

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**JOSÉ LUCAS PEREIRA JÚNIOR**

**Avaliação da resposta inflamatória como marcador de atividade tumoral  
em pacientes com câncer colorretal**

**Juiz de Fora  
2009**

**JOSÉ LUCAS PEREIRA JÚNIOR**

**Avaliação da resposta inflamatória como marcador de atividade tumoral  
em pacientes com câncer colorretal**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de Concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup**

**Juiz de Fora**

**2009**

Pereira Junior, José Lucas.

Avaliação da resposta inflamatória como marcador de atividade tumoral em pacientes com câncer colorretal / José Lucas Pereira Junior. – 2009.

68 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Saúde)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Neoplasias intestinais. 2. Proteína C-reativa. 3. Citocinas. I. Título.

CDU 616.34-006.6

**JOSÉ LUCAS PEREIRA JÚNIOR**

**Avaliação da resposta inflamatória como marcador de atividade tumoral  
em pacientes com câncer colorretal**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de Concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Saúde.

**Aprovado em: 28/09/2009**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup – orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. José Otávio Amaral Corrêa  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Rogério Estevam Farias  
Universidade Federal de Juiz de Fora

*Dedico esse trabalho aos meus pacientes com câncer. Pessoas simples e humildes, mas seres iluminados. Anjos sábios que vieram para mostrar o real valor da vida. Sem vocês este trabalho não poderia ter concretizado e me transformado mais humano.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a *Deus* por estar concluindo esta etapa e por sua presença durante toda esta caminhada.

A *minha esposa Kátia* pelo seu amor e carinho. Pela sua compreensão e apoio nos momentos mais difíceis e de minha ausência.

A *minha filha Julia*, que ainda está chegando, e já encheu minha vida de amor e força para lutar pelos meus objetivos.

Ao *meu Pai*, José Lucas, sempre presente, principalmente nos momentos mais difíceis.

A *minha Mãe*, Marilza, que a vida não permitiu que ela estivesse mais aqui, mas seu amor incondicional me ensinou a seguir o meu caminho.

Ao *Sr. Vanderlei e Sra. Marísia*, pelo carinho e conforto de filho.

Aos meus grandes amigos de Juiz de Fora, *Everton e Daniela, Paulo e Mirian, Marcelo e Andrea, Fábio e Claudia, Helio e Luciana, Leonardo e Cleonice, Milton Prudente e Regina* que me apoiaram e motivaram toda a caminhada.

Ao *Professor Doutor Fernando Aarestrup*, pelos seus ensinamentos que permitiram ampliar meus horizontes e que tanto encorajou no desenvolvimento dessa pesquisa.

A *Professora Doutora Darcília Maria Nagen*, pelo seu carinho e compreensão nos momentos mais difíceis.

Agradeço a grandes professores que em determinados momentos da pesquisa, esteve ao meu lado e permitiu que eu aprendesse seus ensinamentos: *Professora Doutora Dra. Bratriz Julião Vieira, Professor Doutor José Otávio Amaral Correa, Professor Doutor Luiz Claudio Ribeiro e Professor Doutor Rogério Estevem Farias.*

Grandes amigos professores, ***Professor Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar e Professor Dr. Professor Maximiliano Ribeiro*** pelo exemplo de dedicação à pesquisa e busca pelo conhecimento, determinante em minha caminhada.

A colega ***Ana Lívea***, pelo aprendizado em conjunto.

Ao ***Dr. Milton Prudente e toda equipe da NEOCLÍNICA oncologia***, grandes motivadores pelo conhecimento e crescimento humano, permitiu seguir este caminho.

Aos ***pacientes***, fonte de inspiração e motivação para que este projeto fosse realizado.

Ao ***Dr. João Paulo Vieira***, diretor clínico do Hospital Ascomcer que permitiu o desenvolvimento deste trabalho em sua instituição.

Toda a ***equipe do Hospital ASCOMCER*** que mesmo devido a limitações, não mediram esforços para o desenvolvimento desta pesquisa.

A banca avaliadora, pela disponibilidade e contribuição a este trabalho.

*A todos, o meu muito obrigado.*

## RESUMO

Marcadores biológicos têm sido estudados com objetivo de identificar fatores que possam prever a evolução dos pacientes com câncer colorretal e ajudar a selecionar os grupos com alto risco de recidiva; porém estudos existentes são insuficientes para serem recomendados para emprego clínico. O objetivo deste trabalho foi verificar a correlação da resposta inflamatória em pacientes com câncer colorretal como potenciais marcadores de atividade tumoral. Foi realizado um estudo observacional do tipo descritivo para avaliação de marcadores de atividade tumoral em pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal. Foram coletadas amostras de sangue no pós-operatório para a dosagem do nível da proteína C-reativa (PCR) e análise da interleucina-10 (IL-10). Os níveis séricos dos pacientes foram analisados de acordo com dois grupos de pacientes: ressecção curativa e não curativa. A correlação dos níveis da PCR e do antígeno carcinoembrionário (CEA) no grupo de ressecção curativa foi significativamente menor em relação ao grupo de ressecção não curativa ( $p < 0,05$ ). Em relação aos níveis de IL-10, não foi observada uma diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). O estudo sugere que a PCR reflete atividade tumoral quando seus níveis estão elevados. Não houve uma correlação dos níveis de IL-10 com atividade tumoral.

**Palavras chaves:** Neoplasias intestinais. Proteína C-reativa. Citocinas. Interleucina-10. Imunologia. Prognóstico.



## **ABSTRACT**

Biological markers have been studied in order to identify factors that would be able to predict evolution of patients with colorectal cancer that could help to select high risk relapse groups. However, none of them has been recommended for clinical use. The objective of this work was to verify the correlation between the inflammatory response and tumor activity in patients with colorectal carcinoma. An observational and descriptive study was performed. Blood samples from 28 patients were collected postoperatively for determination of C-reactive protein (CRP) and Interleukin-10 (IL-10). The analysis was performed comparatively according to curative and non curative resection. The correlation levels of CPR and carcinoembryonic antigen (CEA) in the curative resection group was lower compared with non curative resection group ( $p < 0.05$ ). No difference between the groups was observed in the levels of IL-10. This study suggests that high levels of CRP, but not IL-10 reflect tumor activity.

**Keywords:** Intestinal neoplasia. C-reactive protein. Cytokines. Interleukin-10. Immunology. Prognosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>ESQUEMA 1</b>	Interação entre células tumorais e infiltrado inflamatório e/ou células do sistema imune no microambiente do tumor.....	21
<b>ESQUEMA 2</b>	Dupla função dos macrófagos na progressão tumoral.....	24
<b>ESQUEMA 3</b>	Papel contrastante dos leucócitos adaptativos durante o desenvolvimento do câncer.....	26
<b>ESQUEMA 4</b>	Relação da resposta inflamatória de uma lesão tecidual normal e uma lesão tumoral.....	28
<b>GRÁFICO 1</b>	Níveis séricos de CEA de acordo com os grupos de pacientes com ressecção curativa e não curativa.....	42
<b>GRÁFICO 2</b>	Níveis séricos da PCR de acordo com os grupos de pacientes com ressecção curativa e não curativa.....	43
<b>GRÁFICO 3</b>	Níveis séricos de IL-10 de acordo com os grupos de pacientes com ressecção curativa e não curativa.....	44

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b>	Características clinicopatológicas dos pacientes do estudo.....	39
<b>TABELA 2</b>	Número de pacientes de acordo com o nível da PCR nos grupos de ressecção curativa e não curativa.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatórios não esteroidais
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
Células NK	Células natural killer
BFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básicos
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CLT	Linfócitos T citotóxico
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunossorbente ligado à enzima
FcR	Receptor Fc
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito-macrófagos
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IL	Interleucina
INF	Interferon
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MHC	Molécula do complexo de histocompatibilidade principal
MMP	Metaloproteinases
MSI	Instabilidade microsatélite
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Proteína C-reativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas

RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAA <sub>s</sub>	Antígenos associados a tumores
TAM	Macrófagos associados a tumores
TGF-β	Fator transformador de crescimento β
TIL	Linfócito infiltrado em tumor
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
Treg	Linfócitos T reguladores
VEGF	Fatores de crescimento endotélio vascular
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Inflamação e câncer.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Células envolvidas na resposta inflamatória anti-tumoral.....</b>	<b>20</b>
2.2.1	Macrófagos associados a tumores (TAM) e células dendríticas.....	22
2.2.2	Linfócitos.....	25
<b>2.3</b>	<b>Mediadores da resposta inflamatória anti-tumoral.....</b>	<b>27</b>
2.3.1	Fator de necrose tumoral.....	29
2.3.2	Interleucinas.....	29
2.3.3	Quimiocinas.....	30
<b>2.4</b>	<b>Papel da proteína C-reativa na resposta inflamatória.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5</b>	<b>Modulação da resposta inflamatória no câncer: implicações clínicas.....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Tipo de estudo.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>População.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>CrITÉRIOS de inclusão.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>CrITÉRIO de exclusão.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5</b>	<b>Amostra.....</b>	<b>36</b>
<b>4.6</b>	<b>Procedimentos.....</b>	<b>36</b>
4.6.1	Avaliações oncológica de triagem.....	36

4.6.2	Análises sorológicas.....	37
4.6.3	Dosagem de Proteína C-reativa ultra-sensível.....	37
4.6.4	Dosagem de IL-10 por ELISA.....	37
<b>4.7</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>38</b>
<b>4.8</b>	<b>Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1</b>	<b>Características clinicopatológicas.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise do antígeno carcioembrionário.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise da proteína C-reativa.....</b>	<b>42</b>
<b>5.4</b>	<b>Análise da interleucina 10.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é um importante problema de saúde pública mundial. Seu diagnóstico tardio é responsável pelas elevadas taxas de mortalidade. Aproximadamente 150 mil novos casos de câncer colo-retal são estimados para o ano de 2009 no mundo, correspondendo aproximadamente 10% de todos os cânceres incidentes. A mortalidade do câncer colorretal está estimada para 2009 de 6 mil novos casos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). Segundo dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2009) a incidência de câncer de cólon do Brasil para 2008 foi de 12.490 casos novos entre homens (4º tumor mais freqüente) e 14.500 casos novos em mulheres (3º entre as mulheres). Esses valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos para cada 100.000 homens e 15 para cada 100.000 mulheres. Além disso, a incidência do câncer colorretal aumenta de forma exponencial com a faixa etária, sendo 90% dos casos diagnosticados entre 50 a 70 anos (LIBUTTI *et al.*, 2005).

Atualmente os aspectos epidemiológicos, classificação histopatológica e o sistema de estadiamento TNM, preconizado pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 2002) são considerados as principais variáveis utilizadas na estratificação dos pacientes com câncer, ou seja, são reconhecidas como fatores prognósticos (BENSON, 2003). A estratificação desses pacientes em grupos de riscos permite estabelecer estimativas de sobrevida e a necessidade de tratamentos complementares. O sistema de estadiamento é o método de maior precisão para o agrupamento dos pacientes com o mesmo prognóstico. O sistema de estadiamento TNM do câncer colorretal (ANEXO 1) baseia-se no nível de penetração tumoral na parede intestinal (T), no número de linfonodos regionais comprometidos por metástases (N) e na presença ou ausência de metástases à distância (M). Esta classificação discrimina pacientes com doença em estágio inicial daqueles com doença avançada de acordo com quatro estádios. O estágio I representa tumor invadindo a submucosa ou muscular própria; o estágio II representa o tumor invadindo além da muscular própria; o estágio III representa evidência de metástase em linfonodos regionais; e o estágio IV representa evidência de metástase a distância, além dos linfonodos regionais acometidos (AJCC, 2002). Contudo sua acurácia é de aproximadamente de 65%, ou seja, falha ao estimar a evolução de muitos pacientes. Principalmente nos estádios II e III, a sobrevida em cinco anos varia de 30% a 70%. Algumas populações do estágio II têm similar recorrência e sobrevida que populações estágio III.



Claramente, o genótipo dessas populações dita o seu comportamento, porém a biologia molecular desses tumores necessita ser elucidada (ROSSI, 2004).

Considerando que os marcadores biológicos são componentes celulares, estruturais e bioquímicos, presentes não só em células tumorais como também em células normais, eles podem estar associados com a recorrência e diferenças na sobrevida (CAPELOZZI, 2001). Seu emprego na avaliação do comportamento clínico das neoplasias constitui um importante instrumento auxiliar na determinação da evolução tumoral e em seu tratamento, posto que as alterações determinantes da progressão de qualquer carcinogênese são resultado de numerosos eventos celulares que ocorrem a nível genético e bioquímico (GARCIA *et al.*, 1989; GERDES; BECKER, 1992; ROCA *et al.*, 2006). Inúmeras variáveis têm sido estudadas com objetivo de identificar os fatores que possam prever a evolução dos pacientes com câncer colorretal e ajudar a selecionar os grupos com alto risco de recidiva, porém a maioria dos estudos existentes são insuficientes para serem recomendados para emprego clínico (COMPTON *et al.*, 2000; DÍEZ *et al.*, 2001; MIRZA *et al.*, 2008; VATHER *et al.*, 2009; YUN *et al.*, 2008).

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é o marcador de carga tumoral mais utilizado na avaliação de rotina de pacientes com câncer colorretal. O CEA é uma glicoproteína da família das imunoglobulinas que, contribui provavelmente, para a capacidade de metastatização destes tumores. (BENCHIMOL *et al.*, 1989; SUN *et al.*, 2009). Sua marcação positiva é observada na membrana das células tumorais, permitindo uma maior adesão entre estas e as células endoteliais. Além de sua presença nas membranas, também é expresso no meio intracelular em quantidade relacionado ao grau de diferenciação celular, sendo observado em maior volume nos tumores pouco diferenciados (PINHO *et al.*, 2004). Seu valor pré-operatório tem sido associado como um marcador prognóstico de sobrevida e recorrência. Contudo, seu valor no pós-operatório ainda é controverso (KAHLENBERG *et al.*, 2003).

Segundo Kahlenberg *et al.* (2003), a identificação de fatores moleculares é essencial para melhorar o tratamento bem como os seus resultados. Esses fatores podem ser expressos tanto pelas células tumorais como pelas próprias células do hospedeiro. Os genes P53 e ras, instabilidade microsatélite (MSI) e fatores de crescimento endotélio vascular (VEGF) são fatores com grande potencial de serem marcadores de prognóstico. Acredita-se que a utilização de múltiplos marcadores moleculares possa desenvolver um melhor perfil de risco. Além disso, considera-se que o desenvolvimento tumoral não é causado apenas por alterações

intrínsecas, mas um processo de múltiplas etapas, que envolve interações complexas entre as células transformadas, a matriz extracelular circundante e o sistema imunológico do hospedeiro. Essas interações podem acontecer pelo contato célula-célula ou serem mediadas por proteínas solúveis, como os fatores de crescimento e citocinas (PALUCKA *et al.*, 1999; SHURIN *et al.*, 1996).

Considerando a resposta imune do hospedeiro contra as células tumorais e dos mecanismos que facilitam a evasão dessas células da vigilância do sistema imunológico, esforços estão sendo feitos para o entendimento e o desenvolvimento de métodos de modulação do sistema imunológico para a identificação e erradicação dos tumores (LORUSSO; RÜEGG, 2008; POLLARD, 2004; QUANTE; WANG, 2008; ROBERT *et al.*, 1998). A imunopatologia tumoral atualmente tem dado grande importância aos antígenos associados a tumores (TAAs). Esses antígenos surgem durante a carcinogênese através de mutações genéticas e o seu comportamento está relacionado à tolerância ou ativação da resposta imune. Os TAAs podem ser percebidos como antígenos “próprios”, e na ausência de sinais inflamatórios a resposta imune a estes antígenos pode ser pouco desenvolvida. Contudo, com a progressão dos tumores, eles se diferem dos tecidos normais tanto na composição do arsenal antigênico como no comportamento clínico-biológico.

Do ponto de vista molecular, as células tumorais apresentam instabilidade genética, expressão anormal de fatores de crescimento e citocinas. Nos tumores malignos podemos observar uma produção de novos antígenos. Esses antígenos possuem o potencial para indução da resposta inflamatória ativando a resposta imune inata e adquirida e a possibilidade de gerar sinais inibitórios (BONERTZ *et al.*, 2009). Muitas vezes não é necessário o aparecimento de novos antígenos; uma mudança da densidade de proteínas codificadas pode afetar dramaticamente a antigenicidade tumoral. (DABELSTEEN; GAO, 2005).

Citocinas inflamatórias podem modular a expressão dos antígenos tumorais, das moléculas de adesão e da produção de fatores imunossupressores, podendo assim, bloquear ou facilitar o crescimento tumoral. Entre uma variedade de citocinas pesquisadas, a interleucina 10 (IL-10) destaca-se por apresentar atividade complexa sobre o microambiente tumoral. Possui efeito imunossupressivo e antiinflamatório como sua principal característica, inibindo a produção de células B imunoglobulinas, células T produtoras de citocinas pró-inflamatórias, redução da proliferação de antígenos das células T e células apresentadoras de antígeno (APC) das moléculas MHC de classe 2. Por outro lado, seu efeito pró-tumor também é observado, atuando de forma direta sobre as células tumorais ou mesmo inibindo o sistema imune

adquirido (DE VITA, *et al.*, 1999; LIN; KARIN, 2007). Uma outra interleucina de importância no desenvolvimento da carcinogênese é a interleucina 6 (IL-6). Caracteriza-se por estimular os hepatócitos a produzirem RNA mensageiro (RNAm) para produção de proteínas de fase aguda.

A proteína C-reativa (PCR) se destaca entre as proteínas de fase aguda por apresentar meia vida plasmática curta (aproximadamente 19h) e uma concentração plasmática exclusivamente relacionada à síntese nesse período (SANTOS *et al.*, 2003). Em certas circunstâncias, a elevação da PCR pode simplesmente refletir um processo inflamatório inespecífico secundário à necrose tumoral ou injúria tecidual. Por outro lado, a elevação da PCR pode indicar o potencial de malignidade de um tumor. Estudos em pacientes com tumores colorretais indicam que pacientes que permanecem com níveis séricos da PCR elevados têm um pior prognóstico em relação aqueles que os níveis permanecem baixos. Além disso, percebe-se uma relação dos níveis elevados com maior frequência de invasão tumoral local, estágios mais avançados e altas taxas de recorrências, sugerindo que a resposta inflamatória possui um importante papel na progressão do tumor colorretal (CANNA *et al.*, 2005; MACMILLAN *et al.*, 1995; NIKITEAS *et al.*, 2005; WIGMORE *et al.*, 2001). Entretanto alguns pesquisadores questionam a validade da PCR como marcador de atividade tumoral a ser analisado em pacientes com câncer colorretal (CHUNG; CHANG, 2003). O objetivo deste estudo foi verificar a correlação da resposta inflamatória em pacientes com câncer colorretal como potencial marcador de atividade tumoral.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Inflamação e câncer

Atualmente, um grande número de observações tem associado a inflamação com o processo de iniciação e promoção tumoral (BALKWILL; MANTOVANI, 2001), diferente de evidências anteriores que apontam para o papel protetor do sistema imune contra os tumores (GALON; FRIDMAN; PAGÈS, 2007).

Durante o processo de iniciação tumoral as células normais são geneticamente alteradas tornando-se malignas e em seguida as células iniciam o processo de promoção tumoral, ou seja, as células iniciadas são envolvidas em eventos epigenéticos que influenciam em sua proliferação e apoptose (KUNDU; SURH, 2008). Modelos experimentais de carcinogênese química e transgênica têm permitido que investigadores identifiquem uma série de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, enzimas e fatores de transcrição que são importantes ou necessários para a carcinogênese (ITZKOWITZ; YIO, 2004; JESSUP, *et al.*, 2004). Assim, diante de uma lesão tecidual, uma rede multifatorial de sinais químicos é iniciada e mantida pelo hospedeiro com objetivo de cicatrizar o tecido lesado. Esse ambiente inflamatório é ocupado pela migração de leucócitos (neutrófilos, monócitos e eosinófilos), células dendríticas, células T e células *Natural Killer* (NK) do sistema venoso para a região da lesão e dos mastócitos do próprio tecido. Uma vez que o reparo é completado e o agente causador removido, a proliferação e a inflamação regredem. No entanto, reações inflamatórias prolongadas e intensas podem ocasionar dano celular, promovendo mutações ou sustentando danos ao DNA, permitindo sua proliferação em ambientes ricos de células inflamatórias e fatores de crescimento. Assim, acredita-se que a resposta inflamatória ou auto-imune aguda tende a estar associada à prevenção de tumores e ao efeito anti-tumor; já a resposta inflamatória crônica modela a inflamação e tende a estar associada com a iniciação e com a promoção tumoral (BALKWILL; MANTOVANI, 2001).

Embora o melhor entendimento do papel da inflamação na carcinogênese seja relativamente recente, houve observações históricas que apontaram para essa direção. Em 1863, Rudolf Virchow identificou leucócitos em tecidos neoplásicos e hipotetizou a relação da inflamação com o câncer. Ele sugeriu que o infiltrado linfocitário reflete a origem do câncer nos locais da inflamação crônica (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Essa

observações ficaram negligenciadas por mais de um século até que as evidências concretas da ligação entre o câncer e a inflamação em humanos foram observadas em indivíduos utilizando anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) que apresentavam incidência reduzida de câncer (BARON, *et al.*, 2003, BARON, *et al.*, 2006; COOK, *et al.*, 2005; FLOSSMANN; ROTHWELL, 2007; RIJCKEN, *et al.*, 2007, SANDLER, *et al.*, 2003).

Adicionalmente, existem evidências que muitas neoplasias são iniciadas por infecções crônicas e doenças auto-imunes (ITZKOWITZ; YIO, 2004). Mais de 15% dos cânceres no mundo podem ser atribuídos a infecções, um total de 1,2 milhões de caso por ano (COUSSENS; WERB, 2002). Embora alguns patógenos, vírus em particular, podem diretamente induzir a transformação celular, outras infecções são ligadas ao desenvolvimento do câncer por estabelecer um microambiente inflamatório crônico que favorece a transformação celular e promoção da progressão tumoral. Como exemplo, o *Helicobacter pylori* infecta cerca de 50% da população mundial, e tem encontrado sua relação com a inflamação crônica gástrica que evolui para atrofia, metaplasia, displasia e câncer gástrico. Notavelmente, o risco de câncer gástrico em pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori* foi maior em quem tinha polimorfismo genético pró-inflamatório nos locos gênicos que regulam a produção das citocinas IL-1B, IL-8, TNF e IL-10 (ALLAVENA, *et al.* 2008 a).

A fim de entender a complexa inter-relação entre o câncer e os mecanismos da inflamação é importante considerar que a lesão neoplásica não é uma estrutura de crescimento estranha sobre um tecido normal, mas uma complexa interação entre as células neoplásicas, o estroma tumoral e a infiltração de células hematopoiéticas. Assim, semelhante a uma infecção por um patógeno que se desenvolve com eficiência dentro de seu hospedeiro, é necessário alterar a homeostasia tecidual sem destruí-la e ao mesmo tempo evitar a resposta imune efetiva contra ele (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). O evento de iniciação para o desenvolvimento de um câncer é susceptível de afetar as células epiteliais, assim como os fibroblastos, células endoteliais, células inflamatórias e outras células estromais. Somente quando o perfeito equilíbrio entre as alterações desses diferentes componentes teciduais está estabelecido, o tumor encontra condições para estabelecer, progredir e disseminar. Portanto a imunogenicidade do tumor é aparentemente adaptado ao microambiente assim como a resposta inflamatória favorecerá a angiogênese, ao crescimento tumoral e à disseminação. Os mecanismos potenciais capazes de induzir a destruição são bloqueados ou atenuados (BUI; SCHREIBER, 2007). O aparente efeito paradoxal da resposta inflamatória e da resposta imune, tanto a favor quanto contra a iniciação tumoral e sua progressão, pode ser melhor

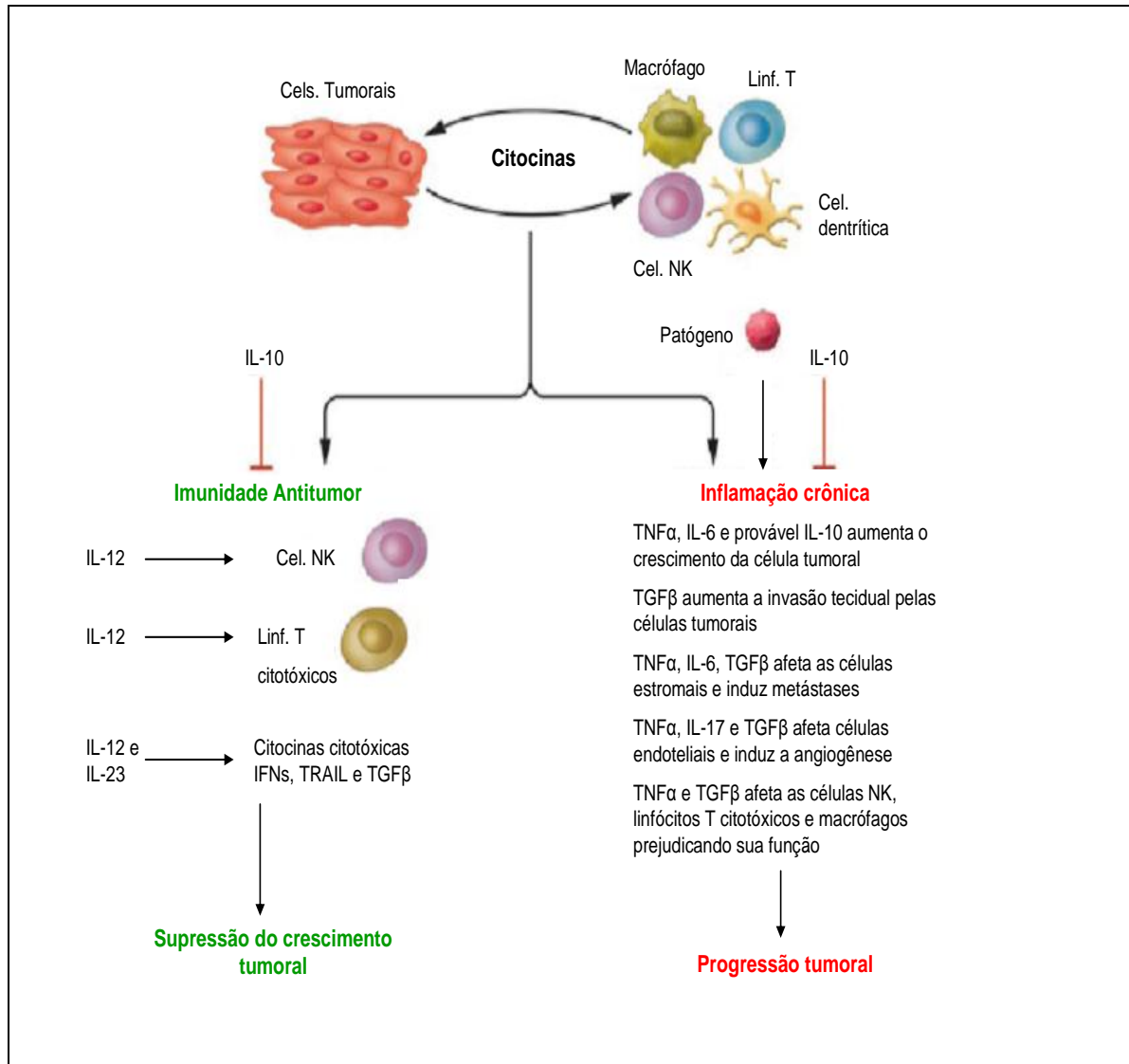
entendido se analisados os agentes e elementos deste delicado equilíbrio que regulam a iniciação tumoral.

## **2.2. Células envolvidas na resposta inflamatória anti-tumoral**

As células tumorais produzem várias citocinas e quimiocinas que atraem leucócitos. O componente inflamatório do desenvolvimento neoplásico pode incluir uma diversa população de leucócitos como, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos e mastócitos assim como linfócitos. Dentre essas, os macrófagos e linfócitos T são freqüentemente predominantes neste ambiente inflamatório. Todos são capazes de produzirem uma variedade de mediadores como as citocinas, oxigênio reativo, proteases cisteinas e serinas, metaloproteinases (MMP), agentes de proliferação de membrana e mediadores solúveis de morte celular como TNF- $\alpha$ , interleucinas e interferons (LU; OUYANG; HUANG, 2006; WAHJ, KLEINMAN, 1998) que podem exercer efeito paradoxal durante o desenvolvimento do câncer. O esquema 1 representa a relação paradoxal das células tumorais com as células do sistema imune no micro-ambiente tumoral, conforme descrição de Lin; Karin (2007):

Citocinas secretadas pelo tumor e pelas células imunes/inflamatórias podem promover o desenvolvimento tumoral e a sobrevivência das células tumorais ou exercer efeitos antitumorais. A inflamação crônica se desenvolve através da ação de vários mediadores inflamatórios, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17, os quais podem levar à erradicação da imunidade antitumor e acelerar a progressão tumoral. Contudo, TRAIL, através da indução direta da apoptose da célula tumoral; IL-10, através dos efeitos anti-inflamatórios; IL-12, através da ativação dos linfócitos T citotóxico e das células NK e expressão de mediadores citotóxicos, podem induzir a supressão tumoral. As múltiplas etapas do TGF- $\beta$  (citotóxico sobre as células do câncer de colon e seus efeitos positivos e negativos no microambiente tumoral) e IL-23 explicam seus papéis duplos no desenvolvimento tumoral. (LIN; KARIN, 2007, p. 1176)

ESQUEMA 1: Interação entre células tumorais e infiltrado inflamatório e/ou células do sistema imune no microambiente do tumor.



FONTE: Adaptado de LIN; KARIN, 2007, p. 1176.

### 2.2.1 Macrófagos associados a tumores (TAM) e células dentríticas

Os macrófagos associados a tumores (TAM) representam o maior componente inflamatório na maioria dos infiltrados tumorais. Os TAM derivam da circulação de monócitos precursores e são direcionados para os tumores através de quimiocinas. Além disso, muitos tumores produzem citocinas chamadas fatores estimuladores de colônias que prolongam a sobrevivência dos TAM (ALLAVENA, *et al.* 2008 a; BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Heterogeneidade e plasticidade são marcas das células da linhagem dos monócitos-macrófagos. Em respostas a citocinas e produtos microbianos, os macrófagos expressam propriedades funcionais específicas e polarizadas, semelhante aos linfócitos T *Helper* 1 e 2 (Th1 e Th2). Muitos estudos referem à polarização dos macrófagos como células M1 e M2. Os macrófagos M1 ativados são induzidos por interferon- $\gamma$  ou em conjunto com estímulos microbianos (ex: lipossacarídeo) ou citocinas (ex: TNF- $\alpha$  e fatores de crescimento de granulócitos-macrófagos). Já os macrófagos M2 abrangem várias formas de ativação distinta da M1, incluindo células expostas a interleucina 4, interleucina 13, glicocorticóides. As células M1 possuem um fenótipo associado a produção elevada de IL-12 e IL-23 e reduzida de IL-10, tornando-se eficientes produtores de oxigênio reativo, reativos intermediários do nitrogênio e outras citocinas inflamatórias (incluindo IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ). Além disso, as células M1 participam como indutoras e efetoras na polarização da resposta Th1, desenvolvendo resistência contra tumores. As células M2, por outro lado, compartilham um fenótipo associado a produção elevada de IL-10 e reduzida de IL-12 e IL-23. As células M2 têm receptores do tipo “*scavenger*”, manose e galactose e o metabolismo da arginina é alterado no nível de ornitina e poliaminas proporcionando uma maior estímulo à proliferação celular. Ao contrário das células M1, as células M2 participam da polarização das reações Th2 que estão presentes em tumores, promovendo a progressão tumoral, reparo tecidual, remodelação e funções imunoreguladoras. Contudo não está claro qual são os sinais que levam à polarização dos TAM (ALLAVENA, *et al.*, 2008b; MANTOVANI, *et al.*, 2002; MANTOVANI, *et al.*, 2008; SICA, *et al.*, 2008).

Os TAM podem exercer dupla influência na formação e função dos vasos sanguíneos. Quando apropriadamente ativados, eles produzem moléculas anti-angiogênicas e alteram a integridade dos vasos sanguíneos. Entretanto, os TAM também produzem moléculas pró-angiogênicas. Vários estudos têm evidenciado que o nível de concentração de TAM está associado ao aumento da angiogênese e com a produção de fatores de angiogênicos, como o

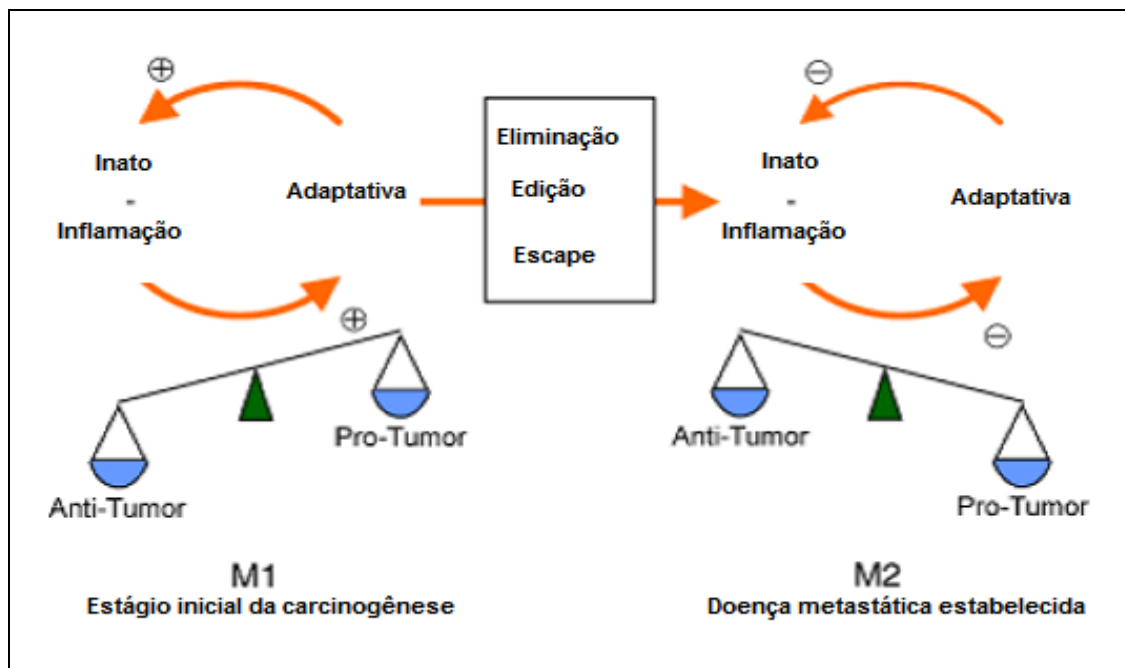


VEGF e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Outro fator produzido pelos macrófagos é o VEGF-C que tem a função de induzir a linfoangiogênese peritumoral e posteriormente disseminar as células cancerosas via linfática (ALLAVENA, *et al.*, 2008 a; ALLAVENA, *et al.*, 2008 c; COUSSENS; WERB, 2002).

Os TAM contribuem para a progressão e a invasão tumoral através da expressão de moléculas que diretamente estimulam as células tumorais a proliferar e degradar a matriz extracelular. Essas moléculas incluem: fatores de crescimento epidérmico (EGF), membros da família do fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), VEGF, quimiocinas e citocinas. Além disso, os macrófagos podem produzir enzimas (metaloproteases (MMP) - MMP2, MMP9, entre outras) que também atuam na degradação da matriz extracelular. Os TAM promovem o crescimento tumoral através de mecanismos imunes e influenciam na supressão da resposta imune adaptativa anti-tumor (ALLAVENA, *et al.*, 2008 a; POLLARD, 2004). O esquema 2 representa a dupla função dos macrófagos na progressão tumoral. Allavena e outros (2008 c) explica que:

Durante as fases iniciais da carcinogênese, os macrófagos M1 predominam. Essas células exibem uma atividade anti-tumoral assim como uma específica imunidade adaptativa anti-tumoral, o qual contribuem para sua polarização. Em uma neoplasia avançada e estabelecida, quando células tumorais escapam do ataque imune, os macrófagos polarizados M2 predominam e suprimem a imunidade adaptativa, a qual contribui para polarização M2. (ALLAVENA, *et al.*, 2008 c, p. 159)

ESQUEMA 2: Dupla função dos macrófagos na progressão tumoral.



FONTE: Adaptado de ALLAVENA, *et al.*, 2008 c, p.159.

Os monócitos, na presença de fatores estimuladores de colônia granulócito-macrófagos (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4), se diferenciam em células dendríticas imaturas. As células dendríticas são apresentadoras de antígenos que modulam a imunidade adaptativa controlando a ativação de células T, células B, células NK; induzem ativação das células M1 levando instabilidade no ambiente inflamatório tumoral. As células dendríticas residem em todos os tecidos. Possuem a propriedade de capturar e processar antígenos, migrando em seguida para o tecido linfóide, a fim de apresentá-los aos linfócitos. Quando inativadas (células dendríticas imaturas) induzem tolerância por apresentar antígenos próprios aos linfócitos T, uma vez que células maduras induzem a imunidade antígeno específicas, promovendo a proliferação de células T e a diferenciação de células *Helper* e efetoras. Embora as células dendríticas maduras geralmente induzam resposta imune Th1 e são consideradas efetivas contra o câncer, elas também podem induzir célula T supressora e reguladora, participando da tolerância central e periférica (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; COUSSENS; WERB, 2002).

Estudos clínicos relatam que as células dendríticas presentes no infiltrado tumoral são frequentemente imaturas e deficientes na estimulação de células T. (BELL, *et al.*, 1999). Além disso, o tumor pode alterar a função das células dendríticas e escapar de efetores imunes por polarizar a maturação das células para um fenótipo que impede a imunidade

específica induzindo tolerância e desencadeando vias supressoras (MANTOVANI, *et al.*, 2008).

### 2.2.2 Linfócitos

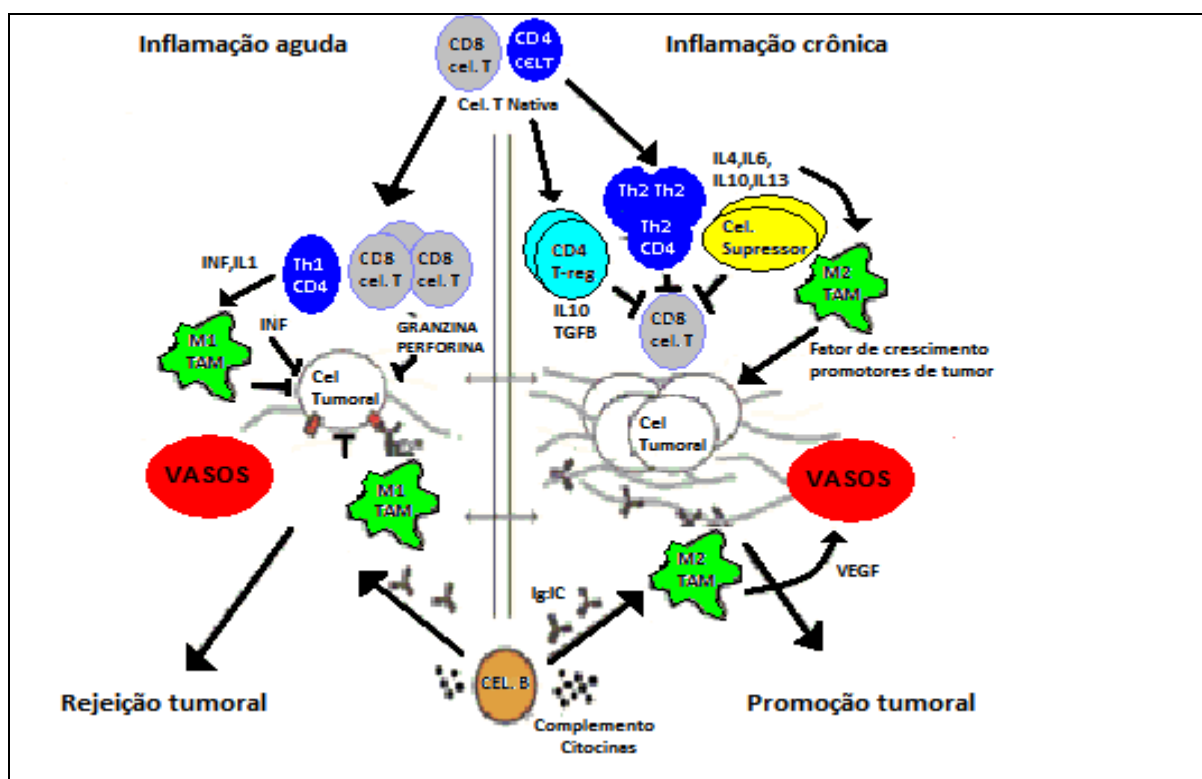
Os tumores são freqüentemente infiltrados por linfócitos, denominados TIL. Os TIL são representados pelos linfócitos T visto que os linfócitos B e células *Natural Killer* (NK) são raras no ambiente tumoral.

Os linfócitos T *helper* são ativados em resposta a fatores solúveis e podem ser classificados em duas categorias: células Th1 e células Th2. De acordo com estímulo recebido, linfócitos T *helper*, que são polarizados para respostas Th1, secretam interferon- $\gamma$ , fator de crescimento transformador beta, TNF $\alpha$  e IL-2. Essas citocinas colaboram com a função citotóxica dos linfócitos CD8+, induzem a auto-regulação do processamento de antígeno nos proteossomas, induzem a expressão MHC de classe I e II e podem induzir outros antígenos relacionados a células neoplásicas. Os Linfócitos Th1 também aumentam a resposta imune anti-tumor estimulando a ativação de macrófagos. Já os linfócitos T *helper* que são polarizados para respostas Th2 sintetizam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que induzem anergia e perda da citotoxicidade das células T. (BALKWILL, MANTOVANI, 2001; DeNARDO, COUSSENS, 2007). Entretanto, não existem papéis fixos e em alguns casos, os mesmos fatores podem estar associados tanto com a iniciação tumoral quanto com a resistência antitumoral.

Os linfócitos B são reconhecidos em contribuir na resposta imune anticâncer via secreção de imunoglobulinas antígeno específica. Apesar do claro papel dos linfócitos B em erradicar células neoplásicas e participar da regressão espontânea tumoral através dos mecanismos mediados por imunoglobulinas, recentes dados indicam que a ativação crônica dos linfócitos B possuem um papel paradoxal, induzindo o desenvolvimento do tumor. Porém, este mecanismo de indução tumoral não está bem esclarecido. (BEI, 2009; DeNARDO, COUSSENS, 2007; DUOSHA, *et al.*, 2008). O esquema 3 representa de forma esquemática o papel da resposta imune adaptativa no desenvolvimento do câncer. Como nos esclarece Denardo; Coussens (2007):

Durante a resposta inflamatória aguda (painel da esquerda, células T (Th1 CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) regulam diretamente a citotoxicidade das células tumorais, enquanto polariza indiretamente células imunes inatas rumo à supressão tumoral (como a polarização de M1 dos TAMs). Fatores derivados de células B imunoglobulinas e complemento facilitam o recrutamento dos leucócitos inatos e destroem as células neoplásicas. Durante a inflamação crônica, entretanto (painel direito), células supressoras mioeloides, células T (Th2 CD4<sup>+</sup>) e células T reguladoras (Treg) atuam inibindo as células T CD8<sup>+</sup> e induzem a polarização pró-tumoral da resposta imune inata (tal como polarização M2 dos TAMs) pela via de secreção de citocinas (IL-4, IL-13, IL-10, IL-6 e TGF-β). Cronicamente durante a inflamação crônica, essas células imunes inatas, por sua vez fornecem um rico microambiente pró-angiogênico e pró-tumoral. (DeNARDO; COUSSENS, 2007, p. 215)

ESQUEMA 3: Papel contrastante dos leucócitos adaptativos durante o desenvolvimento do câncer.



FONTE: Adaptado de DeNARDO; COUSSENS, 2007, p.215.

### 2.3 Mediadores da resposta inflamatória anti-tumoral

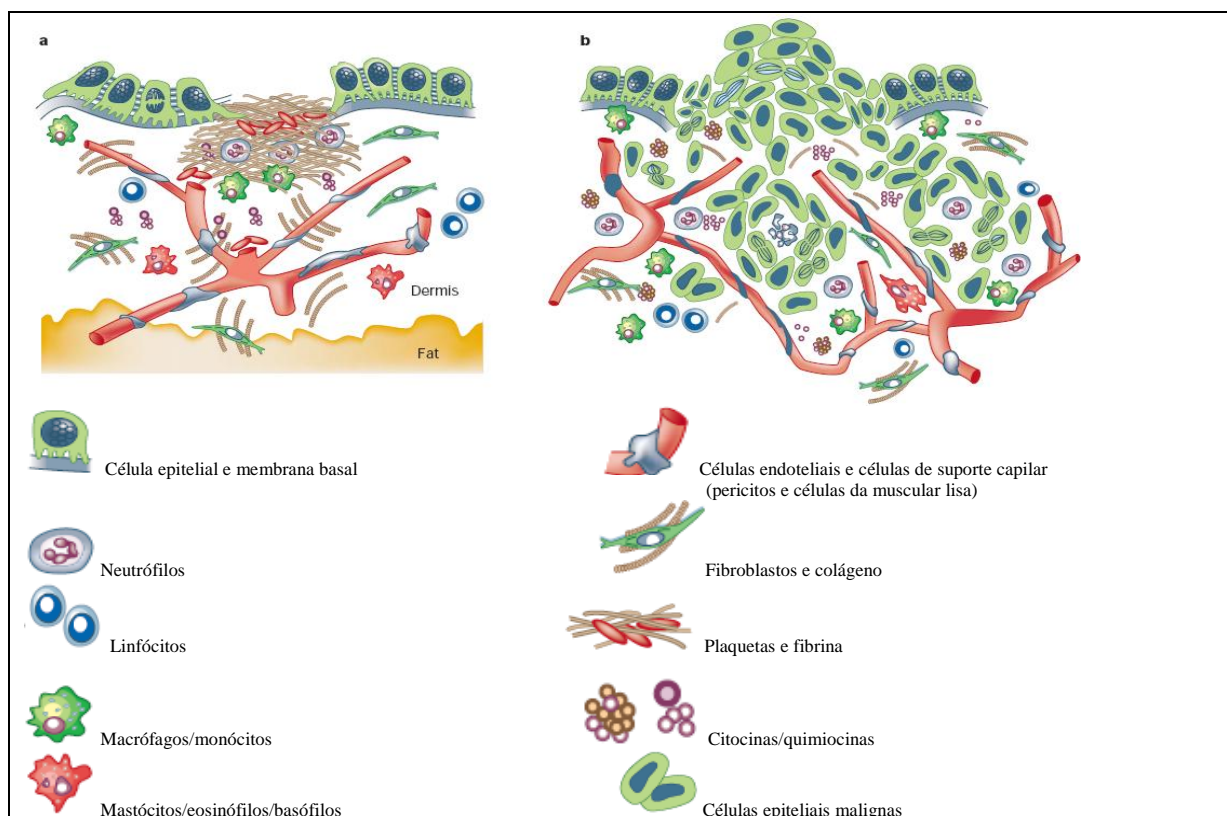
Em um microambiente tumoral há um delicado balanço entre a imunidade anti-tumor e a imunidade pró-tumor. Essas atividades dependem de diferentes mediadores que originam de células inflamatórias do hospedeiro, de células tumorais e de outros tipos de células como os fibroblastos e células endoteliais (LIN; KARIN, 2007). As citocinas (interleucinas, TNF- $\alpha$ , fatores de crescimento e fatores de diferenciação - fatores estimuladores de colônias) são os principais mediadores desse sistema e possuem importante papel regulatório no crescimento, na diferenciação e na inibição da apoptose de células alteradas no microambiente inflamatório (LU; OUYANG; HUANG, 2006).

Em 1986, Dvorak mostrou que a cicatrização de feridas e a formação do estroma tumoral compartilham de importantes propriedades. A cicatrização das feridas são auto limitadas uma vez que nos tumores, a secreção de fatores de permeabilidade vascular e de fatores de crescimento endotelial (VEGF) pode levar à persistência de extravasamento de fibrina e fibronectina e contínua geração de matriz extracelular. As plaquetas presentes nas feridas são fonte de citocinas, principalmente de TGF- $\beta$  e VEGF. Plaquetas que liberam tais fatores podem ter importante papel na angiogênese dos tumores. Além disso, as próprias células malignas podem secretar citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas, mas geralmente faltam citocinas envolvidas em respostas imunes específicas e sustentadas. (BALLKWILL; MANTOVANI, 2001). O esquema 4 apresenta de forma esquemática a relação da resposta inflamatória de uma lesão tecidual normal e uma lesão com desenvolvimento tumoral. Coussens; Werb (2002) descreve esta relação da seguinte maneira:

**a)** Os tecidos normais têm uma estrutura altamente organizada. A membrana basal delimita a transição entre o epitélio e a derme (estroma vascularizado). Durante a cicatrização as plaquetas são ativadas e formam um tampão hemostático que libera fatores vasoativos. Fatores quimiotáticos como TGF- $\beta$  e PAF que induzem a formação do tecido de granulação. Em combinação, granulócitos, monócitos e fibroblastos são recrutados e a rede vascular é restaurada. Finalmente ocorre a reepitelização mediada por sinais recíprocos entre o epitélio e células do estroma.

**b)** Os carcinomas invasivos são menos organizados. A angiogênese e a linfangiogênese associados à neoplasia maligna produz uma rede vascular desorganizada. As células tumorais produzem várias citocinas e quimiocinas que atuam como mediadores mitogênicos e quimiotáticos para granulócitos, mastócitos, monócitos/macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Adicionalmente os fibroblastos e as células do infiltrado inflamatório secretam citocinas e quimiocinas que são mitogênicas para células neoplásicas. Todos esses mediadores potencializam o crescimento tumoral estimulando angiogênese induzindo a maturação e migração de fibroblastos e tornam capaz a difusão metastática por via venosa ou linfática. (COUSSSENS; WERB, 2002, p.861)

ESQUEMA 4: Relação da resposta inflamatória de uma lesão tecidual normal e uma lesão tumoral.



Fonte: Adaptado de COUSSSENS; WERB, 2002, p.861.

### 2.3.1 Fator de necrose tumoral

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é um importante mediador da inflamação, com ações diretas tanto na destruição quanto na recuperação celular. Ele é produzido principalmente pelos macrófagos ativados, mas também pelas células tumorais (KUNDU; SURH, 2008). O TNF- $\alpha$  pode iniciar uma cascata inflamatória constituída de outras citocinas inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e fatores de adesão endotelial, permitindo uma variada migração de células ativadas para o tecido lesado.

No desenvolvimento do câncer, altas doses de TNF- $\alpha$  seletivamente destroem vasos sanguíneos tumorais e induzem efeitos necróticos nos tumores. Quando cronicamente produzido, o TNF- $\alpha$  pode atuar na promoção de tumores, contribuindo para remodelação e desenvolvimento estromal, necessário para o crescimento e disseminação neoplásica. O TNF- $\alpha$  pode induzir dano ao DNA, inibir o reparo do DNA e atuar como fator de crescimento nas células tumorais. A habilidade do TNF- $\alpha$  de remodelação de tecidos na resposta inflamatória pode regular a interação das células tumorais com o estroma e com a matriz extracelular. Além disso, o TNF- $\alpha$  promove a angiogênese e o crescimento tumoral induzindo a produção de fatores angiogênicos, fosforilase timidina e metaloproteinases (LIN; KARIN, 2007; LU; OUYANG; HUANG, 2006).

### 2.3.2 Interleucinas

As interleucinas que regulam a resposta inflamatória influenciam o padrão de resposta imunológica contra tumores. Dentre elas, as IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 e IL-23 destacam-se como importante fator de carcinogênese. A IL-1 expressa tanto no tecido normal quanto em células tumorais e tem a propriedade de induzir fatores de transcrição e promover a expressão de genes envolvidos na proliferação celular e angiogênese. Há uma significativa correlação entre a produção de VEGF e a secreção de IL-1 e IL-6. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, originalmente identificada como fator de diferenciação de linfócitos B, a qual é produzida por uma ampla variedade de células, principalmente monócitos. É uma potente citocina inflamatória de fase aguda, porém está relacionada na transformação maligna, no crescimento tumoral, nos mecanismos anti-apoptóticos e na caquexia associado a tumores (DE VITA, *et al.* 2001; GALIZIA; *et al.* 2002). A IL-10 possui efeitos opostos a IL-6, ou seja, tem efeito

imunossupressivo e anti-inflamatório. A IL-10 inibe o fator de transcrição NF- $\kappa$ B e conseqüentemente inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12. Possui um efeito inibitório no desenvolvimento e na progressão tumoral. Estudos mostram os efeitos da IL-10 sobre a apoptose e a supressão da angiogênese. Entretanto efeitos diretos de IL-10 sobre as células tumorais podem favorecer o crescimento tumoral. Associado ao efeito direto na modulação de células tumorais, IL-10 tem a habilidade de suprimir a resposta imune adquirida (DE VITA, *et al.*, 1999). Níveis séricos elevados, maiores que 5pg/ml, de IL-10 têm sido correlacionados com pior prognóstico em pacientes com câncer (LECH-MARNADA, *et al.*, 2006). Esses mecanismos opostos de IL-10 dependem de interações com outras citocinas ou fatores encontrados no microambiente tumoral. A IL-12 tem um importante papel na atividade anti-tumor através da inibição da tumorigênese e na indução de regressão de tumores já estabelecidos. A maior atividade de IL-12 é promover a resposta Th1 e a resposta dos linfócitos T citotóxicos. A IL-17 tem seu principal papel na inflamação associada à carcinogênese nos efeitos pró-angiogênicos. Além disso, tem a função de recrutar células do sistema imune para o tecido periférico e induzir fatores pró-inflamatórios, incluindo TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , gerando um importante papel na localização e amplificação da inflamação. A IL-23 tem a capacidade de aumentar a proliferação de células T de memória e a produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 na ativação de células T. No entanto a IL-23 pode exercer efeitos sobre a IL-17. (KUNDU; SURH, 2008; LIN; KARIN, 2007; LU; OUYANG; HUANG, 2006).

### 2.3.3 Quimiocinas

As quimiocinas são primariamente definidas como fatores solúveis que regulam a direção de migração dos leucócitos durante a inflamação; contudo, os efeitos das quimiocinas estendem para outros tipos de células, incluindo células endoteliais e neoplásicas. Propriedades efetoras sobre as células também são identificadas, como a capacidade de estimular a proliferação celular (BALKWILL, 2004).

As quimiocinas são classificadas em quatro grupos: CXC, CC, XC e CX3C. A maioria dos tumores produz quimiocinas de dois grandes grupos: CXC e CC. Tipicamente o grupo CXC ativa neutrófilos e linfócitos e o grupo CC atua em vários subtipos de leucócitos incluindo monócitos, eosinófilos, células dendríticas, linfócitos e células *Natural Killer*. Mas



o que determina o número e o tipo de células que vão formar o infiltrado leucocitário nos tumores são as células do estroma e as próprias células tumorais no local de lesão (LU; OUYANG; HUANG, 2006). Como exemplo, no linfoma de Hodgkin, as células malignas de *REED-STERBERG* são a minoria no tumor que é formado principalmente pelo infiltrado de linfócitos, eosinófilos, fibroblastos, macrófagos e células do plasma. As células de *REED-STERBERG* induzem citocinas e quimiocinas que ativam a resposta Th2 contribuindo para supressão local da resposta Th1 (SKINNIDER; MAK, 2002).

Foi constatado que a exposição crônica de leucócitos a altas concentrações de quimiocinas no microambiente tumoral, pode ativar a resposta Th2, liberando citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- $\beta$ . Macrófagos do tipo M2 podem liberar CCL2, a qual contribui para a polarização de resposta Th2. Além disso, o microambiente tumoral pode inibir a migração e a função das células dendríticas, reguladora da resposta Th1 (BALKWILL, 2004).

As quimiocinas também possuem um importante papel sobre as células do endotélio vascular. Algumas quimiocinas CXC são pró-angiogênicas, enquanto outras têm atividade anti-angiogênica. O balanço entre as citocinas e quimiocinas pró-angiogênicas e anti-angiogênicas é o que determina a regulação da neoformação vascular. Além disso, as quimiocinas afetam vários estágios no processo de metástase. As CC podem induzir a produção de proteases importantes na invasão dos tumores (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; KUNDU; SURH, 2008). Assim, a rede de quimiocinas pode influenciar de forma indireta na sobrevivência, crescimento, mutação, proliferação diferenciação e movimento tanto do tumor quanto das células estromais.

#### **2.4 Papel da proteína C-reativa na resposta inflamatória**

A proteína C-reativa é um produto sintetizado pelos hepatócitos em resposta a IL-6 e TNF- $\alpha$  e ampliada pelo efeito sinérgico de IL-1 $\beta$ . Sua elevação no sangue indica a presença de inflamação aguda. Seus níveis tendem a elevar-se em 6 a 12 horas depois do início de um dano tecidual, infecção, inflamação e neoplasia maligna. Seu pico é por volta de 48 horas e sua meia vida plasmática é de 19 horas, mas mantém níveis elevados durante todo o processo inflamatório. Quando o estímulo inflamatório termina, os níveis séricos da PCR caem rapidamente. (MARNELL; MOLD; CLOSS, 2005). Em adultos saudáveis a concentração

mediana da PCR é de 0,8mg/L, sendo que no percentil 90 a PCR é de 3mg/L e no percentil 99 é 10mg/L. Durante um estímulo inflamatório os valores da PCR podem elevar de 50µg/L até níveis superiores a 500mg/L (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003).

A presença de níveis elevados de PCR pode simplesmente refletir uma resposta inflamatória inespecífica secundária à necrose ou dano tecidual. Por outro lado, a PCR também pode refletir um fenótipo tumoral e potencial metastático, partindo do princípio que a síntese da PCR é regulada por citocinas inflamatórias, as quais são fatores de crescimentos para neoplasias (MACMILLAN; CANNA, McARDLE, 2003; SIEMES, *et al.*, 2006). Uma das vantagens da PCR é que sua análise pode ser verificada de forma simples e rápida quando comparada com outros marcadores oncogênicos (NOZOE, *et al.*, 1998).

Vários estudos têm buscado avaliar os níveis séricos da PCR com o prognóstico de pacientes portadores de neoplasia (CROZIER, *et al.*, 2006; McMILLAN, CANNA, McARDLE, 2003; NIKITEAS, *et al.*, 2005; NOZOE, *et al.*, 1998; RAMSEY, *et al.*, 2006). Apesar de resultados conflitantes, os estudos têm correlacionado concentrações elevadas da proteína C-reativa com maior risco de recorrência e pobre sobrevida em pacientes com câncer. O estudo de McMILLAN *et al.* (1995) avaliou a PCR em 36 pacientes portadores de câncer colorretal e constatou que o grupo de pacientes que possuíam níveis da PCR maiores que 5mg/L, depois de quatro meses da cirurgia curativa, apresentaram maior taxa de recorrência independente do estadio do tumor, porém não considerou outras variáveis preditoras de recorrência. Já o estudo de Ghung e Chang (2003), com 172 pacientes com câncer colorretal, verificou que níveis da PCR maiores que 8mg/L no pré-operatório não estariam relacionados à atividade tumoral. Estudos mais recentes mostram que o nível da PCR superior a 10mg/L é uma variável independente associada com pior sobrevida em pacientes portadores de câncer colorretal, podendo assim, estar relacionada com o comportamento tumoral (CHUNG; WONG, *et al.*, 2007; CROZIER, *et al.*, 2007; CROZIER, *et al.*, 2009; NOZOE, *et al.*, 2008).

## 2.5 Modulação da resposta inflamatória no câncer: implicações clínicas

O melhor entendimento da resposta inflamatória e da resposta imune no câncer tem permitido o desenvolvimento de novas terapias na prevenção e tratamento de tumores.

Estudos publicados na literatura sugerem o efeito protetor da aspirina e outros AINEs no desenvolvimento do câncer. Dados indicam que o uso dessas drogas reduz o risco de câncer de colon em 40-50% e pode prevenir o câncer de mama, de pulmão, esôfago e estômago. Além disso, a atuação na prevenção de pólipos adenomatosos tem sido demonstrada com o uso dos AINEs. A habilidade do AINEs em inibir a ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) impede a conversão do ácido aracônico em prostaglandinas, as quais induzem reações inflamatórias nos tecidos lesados. A COX-2 está ligada ao processo inflamatório e relacionada com a inibição da apoptose, migração celular e angiogênese (BARON, *et al.*, 2003; COOK, *et al.*, 2005; BARON, *et al.*, 2006; FLOSSMANN; ROTHWELL, 2007; RIJCKEN, *et al.*, 2007; SANDLER, *et al.*, 2003).

As citocinas produzidas pelas células do sistema imune e de outros tecidos atuam como mediadores da reação imune, sendo consideradas importantes elementos na busca de terapias contra o câncer. A IL-1 $\beta$ , uma citocina com efeitos pleiotrópicos induz a intervenção de macrófagos no peritônio. Esse mediador tem sido um importante fator indicador de crescimento tumoral intraperitoneal. Baseado na influência de IL-1 $\beta$  sobre a carcinogênese, estudos preliminares têm avaliado o uso da *Taurolidine* intraperitoneal como inibidor da IL-1 $\beta$  em pacientes submetidos a ressecção completa de tumores gastrointestinais (BRAUMANN, *et al.*, 2009). Outra importante citocina, alvo de potenciais drogas antitumorais é o TNF- $\alpha$ , mediador chave na inflamação. O TNF- $\alpha$  é importante nos eventos iniciais do tumor, regulando a cascata de citocinas, quimiocinas, adesão, metaloproteínas e atividades pró-angiogênicas. Atualmente seis inibidores de TNF- $\alpha$  são estudados sob seus efeitos no tratamento de doenças auto-imunes e do câncer: Infliximabe, Adalimumabe, Golimumabe, CDP870, CDP571 e Etanercept. Esses inibidores atuam principalmente na lise celular mediada pelo complemento, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo e na via de sinalização, a qual conduz à apoptose e supressão de citocinas (ZIDI, *et al.*, 2009). Uma droga antiga, que atualmente retorna sua aplicação na prática clínica é a Talidomida. A Talidomida possui propriedades anti-angiogênicas, devida a inibição da atividade do fator de crescimento fibroblasto básico (bFGF), VEGF e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) além da inibição da formação de microvasos. Possui também propriedade anti-neoplásicas

inibindo a atividade NF- $\kappa$ B e induzindo à apoptose. Doses baixas e contínuas de talidomida possuem atividade em pacientes com mieloma múltiplo (SINGHAL, *et al.*, 1999). A IL-6 é um importante fator de crescimento em células de mieloma múltiplo. Na doença avançada há um excesso de produção de IL-6 e o aumento das concentrações séricas está associado à atividade proliferativa plasmática e curta sobrevida dos pacientes. Em modelos pré-clínicos, o uso de um anticorpo monoclonal anti-IL-6 tem mostrado atuar no aumento da atividade citotóxica de drogas que atuam no mieloma múltiplo, como a Dexametasona e o Bortezomibe (VOORHEES, *et al.* 2009). Estudos futuros são importantes para o melhor entendimento das terapias imunes.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Verificar a correlação da resposta inflamatória em pacientes com câncer colorretal como potencial marcador de atividade tumoral.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar os níveis séricos de CEA em pacientes submetidos à ressecção colorretal curativa e não curativa.
- Verificar os níveis séricos de Proteína C-reativa ultra-sensível em pacientes submetidos à ressecção colorretal curativa e não curativa.
- Verificar os níveis séricos de interleucina-10 em pacientes submetidos à ressecção colorretal curativa e não curativa.
- Classificar os pacientes submetidos à ressecção colorretal curativa e não curativa de acordo com a presença de atividade inflamatória verificada pela PCR maior que 10mg/L.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

**4.1 Tipo de estudo:** Estudo observacional do tipo descritivo.

**4.2 População:** Pacientes recrutados do Hospital Maria José Baeta Reis - ASCOMCER na cidade de Juiz de Fora no período de agosto de 2007 a fevereiro de 2009.

**4.3 Critérios de inclusão:** Pacientes ambulatoriais, com o diagnóstico de câncer colorretal, com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os sexos, classificados no estadio clínico de I a IV segundo atual classificação TNM (ANEXO 1), do tipo histológico adenocarcinoma conforme a classificação da Organização Mundial de Saúde (HARMILTON, 2000) e somente aqueles que tiverem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2).

**4.4 Critérios de exclusão:** Pacientes com doenças inflamatórias crônicas, incluindo infecções e doença do colágeno, assim como tumores em outros órgãos. Pacientes em uso de antiinflamatórios e antibióticos por qualquer motivo.

**4.5 Amostra:** 28 pacientes portadores de câncer colorretal que foram submetidos a cirurgia oncológica.

**4.6 Procedimentos:** Todos os pacientes foram submetidos à avaliação oncológica de triagem e subsequente e análise sorológica.

### **4.6.1 Avaliações Oncológica de Triagem**

Os candidatos ao estudo foram submetidos à entrevista, anamnese e exame físico. Os dados foram registrados em um formulário próprio, intitulado “Ficha de Registro Clínico” (ANEXO 3), na qual foram registradas informações referentes a:

- História clínica completa, determinando o tipo de cirurgia realizada: curativa, definida quando foi possível a remoção total de todo o tumor primário e cirurgia não curativa, definida quando não foi possível a remoção completa do tumor primário ou metástases estavam presentes.
- Exame físico

- Registro dos exames realizados pelo paciente durante o período de diagnóstico e acompanhamento.
- Registro das análises sorológicas.

#### **4.6.2 Análises sorológicas**

Em todos os pacientes foram realizadas coletas de amostras de sangue. As amostras foram centrifugadas a 2500 rotações por minuto (RPM) durante 10 minutos (centrifuga CELM COMBATE) a fim de separar o soro (material do estudo) dos elementos figurados (glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas). Uma parte do soro foi imediatamente utilizada a fim de dosar o nível de proteína C-reativa, e a outra parte foi armazenada a - 20°C até a análise de interleucina-10. Todas as amostras foram adequadamente registradas através das iniciais do paciente e data da coleta.

#### **4.6.3 Dosagem de Proteína C-Reativa ultra-sensível**

A análise foi realizada no laboratório do Hospital Maria José Baeta Reis a partir de amostras estáveis a 2°C a 8°C. A dosagem foi realizada imediatamente após a coleta do sangue. Amostras lipêmicas e hemolizadas foram descartadas. Valores acima de 10mg/L foram indicativos de presença de atividade inflamatória (CROZIER, *et al.* 2007).

Método: As partículas de látex recobertas com anticorpos anti-PCR humano do Kit BioTécnica (Minas Gerais) foram aglutinadas pela PCR presente na amostra. A proteína C-Reativa (PCR) sérica provoca uma aglutinação das partículas de látex recobertas com anticorpos anti-PCR. A aglutinação das partículas de látex é proporcional à concentração de PCR que foi quantificada por turbidimetria pelo aparelho Cobas Mira S / Plus da Roche. Limite inferior de detecção foi menor que 0,3mg/L.

#### **4.6.4 Dosagem de IL-10 pelo método de ELISA**

Placas de ELISA (Ensaio imunosorbente ligado à enzima) foram sensibilizadas com um primeiro anticorpo, 1µg/ml de anticorpo anti-hIL-10 (PeProtech Inc, New Jersey), diluídos em PBS (*Phosphate Buffered Saline*), incubadas durante 12 horas a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes usando 300µL de 0,05% Tween-20 em PBS em cada poço. Em seguida, adicionado 300µL de 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) em PBS em cada poço, encubado por uma hora em temperatura ambiente. Após este período, as placas foram aspiradas e lavadas quatro vezes usando 300µL de 0,05% Tween-20 em PBS em

cada poço e, em seguida, adicionados 100µL em cada poço, em triplicata, os padrões de IL-10 (3ng/ml) (PeProtech Inc, New Jersey) e as amostras de soro dos pacientes. As placas foram então incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Terminada a incubação as placas foram lavadas quatro vezes usando 300µL de 0,05% Tween-20 em PBS em cada poço e o segundo anticorpo biotinizados (anti-hIL-10 0,5µg/ml) (PeProtech Inc, New Jersey) foram adicionados e incubados por mais 2 hora à temperatura ambiente. A seguir mais quatro lavagens usando 300µL de 0,05% Tween-20 em PBS em cada poço foram feitas e adicionado o conjugado enzimático constituído do complexo streptoavidina-peroxidase, na diluição de 1/2000 (PeProtech Inc, New Jersey) seguido de incubação por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, a reação foi revelada pela adição do substrato contendo Tampão Citrato (pH 5,5) com ABTS. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 4N e a leitura feita em leitor de ELISA (SPECTRAMAX 190, *Molecular Devices*) a 450 nm. As amostras foram quantificadas por comparação com as curvas padrões de IL-10. Os limites de detecção do método variaram de 47 a 3000 pg/ml.

#### **4.7 Análise Estatística**

A análise estatística dos dados foi descrita de acordo com a média, desvio padrão, mediana e as variações de valores máximos e mínimos. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado na avaliação das variáveis CEA, PCR e IL-10. O nível de significância foi considerado  $p < 0,05$ . Em toda a análise foi utilizado o software SPSS 14.0.

#### **4.8 Comitê de Ética Em Pesquisa**

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, com o parecer de número 129/2007, protocolo CEP-UFJF: 1054.100.2007 (ANEXO 4).



## 5 RESULTADOS

Os resultados deste estudo foram obtidos por meio da análise de 28 pacientes portadores de câncer colorretal, avaliados no ambulatório de quimioterapia do Hospital Maria Baeta Reis da cidade de Juiz de Fora - MG, no período entre agosto de 2007 a fevereiro de 2009. Todos os pacientes foram avaliados no período entre 1 a 12 meses (mediana 5 meses) após a cirurgia oncológica.

### 5.1 Características Clinicopatológicas

Várias características clínicas, patológicas e moleculares são apontadas como fatores determinantes de recidiva e sobrevida. Na TAB. 1 são apresentadas as características clinicopatológicas dos pacientes do estudo, separados em dois grupos: ressecção curativa e ressecção não curativa.

TABELA 1: Características clinicopatológicas dos pacientes do estudo.

	<b>Todos (n=28)</b>	<b>Ressecção Curativa (n=18)</b>	<b>Ressecção Não - Curativa (n=10)</b>
IDADE - anos (mediana)	55	54	61
SEXO (M / F)	16 / 12	10 / 8	6 / 4
LOCAL TUMOR			
Colon	19	12	7
Reto	9	6	3
ESTÁDIO CLÍNICO			
I	0	0	0
II	9	9	0
III	9	9	0
IV	10	0	10
GRAU HISTOLOGICO			
1 – bem diferenciado	3	0	3
2 – moderadamente diferenciado	23	17	6

TABELA 1: Características clinicopatológicas dos pacientes do estudo.

			(Continuação)
3 – pobremente diferenciado	1	1	0
4 – indiferenciado	0	0	0
DIAMETRO TUMORAL – cm (mediana)	5	4,75	5,5
INVASÃO ANGIOLINFÁTICA sim / não	9 / 7	6 / 6	3 / 1
PERFURAÇÃO INTESTINAL sim / não	1 / 27	1 / 17	0 / 10
OBSTRUÇÃO INTESTINAL sim / não	3 / 25	2 / 16	1 / 19
LINFONODOS RESSECADOS (mediana)	20	20	18
T4 presente / ausente	4 / 22	4 / 14	0 / 8
COLOSTOMIA sim / não	15 / 13	11 / 7	4 / 6

A mediana das idades foi semelhante entre os dois grupos, sendo de 54 anos para o grupo de pacientes com ressecção curativa e 61 anos para o grupo de ressecção não curativa.

A distribuição de acordo com o tipo de sexo também foi semelhante, com uma predominância do sexo masculino para ambos os grupos, sendo dez pacientes do sexo masculino e oito do sexo feminino para o grupo de pacientes com ressecção curativa e seis pacientes do sexo masculino e quatro do sexo feminino para o grupo de ressecção não curativa.

Em relação à localização do tumor, o câncer no colon foi mais freqüente em relação ao reto com doze casos de câncer de colon e seis casos de câncer de reto para o grupo de pacientes com ressecção curativa e sete casos de câncer de colon e três casos de câncer de reto em pacientes que tiveram ressecção não curativa.

Os pacientes que tiveram ressecção curativa, nove eram estágio II e nove eram estágio III e não houve nenhum caso estágio I no estudo. Do grupo de ressecção não curativa, todos os dez pacientes eram estágio IV.

Quanto ao grau histológico, houve uma predominância do grau moderadamente diferenciado (grau 2) em ambos os grupos, sendo 17 casos para o grupo de ressecção curativa e seis casos no grupo de ressecção não curativa. Apenas um caso de grau histológico 3 para o grupo de ressecção curativa e três casos de grau histológico 1 para o grupo de ressecção não curativa.

Em relação ao maior diâmetro do tumor, a mediana foi maior no grupo de ressecção não curativa, 5,5 cm em relação ao grupo de ressecção curativa, 4,75cm.

A presença de invasão angiolinfática foi identificada com maior frequência no grupo de ressecção não curativa, sendo três casos positivos e um negativo. No grupo de ressecção curativa foram seis casos invasão angiolinfática e seis casos com ausência de invasão angiolinfática.

O registro de cirurgias de urgência devido ao quadro clínico de perfuração e/ou obstrução intestinal foi raro entre os grupos, havendo um caso de perfuração e dois casos de obstrução no grupo de ressecção curativa e um caso de obstrução de ressecção não curativa.

As medianas de linfonodos ressecados nos grupos de ressecção curativa e não curativa foi respectivamente de 20 e 18 linfonodos.

Tumores primários infiltrando órgãos vizinhos (considerado T4 de acordo com o TNM) foram registrados em quatro casos para ressecção curativa e nenhum caso para o grupo de ressecção não curativa.

Dos 28 pacientes examinados, 15 pacientes portavam colostomia após a cirurgia, sendo onze casos no grupo de ressecção curativa e quatro casos de ressecção não curativa.

## **5.2 Análise do antígeno carcinoembrionário**

O CEA é o marcador de carga tumoral mais utilizado em pacientes com câncer colorretal. Os níveis séricos dos pacientes de acordo com cada grupo de pacientes, ressecção curativa e não curativa, são apresentados no GRAF.1. A correlação dos níveis de CEA no grupo de ressecção curativa foi significativamente menor em relação ao grupo de ressecção não curativa ( $p < 0,05$ ), apresentando níveis médios de 1,21ng/ml no grupo de ressecção curativa e níveis médios de 798,5 ng/ml no grupo de ressecção não curativa. Representando a carga tumoral presente quando ocorreu a impossibilidade de uma ressecção curativa.

GRÁFICO 1: Níveis séricos de CEA de acordo com os grupos de pacientes com ressecção curativa e não curativa.

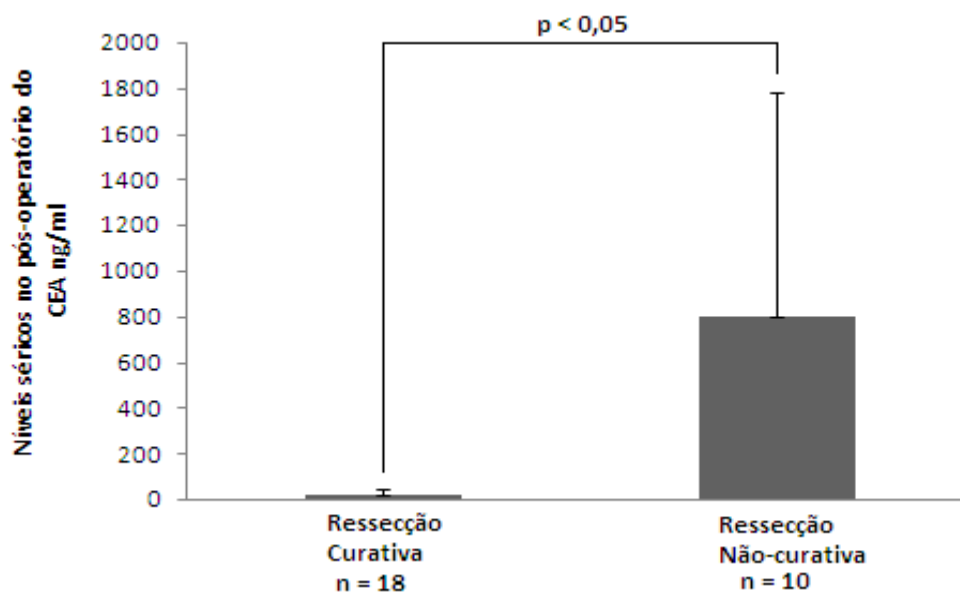


GRÁFICO 1: Diagrama de barra dos níveis séricos de CEA de acordo com os grupos de pacientes com ressecção curativa e não curativa. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os níveis séricos de CEA se encontraram mais elevados no grupo de pacientes com ressecção não curativa em relação ao grupo de pacientes com ressecção curativa ( $p < 0,05$  pelo teste de Mann-Whitney).

### 5.3 Análise da proteína C-reativa

O GRAF. 2 mostra a correlação dos níveis séricos da PCR em relação aos dois grupos. Observa-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo de ressecção curativa, apresentando níveis de 7,1 mg/L em relação ao grupo de ressecção não curativa com níveis de 17,4 mg/L. Considerando que o valor da PCR de 10mg/L seja o valor limítrofe entre a presença ou não da atividade inflamatória, observa-se que o grupo de ressecção não curativa apresenta atividade inflamatória, o que não ocorre no grupo de ressecção curativa.

GRÁFICO 2: Níveis séricos da PCR de acordo com os grupos de pacientes com ressecção curativa e não curativa.

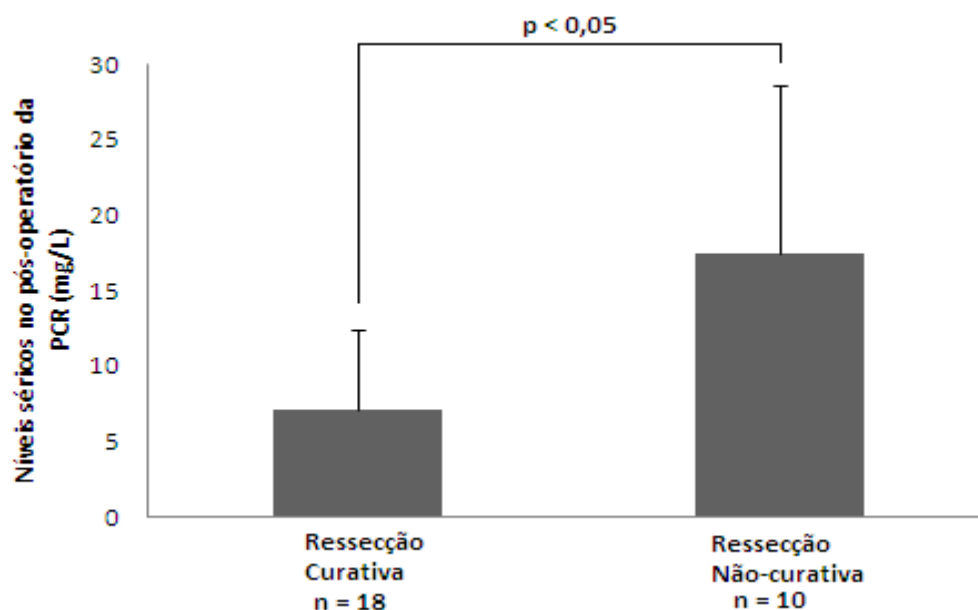


GRÁFICO 2: Diagrama de barra dos níveis séricos da PCR de acordo com os grupos de pacientes com ressecção curativa e não curativa. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os níveis séricos da PCR se encontraram mais elevados no grupo de pacientes com ressecção não curativa em relação ao grupo de pacientes com ressecção curativa ( $p < 0,05$  pelo teste de Mann-Whitney).

A TAB. 2 apresenta o número de pacientes de acordo com a presença ou não da atividade inflamatória em cada grupo, baseando-se no nível limítrofe da PCR de 10mg/L. No grupo de ressecção curativa, 13 pacientes tiveram níveis séricos da PCR menores do que 10mg/L e cinco pacientes tiveram níveis maiores do que 10mg/L. Já no grupo de ressecção não-curativa seis pacientes apresentaram níveis elevados da PCR em relação a quatro pacientes que não apresentaram seus níveis elevados.

TABELA 2: Número de pacientes de acordo com o nível da PCR nos grupos de ressecção curativa e não curativa.

Níveis da PCR	Ressecção curativa	Ressecção não-curativa
< 10mg/L	13	4
> 10mg/L	5	6
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>10</b>

#### 5.4 Análise da interleucina 10

Em relação aos níveis séricos de IL-10 de cada grupo de pacientes (GRAF. 3), foi observada uma diferença não significativa entre o grupo de ressecção curativa (valor = 125,4 pg/ml) e o grupo de ressecção não curativa (valor = 168 pg/ml) ( $p > 0,05$ ); porém percebe-se a tendência a níveis mais elevados no grupo de pacientes que tiveram a ressecção não curativa.

GRÁFICO 3: Níveis séricos da IL-10 de acordo com os grupos de pacientes com ressecção curativa e não curativa.

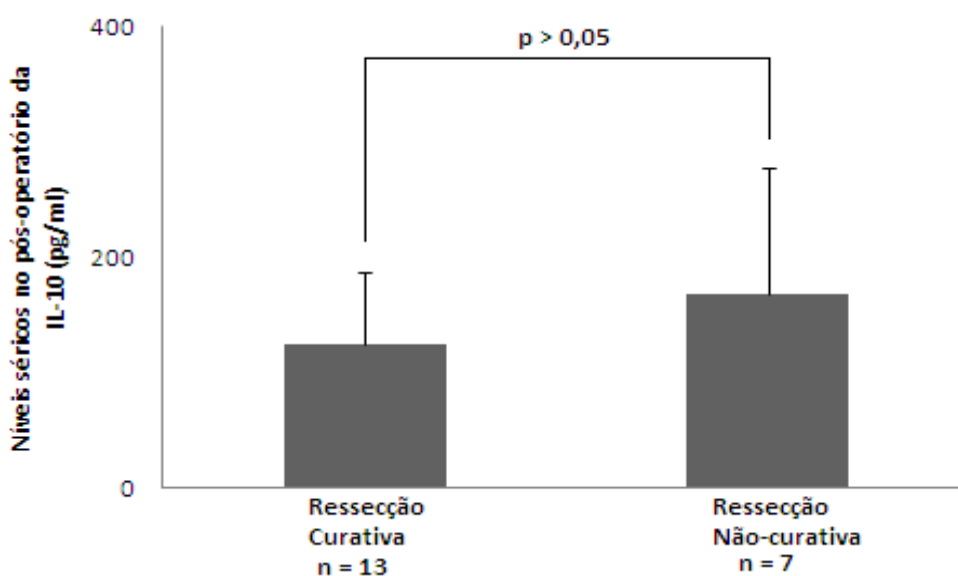


GRÁFICO 3: Diagrama de barra dos níveis séricos da IL-10 de acordo com os grupos de pacientes com ressecção curativa e não curativa. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os níveis séricos da IL-10 se encontraram mais elevados no grupo de pacientes com ressecção não curativa em relação ao grupo de pacientes com ressecção curativa ( $p > 0,05$  pelo teste de Mann-Whitney).

## 6 DISCUSSÃO

A progressão tumoral é um complexo processo que depende não somente das propriedades intrínsecas do tumor, mas de um processo de múltiplas etapas, que envolve interações complexas entre as células transformadas, a matriz extracelular circundante e o sistema imunológico do hospedeiro. As interações podem acontecer pelo contato célula-célula ou serem mediadas por proteínas solúveis, como os fatores de crescimento e citocinas (ALLAVENA *et al.*, 2008b; KUNDU; SURTH,2008).

A elevação da PCR pode simplesmente refletir um processo inflamatório inespecífico secundário à necrose tumoral ou injúria tecidual, mas por outro lado, também pode refletir uma ambiente favorável para o crescimento e disseminação tumoral (WONG *et al.*, 2007). Estudo realizado por Koike, *et al.* (2008) avaliou a PCR como um marcador independente de prognóstico em pacientes portadores de câncer colorretal em estadios iniciais. Foram avaliados o níveis pré-operatório da PCR em 300 pacientes e correlacionados com as características clinicopatológicas, como tamanho tumoral, metástases linfonodal, metástases hepáticas sincrônicas, invasão angiolinfática, albumina sérica, contagem de linfócitos e perda peso. Em sua análise univariada revelou que apenas a PCR e o CEA são preditores de pior sobrevida; enquanto na análise multivariada, apenas a PCR foi preditora de pior sobrevida.

Estudos recentes têm demonstrado que nível sérico da PCR acima de 10mg/L, nos pacientes com câncer colorretal, pode ser considerado como um fator independente de pior prognóstico (CROZIER *et al.*, 2009; ROXBURGH *et al.*, 2009). No presente estudo, observou-se que os níveis da PCR estavam elevados, média de 17,4mg/L, no grupo de pacientes que tiveram a ressecção não curativa, sugerindo atividade inflamatória na presença de tumor. Já o grupo de ressecção curativa os níveis da PCR mantiveram em valores inferiores 10mg/L. Crozier *et al.* (2007) em seu estudo, avaliou 180 pacientes portadores de câncer colorretal submetidos a cirurgia curativa de acordo com níveis da PCR no pré-operatório e no pós-operatório imediato e correlacionou com a sobrevida dos pacientes. Seus resultados mostraram uma menor sobrevida em pacientes com níveis elevados da PCR no pré-operatório mas não no pós-operatório porém, os níveis da PCR foram analisados até o quarto dia do pós cirurgico. Este curto intervalo de tempo da cirurgia pode ter influenciado nos resultados. Segundo Kami, *et al.* (2000) a influência da cirurgia sobre os níveis séricos da PCR e das citocinas pró-inflamatórias em pacientes com câncer colorretal ocorre até 42 dias

do pós-operatório. No presente estudo os níveis da PCR foram avaliados após um período mediano de 5 meses da cirurgia, semelhante ao estudo de Macmillan, Canna e Mcardle (2003) que avaliou 174 pacientes com câncer colorretal submetidos a ressecção curativa. Em todos os pacientes foram avaliados as concentrações da PCR no pré-operatório e no pós-operatório, com 5 meses após cirurgia. Concluiu-se que os níveis elevados da PCR no pré-operatório e no pós-operatório predizem uma pior evolução dos pacientes.

Os mecanismos que estão presentes na resposta inflamatória e que podem influenciar no desenvolvimento do câncer ainda não estão claros. Entretanto, sabe-se que parte da resposta inflamatória reflete o aumento de citocinas pró-inflamatórias e de fatores de crescimento, que podem promover o crescimento tumoral e influenciar na sobrevida. Ramsey, *et al.* (2006) em seu estudo verificou a correlação entre os níveis da PCR, IL-6 e IL-10. Constatou que os níveis da PCR estavam associados com o aumento do estadió tumoral e com as concentrações de IL-6 e IL-10, entretanto após a ressecção completa do tumor não houve uma normalização dos níveis das concentrações da IL-6 e IL-10, significando que essas concentrações não estavam relacionadas unicamente com o tumor. Concluindo que a PCR estaria auto-regulada por citocinas pró-inflamatórias e refletindo uma reação imune sob o tumor.

Evidências suportam a teoria que o tipo de resposta T-helper pode ser relevante para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva por causa da reciprocidade dos efeitos contrastantes das citocinas secretadas (O'HARA *et al.*, 1998). De fato, embora as citocinas do Tipo Th-1 (ex: IL-2 e interferon- $\gamma$ ) mostrem atividade antitumoral das células T citotóxicas *in vitro*, as citocinas do tipo Th-2 (e em particular a IL-10) demonstram efeitos opostos. O estudo realizado por O'Hara, *et al.* (1998) teve o objetivo de avaliar o desequilíbrio entre a IL-12, uma citocina que possui função de estimular uma resposta Th-1, e IL-10, citocina que tem a função de estimular uma resposta Th-2. Demonstrou que os níveis de IL-12 estavam reduzidos e IL-10 elevados em pacientes com câncer colorretal no pré-operatório e apresentavam uma relação significativa com estádios mais elevados do tumor. De Vita, *et al.* (1999) avaliou o significado prognóstico dos níveis de IL-10 em 58 pacientes portadores de câncer gastrointestinal avançado, no qual 28 apresentavam o diagnóstico de câncer colorretal. Concluiu também que os níveis de IL-10 no pré-tratamento pode ser um fator prognóstico independente em pacientes com câncer gastrointestinal avançado. Por outro lado, Galizia *et al.* (2002) avaliou o significado prognóstico dos níveis séricos de IL-10 e IL-6, no pré-operatório e no pós-operatório, em pacientes portadores de câncer colorretal submetidos a ressecção curativa. Seus resultados mostraram um significativo valor prognóstico de IL-10



tanto no pré-operatório quanto no pós-operatório. Além disso, observou que nos pacientes que mantiveram seus níveis de IL-10 elevados no pós-operatório, todos apresentaram recorrência em um determinado momento. Contudo, a IL-6 não apresentou resultados significativos.

Acredita-se que IL-10 possa contribuir na progressão tumoral através de sua relação com a proliferação das células tumorais. Estudo realizado por Evans, *et al.* (2006) correlacionou a taxa de proliferação tumoral e apoptose com níveis sistêmicos de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10) baseando-se no princípio de que o sistema imune seja a chave reguladora da proliferação e morte celular na presença de uma resposta inflamatória. Pode-se concluir que a taxa de proliferação e apoptose correlacionou com níveis elevados de IL-10 e reduzidos de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ .

No atual estudo, apesar dos níveis de IL-10 serem maiores no grupo de pacientes que foram submetidos a ressecção não curativa, esses resultados não atingiram um nível de significância em relação ao grupo de pacientes com ressecção curativa. Da mesma forma, o estudo realizado por Heriot, *et al.* (2000) também não constatou diferença na produção de IL-10 entre o grupo de pacientes com câncer colorretal pré-cirurgia e pós-cirurgia. O objetivo do estudo era avaliar os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 em pacientes com câncer colorretal antes e após a ressecção cirúrgica. A hipótese da supressão imune mediada pelo tumor foi constatado pelos níveis reduzidos de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  antes da cirurgia e sua normalização após a ressecção tumoral; porém os níveis de IL-10 não sofreram alterações. Concluiu que a supressão da produção de citocinas pelo tumor é um processo seletivo.

Frente a esses resultados, verifica-se que a possibilidade de um tumor progredir ou recidivar é uma realidade que ainda não é compreendida. A PCR pode refletir um microambiente rico em fatores que induz a esse comportamento.

## **7 CONCLUSÃO**

O estudo confirma que o CEA é uma fator de atividade tumoral em pacientes com câncer colorretal e os dados sugerem que a PCR reflete atividade tumoral quando seus níveis estão maiores que 10mg/L. Na amostra do estudo não houve uma correlação dos níveis de IL-10 com atividade tumoral; IL-10 não pode ser considerada como parâmetro de atividade tumoral embora seja uma citocina que regula a resposta inflamatória.

## REFERÊNCIAS

ALLAVENA, P. et al. 2008 a. Pathways connecting inflammation and cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, 18, 2008, p.3-10.

ALLAVENA, P. et al. 2008 b. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 66, 2008, p.1-9.

ALLAVENA, P. et al., 2008 c. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. **Immunological Reviews**, v.222, 2008, p.155-161.

AMERICAN CANCER SOCIETY: **Cancer Facts and Figures**. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2009.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC): **Colon and rectum**. Philadelphia: Lippincott–Raven, 2002, p.113.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow. **The Lancet**. v. 357, Feb. 2001, p.539-545.

BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nature**, v.4, Jul. 2004, p.540-550.

BARON, J.A. et al. A randomized trial of Rofecoxib for the Chemoprevention of colorectal adenomas. **Gastroenterology**, v.131, 2006, p.1674-1682.

BARON, J.A. et al., A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. **The New England Journal of Medicine**, v.348(10), Mar. 6, 2003, p.891-899.

BEI, R. et al. A common repertoire of autoantibodies is shared by cancer and autoimmune disease patients: Inflammation in their induction and impact on tumor growth. **Cancer Letters in Press**, v.18, n.281(1), Aug. 2009, p.8-23.

BENCHIMOL, S. et al. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. **Cell**, v.57, 1989, p. 327–334.

BENSON, A.B. Present and future role of prognostic and predictive markers for patients with colorectal cancer. In: AMERICAN SOCIETY CLINICAL ONCOLOGY. **Educational Book**, Chicago: American Society Clinical Oncology, 2003, p.187-190.

BONERTZ, A. et al. Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma. **The Journal of Clinical Investigation**, Oct. 2009, p.1-11.

BRAUMANN, C. et al. Taurolidine reduces the tumor stimulating cytokine interleukin-1 beta in patients with resectable gastrointestinal cancer: a multicentre prospective randomized trial. **World Journal of Surgical Oncology**. v. 7, n. 32, Mar. 23, 2009.

BUI, J.D.; SCHREIBER, R.D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? **Current Opinion in Immunology**, 19, 2007, p. 203-208.

CANNA, K. et al. The relationship between tumors T-lymphocyte infiltration, the systemic inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection for colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v.92, n.4, Feb. 2005, p.651-4.

CAPELOZZI, V.L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n.6, Nov-Dez. 2001, p.321-328.

CHUNG, Y-C.; CHANG, Y-F. Serum C-reactive protein correlates with survival in colorectal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.15, n.4, 2003, p.369-373.

COMPTON, C.C. et al. Prognostic Factors in Colorectal Cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 124, 2000, p.979-994.

COOK, N.R. et al. Low-Dose in the Primary Prevention of Cancer. The women's health study: a randomized controlled trial. **Journal of American Medical Association**, v.294, n.1, Jul. 2005, p.47-55.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature**, v.420,19/26, Dec. 2002, p.19-26.

CROZIER, J.E.M. et al. The presence of a systemic inflammatory response predicts poorer survival in patients receiving adjuvant 5-FU chemotherapy following potentially curative resection for colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v.94, 2006, p.1833-1836.

CROZIER, J.E.M. et al. Preoperative but not postoperative systemic inflammatory response correlates with survival in colorectal cancer. **British Journal of Surgery**, v.94, 2007, p.1028-1032.

CROZIER J.E.M et al. Relationship between emergency presentation, systemic inflammatory response, and cancer-specific survival in patients undergoing potentially curative surgery for colon cancer. **The American Journal of Surgery**, v.197, 2009, p.544-549.

DABELSTEEN, E.; GAO, S. ABO blood-group antigens in oral cancer. **Journal of Dental Research**, v. 84, n.1, Jan. 2005, p.21-28.

DeNARDO, D.G.; COUSSENS, L.M. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v.9, n.4, 2007, p.212-222.

DE VITA, F. et al. Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. **Cancer**, v.86, n.10, Nov. 15, 1999, p.1936-1943.

DE VITA, F. et al. Interleukin-6 serum level correlates with survival in advanced gastrointestinal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v.21, 2001, p.45-52.

DÍEZ, M.; PÉREZ, J.; MARTÍN, A. Marcadores tumorales de valor pronóstico en adenocarcinomas de colon y recto. **Gastroenterología Integrada**, v.2, 2001, p.207-221.

DUNN, G.P.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. The three es of cancer immunoediting. **Annual Review Immunology**, v.22, 2004, p.329-60.

DUOSHA, H. et al. Immunoglobulin Expression and Its Biological Significance in Cancer Cells. **Cellular & Molecular Immunology**, v.5, n.5, Oct. 2008, p.319-324.

EVANS, C. et al. The correlation between colorectal cancer rates of proliferation and apoptosis and systemic cytokine levels; plus their influence upon survival. **British Journal of Cancer**, v.94(10), 2006, p.1412-1419.

FLOSSMANN, E; ROTHWELL, P.M. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomized and observational studies. **The Lancet**, v.369, May 12, 2007, p.1603-1613.

GALIZIA, G.; et al. Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. **Clinical Immunology**, v.102, n.2, Feb. 2002, p.169-178.

GALON, J.; FRIDMAN, W.H.; PAGÈS, F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. **Cancer Research**, v.67(5), Mar. 2007, p.1883-1886.

HARMILTON, S. R. et al. Tumours of the colon and rectum. In: HARMILTON, S. R.; AALTONEN, L. A. **World Health Organization Classification of the Tumors. Pathology & Genetics. Tumors of the digestive system**. 1. ed. Lyon: IARC Press, cap. 6, 2000, p.103-42.

HERIOT, A.G. et al. Reduction in cytokine production in colorectal cancer patients: association with stage and reversal by resection. **British Journal of Cancer**, v.82(5), 2000, p.1009-1012.

INCA, 2009. disponível em:

[http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5) Acessado em 27/06/2009.

ITZKOWITZ, A.H.; YIO, X. Inflammation and cancer: Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.287, 2004, p.7-17.

JESSUP, J.M. et al. Carcinoembryonic antigen induction of IL-10 and IL-6 inhibits hepatic ischemic/reperfusion injury to colorectal carcinoma cells. **International Journal of Cancer**, v.111, 2004, p. 332-337.

KAHLENBERG, M.S. et al. Molecular prognostics in colorectal cancer. **Surgical Oncology**, v.12, 2003, p.173-186.

KAMI, J. et al. CRP, TNF $\alpha$ , IL-1ra, IL-6, IL-8 and IL-10 in Blood serum of colorectal cancer patients. **Pathology Oncology Research**, v.6, n.1, 2000, p.38-41.

KOIKE, Y., et al. Preoperative C-Reactive Protein as a prognostic and therapeutic marker for colorectal cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v.98, 2008, p.540-544.

KUNDU, J.K.; SURH, Y.-J. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutation Research**, v.659, 2008, p.15-30.

LECH-MARNADA, et al. Elevated IL-10 plasma levels correlate with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. **European Cytokine Network**, v. 17, n° 1, Mar. 2006, p.60-6.

LIBUTTI, S. K. et al. Cancers of the Gastrointestinal Tract: Section 8: Cancer of the Colon. In: DE VITA JR., V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: Principles e practice of oncology**, 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams's e Wilkins, Cap. 29, 2005.

LIN, W.-W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.5, May 2007, p.1175-1183.

LORUSSO, G; RÜEGG, C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. **Histochemical Cell Biology**, v.130, 2008, p.1091-1103.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a key event in cancer development. **Molecular Cancer Research**, v.4, n.4, Apr. 2006, p.221-233.

McMILLAN, D.C. et al., A Prospective Study of Tumor Recurrence and the Acute-Phase Response After Apparently Curative Colorectal Cancer Surgery. **The American Journal of Surgery**, v.170, Oct. 1995, p.319-322.

McMILLAN, D.C; CANNA, K.; McARDLE, C.S. Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. **British Journal of Surgery**, v.90, 2003, p.215-219.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **TRENDS in Immunology**, v.23, n.11, Nov. 2002, p.549-555.

MANTOVANI, A. et al. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. **The Lancet**, v.371, Mar.1, 2008, p.771-781.

MARNELL, L.; MOLD, C.; CLOS, T.W.D. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. **Clinical Immunology**, 117, 2005, p.104-111.

MIRZA, M.S. et al. Long-Term Outcomes for Laparoscopic Versus Open Resection of Nonmetastatic Colorectal Cancer. **Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques**, v.18, n. 5, 2008, p.679-685.

NIKITEAS, N.I. et al., Serum IL-6, TNF $\alpha$  and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: Prognostic implications. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n.11, Mar.21, 2005, p.1639-1643.

NOZOE, T. et al. Significance of preoperative elevation of serum C-Reactive Protein as an indicator for prognosis in colorectal cancer. **The American Journal of Surgery**, v.176, Oct., 1998, p.335-338.

NOZOE, T. et al. Preoperative elevation of serum C-reactive protein as an independent prognostic indicator of colorectal carcinoma. **Surgery Today**, v. 38, 2008, p. 587-602.

O'HARA, R.J. et al. Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced 10 production. **Clinical Cancer Research**, v.4, Aug. 1998, p.1943-1948.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive. **Journal Clinical Immunology**, v.19(1), Feb. 1999, p.12-25.

PEPYS, M.B.; HIRSCHFIELD, G.M. C-reactive protein: a critical update. **The Journal of Clinical Investigation**, v.111, n.12, Jun. 2003, p.1805-1812.

PINHO, M. Marcadores Tumorais em Câncer Colorretal. In: ROSSI, B.M., et al. **Câncer de cólon, reto, ânus**, São Paulo: Lemar e Tecned editora, Cap. 7, 2004, p.87-104.

POLLARD, J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature Reviews**, v.4, Jan. 2004, p.71-78.

QUANTE, M.; WANG, T.C. Inflammation and Stem Cell in Gastrointestinal Carcinogenesis. **Physiology**, v.23, Dec. 2008, p.350-359.

RAMSEY, S. et al. The longitudinal relationship between circulating concentrations of C-reactive protein, interleukin-6 and interleukin-10 in patients undergoing resection for renal cancer. **British Journal of Cancer**, v.95, 2006, p.1076-1080.

RIJCKEN, F.E.M. et al. Sulindac treatment in hereditary non-polyposis colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, v.43, 2007, p.1251-1256.

ROBERT, J.; Evolution of immune surveillance and tumor immunity: Studies in xenopus immunology. **Review**, v.166, 1998, p.231- 243.

ROCA, F. et al. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9), and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma. **Journal of Surgical Oncology**, v.93, n.2, Feb. 2006, p.151-60.

ROSSI, B.M., et al. Fatores Prognósticos em Câncer Colorretal. In: ROSSI, B.M., et al. **Câncer de cólon, reto, ânus**, São Paulo: Lemar e Tecned editora, Cap. 9, 2004, p.125-143.

ROXBURGH, C.S.D. et al. Comparison of the prognostic value of inflammation-based pathologic and biochemical criteria in patients undergoing potentially curative resection for colorectal cancer. **Annals of Surgery**, v.249, n.5, May 2009, p.788-793.

SANDLER, R.S. et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.348, n.10, Mar. 6, 2003, p.883-890.

SANTOS, W.B., et al. Proteína C-Reativa e Doença Cardiovascular: As Bases da Evidência Científica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.80, n.4, 2003, p.452-456.

SHURIN, M.R. et al. Dendritic cells presenting tumor antigen. **Cancer Immunotherapy**, v.43, 1996, p.158-164.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumor progression. **Seminars in Cancer Biology**, 18, 2008, p.349-355.

SIEMENS, C. et al. C-Reactive protein levels, variation in the C-reactive protein gene, and cancer risk: the Rotterdam study. **Journal of Clinical Oncology**, v.24, n. 33, Nov. 20, 2006, p. 5216- 5222.

SINGHAL, S. et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. **The New England Journal of Medicine**, v.341, 1999, p.1565-1571.

SKINNIDER, B.F.; MAK, T.W. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 99, n. 12, Jun. 2002, p.4283-4297.

SUN, L. C. et al. Preoperative serum carcinoembryonic antigen, albumin and age are supplementary to UICC staging systems in predicting survival for colorectal cancer patients undergoing surgical treatment. **BMC Cancer**, v. 9, Aug. 2009, p 288-296.

VATHER, R. et al. Lymph node examination as a predictor of long-term outcome in Dukes B colon cancer. **International Journal Colorectal Diseases**, v.24, 2009, p.283-288.

VOORHEES, P.M. et al. Targeted inhibition of interleukin-6 with CNTO 328 sensitizes pre-clinical models of multiple myeloma to dexamethasone-mediated cell death. **British Journal of Haematology**, v.145, Mar. 2009, p.481-490.

WAHJ, L.; KLEINMAN, H.K. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v.90, 1998, p.1583-1584.

WIGMORE, S.J. et al. Acute-phase protein response, survival and tumor recurrence in patients with colorectal cancer. **British Journal of Surgery**, v.88(2), Feb. 2001, p.255-260.

WONG, V.K.H. et al. C-reactive protein as a predictor of prognosis following curative resection for colorectal liver metastases. **British Journal of Cancer**, v.96, 2007, p.222-225.

YUN, H.R. et al. Local recurrence after curative resection in patients with colon and rectal cancers. **International Journal Colorectal Diseases**, v.23, 2008, p.1081-1087.

ZIDI, I. et al. TNF- $\alpha$  and inhibitors in cancer. **Medical Oncology**, v.11, Mar. 2009.



## **ANEXOS**

## ANEXO 1 - TNM - Classificação Clínica

### T - Tumor Primário

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<sup>1</sup>

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 pericólicos ou peri-retais, não peritonizados

T4 Tumor que invade diretamente outros órgãos ou estruturas<sup>2,3</sup> e/ou que perfura o peritônio visceral

Notas: 1. Tis inclui as células neoplásicas confinadas à membrana basal glandular (intra-epitelial) ou à lâmina própria (intramucoso), sem extensão pela muscularis mucosa e sem alcançar à submucosa.

2. No T4, a invasão direta inclui a invasão de outros segmentos do cólon e reto através da serosa; p.ex: invasão do cólon sigmóide por um carcinoma do ceco.

3. O tumor que é aderente a outros órgãos ou estruturas, macroscopicamente, é classificado como T4. Entretanto, não existe tumor na aderência, microscopicamente, a classificação deve ser pT3.

### N- Linfonodos Regionais

NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1 Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais

N2 Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais

Nota: Um nódulo tumoral localizado no tecido adiposo peri-retal ou peri-cólico, sem evidência histológica de Linfonodos residual no nódulo, é classificado na categoria pN como metástase em linfonodo regional, se o nódulo tem a forma e o contorno liso de um linfonodo. Se o nódulo tem um contorno irregular, ele deve ser classificado na categoria T e também codificado como V1 (invasão venosa microscópica) ou V2, se ele era macroscopicamente evidente, pois existe uma forte probabilidade que represente uma invasão venosa.

#### **M - Metástase à Distância**

MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0 Ausência de metástase à distância

M1 Metástase à distância

### **pTNM - CLASSIFICAÇÃO PATOLÓGICA**

As categorias pT, pN e pM correspondem às categorias T, N e M.

pN0: O exame histológico do espécime de uma linfadenectomia regional incluirá, geralmente, 12 ou mais linfonodos. Se os linfonodos são negativos, mesmo que o número usualmente examinado não seja encontrado, classifica-se como pN0.

## GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

GX O grau de diferenciação não pode ser avaliado

G1 Bem diferenciado

G2 Moderadamente diferenciado

G3 Pouco diferenciado

G4 Indiferenciado

## GRUPAMENTO POR ESTADIOS

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
Estadio IIB	T4	N0	M0
Estadio IIIA	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
Estadio IIIB	T3	N1	M0
	T4	N1	M0
Estadio IIIC	Qualquer T	N2	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

## ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Página 1 de 3

### Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: JOSÉ LUCAS PEREIRA JÚNIOR (DR. LUCAS)

ENDEREÇO: Universidade Federal de Juiz de Fora. Martelos – Cidade Universitária.

CEP: 36015-400 Juiz de Fora, MG – Brasil – Caixa Postal: 328MG.

Telefone: (32) 3229 3251 Fax: (32) 3229 3255

E-MAIL: [lucaspi@neoclinica.com.br](mailto:lucaspi@neoclinica.com.br)

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Senhor (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar do estudo: "Resposta inflamatória e correlação prognostica em pacientes com câncer colo-retal: avaliação da expressão de metaloproteinases, proteína C-reativa e cicloxigenase-2".

O objetivo do estudo é avaliar alguns testes que podem funcionar como marcadores para nos auxiliar na avaliação do risco de sua doença voltar após o tratamento. Os marcadores que estudaremos são chamados: proteína C-reativa, cicloxigenase-2 e metaloproteinases. Esses marcadores identificam a resposta inflamatória em relação ao tumor de intestino. Vários outros estudos têm sido realizados para identificar testes que possam prever a evolução do tumor de intestino e ajudar as pessoas que têm maiores riscos de sua doença voltar; porém ainda esses testes não são bons. Atualmente, para tentar prever o comportamento do tumor é necessário estabelecer em que fase ele está (localizado ou se já espalhou), através do exame clínico, biópsia do tumor e exames de imagens. Porém são necessários outros testes, pois portadores de uma mesma fase do tumor podem ter evolução diferente (mais grave ou não). Os testes que identificam a inflamação estão mostrando bons resultados em prever o comportamento do tumor, porém é preciso entender melhor estes testes.

Para participar deste estudo o (a) Senhor (a) será examinado (consulta médica) e fará um exame de sangue simples.

#### **Riscos e desconforto:**

As consultas médicas serão semelhantes às de rotina.

A coleta de sangue pode causar pequeno desconforto igual àqueles que o (a) Senhor (a) eventualmente teve quando foi fazer um exame de sangue.

Não será realizada uma nova biópsia, solicitaremos ao laboratório que realizou a análise de sua biópsia quando diagnosticou o tumor, que empreste o bloco de parafina para nossos testes.

#### **Da realização dos procedimentos:**

**EXAME DE SANGUE:** serão coletados 5ml de sangue da veia para realização dos testes. (Dosagem de proteína C-reativa e metaloproteinases).

**BIÓPSIA DO TUMOR:** será analisado o bloco de parafina para o estudo chamado imunohistoquímica que avaliará expressão de metaloproteinases e cicloxigenase-2.

  
Dra. Arlete Maria Góes  
Coordenadora CEP- UFJF

Página 2 de 3

**Compensação:**

Em nenhum momento os participantes receberão qualquer compensação financeira por participar da pesquisa. Entretanto, o Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora e os pesquisadores assumirão a responsabilidade de dar assistência integral diante das complicações e danos que por ventura forem comprovadamente decorrentes da participação no estudo.

**Benefícios para o participante da pesquisa:**

Ao participar do estudo, você estará contribuindo para um melhor entendimento do comportamento e evolução dos tumores do intestino.

**Garantia de acesso:**

Em qualquer etapa do estudo o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pelo estudo para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Dr. Lucas (Dr. José Lucas Pereira Júnior) que pode ser encontrado nos telefones (32) 3229 3251 ou (32) 3311 4000 ou (32) 9972 4721.

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o CEP- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFJF, CAMPUS UNIVERSITÁRIO DA UFJF, PRÓ-REITORIA DE PESQUISA. CEP 36036.900. FONE: (32) 3229 3788

Para participar deste estudo o senhor (a) não terá nenhum custo. O(A) senhor(a) será esclarecido(a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O (A) Senhor (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em três vias, sendo que a primeira via será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, a segunda via será fornecida ao senhor (a) e a página três da terceira via será utilizada para obtenção dos blocos de parafina junto ao laboratório.

  
Dra. Angela Maria Gollner  
Coordenadora CEP - UFJF

Página 3 de 3

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos do estudo "Resposta inflamatória e correlação prognostica em pacientes com câncer colo-retal: avaliação da expressão de metaloproteinases, proteína C-reativa e cicloxigenase-2", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Autorizo o Dr. José Lucas Pereira Júnior a solicitar o empréstimo dos blocos de parafinas dos meus exames (biópsias) junto ao laboratório onde foram realizadas e armazenar e analisar as amostras de sangue colhidas, de acordo com a resolução do CNS nº347 de 13 de janeiro de 2005. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007.

Assinatura do participante

Nome do participante	Carteira de identidade	Data
----------------------	------------------------	------

Assinatura do pesquisador

Nome do pesquisador	Carteira de identidade	Data
---------------------	------------------------	------

Assinatura da testemunha

Nome da testemunha	Carteira de identidade	Data
--------------------	------------------------	------

  
 Dra. Angélica de Gólfine  
 Coordenadora CEP - UFJ

### ANEXO 3 - Ficha de Registro Clínico

Nome \_\_\_\_\_

Registro de prontuário	Data
Sexo <input type="checkbox"/> masc <input type="checkbox"/> fem	Profissão
Estado Civil	Idade
Cor	

#### ANAMNESE

Queixa principal \_\_\_\_\_

Historia da Moléstia Atual

---



---



---



---



---



---



---



---



---

\* Marcará apenas os itens presentes

Alteração dos hábitos intestinais       Prurido anal

(prisão de ventre, diarréia, cólon  
irritável)

Sangramento

Descargas intestinais do tipo mucoso

Anemia

Fístulas



Emagrecimento (quantificar) \_\_\_\_\_  Hemorróidas

Dor (principalmente em cólicas)  Pólipos

Tenesmo retal  Condilomas

Síndrome de obstrução intestinal  Leucoplasias

#### História Familiar:

- Outros casos de neoplasia de cólon na família
- Polipose familiar do cólon
- Presença de reto-colite ulcerativa
- Síndrome de Peutz-Jeghers: polipose gastrintestinal e pigmentação melânica da pele e mucosa oral
- Síndrome de Gardner: polipose associada com exostoses osteomas, cistos sebáceos e tumores desmóides.

#### Historia social

- Hábitos alimentares ( condimentos,  embutidos,  defumados,  gordurosos)
- Hábito de fumar, tipo de cigarro  fumo de rolo  maço, \_\_\_ano/maço data de início \_\_\_ e término do hábito\_\_\_.
- Uso de bebidas
- Homossexualidade
- Doenças venéreas

## EXAME FÍSICO

Peso \_\_\_\_ altura \_\_\_\_ Superfície corpórea \_\_\_\_

Escala de performance status KPS \_\_\_\_ ECOG \_\_\_\_

Alterações \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

EXAMES LABORATORIAIS alterados (Hemograma e plaquetas, prova de função hepática (TGO, TGP, GGT, Fosfatase alcalina), Bilirrubinas total e frações, prova de função renal (Uréia e creatinina), Raio-x e tórax, Colonoscopia, Ultrassom abdominal total, Tomografia de abdome e pelve)

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

## ANATOMO PATOLÓGICO

Laboratório/telefone \_\_\_\_\_

Numero do registro \_\_\_\_\_

Data da emissão \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Laudo

---

---

---

---

---

---

---

---

Grau de diferenciação  1  2  3  4Invasão angiolinfática  sim  nãoPerfuração intestinal  sim  nãoObstrução intestinal  sim  não

Numero de linfonodos ressecados \_\_\_\_\_ positivos \_\_\_\_\_ negativos \_\_\_\_\_

## DIAGNÓSTICO

 Câncer de colón  Direito  Transverso  Esquerdo  Retosigmoide Câncer de reto

## ESTADIAMENTO

T\_\_ N\_\_ M\_\_ EC\_\_

**DOSAGENS SÉRICAS:**

CEA

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

Proteína C-reativa

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

Metaloproteinase (MMP)

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

**DIAGNÓSTICO IMUNOHISTOQUÍMICO:**

Biomarcador tecidual citoplasmático MMP-9

- Intensidade da imunomarcção citoplasmática :

- ( ) 0+ = Marcação negativa ou ausência de expressão;
- ( ) 1+ = Marcação positiva focal;
- ( ) 2+ = Marcação positiva multifocal;
- ( ) 3+ = Marcação positiva - moderada e difusa;
- ( ) 4+ = Marcação positiva intensa.



## ANEXO 4 - Comitê Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PRO-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP UFJF  
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

### Parecer nº 129/2007

**Protocolo CEP-UFJF:** «1054.100.2007» **FR:** «133235» **CAAE:** «0992.0.000.180-07»

**Projeto de Pesquisa:** "Resposta inflamatória e correlação prognóstica em pacientes com câncer colo-retal: avaliação da expressão de metaloproteinases, proteína C-reativa e ciclooxigenase-2"

**Versão do Protocolo e Data:** «02/08/07»

**Área Temática:** «Grupo III»

**Pesquisador Responsável:** José Lucas Pereira Junior

**TCLE:** «02/08/07»

**Pesquisadores Participantes:** Fernando Monteiro Aarestrup

**Instituição:** Hospital Maria José Baeta Reis e Centro de Biologia da Reprodução - UFJF

#### Sumário/comentários do protocolo:

- O projeto de pesquisa analisado se justifica científica e socialmente, pois "o câncer colo-retal é um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo" e, por mais que existam pesquisas sobre o problema, ainda há uma série de aspectos a serem investigados.
- O objetivo geral do estudo é "verificar a correlação prognóstica de marcadores de respostas inflamatória sistêmica e local em pacientes com câncer colo-retal".
- A revisão de literatura apresentada é suficiente para fundamentar o problema estudado. As referências e citações são apresentadas paradigmaticamente.
- Trata-se de um estudo de corte com pacientes (N = 40) recrutados no Hospital Maria José Baeta Reis em Juiz de Fora portadores de câncer colo-retal. "Critérios de inclusão: Pacientes ambulatoriais, com o diagnóstico de adenocarcinoma colo-retal, com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os sexos, classificados no estágio clínico de I a IV segundo atual classificação TNM da American Joint Committee on Cancer (AJCC) e da International Union Against Cancer (UICC) e somente aqueles que tiverem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Critério de exclusão: Pacientes com doenças inflamatórias, incluindo infecções e doença do colágeno, assim como tumores em outros órgãos. Pacientes em uso de anti-inflamatórios e antibióticos por qualquer motivo."
- "Todos os pacientes serão submetidos a avaliação oncológica de triagem e subsequente, análise sorológica e análise da biópsia. Participarão o Departamento de Psicologia da UFJF e o 4º Batalhão de Bombeiro Militar da região de Juiz de Fora." Os procedimentos foram detalhados no protocolo de pesquisa, sendo que as questões éticas subjacentes a eles foram devidamente consideradas.
- O orçamento detalhado e o responsável pelo financiamento da pesquisa foram apresentados adequadamente.
- O cronograma apresenta as atividades da pesquisa ao longo de dois anos (março de 2007 a fevereiro de 2009), sendo que a coleta de dados estava prevista para ter início em junho de 2007 e ser concluída em julho de 2008.
- O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE está em linguagem adequada, clara para compreensão do sujeito, faz uma descrição suficiente dos procedimentos, explicitando os riscos e desconfortos esperados, o ressarcimento de despesas, a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, informa o sujeito da pesquisa sobre reações adversas, forma do sujeito fazer contatos com o pesquisador informando que está de acordo com a Res. 196/96 CNS.
- Os pesquisadores possuem qualificação suficiente para conduzirem o estudo proposto. Salientamos que o pesquisador deverá encaminhar a este comitê o relatório final da pesquisa. Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela **aprovação** do protocolo de pesquisa proposto.

**Situação:** Projeto Aprovado  
Juiz de Fora, 02 de agosto de 2007

Prof. Dra.   
Coordenadora – CEP/UFJF

RECEBI

DATA: \_\_\_/\_\_\_/2007

ASS: \_\_\_\_\_