão de qualidade.

Ao Dr. Ademar Lopes, motivo de ter escolhido a cirurgia oncológica como profissão, e exemplo a ser seguido por outros jovens cirurgiões oncológicos.

A Dra. Maria Dirlei, uma das pessoas mais integras e corretas que já conheci, e por ter me ajudado nos momentos mais difíceis quando estava fazendo meu estágio na Inglaterra.

Ao Dr. Vladimir, por acrescentar objetividade na execução deste estudo.

Ao Dr. Wilson Toshihiko Nakagawa, Dr. Samuel Aguiar e Dr. Fábio Ferreira pela amizade e toda a disponibilidade em me ajudar.

A todos os companheiros do Departamento de Cirurgia Pélvica e de Anatomia patológica do Hospital A. C. Camargo.

A Sra. Suely Francisco, pelo auxílio na revisão das normas e referências bibliográficas.

A Sra. Ana Kuninari, pelo auxílio na pós-graduação.

A Sra. Inês Nishimoto por realizar toda análise estatística de nosso estudo.

A toda equipe de funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital A.C. Camargo, pela dedicação e disposição em buscar soluções para contornar as adversidades no levantamento de prontuários.

RESUMO

Costa AC. **Impacto da expressão de fatores relacionados à hipóxia (HIF1A e VEGF) e metabolismo lipídico (LXRA, LXRБ e PPARG) em tumores de cólon estágio clínico II e III.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Câncer colorretal é o terceiro câncer com maior incidência em todo o mundo e no Brasil. Considerando sua elevada incidência, e por acreditar que apenas o estadiamento TNM seja insuficiente como fator prognóstico, estudamos outros fatores prognósticos. Acreditamos que a resposta inflamatória seja um fator prognóstico importante para essa doença. Para isto, estudamos a expressão de alguns fatores pró-inflamatórios, como fatores envolvidos com a hipóxia e relacionados ao metabolismo lipídico que estão associados com a resposta inflamatória, em tumores de pacientes com câncer de cólon estágio II e III. **Objetivos:** Nosso objetivo primário foi avaliar a expressão de fatores associados à hipóxia (HIF1A, VEGF) e ao metabolismo lipídico (PPARG, LXRA e LXRБ) em amostras de tumor de pacientes portadores de câncer esporádico de cólon estádios II e III. Nosso objetivo secundário foi avaliar o possível impacto da expressão de HIF1A, VEGF, PPARG, LXRA e LXRБ na sobrevida global e livre de recidiva. **Materiais e Métodos:** Realizamos um estudo de coorte retrospectivo envolvendo 101 pacientes com diagnóstico de carcinoma esporádico de cólon e reto alto, estádios II e III (TNM -6a edição), operados no Hospital A.C. Camargo no período compreendido entre 1990 a 2004; Foi utilizado o tissue microarray, e foi realizado estudos com imunoistoquímica. Utilizamos análise estatística descritiva para caracterização da amostra. O teste de qui-quadrado foi utilizado para comparar as variáveis categóricas em tabelas de contingência. O nível de significância de 5% ($p < 0.05$) foi considerado em todos os testes. A sobrevida foi estimada pelo método de Kaplan-Meier, e usou-se o modelo de regressão de COX para calcular o risco proporcional para óbito. **Resultados:** 101 pacientes estudados, 18 pacientes (17,8%) apresentaram tumores negativos para VEGF, enquanto que 83 tumores (82%) apresentavam expressão positiva de VEGF;

27 pacientes (26,7%) apresentaram tumores negativos para HIF1A, enquanto que 74 tumores (73,3%) apresentavam expressão positiva de HIF1A; 58 pacientes (57,4%) apresentaram tumores negativos para PPARG, enquanto que 43 tumores (42,5%) apresentavam expressão positiva de PPARG; 66 pacientes (65,3%) apresentaram tumores negativos para LXRA, enquanto que 35 tumores (34,6%) apresentavam expressão positiva de LXRA; 3 pacientes (3%) apresentaram tumores negativos para LXRB, enquanto que 98 tumores (97%) apresentavam expressão positiva de LXRA.

Conclusões: A expressão imunoistoquímica de VEGF, HIF1A, LXRA e LXRB não se associou, de maneira estatisticamente significativa, a piores taxas de sobrevida livre de doença, câncer-específica e global. A ausência de expressão imunoistoquímica de PPARG se associou, de maneira estatisticamente significativa ($p<0.05$), a piores taxas de sobrevida global e sobrevida câncer-específica. Suporte: FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo).

SUMMARY

Costa AC. [Impact of expression of factors related to hypoxia (HIF1A and VEGF) and lipid metabolism (LXRA, LXR β and PPARG) in colon cancer clinical stage II and III]. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Colorectal cancer is the third in cancer incidence worldwide and in Brazil. Considering its high incidence, and believing that only TNM staging is insufficient as a prognostic factor, we studied other prognostic factors which have not yet been reported. We believe that the inflammatory response is an important prognostic factor for this disease. Thus, we studied the expression of pro-inflammatory factors involved in hypoxia and factors related to lipid metabolism. Both are associated with the inflammatory response in tumors of colon cancer stage II and III. **Objectives:** Our primary objective was to evaluate the expression of factors associated with hypoxia (HIF1A, VEGF) and lipid metabolism (PPARG, and LXRA LXR β) in tumor samples from patients with sporadic colon cancer stage II and III. Our secondary endpoint was to evaluate the possible impact of the expression of HIF1A, VEGF, PPARG, and LXRA LXR β on overall survival and disease-free survival. **Materials and Methods:** We conducted a retrospective cohort study involving 101 patients with sporadic carcinoma of the colon and rectum, operated in Hospital AC Camargo in the period 1990 to 2004. The tissue microarray was done using a microarrayer to construct slides for immunohistochemistry studies. We used descriptive statistics to characterize the sample and the distribution of variables was presented in the form of contingency tables. Chi square test was used to compare categorical variables in contingency tables and 2x2 tables. $P < 0.05$ value was used as statistically significant. Survival was estimated by the Kaplan-Meier method, and Cox regression model was used for the proportional hazard for death. **Results:** 101 patients studied, 18 patients (17.8%) were negative tumors for VEGF, whereas 83 tumors (82%) showed positive expression of VEGF, 27 patients (26.7%) had HIFA negative tumors, tumors whereas 74 (73 3%) had positive expression of

HIF1A, 58 patients (57.4%) had tumors negative for PPARG, while 43 tumors (42.5%) had positive expression of PPARG, 66 patients (65.3%) had tumors LXRA negative, while 35 tumors (34.6%) showed positive expression of LXRA, 3 patients (3%) were negative tumors LXRβ, while 98 tumors (97%) showed positive expression of LXRA. **Conclusions:** The immunohistochemical expression of VEGF, HIF1A, LXRA and LXRβ not associated statistically with lower rates of disease-free survival, cancer-specific and global survival. The absence of immunohistochemical expression of PPARG was associated in a statistically significant manner with poorer rates of overall survival and cancer-specific survival. **Support:** FAPESP (Research Support Foundation of São Paulo).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Regulação de HIF-alfa através da hidroxilação de resíduos de prolina e posterior ubiquitinação.....	11
Figura 2	Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal corado pelo HE (aumento 20x).....	35
Figura 3	Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com expressão positiva predominantemente citoplasmática e focalmente nuclear de HIF1A (aumento 40x).....	36
Figura 4	Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com tumor negativo para HIF1A (aumento 20x).....	36
Figura 5	Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com expressão positiva citoplasmática de VEGF (aumento 20x).....	36
Figura 6	Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com tumor negativo para VEGF (aumento 20x).....	36
Figura 7	Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com expressão positiva nuclear de PPARG (aumento 40x).....	37
Figura 8	Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com tumor negativo para PPARG (aumento 20x).....	37
Figura 9	Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com expressão positiva de LXRA (aumento 20x).....	37
Figura 10	Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com tumor negativo para LXRA (aumento 40x).....	37

Figura 11	Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com expressão positiva nuclear para LXRβ (aumento 20x).....	38
Figura 12	Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com tumor negativo para LXRβ (aumento 40x).....	38
Figura 13	Curva de sobrevida global para 101 pacientes portadores de câncer colorretal estádios clínicos II e III.....	50
Figura 14	Curva de sobrevida câncer-específica para 101 pacientes portadores de câncer colorretal estádios clínicos II e III.....	51
Figura 15	Curva de sobrevida livre de recidiva para 101 pacientes portadores de câncer colorretal estádios clínicos II e III.....	52
Figura 16	Curva de sobrevida livre de recidiva para 101 pacientes portadores de câncer colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com estágio patológico.....	56
Figura 17	Curva de sobrevida livre de recidiva para 101 pacientes portadores de câncer colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com invasão perineural.....	57
Figura 18	Curva de sobrevida livre de recidiva para 101 pacientes portadores de câncer colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com status linfonodal (N0= Livre de tumor, N1 e N2 comprometido por tumor).	57
Figura 19	Curva de sobrevida global para 101 pacientes portadores de câncer Colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com embolização linfática.....	61

Figura 20	Curva de sobrevida global para 101 pacientes portadores de câncer Colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com a expressão do marcador PPARG.....	62
Figura 21	Curva de sobrevida global para 101 pacientes portadores de câncer Colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com a expressão do marcador HIF1A.....	62
Figura 22	Curva de sobrevida câncer-específica para 101 pacientes portadores de câncer colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com a expressão de PPARG.....	64

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Distribuição da casuística de acordo com variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais.....	30
Tabela 2	Distribuição da casuística de acordo com terapêutica e seguimento...	31
Tabela 3	Distribuição da casuística de acordo com as variáveis anatomopatológicas.....	32
Tabela 4	Distribuição da casuística de acordo com a expressão imunoistoquímica de marcadores associados à hipóxia e ao metabolismo lipídico nas amostras dos tumores.....	34
Tabela 5	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas de acordo com a expressão de VEGF.....	40
Tabela 6	Distribuição das características anatomopatológicas do tumor de acordo com a expressão de VEGF.....	41
Tabela 7	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas de acordo com a expressão de HIF1A.....	41
Tabela 8	Distribuição das características do tumor de acordo com expressão tumoral de HIF1A.....	42
Tabela 9	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas de acordo com expressão tumoral de PPARG.....	43
Tabela 10	Distribuição das características do tumor e de tratamento de acordo com a expressão tumoral de PPARG.....	44

Tabela 11	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas de acordo com a expressão tumoral de LXRA.....	45
Tabela 12	Distribuição das características do tumor de acordo com a expressão tumoral de LXRA.....	46
Tabela 13	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas de acordo com a expressão tumoral de LXRБ.....	47
Tabela 14	Distribuição das características do tumor de acordo com a expressão tumoral de LXRБ.....	48
Tabela 15	Probabilidade de sobrevida livre de recidiva 5-anos e 10-anos de acordo com variáveis demográficas, laboratoriais, clínicas e terapêuticas.....	54
Tabela 16	Probabilidade de sobrevida livre de recidiva 5-anos e 10-anos de acordo com características Anatomopatológicas do tumor.....	55
Tabela 17	Probabilidade de sobrevida livre de recidiva 5-anos e 10-anos de acordo com a expressão imunoistoquímica de marcadores associados à hipóxia (HIF1A, VEGF) e ao metabolismo lipídico (PPARG, LXRA, LXRБ).....	56
Tabela 18	Probabilidade de sobrevida global em 5-anos e 10-anos de acordo com variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas.....	59
Tabela 19	Probabilidade de sobrevida global em 5-anos e 10-anos de acordo com características Anatomopatológicas do tumor.....	60
Tabela 20	Probabilidade de sobrevida global 5-anos e 10-anos de acordo com a expressão imunoistoquímica tumoral de marcadores associados à hipóxia e ao metabolismo lipídico.....	61

Tabela 21	Probabilidade de sobrevida câncer-específica em 5-anos e 10-anos de acordo com a expressão imunistoquímica tumoral de VEGF, HIF1A, PPARG, LXRA e LXRΒ.....	64
Tabela 22	Análise multivariada de fatores prognósticos para óbito por câncer colorretal estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX.....	66
Quadro 1	Sistema de estadiamento TNM para câncer colorretal da AJCC 2002.....	5
Quadro 2	Sistema de estadiamento TNM para câncer colorretal da AJCC 2010.....	6
Quadro 3	Anticorpos utilizados na imunoistoquímica.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

CCR	Câncer colorretal
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
FOLFOX	Oxaloplátino- Ácido Folínico-Fluorourácl
HE	Hematoxilina-eosina
HIF1A	Fator indutor de hipóxia 1 alfa
HNPCC	Câncer colorretal hereditário sem polipose
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LXR	Liver X Receptors
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
Rb	Retinoblastoma
SAME	Serviço de Arquivo Médico
Skp2	S-phase kinase –associated poteína 2
TC	Tomografia computadorizada
TNM	Tumor Node Metastasis
TMA	Tissue Microarray
VEGF	Vascular endotelial growth fator
VHL	Von Hippel-Lindau

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Dados epidemiológicos	1
1.2	Diagnóstico e estadiamento	3
1.3	Tratamento do câncer colorretal	7
1.4	Papel da hipóxia e inflamação tecidual em tumores	9
1.5	Fatores associados ao metabolismo lipídico em tumores	13
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo Primário.....	17
2.2	Objetivo Secundário.....	17
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	18
3.1	Casuística	18
3.1.1	Critérios de inclusão.....	19
3.1.2	Critérios de exclusão	19
3.2	Variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas.....	20
3.3	Variáveis anatomopatológicas	20
3.4	Expressão imunoistoquímica de marcadores associados à hipóxia e metabolismo lipídico.....	22
3.5	Métodos.....	22
3.5.1	Construção do Tissue Microarray (TMA)	22
3.5.2	Imunoistoquímica.....	23
3.5.3	Seguimento dos pacientes	25
3.5.4	Análise estatística.....	25
4	RESULTADOS	28
4.1	Composição da amostra	28
4.2	Variáveis demográficos, clínicos, laboratoriais e terapêuticos	28
4.3	Variáveis de anatomopatológicas.....	31

4.4	Distribuição da amostra de acordo com os marcadores tumorais marcadores imunohistoquímicos associados a hipóxia e ao metabolismo lipídico.....	33
4.5	Teste de associação entre as variáveis	38
4.6	Dados de seguimento	49
4.7	Sobrevida livre de recidiva	53
4.8	Sobrevida global	58
4.9	Sobrevida câncer específica	63
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÕES	75
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ANEXOS

Anexo 1 Registro de Tumores colorretais

Anexo 2 Técnica de Imunoistoquímica

Anexo 3 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

1 INTRODUÇÃO

1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Uma compreensão mais profunda da base molecular do câncer colorretal, juntamente com novas abordagens terapêuticas, alterou significativamente a abordagem terapêutica dos pacientes portadores desta doença (LIBUTTI et al. 2008).

O câncer colorretal é o terceiro câncer mais comumente diagnosticado em homens, e o segundo em mulheres, com incidência mundial de aproximadamente 1.2 milhões de casos novos e 608.700 óbitos estimados em 2008 (JEMAL et al. 2011). A incidência e taxa de mortalidade por esta doença são maiores nos países ocidentais desenvolvidos. Em 2012, haverá cerca de 143.460 casos novos diagnosticados de câncer colorretal nos Estados Unidos, incluindo 103.170 casos de câncer de cólon e 40.290 casos de câncer de reto e 51.690 óbitos. Os homens apresentam um risco ligeiramente aumentado, e a incidência ajustada por idade é de 58,5 por 100.000 em homens e 44,2 por 100.000 em mulheres (JEMAL et al. 2012).

De acordo com as estimativas brasileiras, tendo como fonte o INCA (Instituto nacional do câncer), a incidência de câncer de cólon e reto, no ano de 2012, foi de 30.140 casos, sendo 14.180 em homens e 15.960 em mulheres. Estes valores correspondem a risco estimado de 15 casos novos a cada cem mil homens e 16 para cada cem mil mulheres (Ministério da Saúde 2012).

Nos últimos anos, a incidência e a mortalidade por câncer de cólon apresentaram um declínio, acompanhadas de um aumento da sobrevida, isso se deve

ao diagnóstico mais precoce, identificação e remoção de pólipos do cólon por colonoscopia, melhor conhecimento da biologia celular e molecular do tumor, e aparecimento de novas modalidades de tratamento (LIBUTTI et al. 2008).

Existem vários fatores de risco relacionados ao câncer de cólon, dentre os quais se destacam a idade, agregação familiar de câncer, dieta rica em gordura e pobre em fibras, fatores ambientais e atividade física. O consumo aumentado de carnes vermelhas e gorduras saturadas, associado à baixa atividade física, está associado ao aumento da incidência do câncer de cólon (ZELLER et al. 2008).

A etiologia do câncer de cólon é complexa e envolve a interação de fatores ambientais e genéticos. Esses fatores ambientais podem acarretar alterações na mucosa normal promovendo o surgimento de um pólipó adenomatoso pré-maligno, que ao longo de alguns anos (cerca de 10 anos) pode se transformar em um carcinoma invasivo (FEARON 2011).

Aproximadamente 75% dos casos de câncer colorretal são esporádicos, e o restante dos casos ocorre em pacientes que apresentam maior risco, incluindo aqueles com doença inflamatória intestinal, polipose adenomatosa familiar (FAP), e câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), bem como pacientes com uma forte história familiar de câncer colorretal (CHANG e FEIG 2006).

Quando diagnosticados, 39% dos pacientes têm doença localizada, 38% têm a doença com acometimento regional, 19% têm metástases à distância e em 5% não é possível o estadiamento adequado. Nos Estados Unidos, as taxas de sobrevida para a doença localizada, localmente avançada e metastática em 5 anos é de 90,0%, 66,0% e 9,0% respectivamente, e aos 10 anos, de 85,0%, 58,0%, e 6,6%, respectivamente (CHANG e FEIG 2006).

1.2 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO

A avaliação do paciente com câncer de cólon deve englobar a história clínica completa, incluindo história familiar, exame físico, toque retal, exames laboratoriais, CEA sérico, colonoscopia completa, radiografia ou tomografia computadorizada (TC) de tórax e TC do abdome e pelve. Essas são informações necessárias e indispensáveis para o estadiamento e planejamento terapêutico.

O câncer de cólon ainda é uma doença com alta morbidade e mortalidade em nível mundial. O reconhecimento de fatores prognósticos e o tratamento cirúrgico combinado com quimioterapia têm contribuído para melhorar as taxas de cura e sobrevida dos pacientes portadores dessa doença (LIBUTTI et al. 2008).

O fator prognóstico isolado mais importante para os pacientes com esses tumores é o estadiamento. O estadiamento mais usado para o câncer colorretal é feito usando-se o sistema de estadiamento do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)/ *Union Internationale Controle Cancer* (UICC), baseado no sistema TNM, que classifica os tumores colorretais com base no grau de penetração do tumor (estádio T) na parede do órgão afetado, número de linfonodos locorregionais comprometidos (estádio N), e a presença ou ausência de metástases à distância (estádio M) (Quadro 1) (EDGE et al. 2010).

Embora a classificação TNM seja útil para o estadiamento e seleção de pacientes para tratamento específico, essa classificação é ainda insuficiente, já que muitos pacientes com o mesmo estadiamento podem ter diferentes desfechos clínicos. Assim, novos fatores prognósticos, como biomarcadores, capazes de melhor identificar o comportamento individual desta doença são realmente necessários para

aprimorar a condução clínica de pacientes portadores de câncer de cólon nos dias atuais (CAO et al. 2009).

Na sexta edição do TNM do AJCC 2002 (GREENE et al. 2002), o estágio II era subdividido em IIA e IIB, com base na profundidade de invasão local do tumor primário na parede do órgão, sendo classificado em T3N0M0 e T4N0M0, respectivamente, e o estágio III era subdividido em IIIA (T1-2N1M0), IIIB (T3-4N1M0), ou IIIC (qualquer T-N2M0). Ocorreram mudanças nas definições dos estádios T4, N e M1 no mais recente TNM de 2010 (Quadro 2) (EDGE et al. 2010). O T4 foi subdividido em T4a (o tumor invade o peritônio visceral) e T4b (o tumor invade ou está aderido histologicamente a órgãos e estruturas adjacentes). O estágio N1 foi subdividido em N1a (metástase em 1 linfonodo regional) e N1b (metástase em 2–3 linfonodos), e o estágio N2 foi subdividido em N2a (metástase em 4–6 linfonodos) e N2b (metástase em 7 ou mais linfonodos). Nódulo satélite subseroso, sem comprometimento linfonodal regional, tem uma nova classificação em N1c.

O estágio II foi subdividido em IIA (T3N0), IIIB (T4aN0) e IIC (T4bN0). Da mesma forma no estágio III, ocorreram as seguintes mudanças, o T4bN1M0, anteriormente estadiado como IIIB, foi reclassificado para IIIC, e o N2, anteriormente classificado como IIIC, foi reclassificado em IIIA, quando T1N2; e T1N2b, T2N2a-b e T3N2a foram reclassificados em IIIB. O estágio M foi subdividido em estágio M1a (metástase à distância em um único sítio) e M1b (metástase à distância em múltiplos sítios).

Quadro 1 - Sistema de estadiamento TNM para câncer colorretal da AJCC 2002

TX	O tumor primário não pode ser avaliado		
T0	Não há evidência de tumor primário		
Tis	Carcinoma "in situ": intra-epitelial ou invasão da lâmina própria 1		
T1	Tumor que invade a submucosa		
T2	Tumor que invade a muscular própria		
T3	Tumor que invade além da muscular própria, alcançando a subserosa ou os tecidos peri-colicos não peritonizados		
T4	Tumor que invade diretamente outros órgãos ou estruturas 2,3 e/ou que perfura o peritônio visceral		
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados		
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais		
N1	Metástases em 1 a 3 linfonodos regionais		
N2	Metástases em 4 ou mais linfonodos regionais 4		
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada		
M0	Ausência de metástase à distância		
M1	Presença de metástase à distância		

0	Tis	N0	M0
I	T1,2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
IIIA	T1,2	N1	M0
IIIB	T3,4	N1	M0
IIIC	Qualquer T	N2	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: GREENE et al. (2002)

Quadro 2 - Sistema de estadiamento TNM para câncer colorretal da AJCC 2010

TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma "in situ": intra-epitelial ou invasão da lâmina própria
T1	1
T2	Tumor que invade a submucosa
T3	Tumor que invade a muscular própria
T4	Invasão além da muscular própria (subserosa, tecidos pericólicos não peritonizados) Tumor que invade outros órgãos ou estruturas 2,3 e/ou que perfura o peritônio visceral T4a – perfura o peritônio visceral T4b – invade diretamente outros órgãos ou estruturas
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástases em 1 a 3 linfonodos regionais N1a – 1 linfonodo N1b – 2 a 3 linfonodos N1c – nódulo satélite subseroso, sem comprometimento linfonodal regional ⁴
N2	Metástases em 4 ou mais linfonodos regionais N2a – 4 a 6 linfonodos N2b – 7 ou mais linfonodos
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância M1a – Um órgão M1b – Mais de um órgão ou peritônio

0	Tis	N0	M0
I	T1,2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1,2	N1/N1c	M0
	T 1	N2a	M0
IIIB	T3,4a	N1/N1c	M0
	T2,3	N2a	M0
	T1,2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b

Fonte: EDGE et al. (2010)

1.3 TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL

O tratamento do câncer colorretal é multidisciplinar para os estádios II de alto risco e III, mas tem a cirurgia como modalidade mais importante quando a intenção do tratamento é curativa. A ressecção considerada ideal para tumores do cólon consiste na ressecção do segmento acometido com margem adequada, em monobloco com a cadeia linfática regional, limitada pela origem do tronco arterial daquele segmento (NELSON et al. 2001).

Para os tumores de reto médio e baixo, considera-se ideal a ressecção com margem distal mínima de 2,0 cm, com excisão total do mesorreto e ligadura na origem dos vasos mesentéricos inferiores. Em tumores localmente avançados e aderidos a outros órgãos ou estruturas adjacentes, deve-se realizar a ressecção ampliada em monobloco com a estrutura aderida (NELSON et al. 2001; VIEIRA et al. 2004).

O tratamento adjuvante é empregado em pacientes com alto risco para recidiva após o tratamento cirúrgico com intenção curativa e visa diminuir os riscos de recidiva local e à distância. A cirurgia associada à quimioterapia adjuvante é atualmente o tratamento padrão indicado para o câncer de cólon estágio II de alto risco e III (O'CONNELL et al. 1997; AL BENSON et al. 2004).

A presença de linfonodo comprometido, define o estágio III, e o estágio II de alto risco, embora sem consenso, é definido, dentre outras coisas, pela presença de uma das seguintes características (AL BENSON et al. 2004):

- Nível de CEA pré-operatório maior ou igual a 10;
- Tumores T4;
- Embolização vascular linfática positiva;
- Graus de diferenciação G3 ou G4;
- deleção do 18q;
- Número de linfonodos dissecados na peça operatória menor que 12;
- Tumor Obstrutivo ou perfurado.

Em 1988, o estudo NSABPC-01 foi o primeiro estudo clínico a demonstrar benefício em sobrevida livre de doença e sobrevida global com quimioterapia baseada em semustina, vincristina e 5-fluorouracil (5-FU) para pacientes com câncer de cólon Dukes B e C (WOLMAR et al. 1988). Atualmente se sabe que esquemas baseados em 5-fluorouracil (5-FU) diminuem o risco de recidiva e aumentam a sobrevida global, e a combinação de leucovorin com 5-FU (preconizada pela Mayo Clinic) aumenta a citotoxicidade da fluoropirimidina, resultando em melhor sobrevida livre e global da doença.

A partir da publicação do estudo MOSAIC, o esquema quimioterápico FOLFOX vem sendo usado como padrão em tratamento adjuvante de câncer de cólon. O estudo mostrou que a associação de oxaliplatina ao esquema 5-FU e leucovorin melhorou a sobrevida livre de doença e diminuiu o risco de recorrência quando comparado apenas a associação de 5-FU e leucovorin (WOLMAR et al. 1988; O'CONNELL et al. 1997; AL BENSON et al. 2004; ANDRÉ et al. 2004).

1.4 PAPEL DA HIPÓXIA E INFLAMAÇÃO TECIDUAL EM TUMORES

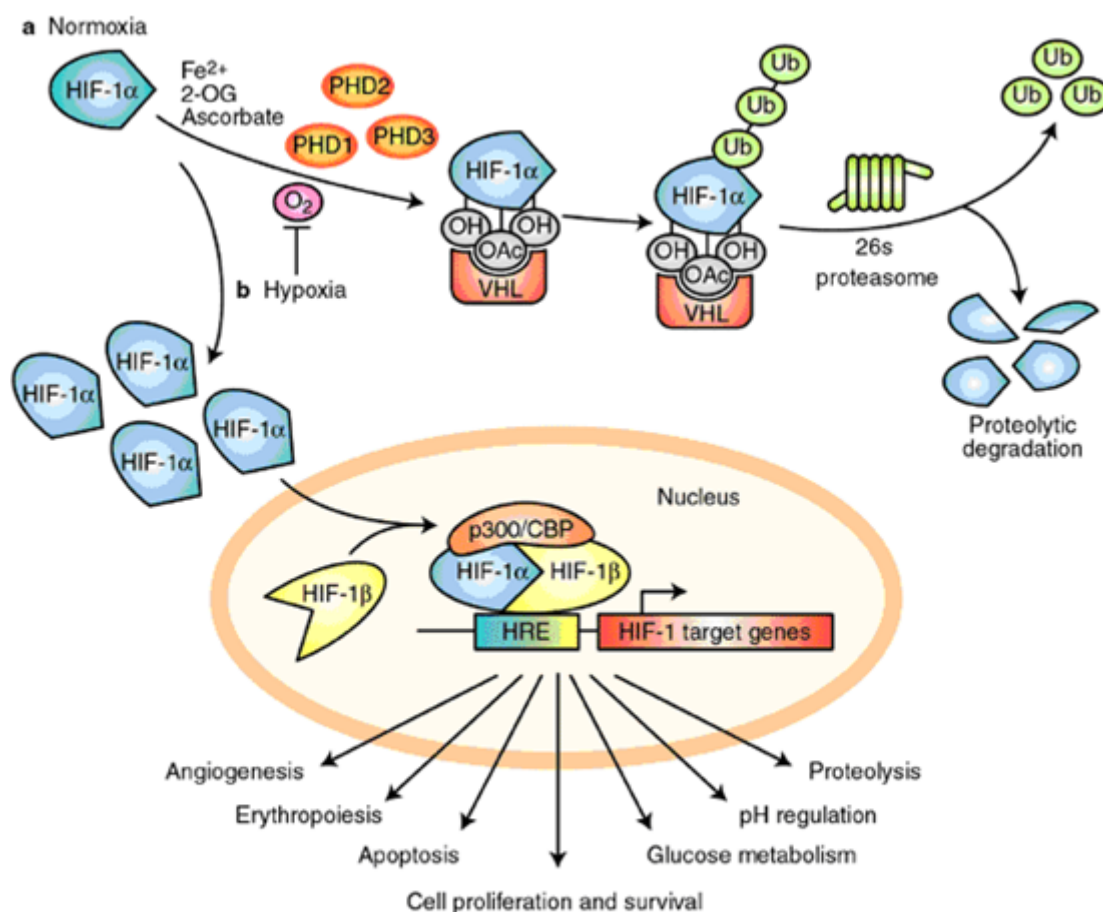
Uma das principais características dos tumores, devido seu crescimento acelerado, são hipóxia, necrose e inflamação. A hipóxia pode induzir a inflamação, e os tecidos inflamados se tornam hipóxicos. A adaptação celular à hipóxia desencadeia a transcrição do fator HIF1A (Hypoxia-inducible fator- 1 alfa), que se encontra inativado em concentrações normais de oxigênio, e ativado em condições de hipóxia. O crescimento tumoral é caracterizado por uma proliferação anárquica de células neoplásicas, e este crescimento rápido acarreta diminuição da oferta de oxigênio e nutrientes na área tumoral. A condição de hipóxia do microambiente tumoral acarreta ativação de um fator denominado HIF1A. O HIF1A é um heterodímero composto de duas unidades, HIF1 alfa (HIF1A) e HIF1 beta (HIF1B) (BENIZRI et al. 2008).

O HIF1A é um importante regulador de transcrição envolvido com controle do metabolismo energético e da adaptação ao estresse celular causada pela deficiência de oxigênio. Em condições normais de oxigenação, a subunidade HIF1A é indetectável, porém quando existe hipóxia esta subunidade se acumula e se liga à subunidade beta formando um dímero ativo. Tumores que crescem mais de 2,0 mm³ na ausência de angiogênese, apresentam escassez de oxigênio na sua parte central, resultando em apoptose celular e necrose. Níveis reduzidos de oxigênio celular são um sinal chave para a indução de angiogênese, e um dos principais fatores angiogênicos regulados pela hipóxia é o VEGF (Vascular endotelial growth fator) (BENIZRI et al. 2008).

HIF1A ativa a expressão do gene do VEGF. HIF1A e VEGF são reguladores importantes da angiogênese. O conhecimento da associação da biologia do tumor com características clínicas é fundamental para o desenvolvimento da terapia anti-angiogênica. Embora a expressão de HIF1A e VEGF tenha sido avaliada em muitos tipos de tumores, poucos estudos investigaram a importância clínica desses fatores em tumores sólidos, em particular em amostras de câncer de cólon humano (CAO et al. 2009).

O fator HIF é constituído por duas subunidades, alfa e beta, e em concentrações normais de oxigênio, ocorrem a hidroxilação de resíduos de prolina presentes na subunidade alfa por hidroxilases, criando sítios de ligação com a proteína do complexo ubiquitina-ligase E3. A ubiquitinação é um processo que ocorre no interior das células, no qual uma proteína é marcada por moléculas de ubiquitina com o objetivo de ser reconhecida e degradada por um complexo proteico citoplasmático chamado proteassoma (KAELIN e RATCLIFFE 2008; ELTZSCHIG e CARMELIET 2011). Ocorre a ligação desse complexo, descrito anteriormente, com o produto proteico do gene VHL (Von Hippel-Lindau), isso acarreta destruição da subunidade alfa pelo proteassoma, evitando assim a ligação entre as subunidades alfa e beta, que formariam um dímero ativo. (Figura 1 - Ilustrativa) (CARROLL e ASHCROFT 2005).

Em baixas concentrações de oxigênio esse mecanismo não acontece, com isso a subunidade alfa se liga à beta, formando um dímero ativo, acarretando, entre outras coisas, a produção de VEGF. HIF1A ativa a expressão do gene do VEGF, e HIF1A e VEGF são reguladores importantes da angiogênese (CAO et al. 2009).



HIF-1 α regulation by proline hydroxylation

Fonte: CARROLL e ASHCROFT (2005)

Figura 1 - Regulação de HIF-alfa através da hidroxilação de resíduos de prolina e posterior ubiquitinação.

O HIF1A além de fazer parte do mecanismo de hipóxia, tem importante papel na resposta inflamatória, principalmente na imunidade inata. A resposta inflamatória compõe-se de dois tipos de imunidade, a inata e a adquirida. A imunidade inata é a linha de defesa inicial, constituindo em mecanismos de defesa imunológica celular e molecular que já existe antes da exposição do organismo a um antígeno qualquer. Os principais componentes da resposta imunológica inata são: (1) barreiras físicas, como epitélios, (2) células fagocitárias (neutrófilos, macrófagos) e células NK (Natural

Killer), (3) proteínas de defesa, citocinas, sistema complemento. A outra forma de imunidade, denomina-se imunidade adaptativa ou adquirida, no qual o organismo é exposto inicialmente a um antígeno, e numa exposição subsequente adquire a capacidade de reconhecimento deste através de células chamadas linfócitos e de seus produtos, os anticorpos (ABBAS et al. 2008).

A inflamação é parte de uma resposta protetora mais ampla dentro da Imunidade inata, podendo ser classificada em aguda ou crônica. A inflamação aguda tem início rápido e é de curta duração, caracterizando-se por exsudação de líquidos, proteínas plasmáticas e acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos. A inflamação crônica é mais insidiosa, de longa duração e caracterizada por influxo de linfócitos, macrófagos e proliferação vascular (KUMAR et al. 2008; PEREIRA 2009).

A hipóxia, hipoglicemia, acidez e os altos níveis de radicais livres de oxigênio são características dos tecidos inflamados, juntamente com o influxo de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos. A partir destes fundamentos surge uma interdependência entre a resposta imune inata e a resposta à hipóxia, onde o HIF tem um papel central como regulador da imunidade inata em mamíferos (NIZET e JOHNSON 2009).

Células fagocitárias têm um papel essencial na defesa imunológica inata contra patógenos, e esta é uma batalha que ocorre principalmente num microambiente hipóxico. Tornou-se claro que o HIF promove a atividade bactericida das células fagocitárias e estimula a resposta imune inata das células dendríticas, mastócitos e macrófagos (MCALPINE et al. 2006).

O risco de desenvolver câncer colorretal (CCR) é significativamente maior para os pacientes com patologias crônicas decorrentes de doenças inflamatórias (RUBIN et al. 2012). Por exemplo, os pacientes com doença de Crohn ou retocolite ulcerativa têm um aumento de risco de 12-20 vezes para o desenvolvimento do CCR. Existe um conjunto de mecanismos de controle da resposta inflamatória da mucosa intestinal e dos linfonodos a antígenos e bactérias presentes nos alimentos, porém nos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal existe um defeito na regulação desta resposta imune (MCALPINE et al. 2006).

O processo inflamatório crônico está intimamente relacionado com a carcinogênese colorretal, porém este processo ainda não é completamente conhecido. Pacientes portadores de doença inflamatória intestinal apresentam um aumento excessivo de células T-CD4, que produzem Interferon- γ e fator de necrose tumoral- α , além disso, são evidenciados níveis elevados de interleucinas, sendo a IL-12 a mais expressa, sugerindo uma possível correlação entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e o desenvolvimento do CCR. Assim, o papel do sistema imunológico na carcinogênese e progressão tumoral é uma grande e crescente área de pesquisa (MCALPINE et al. 2006).

1.5 FATORES ASSOCIADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO EM TUMORES

Os PPARs (Peroxisome proliferator activated receptors) são receptores nucleares que antagonizam a atividade de transcrição de fatores envolvidos na inflamação e imunidade, tais como o fator nuclear KB (NFKB), a proteína ativadora-

1 (AP1) e o fator nuclear de células T (NFAT). Três diferentes isotipos de PPAR já foram identificados: PPARA, PPARD/PPARB e PPARG. O PPARG é expresso por monócitos, macrófagos, células T, células dendríticas, músculo esquelético, adipócitos e células do epitélio gastrointestinal, e está envolvida em vários processos, incluindo homeostase de lipídios e glicose, inflamação e diferenciação de adipócitos (FUJISAWA et al. 2008).

O PPARs compõem uma família de receptores nucleares envolvidos na regulação da resposta imune, são abundantemente expresso em células normais do epitélio do cólon, e são potenciais alvos terapêuticos para o CCR. Os níveis de PPAR modulam a inflamação e desencadeiam ações antiproliferativas e pró-apoptóticas em células epiteliais, e apresentam um papel importante na supressão tumoral. Curiosamente, PPARG é expresso por todos os tipos de células que desempenham um papel importante na patogênese da CCR, incluindo células epiteliais, células T e macrófagos (MCALPINE et al. 2006; FUJISAWA et al. 2008).

Acredita-se que existe um equilíbrio entre a β -catenina e PPARG na sinalização da manutenção da diferenciação e proliferação de células normais, sendo observado uma interrelação direta entre esses dois marcadores. A deficiência de PPARG está associado com o aumento da beta-catenina, e como já está descrito em vários trabalhos científicos, a beta-catenina constitui uma molécula de significância ímpar na etiologia do câncer de cólon. A beta-catenina desempenha duas importantes funções, tanto na regulação da adesão célula-célula, como um componente do complexo de adesão E-caderina/catenina na membrana da célula na mediação da proliferação celular através da sua expressão no citoplasma e núcleo, além de

funções adicionais de sinalização intracelular na via de sinalização WNT, e atuando como um cofator de transcrição em células T.

A inibição de PPAR γ aumenta a expressão de β -catenina, especialmente no núcleo, resultando em expressão aumentada de ciclina D1 e c-Myc, que, por sua vez, promovem proliferação das células epiteliais. Como a ciclina D1 e c-Myc atuam como fatores de aceleração da fase G1/S, parece que a ausência de PPAR γ promove a proliferação celular e tumorigênese, acelerando o ciclo celular e reforçando o efeito da β -catenina. FUJISAWA et al. (2008) demonstraram que a inibição de PPAR γ utilizando um antagonista seletivo promovia a formação de pólipos colônicos em intestino de ratos. Além disso, MCALPINE et al. (2006) relataram que a deficiência de PPAR γ aumentou o número de tumores colônicos em ratos.

Os LXRs (Liver X receptors) são receptores hormonais nucleares e estão relacionados ao metabolismo lipídico, sendo ativados por intermediários da síntese do colesterol. Eles regulam o metabolismo do colesterol e dos ácidos graxos, e se apresentam sob duas formas LXR alfa (LXRA) e beta (LXRB). Estão envolvidos na homeostase do colesterol, atuando diretamente no seu metabolismo, evitando a sua sobrecarga no meio intracelular. São reguladores chave no armazenamento de energia através dos ácidos graxos e triglicerídeos no tecido adiposo e fígado, onde são altamente expressos. Os LXRs atuam das seguintes formas: 1. inibição da absorção intestinal do colesterol; 2. promoção da incorporação do colesterol em lipoproteínas de alta densidade; 3. estímulo do transporte reverso do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado; e 4. ativação da conversão do colesterol em sais biliares no fígado (ULVEN et al. 2005; WÓJCICKA et al. 2007).

Os receptores LXRs apresentam potencial efeito na via da carcinogênese colorretal, ativando a supressão da beta-catenina, sendo assim protetores no surgimento desse tipo de tumor. Esses receptores surgem também como importantes reguladores da resposta inflamatória inata, agindo na diminuição da resposta inflamatória. Sabe-se que os receptores LXRs diminuem a liberação de IL e TNF pelos macrófagos (BENSINGER e TONTONNOZ 2008). Alguns estudos mostram diminuição do crescimento tumoral em câncer de mama e próstata quando se usou agonista sintéticos de LXRs, os quais promoviam apoptose da células tumorais (CHUU et al. 2007). Atualmente, existem poucos trabalhos na literatura relacionando câncer de cólon e receptores LXRs.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a expressão de biomarcadores associados à hipóxia (HIF1A, VEGF) e ao metabolismo lipídico (PPARG, LXRA e LXRΒ) em amostras de tumor de pacientes portadores de câncer de cólon estádios II e III.

2.2 OBJETVO SECUNDÁRIO

Avaliar o possível impacto da expressão de HIF1A, VEGF, PPARG, LXRA e LXRΒ na sobrevida global e livre de recidiva de pacientes portadores de câncer de cólon tratados com cirurgia associada ou não à quimioterapia adjuvante.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Realizamos um estudo de coorte retrospectivo envolvendo 200 pacientes com diagnóstico de carcinoma de cólon e reto alto, sendo 100 pacientes estágio II, e 100 estágio III, operados no núcleo de tumores colorretais do departamento de cirurgia pélvica do Hospital A.C. Camargo no período compreendido entre 1990 a 2004; Foram excluídos 99 pacientes, por material insuficiente em blocos de parafina, tratados em outras instituições, portadores de câncer colorretal hereditário ou doença inflamatória intestinal.

Os dados foram coletados de prontuários junto ao serviço de arquivo médico e estatística (SAME) desta instituição, através de um questionário desenvolvido para este projeto (Anexo1). Os dados obtidos foram organizados em um banco de dados, utilizando o programa Microsoft Excel 2007.

O estágio clínico II de alto risco foi definido pela presença de pelo menos um dos seguintes fatores:

- pT4;
- CEA pré-operatório maior que 10 ng/ml;
- grau de diferenciação II ou III;
- presença de embolização linfática;
- presença de invasão perineural;
- presença de embolização vascular sanguínea.

3.1.1 Critérios de Inclusão

Todos os pacientes incluídos no estudo obedeceram aos seguintes critérios de elegibilidade:

- a) confirmação histológica de adenocarcinoma de cólon ou reto alto, considerou-se reto alto localização a partir de 8,0 cm acima da linha pectínea;
- b) estágio patológico (pTNM) III ou;
- c) estágio patológico (pTNM) II.
- d) disponibilidade de material conservado em parafina para estudo imunoistoquímico.
- e) tratamento exclusivo em nossa instituição.

3.1.2 Critérios de Exclusão

Foram considerados inelegíveis para o estudo os pacientes:

- a) portadores de doença inflamatória intestinal;
- b) com tumores primários de reto médio ou baixo, sendo considerados reto médio ou baixo localização até a distância de 8,0 cm acima da linha pectínea;
- c) tratados com radioterapia;
- d) portadores de câncer colorretal hereditário.

3.2 VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E TERAPÊUTICAS

- Idade: arbitrariamente agrupada em duas categorias (igual ou maior que 65 anos e menor que 65 anos);
- Gênero: masculino ou feminino;
- Localização: cólon ou reto alto. Definida pela descrição do exame endoscópico anotado no prontuário médico. Considerado reto o segmento até 12 cm acima da linha pectínea (NELSON et al. 2001);
- Tipo de cirurgia: ressecções segmentares clássicas e ampliadas. Definiu-se como ressecção ampliada a retirada do órgão acometido (segmento do cólon ou reto alto), em monobloco com outros órgãos ou estruturas adjacentes aderidos ao tumor;
- Realização de quimioterapia adjuvante com 5FU e leucovorin: sim ou não;
- Nível sérico pré-operatório do antígeno carcinoembrionário (CEA): variável obtida a partir de anotação nos prontuários médicos.

3.3 VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS

- Estadiamento TNM: utilizou-se a classificação TNM com base nos dados obtidos dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos. A classificação foi feita de acordo com a edição do TNM, proposta pelo AJCC (GREENE et al. 2002), período em que os pacientes foram operados. Não foi aplicada a última edição do AJCC de 2010, devido ter sido acrescentados novos critérios de estadiamento, como nódulo satélite

subseroso, com isso nossos pacientes não podem ser re-estadiados;

- Grau de diferenciação: utilizou-se a classificação padronizada no departamento de anatomia patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, que segue a classificação preconizada por Broders (1925), citado por SHAMPO (2001, p.5), adaptada para três categorias: grau 1: bem diferenciado; grau 2: moderadamente diferenciado; grau 3: pouco diferenciado. Para fins de análise estatística, optamos por agrupar os graus 2 e 3 em uma única categoria. Esta variável foi obtida a partir da descrição dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos;
- Invasão perineural: presença ou ausência. Variável obtida a partir da descrição dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos;
- Embolização vascular linfática: presença ou ausência. Variável obtida a partir da descrição dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médicos;
- Embolização vascular sanguínea: presença ou ausência. Variável obtida a partir da descrição dos laudos anatomopatológicos arquivados nos prontuários médico;
- Invasão perineural, caracterizada quando ocorre invasão pelas células do tumor maligno do espaço ao redor do nervo;
- Embolização vascular linfática, caracterizada pela invasão das células dos tumores malignos no espaço vascular linfático, sendo capazes de formarem êmbolos e entrarem na circulação linfática;
- Embolização vascular venosa, caracterizada pela invasão das células dos

tumores malignos no espaço vascular sanguíneo, sendo capazes de formarem êmbolos e entrarem na circulação sanguínea, sendo capazes de estabelecerem lesões metastáticas.

3.4 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE MARCADORES ASSOCIADOS À HIPÓXIA E AO METABOLISMO LIPÍDICO

- Determinação da expressão imunoistoquímica de HIF1A;
- Determinação da expressão imunoistoquímica de VEGF;
- Determinação da expressão imunoistoquímica de PPRAG;
- Determinação da expressão imunoistoquímica de LXRA;
- Determinação da expressão imunoistoquímica de LXR β .

3.5 MÉTODOS

3.5.1 Construção dos *Tissue Microarray* (TMA)

Os blocos representativos dos tumores dos casos selecionados para este estudo foram resgatados do arquivo do departamento de anatomia patológica. Novos cortes histológicos foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE). Através do exame de microscopia óptica, as áreas representativas do tumor foram identificadas e marcadas. Procedeu-se então a marcação do bloco de parafina (bloco doador) na área escolhida, com caneta permanente. Utilizando o *tissue microarrayer* (BeecherInstrument, Silver Spring, MD, USA) foram extraídos os cilindros das áreas marcadas, e os mesmos transferidos para novos blocos de parafina (bloco

receptor). Cada caso foi representado em duplicata, com a obtenção de dois cilindros de 1,0 mm cada, de duas áreas distintas e representativas do tumor. Cortes histológicos destes blocos foram obtidos e dispostos em lâminas adequadas para posterior realização dos estudos com imunoistoquímica.

Sistema de coordenadas, a partir de tabelas em “Microsoft Office Excel 2007” foi utilizado para a determinação e identificação exata dos casos no TMA, tendo como referência a posição número 1 ocupada pelo cilindro de tecido hepático.

3.5.2 Imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram realizadas utilizando-se o protocolo do laboratório de imunoistoquímica do departamento de anatomia patológica do Hospital A.C. Camargo (Anexo 2).

Os anticorpos pesquisados com suas diluições, marcas, padrão de marcação e controles podem ser vistos na Tabela 1.

Quadro 3 - Anticorpos utilizados na imunoistoquímica.

Anticorpos	Clone	Origem	Diluição	Controle	Padrão de Expressão
LXR alfa	PPZ0412	Abcam cat ab41902, Cambridge, MA, EUA	1:1000	Cólon normal	Nuclear
LXR beta	K8917	Perseus Proteomics cat PPK8917-10 California, EUA	1:1600	Cólon normal	Nuclear
PPAR gama	H1a67	Neomarkers cat MS1164, Fremont, CA, EUA	1:100	Pulmão normal	Nuclear
HIF 1 ^a	Policlona 1	Abcam cat ab59256	1:50	Tumor de mama	Citoplasmático e Nuclear
VEGF	VG1	Cambridge, MA, EUA Dako cat M7273 Tokyo, Japão	1:100	Tonsila	Citoplasmático

A interpretação das reações imunoistoquímicas foi realizada em microscópio óptico comum e foi analisada a marcação citoplasmática ou nuclear, de acordo com o padrão específico para cada anticorpo pesquisado. Foi utilizado um sistema de escore considerando a intensidade da marcação e a quantidade de células marcadas.

A intensidade de marcação foi avaliada, utilizando-se a seguinte graduação:

- **0:** sem reação detectável;
- **1:** marcação fraca ou discreta;
- **2:** marcação de moderada intensidade;
- **3:** marcação forte.

A porcentagem das células marcadas pelos anticorpos específicos foi dividida em cinco graus de acordo com a porcentagem de células marcadas, a saber:

- **0:** sem reação detectável
- **1:** positividade em menos de 25% das células
- **2:** positividade em 25-50% das células
- **3:** positividade em 50-75% das células
- **4:** positividade em mais de 75% das células

O escore final foi obtido através da somatória das duas graduações. Sendo negativos os casos com escore máximo de 2, positivo fraco os casos com escore 3, positivo moderado os casos com escore 4-5 e positivo forte os casos com escore 6 -7. Para as análises estatísticas de associação entre as variáveis estratificamos os casos para todos os marcadores imunoistoquímicos em 2 grupos: negativos (com escore até 2) e positivos (com escore 3 ou mais).

Todas as análises foram realizadas por um único patologista com experiência

em tumores gastrointestinais (Dra. Maria Dirlei Begnami), e as lâminas foram revisadas para confirmação do diagnóstico anatomopatológico.

3.5.3 Seguimento dos Pacientes

O acompanhamento dos pacientes foi em consultas ambulatoriais: trimestrais, nos primeiros dois anos após a cirurgia, e semestral, do terceiro ao quinto ano. A partir do quinto ano, anuais. As avaliações periódicas incluíam anamnese, exame físico sistemático e toque retal. O exame laboratorial CEA sérico trimestrais, nos primeiros dois anos após a cirurgia, e semestrais, do terceiro ao quinto ano. A partir do quinto ano, anuais. Radiografia de tórax foram feitas a cada 6 meses nos primeiros 2 anos, após anualmente. Tomografia do abdômen foram feitas a cada 6 meses nos primeiros 2 anos, após anualmente. Colonoscopia foram feitas no primeiro, terceiro e quinto anos após a cirurgia.

Segundo o seguimento, os pacientes foram classificados nas seguintes categorias:

- a) vivos sem câncer;
- b) vivos com câncer;
- c) óbitos pelo câncer;
- d) óbitos por outras causas;
- e) perdidos no seguimento.

3.5.4 Análise Estatística

As informações obtidas nos prontuários foram transcritas em uma ficha padronizada (Anexo 1) e digitadas em um banco de dados com auxílio do programa

“Microsoft Office Excel 2007”. Para análise estatística usou-se o programa estatístico STATA versão 7.0.

A distribuição das variáveis referentes às características demográficas, clínicas, laboratoriais, anatomopatológicas, tratamento e expressão imunoistoquímica de marcadores associados à hipóxia e ao metabolismo lipídico foi apresentada em forma de tabelas de contingência.

Foi usada análise estatística descritiva para caracterização da amostra. A distribuição de frequências foi utilizada para descrever as variáveis categóricas e as medidas de tendência central e de variabilidade para as numéricas ou contínuas. O teste de qui-quadrado foi utilizado para comparar as variáveis categóricas em tabelas de contingências e em tabelas 2 x 2. Quando pelo menos uma frequência esperada foi menor do que 5, o teste exato de Fisher foi aplicado para verificar as associações.

O teste t de student ou de Mann-Whitney foi empregado para comparação entre variáveis contínuas. Empregamos ANOVA ou Kruskal-Wallis para comparação de variáveis contínuas de múltiplos grupos.

A sobrevida foi estimada por meio do cálculo atuarial, pelo método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas, pelo teste de log-rank. Na análise multivariada para sobrevida global, usou-se o modelo de regressão de COX calculando-se as razões de risco proporcional para óbito.

A sobrevida global foi calculado como o período entre o início do tratamento e a data da ocorrência do óbito decorrente de qualquer motivo ou a data da última observação objetiva (para os pacientes vivos nesta data). Os pacientes vivos na data da ultima observação foram considerados como sob censura para a curva de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier ou para utilização da regressão de COX.

O tempo de seguimento foi o período entre a data da cirurgia até a data do óbito, e para os casos censurados foi a data da última informação. Para estimar a sobrevida livre de recidiva, considerou-se o período livre de recidivas como sendo o tempo decorrido da data da cirurgia até o diagnóstico de recidiva (local ou à distância).

Análise multivariada foi empregada para predição do impacto combinado de variáveis independentes na sobrevida usando-se o modelo de Cox com riscos proporcionais. O nível de significância de 5% ($p < 0.05$) foi considerado em todos os testes estatísticos. O programa estatístico de computador STATA versão 7.0 foi utilizado para a realização das análises estatísticas.

4 RESULTADOS

4.1 COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

Dentre 200 pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo por câncer de cólon e reto alto no período de janeiro de 1990 a agosto de 2004, 101 casos foram elegíveis para o estudo, sendo a principal causa de exclusão dos 99 pacientes a perda das lâminas de parafina, seguido por outros motivos, como CCR hereditário e doença inflamatória intestinal

4.2 DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, LABORATORIAIS E TERAPEUTICOS

Para os 101 pacientes estudados, a idade variou de 29 a 91 anos, com mediana de 66,0 anos. Dentre eles, 51 (50,5%) tinham mais que 65 anos.

32 pacientes eram homens (31,7%) e 69, mulheres (68,3%).

A queixa clínica mais frequente foi sangramento (32%). Somente 2 pacientes não relataram queixa clínica (2,4%). A duração mediana desta queixa clínica foi de 3 meses, com média de 5,5 meses (Desvio padrão 8,5).

Quanto à topografia, 71 pacientes possuíam tumores nos cólons (70,3%) e 30, no reto alto (29,7%). A localização mais frequente do tumor foi no sigmóide (30,7%), seguida pelo reto alto (29,7%).

Com relação ao marcador tumoral CEA (Antígeno carcinoembrionário), 42

pacientes (57,5%) apresentaram um valor de menor que 5 ng/ml, 8 pacientes (11%), tinham valor entre 5 e 10 ng/ml, e 23 pacientes (31%) tinham CEA maior que 10 ng/ml. Considerando o valor de referência do CEA normal 5 ng/ml, 42 pacientes (57,5%) tinham CEA normal, e 31 pacientes (42,5%) tinham CEA aumentado. Para o outro marcador tumoral CA 19.9, considerando o valor normal de referência 37 ng/ml, obtemos os seguintes resultados, 46 pacientes (80,7%) apresentaram um valor normal menor que 37 ng/ml, e 11 pacientes (19,3%) apresentaram um valor aumentado maior que 37 ng/ml.

A Retossigmoidectomia e anastomose colorretal foi a cirurgia mais realizada (49,5%), seguida de colectomia direita (23,8%). O tipo de cirurgia menos frequente foi a transversectomia (5%).

54 pacientes fizeram quimioterapia adjuvante (53,5%), e 47 (46,5%) não a realizaram. O esquema de quimioterapia mais utilizado foi 5-fluorouracil e leucovorin (48%).

O tempo de seguimento variou de 10 dias até 237 meses, com mediana de 77 meses, e média de 78,1 meses, com desvio padrão 44,8 meses. O tempo para ocorrência de recidivas variou de 7,4 a 62,8 meses, com mediana de 21 meses e média de 24,5 meses. A situação desses pacientes no final do estudo: vivo sem doença (54%), vivo com doença (1%), óbito por outras causas (6,9%), óbito por câncer (26,7%), e foram perdidos de seguimento 11 casos (10,9%).

As recidivas não ocorreram em 74 pacientes (73,3%). Ocorreram recidiva local em 5 pacientes (5%), recidiva local e à distância associadas em 3 pacientes (3%) e recidiva à distância em 19 pacientes (18,9%). O tipo de recorrência mais comum foi à distância (18,8%), sendo fígado o órgão mais acometido (8,9%),

seguido pelo pulmão (7,9%).

A Tabela 1 mostra as frequências das variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais, e a Tabela 2, as variáveis terapêuticas e seguimento, entre os 101 pacientes do nosso estudo.

Tabela 1 - Distribuição da casuística de acordo com variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais.

Variável	Categoria	N (%)
Gênero	Masculino	32 (31,7)
	Feminino	69 (68,3)
Idade (anos)	N	101
	Variação	29 – 91
	Mediana	66,0
	Média (Desvio Padrão)	62,2 (13,5)
Queixa clínica	Sem queixa	2 (2,5)
	Dor	13 (16,2)
	Sangramento	27 (33,8)
	Alteração do Habito intestinal	6 (7,5)
	Anemia	3 (3,8)
	Abdômen Agudo	2 (2,5)
	Massa Palpável	2 (2,5)
	Ignorado	3 (3,6)
	Dor e Sangramento	2 (2,5)
	Dor e Alteração do Habito intestinal	3 (3,8)
	Sangramento e Muco	1 (1,2)
	Sangramento e Alt. Habito intestinal	7 (8,8)
	Outros	12 (15,0)
Topografia	Cólon	71 (70,3)
	Reto	30 (29,7)
CEA	$\leq 5,0$	42 (57,5)
	5,1 – 10,0	8 (11,0)
	$> 10,0$	23 (31,4)
CA19.9	N	57
	Variação	0,4 – 1077,0
	Mediana	14,0
	Média (Desvio Padrão)	49,0 (151,9)
CA19.9	$\leq 37,0$	46 (80,7)
	$> 37,0$	11 (19,3)

Tabela 2 - Distribuição da casuística de acordo com terapêutica e seguimento.

Variável	Categoria	N (%)
Tipo de cirurgia	Colectomia direita	24 (23,8)
	Transversectomia	5 (5,0)
	Colectomia esquerda	11 (10,9)
	Retossigmoidectomia	50 (49,5)
	Ressecção ampliada	11 (10,9)
Quimioterapia adjuvante	Não	47 (46,5)
	Sim	54 (53,5)
Esquema de quimioterapia	Sem quimioterapia	47 (47,0)
	5 FU + LV (6 ciclos)	48 (48,0)
	5 FU + Levamisole (12 ciclos)	2 (2,0)
	Outros esquemas	3 (3,0)
Status	Vivo sem doença	55 (54,5)
	Vivo com doença	1 (1,0)
	Óbito outras causas	7 (6,9)
	Óbito pela doença	27 (26,7)
	Perdido de vista	11 (10,9)
Sítio das recidivas	Sem recidiva	74 (73,3)
	Recidiva local	5 (5,0)
	Recidiva local edistância	3 (3,0)
	Recidiva à distancia	18 (18,8)
	Fígado	9 (8,9)
	Pulmão	8 (7,9)

4.3 VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS

Quanto ao estadiamento patológico, 49 casos foram classificados como estágio II (48,5%) e 52, como estágio III (51,5%). A Tabela 3 resume a distribuição dos pacientes de acordo com características anatomopatológicas do tumor.

Quanto ao grau histológico de diferenciação, 23 tumores foram considerados bem diferenciados (23%); 74, moderadamente diferenciados (74%); 3, pouco diferenciados (3,0%). Diante do pequeno número de tumores classificados como pouco diferenciados, agrupou-se esta classe com os tumores moderadamente

diferenciados, constituindo uma única categoria que foi chamada de alto grau. Assim, 23 tumores (23%) foram considerados de baixo grau e 77 (77%) foram considerados de alto grau.

Quanto à embolização vascular sanguínea de células neoplásicas, estava presente em 15 casos (14,8%) e ausente em 86 casos (85,2%).

Detectou-se embolização vascular linfática de células neoplásicas em 26 casos (25,7%), estando ausente em 75 (74,3%) espécimes.

No que se refere à invasão perineural, estava presente em 21 casos (20,8%) e ausente em 80 (79,2%).

Tabela 3 - Distribuição da casuística de acordo com as variáveis anatomopatológicas.

Variável	Categoria	N (%)
Estádio T	T2	7 (6,9)
	T3	50 (49,5)
	T4	44 (43,6)
Estádio N	N0	49 (48,5)
	N1	36 (35,6)
	N2	16 (15,8)
Estádio patológico geral	EC II	49 (48,5)
	EC III	52 (51,5)
Estádio patológico específico	EC IIA	23 (22,8)
	EC IIB	26 (25,7)
	EC IIIA	6 (5,9)
	EC IIIB	30 (29,7)
	EC IIIC	16 (15,8)
Grau histológico	Baixo grau	23 (23,0)
	Alto grau	77 (77,0)
Tipo do grau	Bem diferenciado	23 (23,0)
	Moderadamente	74 (74,0)
	Pouco diferenciado	3 (3,0)
Embolização sanguínea	Não	86 (85,2)
	Sim	15 (14,8)
Invasão perineural	Não	80 (79,2)
	Sim	21 (20,8)
Embolização linfática	Não	75 (74,3)
	Sim	26 (25,7)

4.4 DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA DE ACORDO COM OS MARCADORES TUMORAIS E MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS ASSOCIADOS À HIPÓXIA E AO METABOLISMO LIPÍDICO

Com relação ao marcador tumoral CEA, 42 pacientes (57,5%) apresentavam um valor de CEA menor que 5,0 ng/ml, 8 pacientes (11%), tinham valor entre 5,0 e 10 ng/ml, e 23 pacientes (31%) tinham CEA maior que 10 ng/ml. Considerando o valor de referência de CEA normal de 5,0 ng/ml, 42 pacientes (57,5%) tinham CEA normal, e 31 pacientes (42,5%) tinham CEA aumentado.

Com relação ao marcador tumoral C19.9, 46 pacientes (80,7%) apresentavam um valor de C19.9 normal (menor que 37,0 ng/ml), e 11 pacientes (19,3%), tinham valor do marcador maior 37,0 ng/ml, considerado aumentado.

Com relação à expressão imunoistoquímica de VEGF, 18 pacientes (17,8%) apresentavam tumores negativos para VEGF, enquanto que 43 tumores (42,6%) apresentavam expressão positiva fraca de VEGF, 35 (34,6%) apresentavam expressão positiva moderada de VEGF e 5 (4,9%) apresentavam expressão positiva forte de VEGF (Tabela 4).

Com relação à expressão imunoistoquímica de HIF1A, 27 tumores (26,7%) foram negativos para HIF1A, enquanto que 33 (32,7%) apresentavam expressão positiva fraca de HIF1A, 39 (38,6%) apresentavam expressão positiva moderada de HIF1A e 2 (1,9%) apresentava expressão positiva forte (Tabela 4).

Com relação à expressão imunoistoquímica de PPRAG, 58 tumores (57,4%) foram negativos para PPARG, enquanto que 27 (26,7%) apresentavam expressão

positiva fraco, 16 (15,8%) apresentavam expressão positiva moderado (Tabela 4).

Com relação à expressão imunoistoquímica de LXRA, 66 tumores (65,3%) foram negativos para LXRA, enquanto que 19 (18,8%) apresentam expressão positiva fraco, 13 (12,9%) apresentam expressão positiva moderado, e 3 (2,9%) apresenta expressão positivo forte (Tabela 4).

Com relação à expressão imunoistoquímica de LXRБ, 3 tumores (3,0%) foram negativos para LXRБ, enquanto que 19 (18,8%) apresentam expressão positiva fraco, 46 (45,5%) apresentam expressão positiva moderado, e 33 (32,7%) apresenta expressão positivo forte (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição da casuística de acordo com a expressão imunoistoquímica de marcadores associados à hipóxia e ao metabolismo lipídico nas amostras dos tumores.

Variável	Categoria / Medidas	N (%)
VEGF	Negativo	18(17,8)
	Positivo fraco	43(42,6)
	Positivo moderado	35(34,6)
	Positivo forte	5(4,9)
HIFА	Negativo	27(26,7)
	Positivo fraco	33(32,7)
	Positivo moderado	39(38,6)
	Positivo forte	2 (1,9%)
PPARG	Negativo	58(57,4)
	Positivo fraco	27(26,7)
	Positivo moderado	16(15,8)
LXRA	Negativo	66(65,3)
	Positivo fraco	19(18,8)
	Positivo moderado	13(12,9)
	Positivo forte	3(2,9)
LXRБ	Negativo	3(3,0)
	Positivo fraco	19(18,8)
	Positivo moderado	46(45,5)
	Positivo forte	33(32,7)

As figuras abaixo mostram adenocarcinoma intestinal corado por HE e tumores negativos e com expressão imunohistoquímica positiva para os marcadores associados à hipóxia (HIF1A, VEGF) e ao metabolismo lipídico (PPARG, LXRA, LXRβ).

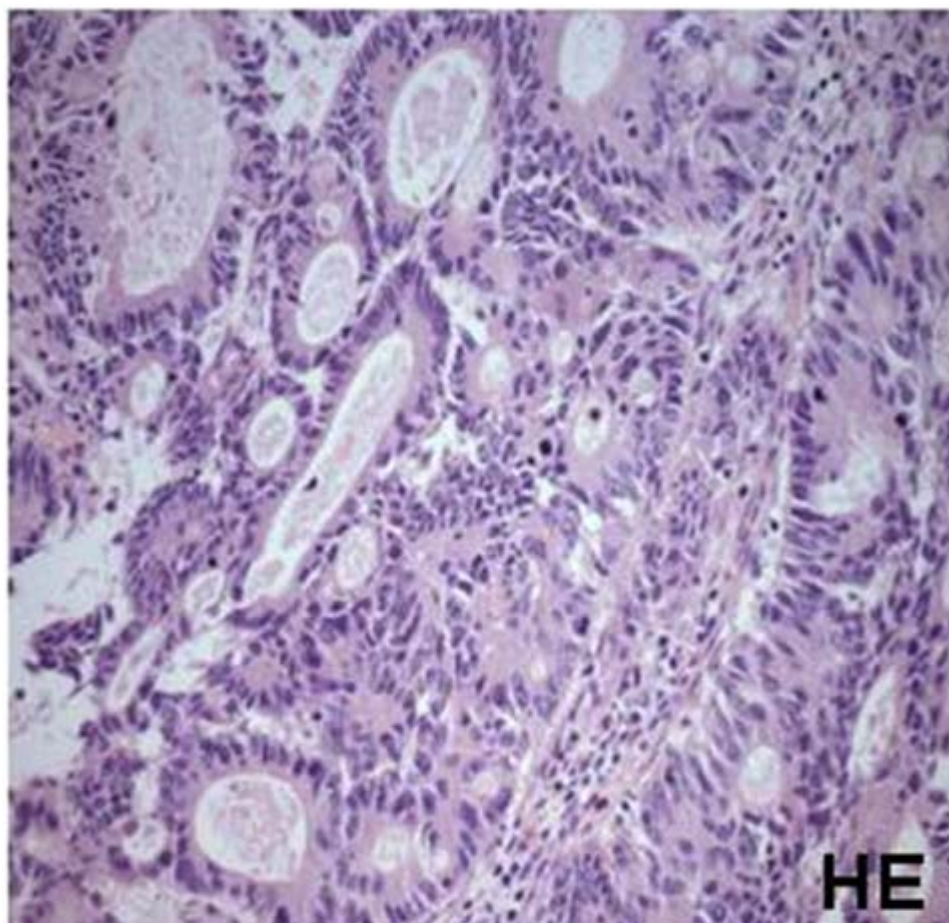


Figura 2 - Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal corado pelo HE (aumento 20x).

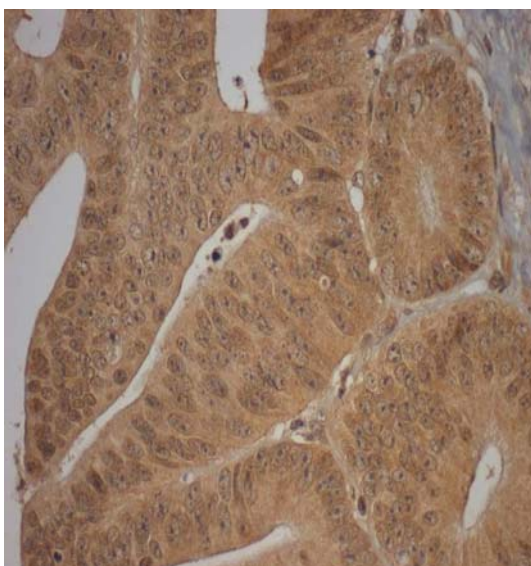


Figura 3 - Fotomicrografia de intestinal com expressão positiva predominantemente citoplasmática e focalmente nuclear de HIF1A.

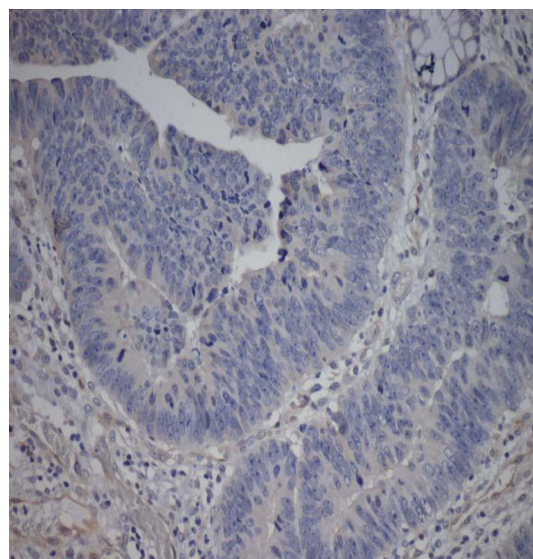


Figura 4 - Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com tumor negativo para HIF1A (aumento 20x).

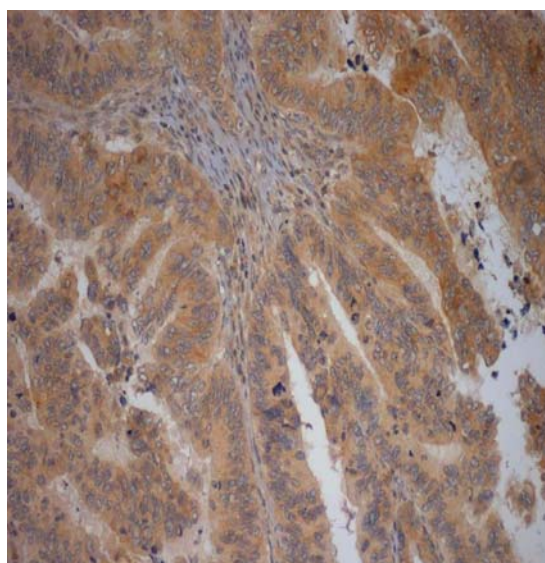


Figura 5 - Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com expressão positivacitoplasmática de VEGF (aumento 20x)

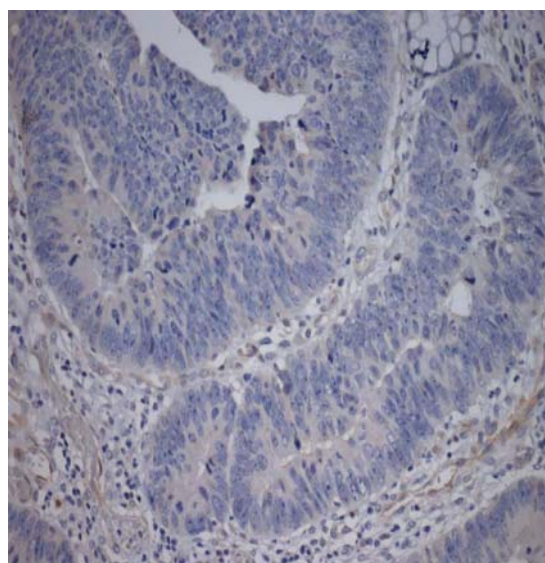


Figura 6 - Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com tumor negativo para VEGF aumento 20x).

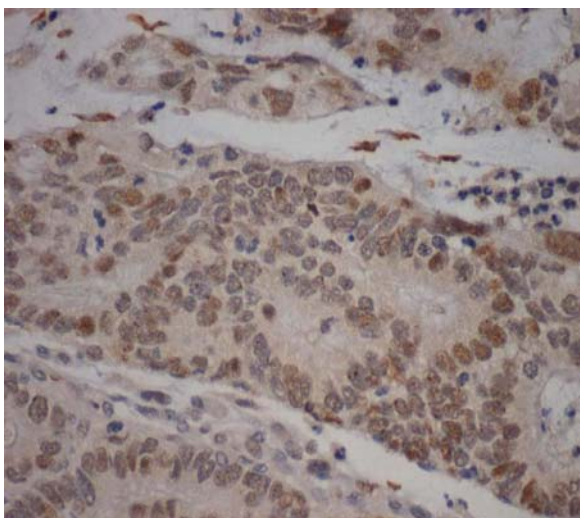


Figura 7 - Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com expressão positiva nuclear de PPARG (aumento 40x).

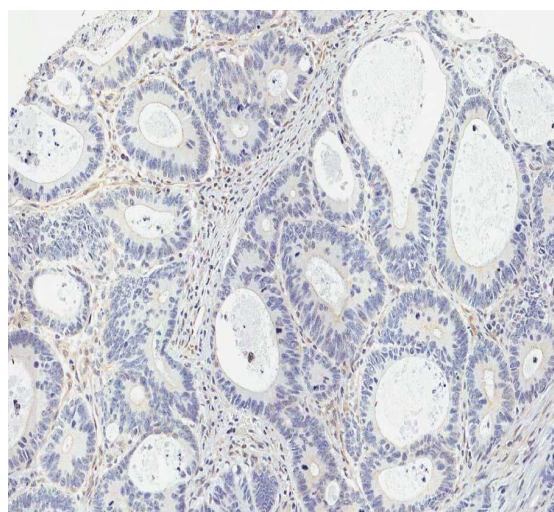


Figura 8 - Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com tumor negativo para PPARG (aumento 20x).

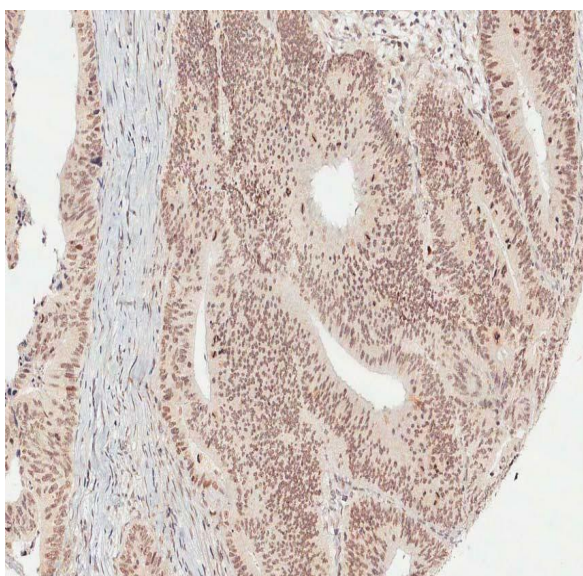


Figura 9 - Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com expressão positiva de LXRA (aumento 20x).

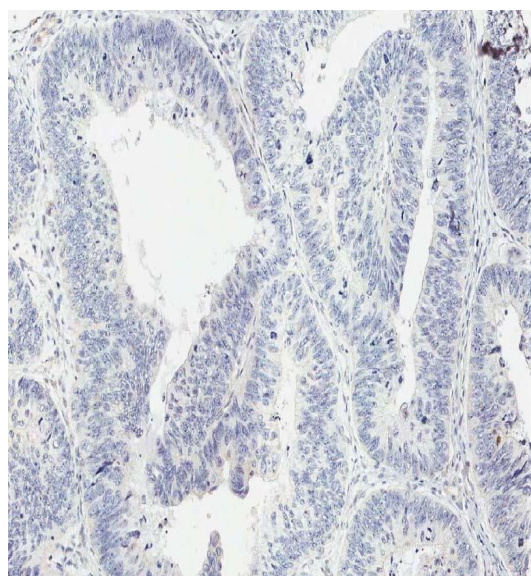


Figura 10 - Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com tumor negativo para LXRA (aumento 40x).

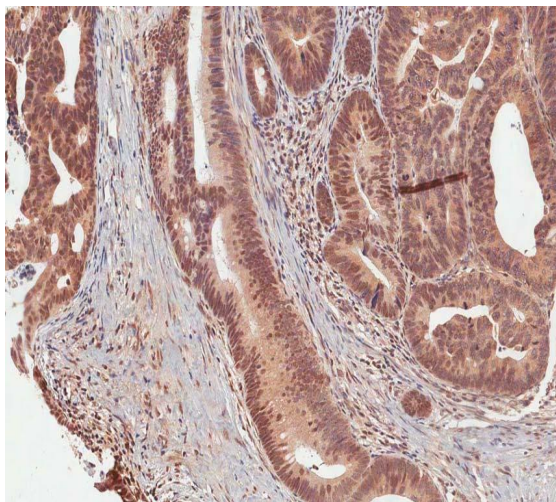


Figura 11 - Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com expressão positiva nuclear para LXRβ (aumento 20x).

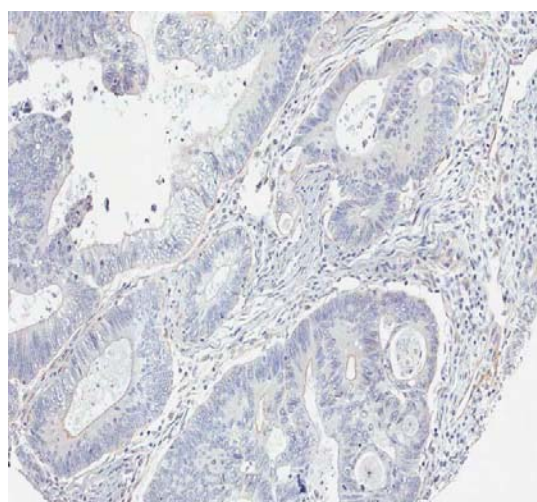


Figura 12 - Fotomicrografia de adenocarcinoma intestinal com tumor negativo para LXRβ (aumento 40x).

4.5 TESTE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS

Ao descrevermos a associação das variáveis de acordo com a expressão positiva ou negativa de VEGF, observamos associação estatisticamente significativa entre VEGF e embolização vascular sanguínea, onde 6 pacientes (33,3%) que apresentavam VEGF negativos apresentavam embolização vascular sanguínea presente, e 72 pacientes (88,9%) que eram positivos não tinham embolização vascular sanguínea presente ($p=0,028$) (Tabela 5). Não foi observado nenhuma outra associação estatisticamente significativa entre VEGF e as demais variáveis (Tabelas 5 e 6).

Ao descrevermos a associação das variáveis de acordo com a expressão positiva ou negativa de HIF1A de acordo com as variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas (Tabelas 7), observou-se associação estatisticamente significativa com a faixa etária, onde 66,7% dos pacientes com tumores negativos para HIF1A tinham

mais de 65 anos de idade, e 69,7 dos pacientes cujos tumores tinham expressão positiva de HIF1A tinham idade inferior a 65 anos, e observamos, também que 55 (76,4%) dos pacientes com expressão positiva para HIF1A eram do sexo feminino ($p=0,018$) e 18 (66,7%) dos tumores negativos para HIF1A tinham idade superior a 65 anos ($p=0,049$) (Tabela 7).

Na Tabela 8, podemos observar que 57 tumores (79,2%) com expressão positiva de HIF1A apresentam embolização linfática ($p=0,045$).

Ao descrevermos a associação das variáveis clínicas e demográficas de acordo com a expressão positiva ou negativa de PPARG, observou-se associação estatisticamente significativa da expressão dessa proteína com a faixa etária, onde 37 (63,8%) dos pacientes cujos tumores eram negativos para PPARG tinham mais de 65 anos de idade, e 28 (71,8 %) dos pacientes cujos tumores eram positivos para PPARG tinham idade inferior a 65 anos ($p=0,001$) (Tabela 9). Não foi observado nenhuma outra associação estatisticamente significativa entre PPARG e demais variáveis clínicas, demográficas e terapêuticas (Tabela 9). Ao descrevermos a associação com variáveis anatomopatológica, não observou-se associação estatisticamente significativa da expressão dessa proteína (Tabela 10).

Ao descrevermos a associação das variáveis de acordo com a expressão de LXRA, não foi observado nenhuma associação estatisticamente significativa entre LXRA e as variáveis. demográficas, clínicas, terapêuticas e anatomopatológicas (Tabelas 11 e 12).

Ao descrevermos a associação das variáveis de acordo com a expressão de LXR β , observou-se uma associação estatisticamente significativa ($p=0,023$) com a topografia do tumor, onde 100 % dos pacientes com tumor de reto alto apresentavam

tumores negativos para LXRb, e 72,9% dos pacientes com expressão positivo de LXRb, tinham topografia em cólon (Tabela 13). Não foi observado nenhuma outra associação estatisticamente significativa entre LXRb e as demais variáveis (Tabela 14).

Tabela 5 - Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas de acordo com a expressão de VEGF.

Variável	Categoria	VEGF		p-valor
		Negativo N (%)	Positivo N.(%)	
Gênero	Masculino	4 (22,2)	26 (32,1)	0,410
	Feminino	14 (77,8)	55 (67,9)	
Faixa etária (anos)	≤ 65	7 (38,9)	42 (51,8)	0,320
	> 65	11 (61,1)	39 (48,2)	
Localização	Colon direito	4 (22,2)	18 (22,2)	NA
	Transverso	0 (0,0)	10 (12,4)	
	Colon esquerdo	0 (0,0)	7 (8,6)	
	Sigmóide	6 (33,3)	25 (30,9)	0,118
	Reto	8 (44,4)	21 (25,9)	
	Colon	10 (55,6)	60 (74,1)	
Topografia	Reto	8 (44,4)	21 (25,9)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA = não avaliável estatisticamente

Tabela 6 - Distribuição das características anatomopatológicas do tumor de acordo com a expressão de VEGF.

Variável	Categoria	VEGF		p-valor
		Negativo N (%)	Positivo N (%)	
Estádio T	T2	1 (5,6)	6 (7,4)	NA
	T3	9 (50,0)	39 (48,2)	
	T4	8 (44,4)	36 (44,4)	
Estádio N	N0	8 (44,4)	40 (49,4)	NA
	N1	7 (38,9)	28 (34,6)	
	N2	3 (16,7)	13 (16,0)	
Estádio geral	EC II	8 (44,4)	40 (49,4)	0,705
	EC III	10 (55,6)	41 (50,6)	
Grau histológico	Baixo grau	6 (33,3)	17 (21,2)	0,355 *
	Alto grau	12 (66,7)	63 (78,8)	
Embolização sanguínea	Não	12 (66,7)	72 (88,9)	0,028 *
	Sim	6 (33,3)	9 (11,1)	
Embolização neural	Não	16 (88,9)	62 (76,5)	0,347 *
	Sim	2 (11,1)	19 (23,5)	
Embolização linfática	Não	15 (83,3)	58 (71,6)	0,386 *
	Sim	3 (16,7)	23 (28,4)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA = não avaliável estatisticamente

Tabela 7 - Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas de acordo com a expressão de HIF1A.

Variável	Categoria	HIF1A		p-valor
		Negativo N (%)	Positivo N (%)	
Gênero	Masculino	13 (48,2)	17 (23,6)	0,018
	Feminino	14 (51,8)	57 (76,4)	
Faixa etária (anos)	≤ 65	9 (33,3)	41 (55,6)	0,049
	> 65	18 (66,7)	33 (44,4)	
Localização	Cólon direito	7 (25,9)	16 (20,8)	NA
	Transverso	2 (7,4)	8 (11,1)	
	Cólon esquerdo	0 (0,0)	7 (9,7)	
	Sigmóide	9 (33,3)	22 (30,6)	
	Reto	9 (33,3)	21 (27,8)	
Topografia	Cólon	18 (66,7)	53 (72,2)	0,589
	Reto	9 (33,3)	21 (27,8)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA = não avaliável estatisticamente

Tabela 8 - Distribuição das características do tumor de acordo com expressão tumoral de HIF1A.

Variável	Categoria	HIF1A		p-valor
		..Negativo	Positivo	
		N (%)	N (%)	
Estádio T	T2	3 (11,1)	4(5,6)	NA
	T3	11 (40,7)	37(51,4)	
	T4	13 (48,2)	31 (43,1)	
Estádio N	N0	13 (48,2)	35(48,6)	NA
	N1	9 (33,3)	26(36,1)	
	N2	5 (18,5)	11(15,3)	
Estádio geral	EC II	13 (48,2)	35 (48,6)	0,967
	EC III	14 (51,8)	37(51,4)	
Grau histológico	Baixo grau	8 (29,6)	15(21,1)	0,375
	Alto grau	19 (70,4)	56(78,9)	
Embolização sanguínea	Não	23 (85,2)	61 (84,7)	0,999
	Sim	4 (14,8)	11(15,3)	
Embolização neural	Não	21 (77,8)	57(79,2)	0,880
	Sim	6 (22,2)	15(20,8)	
Embolização linfática	Não	11 (40,7)	15 (20,8)	0,045
	sim	16 (59,3)	57(79,2)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA = não avaliável estatisticamente

Tabela 9 - Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas de acordo com expressão tumoral de PPARG.

Variável	Categoria	PPARG		p-valor
		Negativo N (%)	Positivo N (%)	
Gênero	Masculino	16 (27,6)	14 (35,9)	0,385
	Feminino	42 (72,4)	25 (64,1)	
Faixa etária (anos)	≤ 65	21 (36,2)	28 (71,8)	0,001
	> 65	37 (63,8)	11 (28,2)	
Localização	Cólon direito	16 (27,6)	5 (12,8)	NA
	Transverso	7 (12,1)	3 (7,7)	
	Cólon esquerdo	3 (5,2)	4 (10,3)	
	Sigmóide	17 (29,3)	13 (33,3)	
	Reto	15 (25,9)	14 (35,9)	
Topografia	Cólon	43 (74,1)	25 (64,1)	0,290
	Reto	15 (25,9)	14 (35,9)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA = não avaliável estatisticamente

Tabela 10 - Distribuição das características anatomopatológicas do tumor de acordo com a expressão tumoral de PPARG.

Variável	Categoria	PPARG		p-valor
		Negativo N (%)	Positivo N(%)	
Estádio T	T2	3 (5,2)	4 (10,3)	NA
	T3	24 (41,4)	22 (56,4)	
	T4	31 (53,4)	13 (33,3)	
Estádio N	N0	32 (55,2)	15 (38,5)	0,266
	N1	18 (31,0)	16 (41,0)	
	N2	8 (13,8)	8 (20,5)	
Estádio geral	EC II	32 (55,2)	15 (38,5)	0,106
	EC III	26 (44,8)	24 (61,5)	
Grau histológico	Baixo grau	16 (27,6)	7 (18,4)	0,304
	Alto grau	42 (72,4)	31 (81,6)	
Embolização sanguínea	Não	48 (82,8)	34 (87,2)	0,555
	Sim	10 (17,2)	5 (12,8)	
Embolização neural	Não	45 (77,6)	31 (79,5)	0,824
	Sim	13 (22,4)	8 (20,5)	
Embolização linfática	Não	39 (67,2)	33 (84,6)	0,055
	Sim	19 (32,8)	6 (15,4)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado
 NA = não avaliável estatisticamente

Tabela 11 - Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas de acordo com a expressão tumoral de LXRA.

Variável	Categoria	LXRA		p-valor
		Negativo N (%)	Positivo N (%)	
Gênero	Masculino	23 (34,8)	7 (21,2)	0,164
	Feminino	43 (65,2)	26 (78,8)	
Faixa etária (anos)	≤ 65	33 (50,0)	16 (48,5)	0,887
	> 65	33 (50,0)	17 (51,5)	
Localização	Colon direito	14 (21,2)	8 (24,2)	NA
	Transverso	7 (10,6)	3 (9,1)	
	Colon esquerdo	6 (9,1)	1 (3,0)	
	Sigmóide	23 (34,9)	8 (24,2)	
	Reto	16 (24,2)	13 (39,4)	
Topografia	Colon	50 (75,8)	20 (60,6)	0,118
	Reto	16 (24,2)	13 (39,4)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA = não avaliável estatisticamente

Tabela 12 - Distribuição das características do tumor de acordo com a expressão tumoral de LXRA.

Variável	Categoria	LXRA		p-valor
		Negativo N (%)	Positivo N (%)	
Estádio T	T2	6 (9,1)	1 (3,0)	NA
	T3	27 (40,9)	21 (63,6)	
	T4	33 (50,0)	11 (33,3)	
Estádio N	N0	35 (53,0)	13 (39,4)	0,396
	N1	22 (33,3)	13 (39,4)	
	N2	9 (13,6)	7 (21,2)	
Estádio geral	EC II	35 (53,0)	13 (39,4)	0,201
	EC III	31 (47,0)	20 (60,6)	
Grau histológico	Baixo grau	18 (27,3)	5 (15,6)	0,202
	Alto grau	48 (72,7)	27 (84,4)	
Embolização sanguínea	Não	58 (87,9)	26 (78,8)	0,234
	Sim	8 (12,1)	7 (21,2)	
Embolização neural	Não	55 (83,3)	23 (69,7)	0,118
	Sim	11 (16,7)	10 (30,3)	
Embolização linfática	Não	49 (74,2)	24 (72,7)	0,872
	Sim	17 (25,8)	9 (27,3)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

NA = não avaliável estatisticamente

Tabela 13 - Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas de acordo com a expressão tumoral de LXR_B.

Variável	Categoria	LXR _B		p-valor
		Negativo N (%)	Positivo N (%)	
Gênero	Masculino	1 (33,3)	29 (30,2)	0,999
	Feminino	2 (66,7)	67 (69,8)	
Faixa etária (anos)	≤ 65	2 (66,7)	47 (49,0)	0,617
	> 65	1 (33,3)	49 (51,0)	
Localização	Colon direito	0 (0,0)	22 (22,9)	NA
	Transverso	0 (0,0)	10 (10,4)	
	Colon esquerdo	0 (0,0)	7 (7,3)	
	Sigmóide	0 (0,0)	31 (32,3)	
Topografia	Reto	3 (100,0)	26 (27,1)	0,023
	Colon	0 (0,0)	70 (72,9)	
	Reto	3 (100,0)	26 (27,1)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA = não avaliável estatisticamente

Tabela 14 - Distribuição das características do tumor de acordo com a expressão tumoral de LXRb.

Variável	Categoria	LXRb		p-valor
		Negativo N (%)	Positivo N. (%)	
Estádio T	T2	1 (33,3)	6(6,3)	NA
	T3	1 (33,3)	47(49,0)	
	T4	1 (33,3)	43(44,8)	
Estádio N	N0	1 (33,3)	47(49,0)	NA
	N1	1 (33,3)	34(35,4)	
	N2	1 (33,3)	15(15,6)	
Estádio geral	EC II	1 (33,3)	47(49,0)	0,999
	EC III	2 (66,7)	49(51,0)	
Grau histológico	Baixo grau	0 (0,0)	23(24,2)	0,999
	Alto grau	3 (100,0)	72(75,8)	
Embolização sanguínea	Não	3 (100,0)	81(84,4)	0,999
	Sim	0 (0,0)	15(15,6)	
Embolização neural	Não	2 (66,7)	75(79,2)	0,515
	Sim	1 (33,3)	20(20,8)	
Embolização linfática	Não	3 (100,0)	70(72,9)	0,564
	Sim	0 (0,0)	26(27,1)	

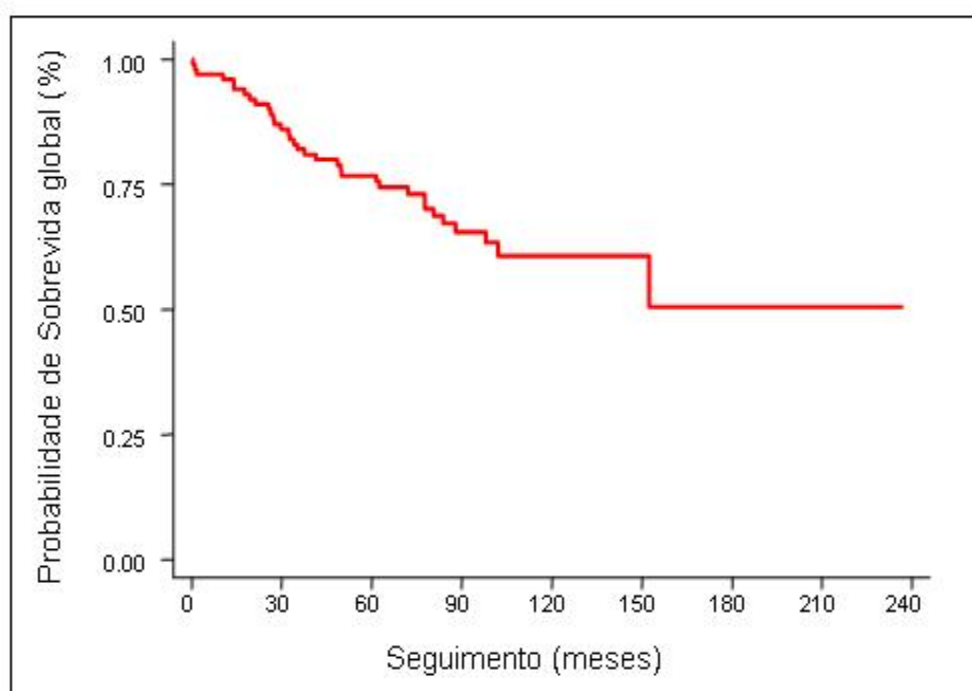
p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

NA = não avaliável estatisticamente

4.6 DADOS DE SEGUIMENTO

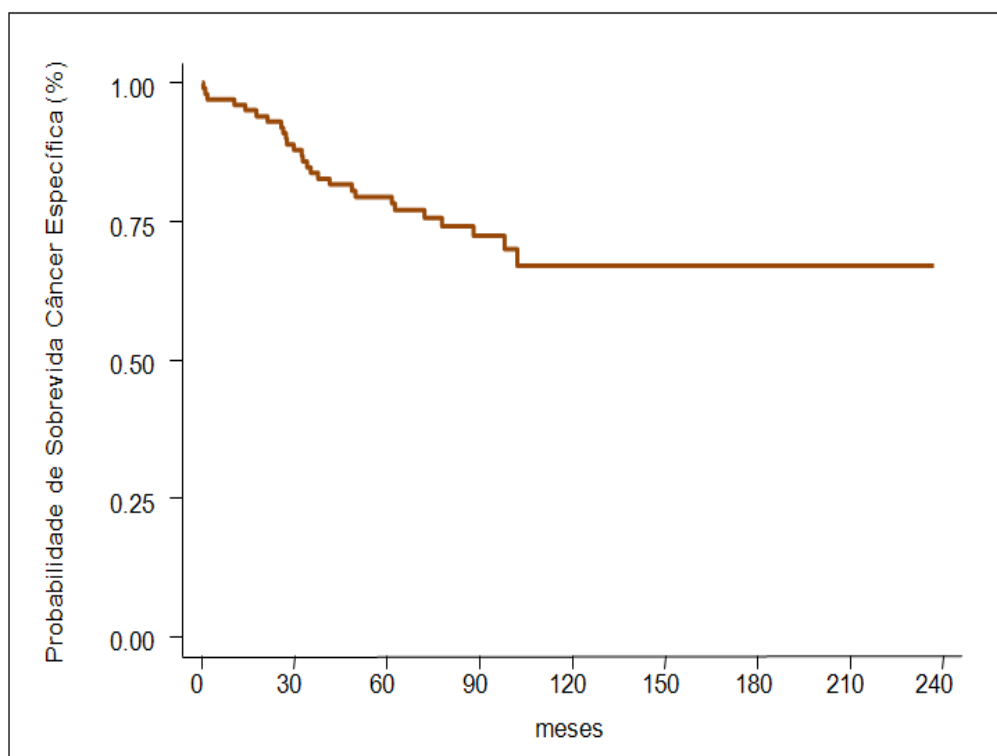
O tempo de seguimento mediano foi de 78 meses, variando de 10 dias a 237 meses. O tempo para ocorrência de recidiva variou de 7,4 a 62,8 meses, com mediana de 21 meses e média de 24,5 meses. Ao final da atualização do seguimento dos 101 pacientes, 74 pacientes (73,3%) não apresentaram recidivas, 5 pacientes (5,0%) haviam evoluído com recidiva local, 19 pacientes (18,8%) haviam evoluído com recidiva à distância, e 3 pacientes (3,0%) haviam evoluído com recidiva local e à distância associadas. Os sítios de recidiva à distância mais comuns foram o fígado, em primeiro lugar, com 9 casos (8,9%), seguido pelo pulmão, com 8 casos (7,9%), e 1 caso (1%) com fígado e pulmão associados. Em relação ao estado clínico ao final da atualização, 55 pacientes (54,5%) estavam vivos e sem sinais de recidiva tumoral, 1 paciente (1%) estava vivo com doença, 27 pacientes (26,7%) morreram por câncer, 7 pacientes (6,9%) morreram por outras causas. Houve perda de seguimento de 11 pacientes (10,9%).

A probabilidade acumulada de sobrevida global da amostra foi de 76,6% em 5 anos, e 60,2% em 10 anos, e câncer específica de 79,3% em 5 anos, e 66,4% em 10 anos (Figuras 14 e 15). A probabilidade de sobrevida livre de recidiva foi de 73,6% em 5 anos, e 70,8% em 10 anos (Figura 15).



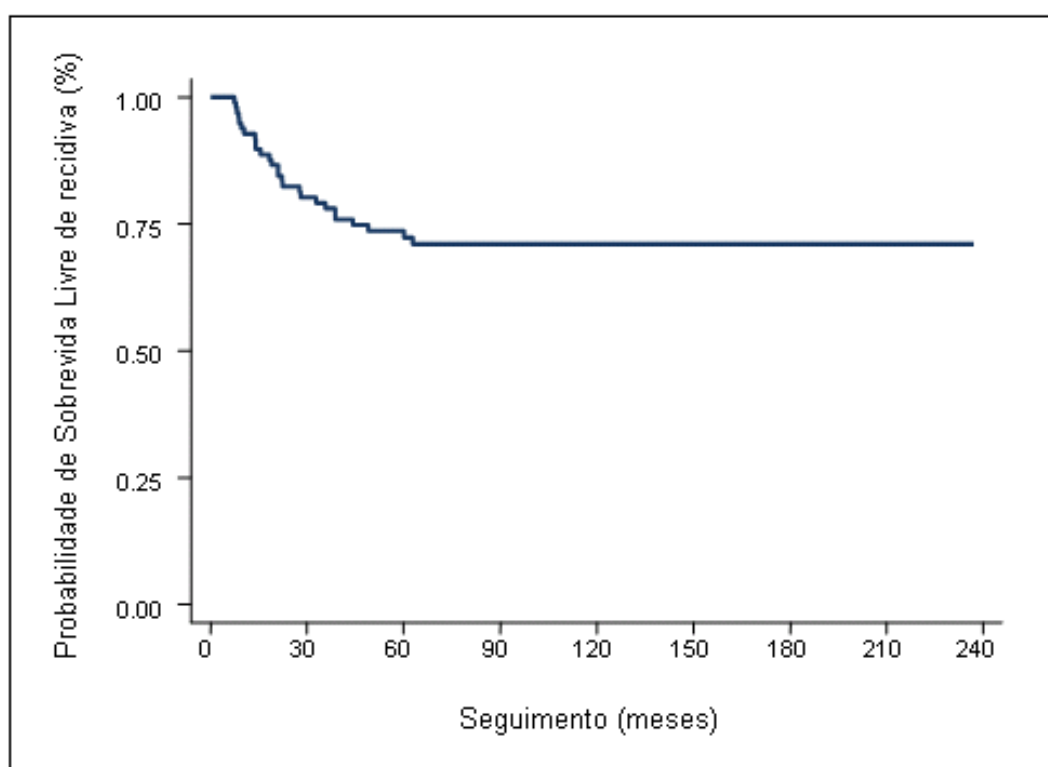
■ N= 101

Figura 13 - Curva de sobrevida global para 101 pacientes portadores de câncer colorretal estádios clínicos II e III.



■ N= 101

Figura 14 - Curva de sobrevida câncer-específica para 101 pacientes portadores de câncer colorretal estádios clínicos II e III.



■ N= 101

Figura 15 - Curva de sobrevida livre de recidiva para 101 pacientes portadores de câncer colorretal estádios clínicos II e III.

4.7 SOBREVIDA LIVRE DE RECIDIVA

A probabilidade acumulada de sobrevida livre de recidiva da amostra estudada, 101 pacientes, foi de 73,6% em 5 anos, e 70,8% em 10 anos. Ao descrevermos a associação da sobrevida livre de recidiva em 5 e 10 anos de acordo com as variáveis demográficas e clínicas, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas de acordo com as variáveis demográficas estudadas (Tabela 15). No entanto, ao analisarmos a associação com as características do tumor, observamos diferenças estatisticamente significativa de acordo com o estágio patológico da doença, onde a sobrevida livre de recidiva foi inferior para estágio patológico III (64,6%) ($p=0,029$) (Tabela 16; Figura 16). A presença de embolização linfática (58,6%) ($p=0,008$) e invasão perineural (49,0%) ($p=0,002$) (Figura 16) estiveram associados de maneira estatisticamente significativa com a sobrevida livre de recidiva, observando-se uma sobrevida livre de recidiva inferior nos pacientes que tinham essas características.

O estágio N0 mostrou sobrevida livre de recidiva em 5 anos de 82%, N1 de 68,8% e N2 de 65%, e a diferença entre as curvas de sobrevida livre de doença não foi estatisticamente significativa ($p=0,087$), porém ao agruparmos N1 e N2 em um mesmo grupo, observamos que a diferença na curva de sobrevida entre N0 e N1+N2 foi estatisticamente significativa ($p=0,048$) (Tabela 16; Figura 18).

Ao descrevermos a associação da sobrevida livre de recidiva em 5 e 10 anos de acordo com os marcadores tumorais CEA, CA19.9, e a expressão de VEGF e HIF1A, PPARG, LXRA e LXRβ, nenhum dessas variáveis esteve associada de maneira estatisticamente significativa com a sobrevida livre de recidiva ($p>0,05$)

(Tabela 17).

Tabela 15 - Probabilidade de **sobrevida livre de recidiva** 5-anos e 10-anos de acordo com variáveis demográficas, laboratoriais, clínicas e terapêuticas.

Variável	Categoria	Sobrevida Livre de Doença (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Sobrevida	Livre de Doença	73,6	70,8	
Gênero	Masculino	72,3	66,9	0,652
	Feminino	74,2	72,3	
Faixa etária (anos)	≤ 65	74,9	69,7	0,994
	> 65	72,4	72,4	
CEA	≤ 5,0	80,4	77,0	0,660
	5,1 – 10,0	70,9	70,9	
	> 10,0	67,8	67,8	
CEA	≤ 5,0	80,4	77,0	0,363
	> 5,0	68,4	68,4	
CA19.9	≤ 37,0	82,3	79,4	0,118
	> 37,0	60,7	60,7	
Localização	Cólon direito	85,6	79,3	0,552
	Transverso	77,8	77,8	
	Cólon esquerdo	85,7	85,7	
	Sigmóide	70,0	70,0	
	Reto	63,9	59,1	
Topografia	Cólon	77,6	75,7	0,151
	Reto	63,9	59,1	
Tipo de cirurgia	Colectomia direita	86,3	80,3	0,788
	Transversectomia	75,0	75,0	
	Colectomia esquerda	72,7	72,7	
	RA e anatomose	67,7	64,8	
	Ampliada	72,7	72,7	
Quimioterapia	Não	79,5	76,5	0,324
adjuvante	Sim	68,7	66,1	

p-valor obtido pelo teste de log-rank

Tabela 16 - Probabilidade de **sobrevida livre de recidiva** 5-anos e 10-anos de acordo com características Anatomopatológicas do tumor.

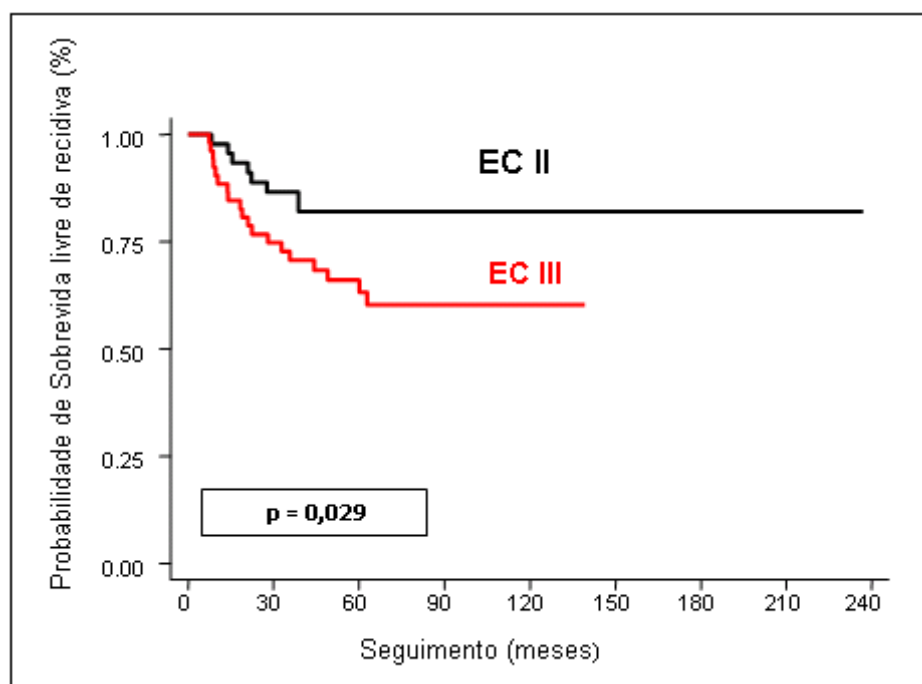
Variável	Categoria	Sobrevida Livre de Doença (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Estádio T	T2	85,7	85,7	0,746
	T3	74,7	68,9	
	T4	70,4	70,4	
Estádio N	N0	82,0	82,0	0,087
	N1	65,1	60,6	
	N2	68,8	58,9	
	N1+ N2	66,9	52,7	
Estádio geral	EC II	82,0	82,0	0,029
	EC III	65,9	59,7	
Estádio específico	EC IIA	76,4	76,4	0,042
	EC IIB	87,2	87,2	
	EC IIIA	100,0	100,0	
	EC IIIB	58,3	53,0	
	EC IIIC	68,7	58,9	
Grau histológico	Baixo grau	71,6	65,1	0,579
	Alto grau	73,9	72,1	
Tipo do grau	Bem diferenciado	71,6	65,1	0,537
	Moderadamente	72,8	70,9	
	Pouco diferenciado	100,0	100,0	
Embolização sanguínea	Não	76,1	73,0	0,152
	Sim	57,3	57,3	
Invasão perineural	Não	80,0	78,3	0,002
	Sim	49,0	42,8	
Embolização linfática	Não	78,7	78,7	0,008
	Sim	58,6	47,4	

p-valor obtido pelo teste de log-rank

Tabela 17 - Probabilidade de **sobrevida livre de recidiva** 5-anos e 10-anos de acordo com a expressão imunoistoquímica de marcadores associados à hipóxia (HIF1A, VEGF) e ao metabolismo lipídico (PPARG, LXRA, LXRΒ).

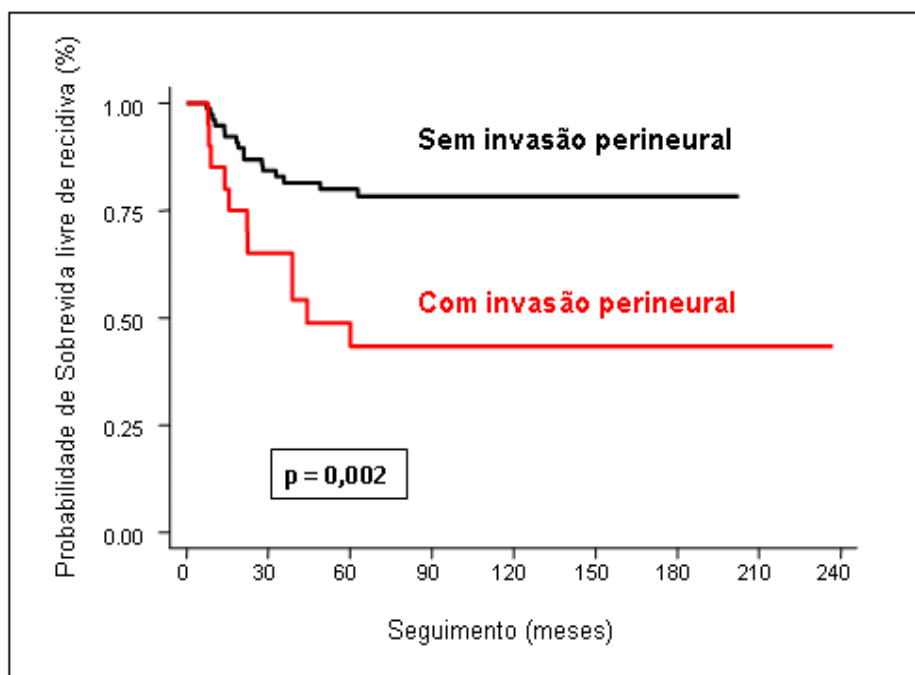
Variável	Categoria	Sobrevida Livre de Doença (%)		
		5-anos	10-anos	p-valor
VEGF	Negativo	81,6	81,6	0,283
	Positivo	71,1	67,8	
HIF1A	Negativo	67,4	67,4	0,595
	Positivo	75,1	71,3	
PPARG	Negativo	72,5	68,0	0,434
	Positivo	75,1	75,1	
LXRA	Negativo	75,9	73,8	0,238
	Positivo	67,4	62,9	
LXRΒ	Negativo	66,7	66,7	0,862
	Positivo	73,3	70,4	

p-valor obtido pelo teste de log-rank



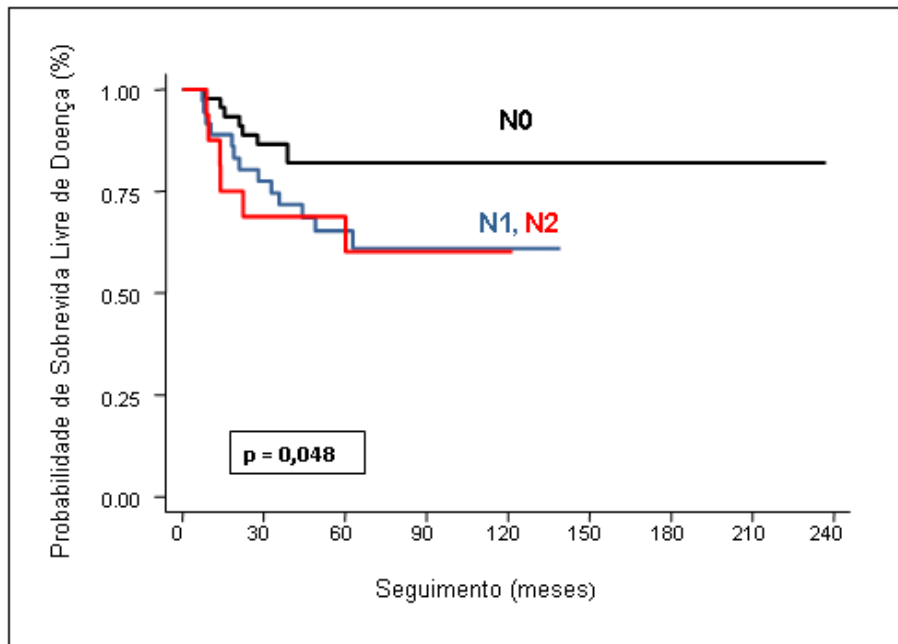
■ N= 52 ■ N= 49

Figura 16 - Curva de sobrevida livre de recidiva para 101 pacientes portadores de câncer colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com estágio patológico.



↑ N= 21 ■ N= 80

Figura 17 - Curva de sobrevida livre de recidiva para 101 pacientes portadores de câncer colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com invasão perineural.



↑ N= 52 ■ ↑ N= 49

Figura 18 - Curva de sobrevida livre de recidiva para 101 pacientes portadores de câncer colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com status linfonodal (N0= Livre de tumor, N1 e N2 comprometido por tumor).

4.8 SOBREVIDA GLOBAL

A probabilidade acumulada de sobrevida global foi de 76,6% em 5 anos, e 60,2% em 10 anos. Ao descrevermos a associação da sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com as variáveis demográficas e clínicas, observou-se diferenças significativas entre as curvas de sobrevida global com relação as faixas etárias, onde os pacientes com idade acima de 65 anos apresentavam uma pior sobrevida em 5 anos de 67,7%, em comparação aos pacientes com idade inferior a 65 anos ($p=0,021$) (Tabela 18; Figura 13). Ao descrevermos a associação das características do tumor com as curvas de sobrevida global, observou-se diferenças estatisticamente significativa com a invasão perineural, onde a sobrevida global foi inferior quando existia a presença de embolização linfática (64,5%) ($p=0,018$) (Tabela 19; Figura 17).

Ao descrevermos a associação da sobrevida global da doença em 5 e 10 anos de acordo com os marcadores tumorais CEA, CA19.9, expressão imunoistoquímica de VEGF, HIF1A, LXRA e LXRБ, nenhuma dessas variáveis mostrou diferença estatisticamente significativa.

Ao descrevermos a associação da sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com a expressão de PPARG, observou-se que tumores negativos apresentam sobrevida global de 70,45 em 5 anos, e 52,6 %, e tumores positivos 83,5% em 5 anos e 75,9% em 10 anos. A probabilidade de sobrevida global foi inferior para os pacientes com negativos para PPARG. A diferença entre as curvas de sobrevida global foi estatisticamente significativa ($p=0,018$) (Tabela 20; Figura 20), e essa queda de sobrevida foi importante, demonstrando que a ausência do PPARG apresenta um grande impacto na sobrevida global desses pacientes.

Em relação ao HIF1A, observou-se que tumores positivos para HIF1A apresentam sobrevida inferior aos negativos, contudo sem significância estatística ($p=0,086$) (Tabela 20; Figura 21).

Tabela 18 - Probabilidade de **sobrevida global** em 5-anos e 10-anos de acordo com variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Sobrevida	Global	76,6	60,2	
Gênero	Masculino	67,8	61,9	0,339
	Feminino	80,6	60,8	
Faixa etária (anos)	≤ 65	85,5	74,0	0,021
	> 65	67,7	45,2	
Localização	Cólon direito	68,8	56,4	0,652
	Transverso	88,9	88,9	
	Cólon esquerdo	85,7	85,7	
	Sigmóide	76,7	59,0	
	Reto	76,4	50,9	
Topografia	Colon	76,6	64,4	0,425
	Reto	76,4	50,9	
Tipo de cirurgia	Colectomia direita	70,1	57,7	0,729
	Transversectomia	100,0	100,0	
	Colectomia esquerda	72,7	72,7	
	RA e anatomose	77,3	50,9	
	Ampliada	81,8	72,7	
Quimioterapia adjuvante	Não	76,0	53,2	0,343
	Sim	76,8	69,2	

p-valor obtido pelo teste de log-rank

Tabela 19 - Probabilidade de **sobrevida global** em 5-anos e 10-anos de acordo com características Anatomopatológicas do tumor.

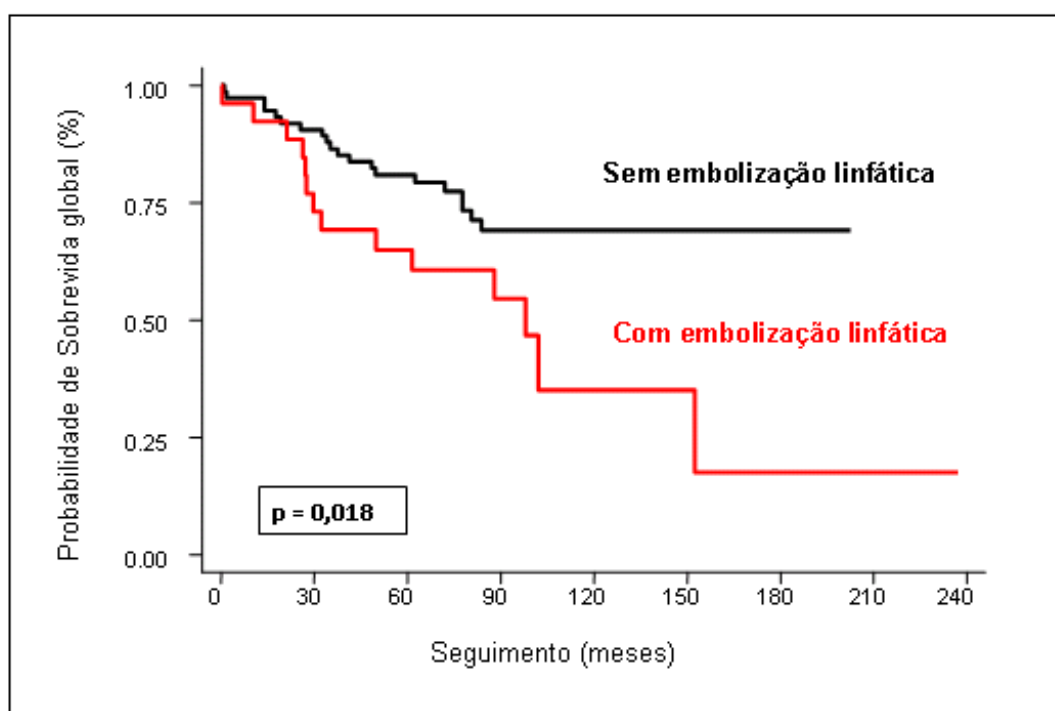
Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida		p-valor
		(%)		
		5- anos	10-anos	
Estádio T	T2	85,7	85,7	0,713
	T3	81,5	51,2	
	T4	69,5	64,2	
Estádio N	N0	83,4	69,0	0,298
	N1	71,0	46,2	
	N2	66,0	55,8	
Estádio geral	EC II	83,4	69,0	0,120
	EC III	69,8	50,0	
Estádio específico	EC IIA	86,8	51,8	0,118
	EC IIB	80,1	80,1	
	EC IIIA	100,0	100,0	
	EC IIIB	65,8	38,5	
	EC IIIC	66,0	55,8	
Grau histológico	Baixo grau	67,4	54,0	0,493
	Alto grau	78,8	61,5	
Tipo do grau	Bem diferenciado	67,4	54,0	0,763
	diferenciado	79,4	61,0	
	Moderadamente	66,7	66,7	
	Mal diferenciado			
Embolização sanguínea	Não	78,5	59,0	0,952
	Sim	65,3	65,3	
Invasão perineural	Não	79,4	64,8	0,143
	Sim	66,0	45,1	
Embolização linfática	Não	80,7	69,0	0,018
	Sim	64,5	35,8	

p-valor obtido pelo teste de log-rank

Tabela 20 – Probabilidade de **sobrevida global** 5-anos e 10-anos de acordo com a expressão imunoistoquímica tumoral de marcadores associados à hipóxia e ao metabolismo lipídico.

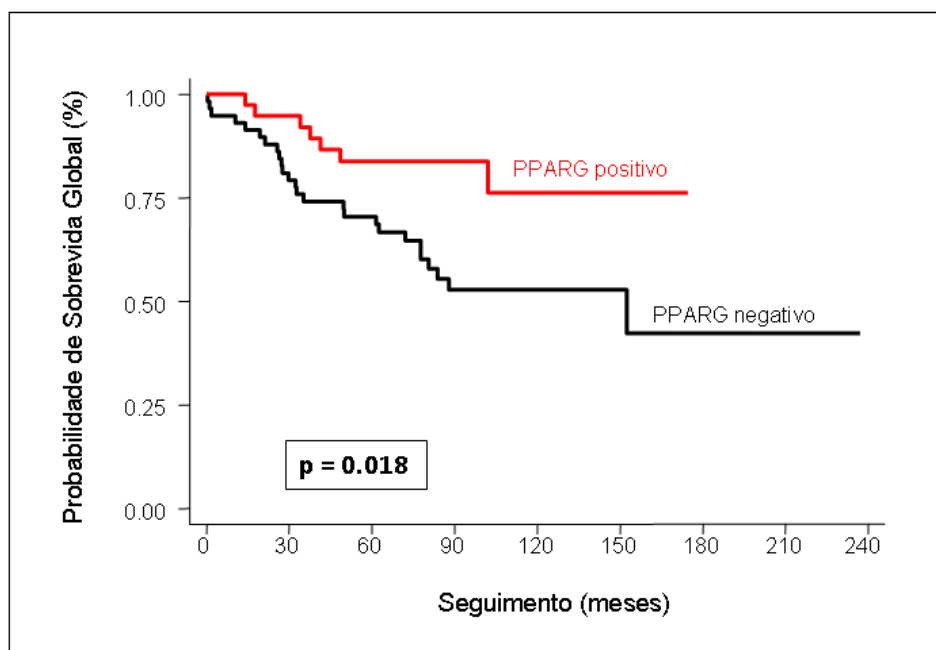
Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
VEGF	Negativo	68,9	61,6	0,988
	Positivo	77,4	59,5	
HIF1A	Negativo	78,6	64,7	0,086
	Positivo	69,3	46,8	
PPARG	Negativo	70,4	52,6	0,018
	Positivo	83,5	75,9	
LXRA	Negativo	79,9	60,3	0,845
	Positivo	68,4	57,0	
LXRB	Negativo	100,0	50,0	0,959
	Positivo	75,4	59,9	

p-valor obtido pelo teste de log-rank



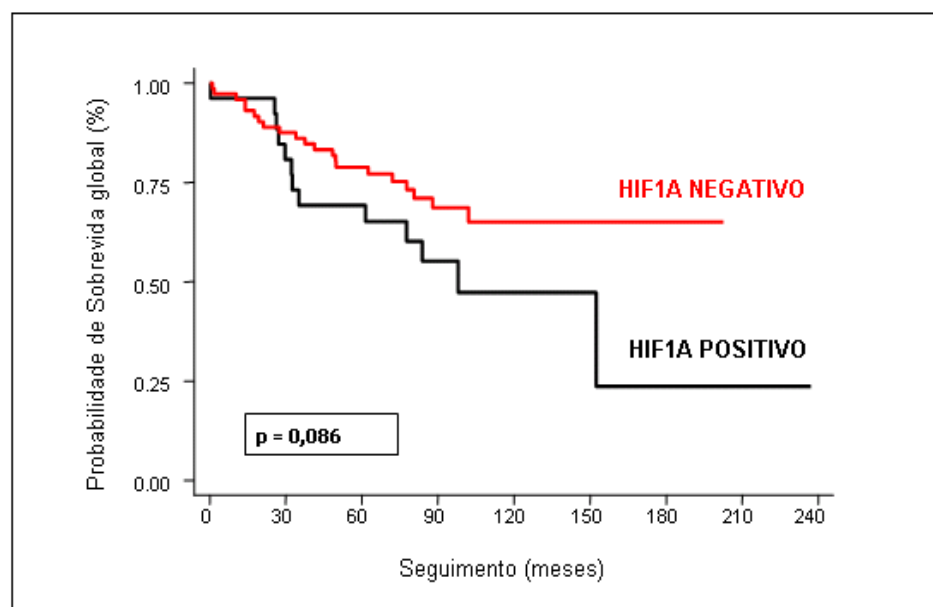
■ N= 26 ■ N= 75

Figura 19 - Curva de sobrevida global para 101 pacientes portadores de câncer Colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com embolização linfática.



■ N= 43 ■ N= 58

Figura 20 - Curva de sobrevida global para 101 pacientes portadores de câncer Colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com a expressão do marcador PPARG.



■ N= 27 ■ N= 74

Figura 21 – Curva de sobrevida global para 101 pacientes portadores de câncer Colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com a expressão do marcador HIF1A.

4.9 SOBREVIDA CÂNCER-ESPECÍFICA

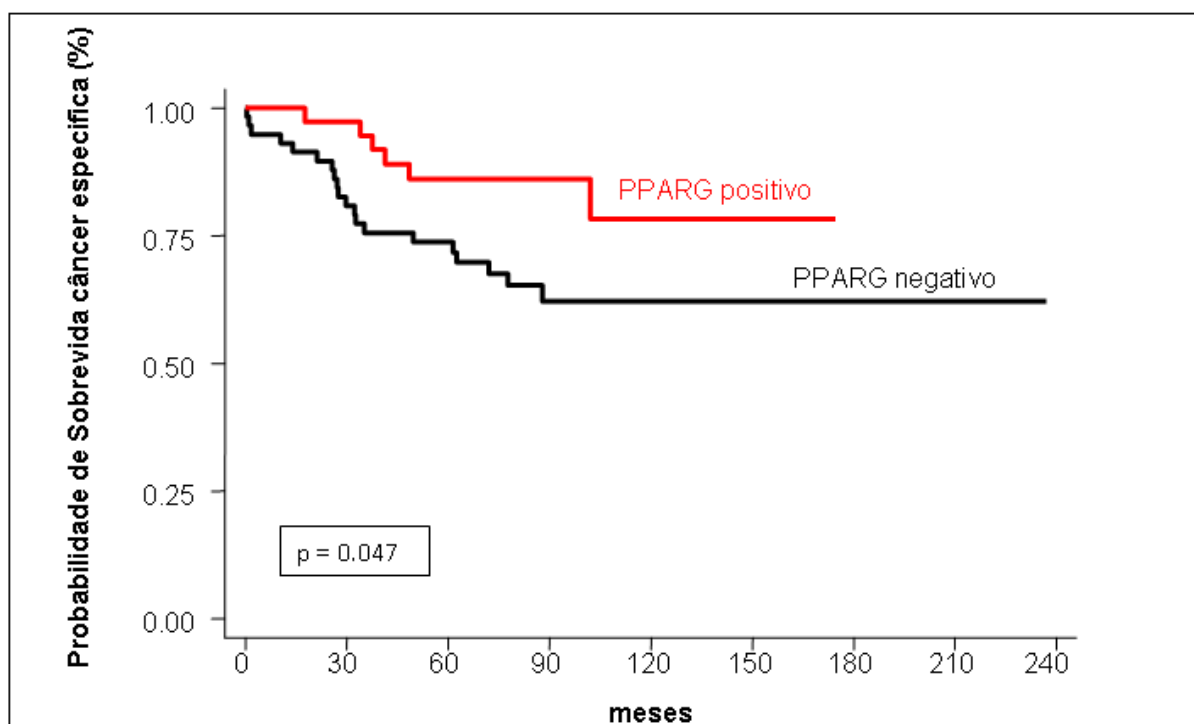
A probabilidade acumulada de sobrevida câncer-específica de 79,3% em 5 anos, e 66,4% em 10 anos (Figura 14). Ao descrevermos a associação da sobrevida câncer-específica com a expressão tumoral imunoistoquímica de VEGF, HIF1A, LXRA e LXR β , nenhuma dessas variáveis mostrou diferença estatisticamente significativa.

Ao descrevermos a associação da sobrevida câncer-específica em 5 e 10 anos de acordo com a expressão de PPAR γ , observou-se que a probabilidade de sobrevida foi inferior para os pacientes com tumores negativos para PPAR γ , mostrando uma sobrevida maior para os positivos, onde observou-se que tumores negativos apresentavam 73,5% de sobrevida em 5 anos, e 61,4% em 10 anos, e tumores positivos apresentam 85,5% de sobrevida em 5 anos e 64,5 % em 10 anos, e essa diferença entre as curvas de sobrevida global foi estatisticamente significativa ($p=0,047$) (Tabela 21; Figura 22). Em relação ao HIF1A, observou-se que tumores positivos para HIF1A apresenta sobrevida inferior aos negativos, contudo sem significância estatística ($p=0,058$) (Tabela 21).

Tabela 21 - Probabilidade de **sobrevida câncer-específica** em 5-anos e 10-anos de acordo com a expressão imunistoquímica tumoral de VEGF, HIF1A, PPARG, LXRA e LXRБ.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
VEGF	Negativo	79,9	79,9	0,354
	Positivo	78,5	63,5	
HIF1A	Negativo	82,5	71,9	0,058
	Positivo	69,3	50,7	
PPARG	Negativo	73,5	61,4	0,047
	Positivo	85,8	78,0	
LXRA	Negativo	79,9	65,9	0,887
	Positivo	76,8	64,0	
LXRБ	Negativo	100,0	50,0	0,909
	Positivo	78,2	66,3	

p-valor obtido pelo teste de log-rank



■ N= 43 ■ N= 58

Figura 22 – Curva de sobrevida câncer-específica para 101 pacientes portadores de câncer colorretal, estádios clínicos II e III, de acordo com a expressão de PPARG.

A análise univariada mostrou as variáveis faixa etária, estágio clínico, embolização linfática, CA19.9 e HIF1A, estiveram associadas com a sobrevida câncer-específica, mas não foram selecionadas na análise multivariada pela técnica *stepwise* pelo modelo de regressão de COX. A análise multivariada foi realizada para as variáveis estadiamento linfonodal, embolização neural e expressão de PPARG (Tabela 22), devido representarem maior força para ocorrência de óbito pela doença, e estiveram associadas de maneira independente com a sobrevida com a sobrevida câncer-específica.

A partir do modelo de regressão de COX uni e multivariado, chegamos aos seguintes resultados:

- 1 Pacientes com linfonodos comprometidos (Estádio N+) mostraram 2,5 vezes mais chance de óbito por câncer que os pacientes sem comprometimento linfonodal (estádio N0);
- 2 A presença de embolização neural esteve associada com 2,5 vezes mais chance de óbito por câncer;
- 3 Tumores negativos para PPARG esteve associada com 2,72 vezes mais chance de óbito por câncer.

A partir destes resultados, concluímos que o comprometimento metastático linfonodal, a presença de invasão perineural e tumores negativos para PPARG, mostraram ser fatores prognósticos independentes para morte por câncer colorretal.

Tabela 22 - Análise multivariada de fatores prognósticos para óbito por câncer colorretal estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX.

Variável	Categoria	N	RR
			(95%IC) Multivariado
Estádio N	N0	49	1,0 (ref.)
	N1 + N2	52	2,51(1,10 – 5,72)
Invasão perineural	Não	80	1,0 (ref.)
	Sim	21	2,51 (1,13 – 5,57)
PPARG	Positivo	39	1,0 (ref.)
	Negativo	58	2,72(1,08 – 6,85)

5 DISCUSSÃO

Atualmente, o câncer assume grande importância, sendo considerado um problema de saúde pública mundial, e seu estudo envolve diversos aspectos relacionados à prevenção primária, programas de rastreamento, diagnóstico, tratamento e seguimento.

O presente estudo reuniu um número expressivo de casos de câncer de cólon e reto alto, tratados com intenção curativa e acompanhados, segundo protocolos bem definidos, dentro de um centro oncológico especializado.

Acreditamos que a resposta inflamatória seja um fator prognóstico importante para essa doença, por isto, estudamos a expressão de alguns fatores que modulam a resposta inflamatória, como fatores envolvidos com a hipóxia (HIF1A e VEGF), já que é próprio dos tecidos inflamados apresentarem baixas concentrações de oxigênio, bem como a expressão de receptores específicos de lipídeos relacionados com a resposta inflamatória (PPARG, LXRA e LXRβ) no tecido tumoral de pacientes portadores de câncer colorretal. A discussão sobre o papel da resposta inflamatória como fator prognóstico para pacientes portadores de câncer colorretal apresenta grande interesse pela elevada incidência desta neoplasia e o grande contingente de pacientes envolvidos.

O evento central deste estudo consistiu na avaliação da expressão desses marcadores e seu impacto na sobrevida global, câncer-específica e livre de recidiva no câncer colorretal estágio II e III, com interesse de demonstrar que a resposta inflamatória é um fator prognóstico importante nestes tumores sólidos, e também

com objetivo de estimular o surgimento de novos estudos sobre esse tópico, já que achamos apenas o estadiamento TNM insuficiente, uma vez que pacientes de mesmo estágio apresenta desfechos clínicos diferentes. No nosso estudo, utilizamos o estadiamento AJCC 2002, devido o período de tratamento desses pacientes ter sido realizado de janeiro de 1990 à agosto de 2004, e não sendo possível realizar um novo re-estadiamento baseado no AJCC de 2010, pois foram acrescentados novos critérios, como por exemplo, critérios intra-operatórios, tais como nódulo satélite subseroso, que não faziam parte e não eram utilizados no AJCC 2002.

Em relação ao estado linfonodal, inicialmente, comparamos os estádio N0, N1 e N2 separados, e obtivemos os seguintes resultados: O estágio N0 mostrou sobrevida livre de recidiva em 5 anos de 82%, N1 com 68,8% e N2 com 65%, porém a diferença entre as curvas de sobrevida livre de doença não foi estatisticamente significativa ($p=0,08$). Decidimos, então, dividir o estado linfonodal em livre e comprometido por neoplasia, agrupando N1 e N2 em um mesmo grupo, daí observamos que a diferença na curva de sobrevida entre N0 versus N1 agrupado a N2 foi estatisticamente significativa ($p=0,04$).

O tempo de seguimento do nosso estudo foi longo, quando comparamos a outros estudos em pacientes portadores de câncer colorretal, variando de 10 dias até 237 meses, com mediana de 77 meses. Ao final da atualização a sobrevida global da amostra de nosso estudo foi de 76,6% em 5 anos, e 60,2% em 10 anos. Quando estratificamos por estágio, observamos que o estágio II teve sobrevida global maior que o estágio III. O mesmo também foi observado para probabilidade de sobrevida livre de recidiva, demonstrando pior evolução para os pacientes classificados no estágio III da doença. Os resultados de sobrevida global e livre de recorrência

observados em nosso estudo foram semelhantes aos da literatura (CHANG e FEIG 2006; LIBUTTI et al. 2008).

A busca de fatores prognósticos que interfiram na sobrevida desses pacientes tem sido uma preocupação constante da comunidade científica que estuda essa linha de pesquisa. Em nosso estudo observamos alguns fatores prognósticos importantes. Ao estudarmos as características clínicas, observamos que o estágio patológico se mostrou como um importante fator prognóstico, onde pacientes com estágio patológico III apresentaram pior prognóstico quando comparados à pacientes estágio II. A presença de metástases linfonodais foi um dos fatores prognósticos mais expressivos, uma vez que pacientes com linfonodos comprometidos tiveram pior prognóstico quando comparados a pacientes com linfonodos livres de neoplasias, e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,04$). Foi observado, também, que a presença de embolização linfática e de invasão perineural esteve associada de maneira significativa com menor sobrevida livre de recidiva, sendo assim também classificados como fatores prognósticos importantes para pacientes portadores de câncer.

Com relação ao marcador HIF1A, a expressão positiva se associou a piores taxas de sobrevida global, porém de maneira não estatisticamente significativa ($p=0,086$). Talvez se o número de amostras de tumores fossem maior, essa associação poderia ter se mostrado estatisticamente significante. A associação entre a expressão de HIF1A e embolização linfática, que se associou a piores taxa de sobrevida global, de maneira significativa, fazendo-nos crer que a expressão de HIF1A seja um fator de pior prognóstico, porém para confirmarmos essa conclusão precisaríamos de uma casuística maior.

Quando analisamos a expressão de VEGF, foi encontrada expressão positiva em 82% dos pacientes com câncer de cólon e reto alto. Observamos associação estatisticamente significativa entre VEGF e embolização vascular sanguínea, porém a expressão positiva de VEGF não teve impacto na sobrevida global e livre de doença, não se mostrando um fator prognóstico importante.

CAO et al. (2009) avaliaram a associação entre expressão imunoistoquímica de HIF1A e VEGF com resultados clínicos e como fatores prognósticos em câncer colorretal. Publicaram estudo com 71 pacientes portadores de câncer colorretal onde a expressão de HIF1A e VEGF foi positiva, respectivamente, em 54,93% e 56,34% dos pacientes. A expressão do HIF1A foi estatisticamente significativa nos estádios patológicos mais avançados, pacientes com metástases linfonodais e hepáticas, e essa expressão positiva foi associada a menor sobrevida global.

EDGE et al. (2010) demonstraram que ocorre uma adaptação metabólica em condições de hipóxia, no qual há um aumento da expressão de HIF1A, acarretando aumento da produção do VEGF, estimulando a angiogênese. Demonstraram, também, que em xenoinxerto de camundongos, o crescimento dos tumores está associado a um aumento da expressão do HIF1A. Em tumores malignos humanos, o HIF1A está superexpresso como resultado da hipóxia intratumoral, e está correlacionada com a falha do tratamento e aumento da mortalidade de pacientes portadores de câncer. O aumento da expressão do HIF1A promove progressão do tumor, e a inibição do HIF1A pode representar uma nova abordagem para o tratamento do câncer.

WU et al. (2010) estudaram o efeito da expressão do HIF1A em xenoinxerto de tumores colorretais em camundongos. Os xenoinxertos foram cultivados em

condições de hipóxia e normóxia, e a expressão do HIF1A foi detectado pela técnica de RT-PCR e Western blotting. O efeito da expressão do HIF1A foi avaliado pela mensuração do volume do tumor e por análise da sua expressão imunoistoquímica. A análise revelou que HIF1A era superexpressa nos xenoinxertos que foram cultivados em condições de hipóxia. Foi realizado nos xenoinxertos terapia de RNA contra HIF1A, evidenciando-se aumento da apoptose das células tumorais e diminuição do tamanho do tumor, concluindo-se que a regulação do HIF1A apresenta grande potencial para o tratamento do câncer colorretal.

PATJAR e HARRIS (2006) estudou o mecanismo da hipóxia tecidual tumoral, e descreveu que, devido a uma descompensação entre o crescimento tumoral acelerado não acompanhado pela formação de novos vasos sanguíneos, ocorre uma situação de hipóxia tecidual. A hipóxia tumoral está associada a um fenótipo mais agressivo, além de maior resistência à quimioterapia e à radioterapia, isso confere pior prognóstico a estes pacientes. O HIF1A é ativado em resposta a hipóxia tecidual, desempenhando um papel chave na angiogênese, através da ativação da transcrição do VEGF. Isto faz com que o HIF1A seja um atraente alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra o câncer.

BABA et al. (2010) realizou um estudo de coorte prospectivo com 721 tumores de pacientes portadores de câncer colorretal, e evidenciou que a superexpressão de HIF1A esteve associado, de maneira estatisticamente significativa, a maior mortalidade câncer-específica, conferindo um marcador de mau prognóstico. Seus estudos sugeriram que o HIF1A é um potencial alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra o câncer colorretal.

Com relação ao marcador LXRA, observamos a expressão deste em 34,7% das amostras de tumores. Já o marcador LXR β esteve expresso em apenas 3,0% das amostras dos tumores. Em nosso estudo, não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa da expressão de LXR com as variáveis clínicas e anatomopatológicas, e sua expressão não teve impacto na sobrevida global, câncer-específica e livre de recidiva de doença. Sendo assim, a expressão do LXR, em nosso estudo, não se mostrou como um fator prognóstico em pacientes portadores de câncer colorretal.

Apesar de CHUU et al. (2007) demonstrar em seus estudos que agonistas do LXR suprimem a proliferação de células cancerosas *in vitro*, por inibir a fase S do ciclo celular e suprimir a atividade oncogênica de β -catenina, em nosso estudo a expressão de LXR não se mostrou um marcador eficaz. O mesmo autor, recentemente, observou que agonistas de LXR suprimiam a proliferação de várias linhagens de células neoplásicas *in vitro*, bem como suprimia o crescimento e progressão de xenoinxertos de tumor de próstata em camundongos. O tratamento com agonistas de LXR está associado com a parada do ciclo celular em G1 por redução dos níveis de expressão das proteínas Skp2, ciclina A2, ciclina D1, e por provocar hipofosforilação de Rb, que é uma proteína supressora de tumor. Agonistas de LXR também suprimem a atividade oncogênica de β -catenina, um importante regulador da sinalização da via WNT, acarretando a supressão da proliferação das células neoplásicas do câncer de cólon. Os fitoesteróides, equivalentes do colesterol humano nas plantas, são agonistas do LXR, e são propostos para prevenção do câncer de cólon.

CHUU (2011) e VEDIN et al. (2012), mostraram que a ativação de LXR por oxisteróis, que são derivados de modificações oxidativas na molécula do colesterol, causava parada no ciclo celular de células de linhagens de câncer colorretal em camundongos, pelos mesmos mecanismos.

UNO et al. (2009) investigaram o potencial papel do LXR na carcinogênese colorretal, e encontraram que a ativação do LXR inibe a atividade de β -catenina, molécula chave na via WNT, e seus estudos in vitro mostrou que receptores LXRs regulam a atividade de β -catenina e a proliferação celular no câncer de cólon.

Em nosso estudo, o único marcador que teve impacto na sobrevida foi o PPARG. Observou-se que a probabilidade de sobrevida global e câncer-específica foi inferior para os pacientes com tumores negativos para PPARG, e essa diferença entre as curvas de sobrevida foi estatisticamente significativa ($p=0,018$ e $p=0,047$). A análise multivariada mostrou que tumores negativos para PPARG esteve associada com 2,72 vezes mais chance de óbito em relação aos pacientes cujo os tumores apresentavam expressão de PPARG. A ausência de expressão de PPARG, mostrou ser um fator prognóstico importante, sendo um fator de mal prognóstico para pacientes portadores de câncer colorretal, sugerindo que tumores negativos para PPARG são mais agressivos. Observando os resultados do nosso estudo, concluímos que o PPARG atua como um marcador nuclear na supressão tumoral no câncer colorretal.

MCALPINE et al. (2006), estudando a associação entre a expressão de PPARG e câncer de cólon e intestino em camundongos, observaram que a

deficiência da expressão de PPARG esteve associada com aumento da incidência, tanto de câncer de cólon, como de intestino.

FEARON et al. (2011) estudaram o papel do PPARG no modelo do câncer colorretal, e observaram uma importante diminuição da expressão do PPARG em tumores de cólon quando comparadas com tecidos normais. Resultados similares foram observados em tumores de cólon em camundongos quando comparados aos tecidos normais. Além disso, os autores também demonstraram o PPARG é um importante modulador da apoptose celular.

YANG et al. (2011) realizaram um estudo na Suécia com 141 pacientes portadores de câncer colorretal, no qual foi observado que a expressão de PPARG está aumentada em mucosa intestinal normal, e diminuída nos tumores intestinais. Foi observado também que PPARG está envolvido na diminuição da resposta inflamatória nos tumores e com a inibição da proliferação celular no câncer colorretal. Neste estudo foi concluído que altos níveis de expressão de PPARG predizem prognóstico favorável em câncer colorretal, o mesmo sendo observado em nosso estudo.

6 CONCLUSÕES

- 1 A expressão imunoistoquímica de HIF1A, VEGF, PPARG, LXRA e LXRΒ foi encontrada em respectivamente 72%, 81%, 39%, 33% e 96% dos casos estudados.
- 2 A expressão imunoistoquímica de HIF1A, VEGF, LXRA e LXRΒ não se associou, de maneira estatisticamente significativa, a piores taxas de sobrevida livre de doença, câncer-específica e global.
- 3 A ausência de expressão imunoistoquímica de PPARG se associou, de maneira estatisticamente significativa, a piores taxas de sobrevida global e sobrevida câncer-específica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. **Imunologia celular e molecular**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. Introdução à imunologia; p.3-47.

Al Benson, Scharag D, Somerfeld MR, et al. American Society of Clinical oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. **J Clin Oncol** 2004; 22:3408-19.

André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaloplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. **N Engl J Med** 2004; 350:2343-51.

Baba Y, Nosho K, Ogino S. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorrectal cancers. **Am J Pathol** 2010; 176:2292-301.

Benizri E, Ginouvès A, Berra E. The magic of the hypoxia-signaling cascade. **Cell Mol Life Sci** 2008; 65:1133-49.

Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature** 2008; 454:470-7.

Cao D, Hou M, Guan YS, Jiang M, Yang Y, Gou HF. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. **BMC Cancer** 2009; 9:432.

Carroll VA, Ashcroft M. Targeting the molecular basis for tumor hypoxia. **Expert Rev Mol Med** 2005; 7:1-16.

Chang GJ, Feig BW. Cancer of the colon. In: Feig BW, Berger DH, George M, editors. **The MD Anderson surgical oncology handbook**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p.261-319.

Chuu CP, Kokontis JM, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. **J Biomed Sci** 2007; 14:543-53.

Chuu CP. Modulation of liver X receptor signaling as a prevention and therapy for cancer. **Med Hypotheses** 2011; 76:697-9.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Colon and Rectum, p.143-164.

Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. **N Engl J Med** 2011; 364:656-65.

Fearon RF. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annu Rev Pathol Mech Dis** 2011; 6:479-507.

Fujisawa T, Sugiyama M, Tomimoto A, et al. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes tumorigenesis through activation of the beta-catenin / T cell factor (TCF) pathway in the mouse intestine. **J Pharmacol Sci** 2008; 108:535-44.

Greene FL, Page DL, Flaming ID, et al. **AJCC cancer staging manual**. 6th Ed. New York: Springer-Verlag; 2002. Colon and rectum, p.127-38.

Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics 2011. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics 2012. **CA Cancer J Clin** 2012; 62:10-29.

Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. **Mol Cell** 2008; 30:393-402.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. **Robbins patologia básica**. 8ª ed. Rio de Janeiro; 2008. Inflamação aguda e crônica; p.33-62.

Libutti SK, Saltz LB, Tepper JE. Colon cancer. In: DeVita Jr V, Lawrence TS, Rosenberg AS, editors. **DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology**. 8ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p.1232-85.

McAlpine CA, Barak Y, Matisse I, Cormier RT. Intestinal-specific PPARgamma deficiency enhances tumorigenesis in ApcMin/+ mice. **Int J Cancer** 2006; 119:2339-46.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Nelson H, Petrelli N, Carlin A, et al. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:583-96.

Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. **Nat Rev Immunol** 2009; 9:609-17.

O'Connell MJ, Mailliard JA, Kahn M, et al. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. **J Clin Oncol** 1997; 15:246-50.

Patiar S, Harris AL. Role of Hypoxia-inducible fator-1 alfa as a cancer therapy target. **Endocr Relat Cancer** 2006; 13(Suppl 1):61-75.

Pereira FEL. Inflamações. In: Brasileiro Filho G, editor. **Bogliolo: patologia geral**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. p.189-225.

Rubin DC, Shaker A, Levin MS. Inflammatory bowel disease and colitis-associated colon câncer. **Front Immunol** 2012; 3:107.

Shampo MA. Dukes and Broders: pathologic classifications of cancer of the rectum. *J Pelvic Surg* 2001; 7:5-7.

Ulven SM, Dalen KT, Gustafsson JA, Nebb HI. LXR is crucial in lipid metabolism. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 2005; 73:59-63.

Uno S, Endo K, Makishima M, et al. Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. **Biochim Pharmacol** 2009; 77:186-95.

Vedin LL, Gustafsson JA, Steffensen KR. The oxysterol receptors LXR α and LXR β suppress proliferation in the colon. **Mol Carcinog** 2012. [Epub ahead of print]

Vieira RA, Lopes A, Almeida PA, et al. Prognostic factors in locally advanced colon cancer treated by extended resection. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo** 2004; 59:361-8.

Wójcicka G, Jamroz-Wiśniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. **Postepy Hig Med Dosw (Online)** 2007; 61:736-59.

Wolmar KN, Fisher B, Rockette H, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABPC0-1. **J Natl Cancer Inst** 1988; 80:30.

Wu XY, Fu ZX, Wang XH. Effect of hypoxia-inducible factor1-alfa in colorectal cancer. **Mol Med Report** 2010; 3:409-15.

Yang L, Zhang H, Zhou ZG, Yan H, Adell G, Sun XF. Biological function and prognostic significance of peroxisome proliferator-activated receptor δ in rectal cancer. **Clin Cancer Res** 2011; 17:3760-70.

Zeller JL, Lynm C, Glass RM. JAMA patient page. Colon cancer. **JAMA** 2008; 300:2816.

Anexo 1 - Registro de Tumores Colorretais

1. RGH:	
2. Número do AP:	
3. Idade:	
4. Valor da Idade:	
(0) Abaixo de 65 anos	(1) Acima de 65 anos
5. Sexo:	
(1) Masculino	(2) Feminino
6. Data da Admissão:	
7. Queixa Clínica:	
(0) Sem queixa	(6) Emagrecimento
(1) Dor	(7) Abdômen Agudo
(2) Sangramento	(8) Massa Palpável
(3) Muco	(9) IGN (Ignorado).
(4) Alteração do Habito intestinal	
(5) Anemia	
8. Duração da queixa em meses:	
9. Localização:	
(1) Colon direito	(4) Sigmóide
(2) Transverso	(5) Reto
(3) Colon esquerdo	
10. Topografia:	
(1) Colon	
(2) Reto	
11. Tipo de Cirurgia	
(1) Colectomia direita	(5) Proctocolectomia
(2) Transversectomia	(6) RA e anatomose
(3) Colectomia esquerda	(7) AAP
(4) Colectomia total	(9) Ampliada
12. Data da Cirurgia:	
13. Estádio T:	
14. Estádio N:	
15. Estadio por grupos:	

16. Estádio patológico:	
(1) EC IIA	(4) EC IIIB
(2) EC IIB	(5) EC IIIC
(3) EC IIIA	
17. Grau Histológico:	
(1) Baixo grau	
(2) Alto grau	
18. Tipo do grau:	
1) Bem diferenciado	
2) Moderadamente	
3) Mal diferenciado	
19. Embolização sanguínea:	
(0) Não	
(1) Sim	
(2) IGN	
20. Embolização Neural	
(0) Não	
(1) Sim	
21. IGN Embolização Linfática:	
(0) Não	
(1) Sim	
22. CEA:	
23. CEA por Grupo	
(0) Normal	
(1) Entre 5-9	
(2) Maior que 10	
24. Valor do CEA	
(0) Normal	
(1) Aumentado	
25. CA19.9:	
26. Valor do CA19.9	
(0) Normal	
(1) Aumentado	
27. Quimioterapia Adjuvante	
(0) Não	
(1) Sim	
28. Esquema de QT	
(0) Sem QT	
(1) 7= Outro	
(2) 35= 5 FU + LV x 12	
(3) 36= 5 FU + LV x 6	
(4) 45= 5 FU + Levamisole x 12	
29. Data do termino da QT:	

30. Recidiva
(0) Sem recidiva
(1) Local
(2) Distância
31. Sitio da recidiva à distância
(0) Sem recidiva (5) Outro
(1) Fígado (6) Fígado e Pulmão
(2) Pulmão (7) Fígado, Pulmão e Osso
(3) Peritôneo
(4) Osso
32. Data da Recidiva
33. Data da recidiva Local
34. Data da recidiva à distância
35. Data da Ultima informação
36. Status:
(1) Vivo sem doença
(2) Vivo com doença
(3) Óbito sem câncer
(4) Óbito com câncer
(5) Perda de vista
37. Sobrevida livre de doença
38. Recidiva:
39. Óbito:
40. Óbito por Câncer:
41. HIF1A:
(0) Negativo (1) Positivo
42. PPARG:
(0) Negativo (1) Positivo
43. VEGF
(0) Negativo (1) Positivo
44. LXRA
(0) Negativo (1) Positivo
45. LXRB
0) Negativo (1) Positivo

Anexo 2 - Técnica de Imunoistoquímica

- 1- Desparafinização e hidratação dos cortes histológicos: 3 banhos em Xilol (5 minutos cada), 4 banhos de álcool, lavagem por 5 minutos em água corrente;
- 2- Recuperação antigênica na Pascal (Câmara de Pressão) em solução de citrato pH 6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi). Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 3- Bloqueio da peroxidase endógena: 3 banhos de 5 minutos cada com Peróxido de Hidrogênio 10 volumes;
- 4- Lavagem em PBS;
- 5- Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO);
- 6- Incubação dos anticorpos primários, anti HIF1A, VEGF, LXRA, LXRβ, PPARG, por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida;
- 7- Lavagem em PBS;
- 8- Incubação com anticorpo secundário (Advance HRP Link - DAKO) por 30 minutos (Ta);
- 9- Lavagem em PBS;
- 10- Incubação com Polímero (Advance HRP enzyme - DAKO) por 30 minutos (Ta);
- 11- Lavagem em PBS;
- 12- Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidina (DAB) 5 minutos (Kit Liquid DAB+ Substrate Chromogen System; DakoCytomation, Carpinteria, California);
- 13- Lavagem em água corrente;
- 14- Contra coloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;
- 15- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 16- Desidratação em álcool, Xilol, montagem em meio permanente.

Anexo 3 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 29 de Setembro de 2010.

Ao
Dr. Ademar Lopes

Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1459/10
"Impacto da expressão de fatores relacionados à hipóxia (HIF1A e VEGF), metabolismo lipídico (LXRA, LXRB e PPARG) e infiltrado inflamatório em tumores de cólon estágio clínico II e III".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 28/09/2010, aprovaram a realização do estudo em referência, datado de 10 de setembro de 2010 e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre os dados coletados, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
- Declaração sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e propriedade das Informações Geradas;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia Pélvica;
- Declaração de Ciência do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1