**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ANDRE LUIZ PREZOTTO VILLA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO PPARG EM TUMORES
COLORRETAIS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O ESTADIAMENTO
E A EVOLUÇÃO CLÍNICA**

**Ribeirão Preto
2017**

ANDRE LUIZ PREZOTTO VILLA

**Análise da expressão do PPAR γ em tumores colorretais e sua
associação com o estadiamento e a evolução clínica**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Departamento de Cirurgia e
Anatomia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo.

Área de concentração: Clínica cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Omar Féres

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação parcial ou total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Catálogo da Publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA

Villa, Andre Luiz Prezotto

Análise da expressão do PPARG em tumores colorretais e sua associação com o estadiamento e a evolução clínica

.

XX p 85 ..3.: il.; 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Féres, Omar.

1. Câncer colorretal 2. PPARG 3. Prognóstico

FOLHA DE APROVAÇÃO

Villa, Andre Luiz Prezotto

Análise da expressão do PPARG em tumores colorretais e sua associação com o estadiamento e a evolução clínica

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção do **Título de Mestre** em Ciências.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof.Dr. Omar Féres

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, por tudo que me proporcionou viver e realizar.

À minha esposa, Márcia, minha melhor amiga e companheira de todas as horas, que sempre me incentivou neste projeto e me levantou quando eu achava que não conseguiria.

Aos meus pais, Afonso e Girlene, exemplos de dedicação e disciplina, que me mostraram que o caminho mais fácil nem sempre é o mais bonito ou o mais gratificante, e que uma boa educação é o maior bem que se pode ter.

A todos os mestres e professores, que me despertaram o interesse e a curiosidade pelo conhecimento, sempre associando o estudo e o aprendizado a algo prazeroso e recompensador.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Omar Féres, orientador desta dissertação, que com a convivência se tornou um exemplo pra mim, com sua sensatez, praticidade e inteligência muito acima da média. Uma pessoa admirável pelo seu profissionalismo, entusiasmo pela profissão e dedicação aos pacientes e alunos.

Ao Prof. Dr. José Joaquim Ribeiro da Rocha, Chefe da Divisão de Coloproctologia do Depto. de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, que me acolheu de braços abertos e fez o possível para ajudar neste projeto.

A Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, pela prontidão e disposição em ajudar, sempre solícita e com excelentes ideias, que me mostrou um novo mundo até então distante para mim.

Ao Prof. Dr. Fermino Sanchez Lizarte Neto e a todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular, pois sem a valiosíssima ajuda prestada, este experimento não teria acontecido.

A Sra. Marlene Lucio, por sempre ajudar quando necessário e por acreditar, por vezes mais do que eu mesmo, que chegaríamos com sucesso ao final desta empreitada.

Ao Prof. Dr. Marley Ribeiro Feitosa, pelos conselhos e pela colaboração na publicação deste trabalho.

Aos meus colegas, residentes e alunos, pelo companheirismo e estímulo diário.

À UNICAMP e ao A.C.Camargo Cancer Center, instituições que ajudaram não só na minha formação profissional, como também forjaram parte do meu caráter.

À Santa Casa de Ribeirão Preto e à Faculdade de Medicina Barão de Mauá, pelo incentivo constante à atualização e ao aperfeiçoamento acadêmico.

RESUMO

VILLA, A.L.P. **Análise da expressão do PPARG em tumores colorretais e sua associação com o estadiamento e a evolução clínica.** 2017. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017.

Introdução: O câncer colorretal é um dos mais frequentes no mundo ocidental. Novas medidas de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento vêm melhorando o prognóstico para os pacientes, com novos achados biológicos inferindo relação com a evolução da doença. A PPARG é um receptor nuclear abundantemente expresso em células epiteliais do cólon, e variações na sua expressão podem ser relacionadas à evolução clínica do câncer colorretal. **Objetivo:** Avaliar a expressão gênica do PPARG em tumores colorretais e relacionar este dado com variáveis clínicas dos pacientes, como: idade, tipo histológico, CEA, estadiamento e a evolução clínica. **Casuística e métodos:** Analisamos a expressão gênica do PPARG em 50 amostras de tumores colorretais através da RT-PCR, e 20 amostras de tecido normal adjacente como controle. Os resultados destas quantificações foram correlacionados com as informações clínicas dos prontuários dos respectivos pacientes. **Resultados:** Houve menor expressão do PPARG no tecido tumoral em comparação ao tecido controle. Dentre os tumores, os pacientes com idade acima de 60 anos, tipo histológico com diferenciação mucinosa, estadiamento mais avançado ao diagnóstico e os pacientes que evoluíram com recidiva da doença ou óbito apresentavam maior expressão do PPARG. **Discussão:** Analisando os tecidos tumorais, pode-se inferir uma tendência a pior prognóstico nos pacientes com expressão mais elevada de PPARG. Esses achados, correlacionados aos demais estudos já publicados na literatura, apontam uma tendência desfavorável na evolução da doença. Estudos futuros com um maior número de pacientes e várias instituições podem inferir uma importância prognóstica e até terapêutica para a PPARG.

Palavras-chave: Câncer colorretal; PPARG; Prognóstico

ABSTRACT

VILLA, A.L.P. **Analysis of PPARG expression in colorectal tumors and its association with staging and clinical evolution.** 2017. Thesis (Master degree) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2017.

Introduction: Colorectal cancer is one of the most frequent neoplasm in the Western world. New strategies of prevention, early diagnosis and treatment have improved the prognosis for the patients, and new biological findings relate to the prognosis of the disease. PPARG is a nuclear receptor highly expressed in colon epithelial cells, and variations on its expression may be related to the clinical evolution of colorectal cancer. **Objective:** To evaluate the gene expression of PPARG in colorectal tumors and to correlate this data with clinical variables of the patients, such as: age, histological type, CEA, staging and clinical evolution. **Casuistry and methods:** We analyzed the gene expression of PPARG in 50 samples of colorectal tumors using RT-PCR, and 20 adjacent normal tissue samples as control. The results of these quantifications were correlated with the respective patients' medical records' clinical information. **Results:** There was a lower PPARG expression in the tumor tissue compared to the control tissue. Among the tumors samples, patients older than 60 years, histological type with mucinous differentiation, more advanced staging at the time of diagnosis, and patients who evolved with recurrence of the disease or death presented higher PPARG expression. **Discussion:** Analyzing the tumor tissues, we can infer a tendency to worse prognosis in patients with higher PPARG expression. These findings, correlated with the other studies already published in the literature, point to an unfavorable trend in the disease's evolution. Future studies with a larger number of patients and several institutions may infer a prognostic and even therapeutic importance for PPARG.

Keywords: Colorectal cancer; PPARG; Prognostic

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento TNM da AJCC 2010 para câncer colorretal

Tabela 2 – Resumo das características clínicas e patológicas da amostra estudada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Potenciais mecanismos moleculares para o PPARG como pró-carcinogênico no CCR.

Figura 2 - Potenciais mecanismos moleculares para o PPARG como supressor tumoral.

Figura 3 - Freezer para armazenamento das amostras tumorais a -80° C

Figura 4 - Homogeneizador “Polytron®”

Figura 5 - Centrífuga utilizada; Fases aquosas e após centrifugação

Figura 6 - Freezer as -20°.C para precipitação do RNA

Figura 7 - Espectrofotômetro “Thermo Scientific NanoDrop 2000”

Figura 8 - Aparelho para RT-PCR “7500 Fast Real-Time PCR System”

Figura 9 - Genevestigator com os candidatos a gene de referência

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Idade e diagnóstico dos pacientes

Gráfico 2. Estadiamento

Gráfico 3. Evolução dos pacientes

Gráfico 4. PPARG

Gráfico 5. PPARG GAPDH

Gráfico 6. PPARG IGHMBP2

Gráfico 7. Estadiamento e idade

Gráfico 8. Estadiamento e evolução clínica

Gráfico 9. Idade e a expressão do PPARG pela média dos genes de referência

Gráfico 10. Tipo histológico e a expressão de PPARG pela média dos genes de referência

Gráfico 11. CEA e a expressão de PPARG pela média dos genes de referência

Gráfico 12. Estadiamento e a expressão do PPARG pela média dos genes de referência

Gráfico 13. Evolução clínica e a expressão do PPARG pela média dos genes de referência

Gráfico 14. Idade e a expressão do PPARG pela média dos genes de referência

Gráfico 15. Tipo histológico e a expressão do PPARG pela média dos genes de referência

Gráfico 16. CEA e a expressão do PPARG usando o GAPDH como gene de referência

Gráfico 17. Estadiamento e a expressão do PPARG usando o GAPDH como gene de referência

Gráfico 18. Evolução clínica e a expressão do PPARG usando o GAPDH como gene de referência

Gráfico 19. Idade e a expressão do PPARG usando-se o IGHMBP2 como gene de referência

Gráfico 20. Tipo histológico e a expressão do PPARG usando-se o IGHMBP2 como gene de referência

Gráfico 21. CEA e a expressão do PPARG usando o IGHMBP2 como gene de referência

Gráfico 22. Estadiamento e a expressão do PPARG usando o IGHMBP2 como gene de referência

Gráfico 23. Evolução clínica e a expressão do PPARG usando o IGHMBP2 como gene de referência

ANEXOS:

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CSE-FMRP-USP

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	: American Joint Committee on Cancer
AP1	: Proteína ativadora 1
CCR	: Câncer colorretal
Cdna	: DNA complementar
CEA	: Antígeno Carcinoembrionário
CEP	: Comitê de Ética em Pesquisa
COX-2	: Ciclo Oxigenase 2
CT	: Controle
DEPC	: Dimetil pirocarbonato
FAP	: Polipose adenomatosa familiar
GAPDH	: Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
HC-FMRP-USP	: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HIF1A	: Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HNPCC	: Câncer colorretal hereditário sem polipose
IGHMBP2	: Immunoglobulin Helicase u-binding protein 2
INCA	: Instituto Nacional do Câncer
LXRA	: Liver X receptor alpha
LXRB	: Liver X receptor beta
mRNA	: RNA Mensageiro
NCCN	: National Comprehensive Cancer Network
NFAT	: Fator nuclear de células T
NFKB	: Fator nuclear KB
PBS	: Phosphated-buffered saline
PCR	: Reação em cadeia de Polimerase
PGE2	: Prostaglandina E2
PPAR	: Peroxisome proliferator activated receptor
PPARA	: Peroxisome proliferator activated receptor alfa
PPARB	: Peroxisome proliferator activated receptor beta
PPARD	: Peroxisome proliferator activated receptor delta
PPARG	: Peroxisome proliferator activated receptor gamma
RNA	: Ácido Ribonucléico
RT-PCR	: Real Time PCR
SAME	: Setor de Arquivos Médicos
UICC	: Union Internationale Controle Cancer
VEGF	: Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

	pág
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Dados epidemiológicos	16
1.2 Diagnóstico e estadiamento	17
1.3 Tratamento do câncer colorretal	19
1.4 Fatores associados ao metabolismo lipídico em tumores	20
1.5 O PPARG e o câncer colorretal	21
2. OBJETIVOS	26
3. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	28
3.1 Critérios de inclusão e de exclusão	30
3.2 Variáveis clínicas, demográficas e terapêuticas	31
3.3 Variáveis anatomopatológicas	31
3.4 Análise da expressão do RNA de marcador associado ao metabolismo lipídico	32
3.5 Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Análises da amostra dos pacientes	40
4.2 Análise da expressão do PPARG	44
4.3 Análise comparativa do estadiamento com variáveis clínicas	46
4.4 Análise comparativa entre dados clínicos e expressão gênica do PPARG pela média dos genes de referência	48
4.5 Análise comparativa entre dados clínicos e expressão gênica do PPARG usando o GAPDH como gene de referência	51
4.6 Análise comparativa entre dados clínicos e expressão gênica do PPARG usando o IGHMBP2 como gene de referência	55
5. DISCUSSÃO	58
5.1 Amostra dos pacientes	59
5.2 Expressão da PPARG	61
5.3 Análise dos genes de referência	64
5.4 Considerações finais	65
6. CONCLUSÃO	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8. ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais comumente diagnosticado em homens e o segundo em mulheres, com incidência mundial de aproximadamente 1.36 milhão de casos novos e 694.000 óbitos estimados em 2012 (FERLAY et al., 2013). A incidência e a taxa de mortalidade por esta doença variam ao redor do mundo, mas são maiores nos países desenvolvidos.

No Brasil, de acordo com as estatísticas do Instituto Nacional do Câncer – INCA, estimou-se para 2014, 15.070 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 17.530 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15,44 casos novos a cada 100 mil homens e 17,24 a cada 100 mil mulheres (INCA-MS, 2014).

Desde meados da década de 80, a incidência e a mortalidade por câncer de cólon apresentaram um declínio nos países ocidentais, acompanhadas de um aumento da sobrevida. Isso provavelmente deve-se ao diagnóstico mais precoce, identificação e remoção de pólipos do cólon por colonoscopia, melhor conhecimento da biologia celular e molecular do tumor, e aparecimento de novas modalidades de tratamento (LIBUTTI et al., 2008).

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

O *status* socioeconômico mais baixo é associado com maior risco para o desenvolvimento do CCR, conforme foi demonstrado por DOUBENI et al (2012). Isso se deve provavelmente a fatores ambientais potencialmente modificáveis, como: sedentarismo, dietas e alimentos não saudáveis, tabagismo, obesidade, pouco acesso aos serviços de saúde e exames de rastreamento, entre outros (DOUBENI et al., 2012).

A idade é o principal fator de risco para o CCR esporádico. Ele é incomum antes dos 40 anos e a incidência vai aumentando a cada década após esta idade, (EDDY, 1990) sendo que 90% dos casos ocorrem após os 50 anos.

1.2 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO

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

Os pacientes com CCR podem apresentar a doença através de sintomas suspeitos como anemia, perda de sangue nas fezes, alteração de hábito intestinal e do aspecto das fezes, ou já em casos mais avançados com obstrução intestinal, peritonite ou hemorragia digestiva. Pacientes assintomáticos geralmente diagnosticam a doença através de exames de rastreamento como a colonoscopia ou a pesquisa de sangue oculto nas fezes. Infelizmente, estes pacientes são cerca de 30% dos casos apenas (MOIEL et al., 2011).

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

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

desta doença são realmente necessários para aprimorar a condução clínica de pacientes portadores de câncer colorretal (CAO et al., 2009).

Tabela 1 – Estadiamento TNM da AJCC 2010 para câncer colorretal

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

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

Fonte: Edge et al., 2010

1.3 TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL

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

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

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

- Número de linfonodos dissecados na peça operatória menor que 12
- Tumores pouco diferenciados (Graus de diferenciação G3 ou G4)
- Embolização vascular, linfática ou perineural positiva
- Tumor obstrutivo ou perfurado
- Tumores T4

Tratamento neoadjuvante com quimioterapia e radioterapia é uma abordagem comum para tumores de reto médio e baixo, já consagrada na prática clínica e com múltiplos estudos que confirmam seus benefícios em sobrevida global e na sobrevida livre de recidiva. Entretanto, não há consenso quanto ao seu uso em tumores de reto alto e cólon, com apenas alguns relatos de caso e séries com pequeno número de pacientes tratados (TAYLOR et al., 2002; CUKIER et al., 2012; YOH et al., 2011).

Um novo estudo para melhor avaliar a quimioterapia neoadjuvante para câncer de cólon está sendo realizado através de um ensaio clínico fase

3 (FOXTROT Collaborative Group, 2012). Neste ensaio, o recrutamento foi iniciado em abril de 2008, com previsão de término em dezembro de 2016. Enquanto não há resultados finais, o consenso de especialistas do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) sugere que apenas pacientes com tumores de cólon localmente irresssecáveis ou pacientes clinicamente inoperáveis devem ser tratados com quimioterapia exclusiva para doença avançada (NCCN, 2016).

1.4 FATORES ASSOCIADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO EM TUMORES

Os PPARs (*Peroxisome proliferator activated receptors*) são receptores nucleares que antagonizam a atividade de transcrição de fatores envolvidos na inflamação e imunidade, tais como, o fator nuclear KB (NFKB), a proteína ativadora um (AP1) e o fator nuclear de células T (NFAT). Três diferentes isotipos de PPAR já foram identificados: PPARG (alfa), PPARG/PPARB (delta/beta) e PPARG (gamma). O PPARG é expresso por monócitos, macrófagos, células T, células dendríticas, músculo esquelético, adipócitos e células do epitélio gastrointestinal, e está envolvido em vários processos, incluindo homeostase de lipídios e glicose, inflamação e diferenciação de adipócitos (FUJISAWA et al., 2008).

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

Acredita-se que existe um equilíbrio entre a β -catenina e o PPARG na sinalização da manutenção da diferenciação e proliferação de células normais, sendo observada uma inter-relação direta entre esses dois

marcadores. A deficiência de PPARG está associada ao aumento da betacatenina e, como já está descrito em vários trabalhos científicos, a betacatenina constitui uma molécula de significância ímpar na etiologia do câncer de cólon (YANG et al., 2014).

A betacatenina desempenha duas importantes funções, tanto na regulação da adesão célula-célula, como no componente do complexo de adesão E-caderina/catenina na membrana da célula na mediação da proliferação celular através da sua expressão no citoplasma e núcleo, além de funções adicionais de sinalização intracelular na via de sinalização WNT, atuando como um cofator de transcrição em células T (SABATINO et al., 2014).

A inibição de PPARG aumenta a expressão de β -catenina, especialmente no núcleo, resultando em expressão aumentada de ciclina D1 e c-Myc que, por sua vez, promove proliferação das células epiteliais. Como a ciclina D1 e c-Myc atuam como fatores de aceleração da fase G1/S, parece que a ausência de PPARG promove a proliferação celular e tumorigênese, acelerando o ciclo celular e reforçando o efeito da β -catenina.

Fujisawa et al. (2008) demonstraram que a inibição de PPARG utilizando um antagonista seletivo promovia a formação de pólipos colônicos em intestino de ratos. Além disso, McAlpine et al. (2006) relataram que a deficiência de PPARG aumentou o número de tumores colônicos em ratos.

1.5. O PPARG E O CÂNCER COLORRETAL

Na literatura, vários estudos demonstraram em humanos os efeitos do PPARG em diferentes tumores. A expressão ou ativação do PPARG foi associada a bom prognóstico no câncer colorretal (PANCIONE et al., 2009; OGINO ET al., 2009) e também considerado efeito protetor contra o câncer de fígado (KOGA et al., 2001), de ovário (KOMAR et al., 2005), de mama (BURSTEIN et al., 2003; MUELLER et al., 1998; MEHTA et al., 2000) e de tireóide (COPLAND et al., 2006), entre outros.

Em um dos estudos pioneiros do PPARG no CCR, Sarraf et al, em 1999, demonstraram que muitos tumores apresentam mutações somáticas

no PPARG, e que elas são funcionalmente significantes e podem ter um papel no desenvolvimento e progressão da doença. A mutação estava presente apenas no tecido neoplásico e não nas demais células dos pacientes; ela causava efeitos profundos na função do receptor e nenhuma outra mutação patológica foi observada nesses pacientes. O fato de que mutações com perda de função do PPARG poderiam estar associadas ao CCR abriu uma nova janela de estudo para um potencial alvo terapêutico (SARRAF et al., 1999).

Sabatino et al., em 2012, realizaram uma revisão sobre a desregulação epigenética do PPARG e seu papel na tumorigênese colorretal, concluindo que há claros indícios de que essa desregulação pode resultar em função gênica alterada e transformação maligna. Também mostraram que o PPARG é importante em diversos processos biológicos e tem efeito protetor contra a progressão tumoral (SABATINO et al., 2012).

No Brasil, Costa et al., em 2012, realizaram a análise da expressão imunoistoquímica de alguns fatores associado a hipóxia (HIF1A e VEGF) e ao metabolismo lipídico (PPARG, LXRA e LXRβ) em pacientes com tumores colorretais esporádicos em estágios clínicos II e III. O único fator que apresentou significância estatística com as variáveis estudadas foi o PPARG, pois pacientes cujos tumores não o expressavam, apresentavam piores taxas de sobrevida global e sobrevida câncer-específico (COSTA, 2012).

Em um dos trabalhos de maior impacto recente sobre este tema, Ogino et al. (2009) publicaram resultados de um estudo prospectivo onde examinaram o papel prognóstico da expressão do PPARG em 470 pacientes com câncer colorretal, estágios I-IV, por imunoistoquímica, quando identificaram a expressão do PPARG em 22% destes pacientes, e apresentaram resultados estatisticamente significativos, com maior sobrevida global e menor mortalidade global e câncer específica. Independentemente de outras variáveis, a expressão do PPARG foi associada a um melhor prognóstico em câncer colorretal (OGINO et al., 2009).

Entretanto, outros estudos na literatura apontam no sentido contrário. Wang et al. (2014) publicaram que a deleção do PPARG atenua a

inflamação colônica e a formação de adenomas associados às colites em camundongos transgênicos. Seus resultados indicam que tanto o PPARD quanto a COX-2 derivada da PGE2 promovem a tumorigênese, e muito provavelmente tem relevância clínica, pois a elevação do PPARD e da COX-2 em tecidos tumorais correlacionam com um pior prognóstico em pacientes com CCR (WANG et al., 2014; YOSHINAGA et al., 2011).

Em outro experimento, com células tumorais mutadas para o gene APC e inoculadas em camundongos, o uso de pioglitazona (um agonista do PPARG), em baixas doses, promoveu o crescimento tumoral associado ao aumento na expressão da B-catenina e do c-Myc, enquanto altas doses de pioglitazona suprimiram o crescimento (CHOI et al., 2008). Estes dados podem indicar que níveis de função do PPARG possam influenciar na carcinogênese, inibindo ou promovendo-a.

Outros PPARs também podem estar associados ao prognóstico dos pacientes. A expressão imunoistoquímica do PPARG em metástases hepáticas colorretais foi associada a uma pior sobrevida global comparando-se àqueles que não a expressavam; o mesmo não foi possível afirmar em relação à expressão da PPARG (PANG et al., 2015).

O desenvolvimento de novas estratégias para o combate ao CCR passa pelo melhor entendimento do PPARG. Aires et al. demonstraram que o uso do resveratrol como droga pró-apoptótica depende da expressão e do funcionamento adequado do PPARG, e que a atuação de um agonista do PPARG conjuntamente sinergiza a ação antitumoral. Também mostraram que este efeito sinérgico é específico do PPARG e não tem relação com o PPARG ou PPARD/PPARB, concluindo-se que é importante uma expressão adequada do PPARG para que ocorra a morte da célula tumoral devido ao resveratrol (AIRES et al., 2014).

Em um artigo de revisão, Park e Kwak, em 2012, apontaram como a literatura ainda é bastante divergente quanto ao papel real dos diversos PPARs, principalmente do PPARG, demonstrando evidências e teorias que suportam a sua atividade tanto anticâncer quanto pró-carcinogênico (Figuras 1 e 2) (PARK e KWAK, 2012).

Estas divergências, que mostram o quanto ainda não se entende as funções do PPARG, abrem espaço para que se continue pesquisas em busca de uma resposta que possa contribuir no combate ao câncer colorretal.

Figura 1 – Potenciais mecanismos moleculares para o PPARG como pró-carcinogênico no CCR.

(Adaptado de: Park et al., 2012)

Figura 2 – Potenciais mecanismos moleculares para o PPARG como supressor tumoral.

(Adaptado de: Park et al, 2012)

2. OBJETIVOS

A decorative L-shaped line consisting of a horizontal segment and a vertical segment meeting at a right angle, positioned to the right of the section header.

1 - Avaliar a expressão do PPARG em amostras de tumores de cólon e reto;

2- Correlacionar este dado com variáveis epidemiológicas, laboratoriais e clínicas dos pacientes estudados:

- Idade
- Tipo histológico
- CEA
- Estadiamento
- Evolução clínica

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Estudo de coorte retrospectivo envolvendo pacientes com diagnóstico de carcinoma de cólon e reto, estágios I a IV, operados no Serviço de Coloproctologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), entre 2008 e 2009, tratados ou não com quimioterapia adjuvante.

Estes pacientes cederam amostras para o Banco de Tumores da Instituição, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer 1.469.953), para que fossem estudadas posteriormente, fornecendo consentimento por escrito, autorizando o uso das amostras para fins de pesquisa. As amostras foram armazenadas no banco de tumores proctológicos, localizado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, ficando conservadas a -80°C (Figura 3).

Figura 3 – Freezer para armazenamento das amostras tumorais a -80°C

Foram incluídas 50 amostras sequenciais, obtidas através da ressecção cirúrgica do tumor primário de pacientes adultos, tratados pela equipe da divisão de Coloproctologia do HC-FMRP-USP.

Como controle, foram usadas 20 amostras de tecido normal, não tumoral, adjacente à neoplasia, que foi coletado no mesmo procedimento cirúrgico.

Os dados clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos dos pacientes foram obtidos através de pesquisa no setor de arquivos médicos (SAME) do HC-FMRP-USP. A consulta ao prontuário de cada paciente foi realizada em julho de 2015, sendo levantados dados, como: identificação, história clínica, tratamentos realizados, resultados de exames, seguimento clínico oncológico, recidivas de doença e óbitos.

O projeto foi avaliado e aprovado pelo comitê de Ética em pesquisa do HC-FMRP-USP, através do parecer 1.469.953 de 30 de março de 2016.

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO

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

- a) Confirmação histológica de adenocarcinoma de cólon ou reto;
- b) Disponibilidade de material tumoral conservado em nitrogênio para extração e análise do RNA;
- c) Tratamento exclusivo em nossa instituição.

Foram considerados inelegíveis para o estudo e, portanto, excluídos da casuística, os pacientes:

- a) Portadores de doença inflamatória intestinal;
- b) Portadores de câncer colorretal hereditário;
- c) Tumores que não eram adenocarcinomas, como carcinomas epidermóides e tumores de estroma intestinal.

3.2 VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E TERAPÊUTICAS

- Idade: agrupada em duas categorias (≥ 60 anos e > 60 anos);
- Gênero: masculino ou feminino;
- Localização: cólon ou reto. Definida pela descrição do exame endoscópico anotado no prontuário médico. Considerado reto o segmento até 12 cm acima da linha pectínea (NELSON et al., 2001);
- Tipo de cirurgia: ressecções segmentares clássicas e ampliadas. Definiu-se como ressecção ampliada a retirada do órgão acometido (segmento do cólon ou reto alto), em monobloco com outros órgãos ou estruturas adjacentes aderidos ao tumor;
- Realização de quimioterapia adjuvante: sim ou não;
- Nível sérico pré-operatório do antígeno carcinoembrionário (CEA): variável obtida a partir de anotação nos prontuários médicos.

3.3 VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS

- Estadiamento TNM
- Grau de diferenciação
- Embolização vascular linfática: presença ou ausência
- Embolização vascular sanguínea: presença ou ausência
- Embolização vascular linfática, caracterizada pela invasão das células dos tumores malignos no espaço vascular linfático, sendo capazes de formarem êmbolos e entrarem na circulação linfática;
- Embolização vascular venosa caracterizada pela invasão das células dos tumores malignos no espaço vascular sanguíneo, sendo capazes de formarem êmbolos e entrarem na circulação sanguínea e estabelecerem lesões metastáticas.

3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNA DE MARCADOR ASSOCIADO AO METABOLISMO LIPÍDICO

- Quantificação da expressão do RNA do gene do PPARG
- **Método de extração de RNA total e síntese de cDNA**

As amostras de RNA total foram extraídas a partir de tecido tumoral e normal (adjacente ao tumor) a fresco. Foi adicionado 250 μ L de PBS (*phosphate-buffered saline*) + 750 μ L de TRIZOL® (Invitrogen, EUA) às amostras, as quais foram lisadas em homogeneizador “Polytron®” por aproximadamente 3 minutos (Figuras 4a e 4b).

Figuras 4a e 4b – Homogeneizador “Polytron®”

Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foi acrescentado 200 μ L de clorofórmio a 100%, agitado por 15 segundos num vortexador e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm (rotações por minuto), obtendo ao final a divisão em duas fases bem delimitadas, uma fase aquosa e uma fase orgânica (Figuras 5a e 5b).

Figura 5A – Centrífuga **Figura 5B – Fases aquosa e após centrifugação**

A fase aquosa foi transferida para novos tubos e o RNA foi precipitado com 500ul de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -20°C por pelo menos 12 horas (Figura 6).

Figura 6 – Freezer a -20°C para precipitação do RNA

No dia seguinte a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Foi acrescentado 1000uL de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada (4°C) por 15 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado

secou em temperatura ambiente. Após seco, foi dissolvido em água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) por pelo menos 15 minutos. Esse material foi dividido, identificado e armazenado a -80°C .

Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose com concentração de 1% para RNA. A concentração da amostra de RNA também foi quantificada utilizando o equipamento Thermo Scientific NanoDrop 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1-2 μL , além de uma razão referente a integridade das amostras (razão 260/280). Para valores menores que 1,6 foi considerado que o material degradado e acima de 2,0, pode ter sofrido interferência do clorofórmio. Assim considerou-se uma amostra adequada na faixa de 1,61 a 1,99 (Figuras 7a e 7b).

Figuras 7a e 7b – Espectrofotômetro “Thermo Scientific NanoDrop, 2000”

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do mRNA a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial (Applied Biosystems) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, de acordo com as instruções do fabricante. Para cada 0,5 μg de RNA, foi adicionado 2,5 μL de RT Buffer; seguido de 1,0 μL de dNTP's; 2,5 μL de Random Primers e 1,25 μL da

enzima MultiScribe™, 0,6 µl de RNase out, completando com água DEPC o volume final de 20µL. O material então foi levado ao termociclador nas condições padrão, onde o cDNA é sintetizado a partir do RNA das amostras.

- **PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)**

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão gênica de PPARG, relacionado aos tumores colorretais.

A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RT-PCR), com a utilização da TaqMan Master Mix (Applied Biosystems). Para a análise quantitativa da expressão gênica, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Assay, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems).

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, foram normalizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado gene) foi subtraído do CT determinado para um gene house-keeping (neste caso o GAPDH e o IGHMBP2) na mesma amostra, originando o chamado Δ CT. Os valores de Δ CT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica.

Assim, o número de ciclos que separa o Δ CT de uma amostra do Δ CT de outra amostra de referência ($\Delta\Delta$ CT) reflete a diferença existente entre as amostras, amostras, que, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK et al., 2001). Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados pelo software Sequence Detection System para se obter os valores de CT (Figuras 8a e 8b).

Figuras 8a e 8b – Aparelho para RT-PCR “7500 Fast Real-Time PCR System”

- **A escolha dos genes de referência**

A escolha dos genes de referência (*house-keeping genes*) é de suma importância para uma validação precisa dos resultados. Eles servem como um controle interno na quantificação da transcrição, pois as diferentes amostras podem apresentar variações na quantidade total de RNA, estabilidade do RNA, eficiência enzimática, volume amostral, entre outros. Para tentar corrigir isso, as medidas de expressão são normalizadas pelos controles internos, que são os genes de referência. Idealmente, estes genes não variam a sua expressão entre diferentes amostras e, portanto se correspondem com a quantidade total de RNA. A opção pelos genes GAPDH e IGHMBP2 foi feita considerando-se a literatura já existente e também os novos bancos de dados que relacionam múltiplos dados para a escolha da opção mais adequada.

O GAPDH é tradicionalmente usado como gene de referência no estudo do RT-PCR em cólon e PPARG , e estudos recentes continuam mostrando que ele é um dos mais estáveis genes para controle (WANG et

al., 2015; SORBY et al., 2010). Por esse motivo selecionamos o GAPDH como um dos *house-keeping genes* para este experimento.

A base de dados Genevestigator (<http://www.genevestigator.com>), contém uma grande quantidade de informação de diferentes organismos e patologias (HRUZ et al., 2008). Ela oferece a busca por genes de referência que tenham um comportamento mais estável, levando-se em consideração variados contextos biológicos, por exemplo: gene a ser comparado, espécie e patologia estudadas, entre outros.

Hruz et al., em 2011, validaram esta metodologia como confiável para a seleção de genes de referência, na busca pelo gene mais estável dentro de uma grande gama de candidatos (ao invés de uma pequena amostra de genes comumente usados). Afirmaram também que a identificação de genes de referência específicos para o contexto, combinado com métodos de normalização existentes, deve melhorar significativamente a qualidade e sensibilidade de experimentos de expressão e quantificação, facilitando a correta interpretação dos dados de RT-PCR.

Com estes dados, submetemos nosso contexto biológico experimental à análise do Genevestigator, e encontramos o IGHMBP2 como o gene mais estável para a nossa pesquisa (Figura 9).

Figura 9. Indicações do Genevestigator com os candidatos a gene de referência

Atualmente o consenso é de que o uso de múltiplos genes de referência para normalizar os dados de RT-PCR é a melhor opção (DE KOK et al., 2005). Por isso foi utilizado ambos, o GAPDH e o IGHMBP2 para avaliação da expressão do PPARG através da média dos dois genes. Também estudou-se a expressão do PPARG levando-se em consideração cada um dos *house-keeping genes* separadamente, pois era o método usado até algum tempo atrás e, assim, pôde-se comparar melhor nossos resultados aos da literatura.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação comparativa de grupos não pareados e de distribuição não Gaussiana, optou-se pelo teste de Mann-Whitney. Caso houvesse mais de dois grupos a serem comparados, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis.

O software Graphpad Prism 6.0 foi utilizado para confecção dos gráficos e análise estatística, considerando significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

A decorative L-shaped line consisting of a horizontal segment and a vertical segment meeting at a right angle, positioned to the right of the section header.

4.1 ANÁLISES DA AMOSTRA DOS PACIENTES

As características clínicas e patológicas dos pacientes estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Resumo das características clínicas e patológicas da amostra estudada

Características clínicas e patológicas	No. de pacientes
Sexo	
Masculino	25
Feminino	25
Idade em anos	
<45	5
45-60	15
>60-75	19
>75	11
Topografia do tumor primário	
Cólon	28
Reto	22
pT do estadiamento	
T1	1
T2	5
T3	33
T4	11
pN do estadiamento	
N0	27
N1	10
N2	13
TNM	
I	1
II	21
III	17
IV	11
Invasão angiolinfática	
Presente	18
Ausente	18
Sem informação	14
CEA	
<5 ng/dl	27
5 a 15 ng/dl	10
>15 a 50 ng/dl	10
>50 ng/dl	3

- **Idade**

Na amostra populacional, foram encontrados 25 pacientes do sexo masculino e 25 do feminino. O mais novo tinha 27 anos e o mais velho 89 anos ao diagnóstico. A maioria tinha mais de 60 anos (gráfico 1).

Gráfico 1

- **Neoplasia primária**

Em relação à topografia do tumor primário, 28 pacientes apresentavam tumores colônicos e 22 no reto. Não houve tumores sincrônicos. A maioria dos pacientes foi submetida à colonoscopia previamente à cirurgia ou logo após, quando a cirurgia foi realizada em caráter de urgência.

O adenocarcinoma puro foi o subtipo histológico mais prevalente, acometendo 42 pacientes e o adenocarcinoma mucinoso foi encontrado em oito pacientes. Dos tumores, 92% eram moderadamente diferenciados, classificados como grau II e a invasão angiolinfática foi reportada em 18 pacientes.

- **Estadiamento**

Pela classificação da AJCC sétima edição, houve um paciente em estágio clínico I, 21 no estágio II, 17 no estágio III e 11 pacientes com doença metastática ao diagnóstico (estágio IV). Os órgãos mais frequentemente acometidos de metástases foram fígado e pulmão, mas também houve casos de lesões secundárias em omento, ovário e ossos (Gráfico 2).

- **CEA**

Dos 50 pacientes avaliados, em três não foi medido o CEA antes da ressecção cirúrgica do tumor primário. As dosagens do CEA variaram entre 0,26 ng/dl a 182 ng/dl e a maioria dos pacientes apresenta níveis de abaixo de 5 ng/dl.

- **Tratamento realizado**

Com relação ao tratamento oncológico dos pacientes, todos foram submetidos à ressecção cirúrgica do tumor primário. Em 22% a cirurgia foi o único tratamento para o câncer. A maioria recebeu quimioterapia após a cirurgia, sendo 58% com intenção adjuvante e 18% com intenção paliativa.

Apenas seis pacientes receberam radioterapia em algum momento do tratamento. Três pacientes apresentaram metástases hepáticas passíveis de ressecção e foram submetidos à hepatectomia em um segundo tempo cirúrgico, após a ressecção do tumor primário.

- **Evolução dos pacientes**

Nas informações obtidas através de consulta aos prontuários em julho de 2015, com mais de cinco anos de seguimento em todos os pacientes, houve 23 pacientes em remissão clínica completa. Seis pacientes apresentaram recidivas locais ou à distância e encontram-se vivos.

Vinte pacientes foram a óbito, sendo que nove, ao diagnóstico, estavam no estágio clínico IV. De um paciente não havia informação recente no prontuário, pois abandonou o seguimento (gráfico 3).

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO PPARG

Foram comparados os resultados da expressão gênica de 49 amostras tumorais com 20 amostras de tecido normal adjacentes ao tumor, que foram usadas como controle. Uma das amostras tumorais não apresentou amplificação gênica satisfatória para realização do RT-PCR e foi descartada.

- **Expressão do PPARG pela média dos dois genes de referência**

Quando os dados foram analisados, considerando-se ambos os genes de referência como controles e fazendo-se uma média dos dois (tanto GAPDH quanto IGHMBP2), foi observado que a expressão do gene PPARG esteve diminuída em relação ao controle. Entretanto não houve significância estatística neste achado ($p=0,2114$) (gráfico 4).

- **Expressão do PPARG usando o GAPDH como gene de referência**

Se analisado os *house-keeping genes* separadamente, observa-se que em relação ao GAPDH, o PPARG apresenta-se menos expresso (gráfico 5), mas sem significância estatística ($p=0,1056$).

Gráfico 5

- **Expressão do PPARG usando o IGHMBP2 como gene de referência**

Quando analisada a expressão do PPARG usando o IGHMBP2 como *house-keeping gene*, o PPARG estava mais expresso (gráfico 6), mas sem significância estatística ($p=0,9843$).

Gráfico 6

Como a literatura reconhece que a média de mais de um gene de referência é mais confiável para normalização do RT-PCR, usou-se a média dos dois *house-keeping* para nosso estudo (DE KOK et al., 2005), mas também analisou-se a expressão do PPARG, levando-se em consideração cada um dos *house-keeping genes* separadamente, para melhor comparar nossos resultados à bibliografia já existente.

4.3 ANÁLISE COMPARATIVA DO ESTADIAMENTO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS

Por se tratar do principal fator prognóstico no câncer colorretal, comparou-se o estadiamento com as outras características clínicas dos pacientes amostrados.

• Estadiamento e idade

No estágio I, houve apenas um paciente, com idade de 58 anos. Nos estágio II, III e IV, não houve um nítido predomínio de faixa etária nos diferentes estágios. Entretanto notou-se que a proporção de pacientes acima de 75 anos foi aumentando progressivamente com estágios mais avançados da doença (gráfico 7).

• Estadiamento e evolução clínica

A maioria dos pacientes em estágio IV evoluiu para óbito, sendo que dos 11 pacientes neste estágio, 10 já faleceram. O único paciente vivo foi submetido à ressecção da metástase hepática e quimioterapia, e até julho

de 2015 encontrava-se sem evidência de doença. O paciente que não veio no seguimento foi considerado falecido, pois era idoso (78 anos) e já apresentava lesões pulmonares ao diagnóstico.

De um total de 17 pacientes em estágio III, oito faleceram, três apresentaram recidivas e seis encontram-se em remissão clínica da doença. A maioria destes pacientes recebeu quimioterapia adjuvante.

Dos pacientes em estágio II, que totalizam 21 pacientes, apenas três faleceram. Houve duas recidivas e 16 encontram-se sem evidência de doença. O único paciente em estágio I mantém-se sem evidência de doença (gráfico 8).

Gráfico 8

4.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DADOS CLÍNICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DO PPARG PELA MÉDIA DOS GENES DE REFERÊNCIA

- **Idade e a expressão do PPARG pela média dos genes de referência**

As amostras foram subdivididas em dois grupos para se ter um número de paciente mais representativo, em cada grupamento.

O grupo de pacientes com 60 anos ou menos tinha 21 pacientes, e o grupo acima dos 60 anos, 28. A expressão gênica foi maior no grupo acima de 60 anos, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,2940$) (gráfico 9).

- **Tipo histológico e a expressão do PPARG pela média dos genes de referência**

Os pacientes foram distribuídos em dois grupos de subtipos histológicos: os adenocarcinomas puros e os adenocarcinomas que apresentavam alguma diferenciação mucinosa. Os pacientes com alguma diferenciação mucinosa apresentaram maior expressão do PPARG. Entretanto, a diferença não teve significância estatística ($p=0,5452$) (gráfico 10).

Gráfico 10

- **CEA e a expressão do PPARG pela média dos genes de referência**

Distribuímos os pacientes entre os que apresentaram CEA maior ou menor que 5 ng/dl. Os dois grupos não apresentaram grande diferença entre si na expressão gênica, o que não foi significativo ($p=0,2949$) (gráfico 11).

Gráfico 11

- **Estadiamento e a expressão do PPARG pela média dos genes de referência**

Como houve apenas um paciente em estágio I, ele não foi incluído na análise estatística. Nos demais estágios foi observada maior expressão do PPARG nos estágios mais avançados, entretanto a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,4062$) (gráfico 12).

Gráfico 12

- **Evolução clínica e a expressão do PPARG pela média dos genes de referência**

Os pacientes foram separados em dois grupos com desfechos clínicos diferentes: um grupo encontrava-se em remissão da doença e o outro apresentava recidiva ou foi a óbito.

Os pacientes com evolução desfavorável apresentaram maior expressão do PPARG quando comparados aos pacientes em remissão clínica. Entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,3895$) (gráfico 13).

Gráfico 13

4.5 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DADOS CLÍNICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DO PPARG USANDO-SE O GAPDH COMO GENE DE REFERÊNCIA

- **Idade e expressão do PPARG usando o GAPDH como gene de referência**

Manteve-se a amostra distribuída em dois grupos para se ter um número de pacientes mais representativo em cada grupamento.

O grupo com 60 anos ou menos com 21 pacientes e o grupo acima dos 60 anos tinha 28 pacientes. A expressão gênica foi maior no grupo acima de 60 anos, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,4735$) (gráfico 14).

Gráfico 14

- **Tipo histológico e a expressão do PPARG usando-se o GAPDH como gene de referência**

Manteve-se a divisão dos pacientes em dois grupos de subtipos histológicos: os adenocarcinomas puros e os adenocarcinomas que apresentavam alguma diferenciação mucinosa. Os pacientes com alguma diferenciação mucinosa apresentaram maior expressão do PPARG, entretanto, a diferença não teve significância estatística ($p=0,6183$) (gráfico 15).

Gráfico 15

- **CEA e a expressão do PPARG usando o GAPDH como gene de referência**

Foi mantida a divisão dos pacientes entre os que apresentaram CEA maior ou menor que 5 ng/dl. Houve maior diferença na expressão, se comparado a análise com a média dos dois *house-keeping*, com tendência a apresentar maior expressão do PPARG em tumores com CEA baixo. Entretanto, a diferença não foi significativa ($p=0,2199$) (gráfico 16).

Gráfico 16

- **Estadiamento e a expressão do PPARG usando o GAPDH como gene de referência**

Observou-se ainda maior expressão do PPARG nos estágios mais avançados, entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,5887$) (gráfico 17).

Gráfico 17

- **Evolução clínica e a expressão do PPARG usando o GAPDH como gene de referência**

Os pacientes que evoluíram com recidiva ou óbito apresentaram maior expressão do PPARG quando comparados aos pacientes em remissão clínica, entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,4291$) (gráfico 18).

Gráfico 18

4.6 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DADOS CLÍNICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DO PPARG USANDO-SE O IGHMBP2 COMO GENE DE REFERÊNCIA

- **Idade e a expressão do PPARG usando-se o IGHMBP2 como gene de referência**

Houve maior expressão no grupo acima de 60 anos, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,4195$) (gráfico 19).

Gráfico 19

- **Tipo histológico e a expressão do PPARG usando-se o IGHMBP2 como gene de referência**

Os pacientes com alguma diferenciação mucinosa apresentaram maior expressão do PPARG, entretanto, a diferença não teve significância estatística ($p=0,6955$) (gráfico 20).

Gráfico 20

- **CEA e a expressão do PPARG usando-se o IGHMBP2 como gene de referência**

Utilizando o IGHMBP2 como referência, foi observada maior expressão do PPARG em tumores com CEA alto, entretanto, a diferença não foi significativa ($p=0,7113$) (gráfico 21).

Gráfico 21

- **Estadiamento e a expressão do PPARG usando o IGHMBP2 como gene de referência**

Houve ainda maior expressão do PPARG nos estágios mais avançados, entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,4832$) (gráfico 22).

Gráfico 22

- **Evolução clínica e a expressão do PPARG usando o IGHMBP2 como gene de referência**

Os pacientes com evolução desfavorável apresentaram maior expressão do PPARG quando comparados aos pacientes em remissão clínica, entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,6875$) (gráfico 23).

Gráfico 23

5. DISCUSSÃO

5.1 AMOSTRA DOS PACIENTES

O câncer colorretal é um dos tumores mais incidentes e de maior mortalidade no mundo Ocidental.

Nossa casuística, com os 50 casos selecionados, mostrou de forma bem razoável a distribuição homogênea e até equilibrada de sua incidência entre os sexos na população geral, pois foram encontrados exatos 25 pacientes do sexo feminino e 25 do sexo masculino, dentro do período de tempo estudado (INCA, 2015).

A distribuição por faixa etária de nossa amostra identificou um predomínio no acometimento acima dos 60 anos de idade. Estes pacientes corresponderam a 60% dos casos. Considerando-se também os pacientes entre 45 e 60 anos, identificou-se que 90% deles tinham mais de 45 anos de idade ao diagnóstico do tumor colorretal. A literatura realmente aponta um risco maior de tumores colorretais com o avançar da idade, sendo a orientação dos especialistas iniciar o rastreamento para esses tumores a partir dos 50 anos, com a realização de colonoscopia, retossigmoidoscopia ou pesquisa de sangue oculto nas fezes.

O rastreamento possibilita a detecção de lesões precursoras e tumores iniciais, antes de haverem sintomas, traduzindo esse diagnóstico precoce em um estadiamento mais inicial e melhor sobrevida. Entretanto, a maioria dos pacientes apresentava estágios mais avançados da doença, observando-se apenas um paciente em estágio clínico I ao diagnóstico, e 76% encaixavam-se nos estágios III ou IV, apontando um prognóstico já mais reservado para a essa casuística e talvez uma falha no sistema de rastreamento em nossa população.

O CEA (antígeno carcinoembrionário) é uma glicoproteína produzida por 60% das neoplasias colorretais, assim como por alguns adenocarcinomas de outras topografias e até por afecções benignas. Devido a isso, tem baixa sensibilidade e especificidade, não sendo um recurso útil no rastreamento do câncer colorretal. O CEA tem correlação com o prognóstico e, caso esteja elevado no pré-operatório, pode ser uma grande

ajuda no seguimento oncológico, detectando-se recidivas precoces. Nessa casuística, 54% dos pacientes tinham CEA normal no pré-operatório.

Com relação ao tratamento posterior à cirurgia para ressecção da lesão primária, 76% dos pacientes receberam quimioterapia, seja em caráter adjuvante ou paliativo. Isso reflete o grande número de pacientes que encontravam-se em estágios clínicos III e IV, indicações inequívocas de terapia sistêmica, caso o paciente tenha condições de recebê-la.

A radioterapia foi utilizada em apenas 10% dos pacientes e somente 6% evoluíram com metástases hepáticas passíveis de ressecção e foram submetidos à hepatectomia em um segundo tempo cirúrgico.

Apesar da maior parte dos pacientes se encontrarem em estágios avançados ao diagnóstico, 68% encontravam-se vivos após mais de cinco anos de seguimento. Destes, 46% estão em remissão completa e 12% com recidiva local ou à distância.

Os pacientes em estágio IV totalizavam 22% dos casos. Destes, apenas um está vivo após mais de cinco anos da doença, sendo que a época do diagnóstico apresentava metástase hepática, que foi ressecada em um segundo tempo cirúrgico. Até o último levantamento ele encontrava-se em remissão completa. Este achado ilustra o avanço na condução dos casos de câncer colorretal metastático, onde a melhor efetividade das novas drogas sistêmicas possibilita maior agressividade no tratamento das lesões metastáticas, em especial as hepáticas, e este avanço se traduz em um aumento das taxas de sobrevida e, em alguns casos, até em remissão completa prolongada.

Este achado repete-se em outros dois pacientes que ao diagnóstico eram estágio III, evoluíram com metástases hepáticas durante o seguimento, foram submetidos à hepatectomia para ressecção das mesmas e encontram-se em remissão até o último levantamento.

Estes exemplos fazem com que concordemos com os estudos atuais, que mostram que a ressecção das lesões hepáticas, associadas ao tratamento sistêmico, tem melhorado significativamente a sobrevida global e a qualidade de vida destes pacientes (HALLET et al., 2016 ; GANDY et al., 2016).

5.2 EXPRESSÃO DA PPARG

A cada dia novas descobertas aumentam a importância das PPARs. Uma das mais bem estudadas e discutidas funções destes receptores é a sua participação na regulação do metabolismo, principalmente dos lipídeos. Sua função na maturação e transformação dos adipócitos tem papel significativo no controle de doenças como a obesidade (CRISTANCHO e LAZAR, 2011), fazendo esse receptor nuclear agir como um dos reguladores mestres da adipogênese. De fato, vários estudos verificaram alterações na expressão da PPARG, dependendo do grau de obesidade e da quantidade de lipídios ingeridos na dieta (GARCIA-FUENTES et al., 2010).

A PPARG também tem como função ser um importante sensibilizador à insulina. Uma família de drogas, as tiazolidinedionas, agonistas sintéticos da PPARG, são amplamente usadas na prática clínica para o controle do diabetes, mostrando uma clara melhora na resistência a insulina, redução dos níveis de leptina e aumentando a produção de adiponectina (AMENT et al., 2012).

Apesar de participar tão ativamente do processo metabólico, a própria PPARG parece agir diferentemente, dependendo do microambiente em que se encontra, funcionando de maneira diferente em roedores doentes e saudáveis. Na doença, a PPARG ativada parece melhorar os parâmetros metabólicos, mas nos saudáveis sua inativação parece ter efeitos contra a obesidade (IMAM et al., 2013).

Conforme citado no início dessa dissertação, a PPARG é expressa em vários tecidos e órgãos diferentes, como pulmão, próstata, bexiga, mama, cólon e reto. E nestes locais já há evidência de que a PPARG tem função tanto pró quanto anticarcinogênica.

No câncer colorretal, alguns estudos apontam que o silenciamento da PPARG está associado a um pior prognóstico, devido à maior proliferação e maior potencial invasivo (PANCIONE et al., 2010). Mas Ogino et al., em 2009, ao analisarem a expressão da PPARG através da imunohistoquímica, avaliaram que apenas 22% dos tumores apresentavam a PPARG expressa. Esses dados são conflitantes com os nossos achados, onde verificou-se que

há expressão genética do RNA da PPARG em praticamente todos os casos, mas que a quantificação medida por rt-PCR mostrou maior quantidade do RNA em tumores nos estágios mais avançados e nos pacientes que tiveram pior prognóstico. Talvez essa diferença possa ser explicada devido ao seguinte fato: enquanto a expressão imunoistoquímica precisa de uma maquinaria genética e molecular suficientemente íntegra, a expressão do RNA pode estar elevada sem necessariamente esta maquinaria estar funcionando, provavelmente devido às mutações acumuladas pela neoplasia. Assim, talvez até se encontre uma hiperexpressão a nível genético da PPARG, numa tentativa de melhorar o funcionamento da célula neoplásica, mas esta maior expressão não resulta num funcionamento adequado do receptor, ou numa maior expressão pela imunoistoquímica.

A teoria levantada por Bandera Merchan et al., em 2016, na tentativa de explicar por que a resposta anticâncer não é sempre constante, consistente e reproduzível, é a de que o microambiente celular controla a ação da PPARG de “fora para dentro” da célula. Assim, o receptor é apenas a parte intracelular de uma mensagem que começou a ser transmitida de fora. Portanto, quando um “limiar de doença” é alcançado, há um silenciamento epigenético da PPARG, que passa a não mais funcionar nem ser expresso nas membranas, deixando o paciente mais suscetível à doença. Talvez por isso a expressão imunoistoquímica da PPARG funcionando tenha sido descrita como um fator de bom prognóstico. Já a expressão do RNA da PPARG, talvez não se traduza em maior expressão imunoistoquímica em estágios mais avançados da doença, devido ao silenciamento epigenético que ocorre após um determinado estágio da doença que desliga a PPARG, apesar de uma alta expressão genética.

Eles chamam este raciocínio de “teoria da exaustão do receptor nuclear”, onde em estágios iniciais, a PPARG equilibra os efeitos maléficos do câncer e da obesidade, funcionando ativa e perfeitamente. Contudo, se a doença progride, mecanismos epigenéticos silenciam fatores de transcrição e a expressão do receptor nas membranas diminui. Acredita-se que isso explique de maneira plausível o fato de se encontrar alta expressão do RNA da PPARG em estágios avançados, talvez uma resposta do próprio

organismo a função débil ou inoperante da PPARG nestes estágios, mas devido ao silenciamento da transcrição, esta maior expressão do RNA não se reflete em receptores de membrana viáveis e visíveis na imunistoquímica.

Em estudo publicado por Beyaz et al., em 2016, com grande impacto no meio acadêmico, foi demonstrada uma correlação importante entre dietas ricas em gordura e um outro subtipo de PPAR, a delta (PPARD). Verificou-se maior atividade da PPARD induzida por dietas gordurosas e também por agonistas farmacológicos da PPARD, efeito este encontrado não só em células-tronco como também em células progenitoras do trato intestinal.

Houve maior ativação da B-catenina, maior incidência de lesões de baixo grau (adenomas) e também de carcinomas na população tratada com dieta hiperlipídica e com agonistas da PPARD. Isso possivelmente indica que a ativação da PPARD permite que algumas células progenitoras, não mais células-tronco apenas, iniciem crescimento de adenomas tanto *in vivo* como *in vitro*.

Este modelo de estudo mostrou que uma dieta rica em gorduras aumenta o número e a proliferação de células-tronco intestinais, o que pode ser parcialmente responsabilizado pelo aumento no número de tumores intestinais. Também levanta a hipótese de que uma maior ativação da PPARD pela dieta hiperlipídica aumenta a suscetibilidade das células intestinais sofrerem transformação oncogênica, aumentando a amostragem de células capazes de iniciar um tumor. Entretanto, a maneira como esta relação entre obesidade, dieta hiperlipídica e inflamação contribuem para a sinalização da PPARD e a carcinogênese não está clara e necessita outras investigações.

Estes achados, apesar de dizerem respeito à PPARD, podem explicar um pouco os dados encontrados nesse estudo, visto que a família das PPARs tem um grau de semelhança entre seus subtipos. Se pudéssemos relacionar dados de massa corporal, IMC e percentual de gordura nos pacientes por nós avaliados, poderíamos ter um dado interessante. Apesar de a obesidade ser bastante prevalente em nossa população, ela não apresenta índices tão altos quanto na América do Norte,

e talvez os tumores em nossa população sejam menos relacionados à dieta e à ativação dos PPARs do que em outras populações com hábitos diferentes.

5.3 ANÁLISE DOS GENES DE REFERÊNCIA

Um fato que chama a atenção durante na análise dos resultados é a discrepância entre os achados da PPARG com relação aos dois genes de referência. Utilizando a média dos dois genes, que é o método mais confiável segundo a literatura, observa-se que o PPARG é menos expresso no tumor do que no tecido normal adjacente. Esta mesma tendência é mostrada quando se utiliza apenas o GAPDH como referência. Entretanto, quando se utiliza apenas o IGHMBP2 como *house-keeping gene*, a tendência se inverte e, comparativamente, o tecido tumoral passa a ter maior expressão do que o tecido normal.

Posteriormente, na análise estratificada apenas entre os tumores, os resultados assemelham-se tanto na média como com cada gene de referência isoladamente. Observa-se que a expressão do RNA da PPARG é maior entre estágios mais avançados da doença, em tumores que tiveram evolução clínica desfavorável, em paciente com idade acima de 60 anos ou em tumores com alguma diferenciação mucinosa na histologia. A única variável que apresentou diferença entre a análise pela média ou isoladamente foi o CEA, onde tumores com CEA acima de 5ng/dl apresentaram maior expressão da PPARG usando a média dos genes ou o IGHMBP2 isoladamente, e menor expressão quando utilizou-se apenas o GAPDH como referência.

Estes achados apontam a fundamental importância que a escolha adequada do gene de referência tem no método da rt-PCR, e que o uso de banco de dados institucionais e universais, que personalizam e tentam identificar a melhor referência para o controle da reação e levam em conta múltiplas variáveis como: a espécie, o órgão, a doença e a proteína ou receptor estudados. Essa escolha individualizada pode contribuir na decisão

e aumentar o grau de confiabilidade do método. O uso dos *house-keeping genes* tradicionais, como o GAPDH, certamente ainda tem sua valia e utilidade, principalmente devido a todos os estudos e registros na literatura de seu uso, mas novas escolhas mais personalizadas para cada situação podem ser em breve o melhor método para realização do rt-PCR.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A PPARG é um receptor com futuro promissor na medicina e muito estudado na atualidade, com direito a publicações específicas para este assunto.

Mais propriamente na oncologia e em tumores colorretais, ela vem levantando e suscitando discussões a respeito de sua importância e de sua influência na biologia tumoral.

Nesse estudo evidenciou-se maior expressão do PPARG em tumores com estágio mais avançado e evolução clínica desfavorável, quando comparados aos tumores mais indolentes e iniciais, o que pode inferir uma tendência a pior prognóstico para esses pacientes.

Os dados da literatura ainda são conflitantes e inconclusivos, mas estudos mais aprofundados, com maior número de pacientes de diversas instituições, podem inferir uma importância prognóstica e até terapêutica para este receptor, levando a uma melhora no tratamento e na condução destes casos.

6. CONCLUSÕES

O PPARG está expresso de maneira similar em tumores colorretais em relação ao tecido normal adjacente, com uma tendência a estar menos expresso nos tumores.

Com relação às demais variáveis, foram observados:

- Dentre os pacientes com tumores colorretais, naqueles acima de 60 anos houve uma tendência a maior expressão do PPARG.
- Os tumores com diferenciação mucinosa apresentavam uma tendência a maior expressão do PPARG em comparação aos adenocarcinomas puros.
- Não houve diferença na expressão da PPARG, fosse o nível de CEA maior ou menor que 5ng/dL.
- Observou-se uma tendência a maior expressão da PPARG quanto mais avançado fosse o estadiamento.
- Foi notada uma tendência a maior expressão do PPARG em pacientes que evoluíram com recidiva da doença ou óbito.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIRES V, BRASSART B, CARLIER A, SCAGLIARINI A, MANDARD S, LIMAGNE E, SOLARY E, MARTINY L, TARPIN M, DELMAS D. A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in resveratrol-induced colon cancer cell apoptosis. **Mol Nutr Food Res**, v.58 n.9, Apr, p. 1785-94. 2014.
2. AMENT Z, MASOODI M, GRIFFIN JL. Applications of metabolomics for understanding the action of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in diabetes, obesity and cancer. **Genome Med**. v.4 n.4, p. 32. 2012.
3. BANDERA MERCHAN B, TINAHONES FJ, MACÍAS-GONZÁLEZ M. Commonalities in the Association between PPARG and Vitamin D Related with Obesity and Carcinogenesis. **PPAR Res**. v.2016, Article ID 2308249, 15 pages. 2016.
4. BENSON AB 3RD, SCHRAG D, SOMERFIELD MR, COHEN AM, FIGUEREDO AT, FLYNN PJ, KRZYZANOWSKA MK, MAROUN J, MCALLISTER P, VAN CUTSEM E, BROUWERS M, CHARETTE M, HALLER DG. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. **J Clin Oncol**. v.22 n.16, Aug 15, p.3408-19 2004.
5. BEYAZ S, MANA MD, ROPER J, KEDRIN D, SAADATPOUR A, HONG SJ, BAUER-ROWE KE, XIFARAS ME, AKKAD A, ARIAS E, PINELLO L, KATZ Y, SHINAGARE S, ABU-REMAILEH M, MIHAYLOVA MM, LAMMING DW, DOGUM R, GUO G, BELL GW, SELIG M, NIELSEN GP, GUPTA N, FERRONE CR, DESHPANDE V, YUAN GC, ORKIN SH, SABATINI DM, YILMAZ ÖH. High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. **Nature**, v.531, n.7592, Mar, p.53-8. 2016.
6. BURSTEIN HJ, DEMETRI GD, MUELLER E, SARRAF P, SPIEGELMAN BM. Use of the peroxisome proliferator-activated

- receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. **Breast Cancer Res Treat**, v.79, n.3, Jun, p.391-7. 2003.
7. CAO D, HOU M, GUAN YS, JIANG M, YANG Y, GOU HF. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. **BMC Cancer**, v.9, Dec, p. 432. 2009.
 8. CHANG GJ, FEIG BW. Cancer of the colon. In: Feig BW, Berger DH, George M, editors. **The MD Anderson surgical oncology handbook**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.261-319. 2006.
 9. COPLAND JA, MARLOW LA, KURAKATA S, FUJIWARA K, WONG AK, KREINER PA, WILLIAMS SF, HAUGEN BR, KLOPPER JP, SMALLRIDGE RC. Novel high-affinity PPARgamma agonist alone and in combination with paclitaxel inhibits human anaplastic thyroid carcinoma tumor growth via p21WAF1/CIP1. **Oncogene**, v.25, n.16, Apr 13, p. 2304-17. 2006.
 10. COSTA AC. Impacto da expressão de fatores relacionados à hipóxia (HIF1A e VEGF) e metabolismo lipídico (LXRA, LXRβ e PPARG) em tumores de cólon estágio clínico II e III. **Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente**. São Paulo, 2012.
 11. CRISTANCHO AG, LAZAR MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. **Nature Reviews Mol Cell Biol**, v.12, n.11, p.722-734. 2011.
 12. CUKIER M, SMITH AJ, MILOT L, CHU W, ET AL. Neoadjuvant chemoradiotherapy and multivisceral resection for primary locally advanced adherent colon cancer: a single institution experience. **Eur J Surg Oncol**, v.38, n.8, p.677. 2012.
 13. DE KOK JB, ROELOFS RW, GIESENDORF BA, PENNING S JL, WAAS ET, FEUTH T, SWINKELS DW, SPAN PN. Normalization of

- gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. **Lab Invest**, v.85, n.1, Jan, p.154-9. 2005.
14. DOUBENI CA, LAIYEMO AO, MAJOR JM, SCHOOTMAN M, LIAN M, PARK Y, GRAUBARD BI, HOLLENBECK AR, SINHA R. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. **Cancer**, v.118, n.14, Jul 15, p.3636-44. 2012.
 15. EDDY DM. Screening for colorectal cancer. **Ann Intern Med**. v.113, n.5, p.373. 1990.
 16. EDGE SB, BYRD DR, COMPTON CC ET AL., **AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, 7th edition**, Springer, New York, p.143. 2010
 17. FERLAY J., ET AL. GLOBOCAN 2012 v1 0, cancer incidence and mortality worldwide. **IARC. (IARC CancerBase, 11)**. Lyon, France. 2013. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 24 set. 2015.
 18. Foxtrot Collaborative Group. Feasibility of preoperative chemotherapy for locally advanced, operable colon cancer: the pilot phase of a randomised controlled trial. **Lancet Oncol**, v.13, n.11, p.1152. 2012.
 19. FUJISAWA T, SUGIYAMA M, TOMIMOTO A, ET AL., Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes tumorigenesis through activation of the beta-catenin / T cell factor (TCF) pathway in the mouse intestine. **J Pharmacol Sci**, v.108, p.535-44. 2008.
 20. GANDY RC, STAVRAKIS T, HAGHIGHI KS. Short- and long-term outcomes of elderly patients undergoing liver resection for colorectal liver metastasis. **ANZ J Surg**, Oct 30. doi: 10.1111/ans.13690. 2016.

21. GARCIA-FUENTES E, MURRI M, GARRIDO-SANCHEZ L, GARCIA-SERRANO S, GARCÍA-ALMEIDA JM, MORENO-SANTOS I, TINAHONES FJ, MACIAS-GONZALEZ M. PPARgamma expression after a high-fat meal is associated with plasma superoxide dismutase activity in morbidly obese persons. **Obesity**, v.18, n.5, May, p.952-8. 2010.
22. GUPTA RA, BROCKMAN JA, SARRAF P, WILSON TM, DUBOIS RN. Target genes of peroxisome-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. **J Biol Chem**, v.276, n.32, p.29681. 2001.
23. HALLET, J., SA CUNHA, A., ADAM, R., GOÉRÉ, D., BACHELLIER, P., AZOULAY, D., AYAV, A., GRÉGOIRE, E., NAVARRO, F., PESSAUX, P. AND THE FRENCH COLORECTAL LIVER METASTASES WORKING GROUP, ASSOCIATION FRANÇAISE DE CHIRURGIE (AFC). Factors influencing recurrence following initial hepatectomy for colorectal liver metastases. **Br J Surg**, v.103, p.1366–1376. doi:10.1002/bjs.10191. 2016.
24. HRUZ T, LAULE O, SZABO G, WESSENDORP F, BLEULER S, OERTLE L, WIDMAYER P, GRUISSEM W, ZIMMERMANN P. Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. **Adv Bioinform**. 2008.
25. HRUZ T, WYSS M, DOCQUIER M, PFAFFL MW, MASANETZ S, BORGHIL L, VERBRUGGHE P, KALAYDJIEVA L, BLEULER S, LAULE O, DESCOMBES P, GRUISSEM W, ZIMMERMANN P. RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. **BMC Genomics**, v.21, n.12, Mar, p.156. 2011.
26. IMAM MU, ISMAIL M, ITHNIN H, TUBESHA Z, OMAR AR. Effects of germinated Brown rice and its bioactive compounds on the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene. **Nutrients**, v.6, n.5(2), Feb, p.468-77. 2013.

27. INCA-MS, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa/2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. **INCA**. 2015.
28. KOGA H, SAKISAKA S, HARADA M, TAKAGI T, HANADA S, TANIGUCHI E, KAWAGUCHI T, SASATOMI K, KIMURA R, HASHIMOTO O, UENO T, YANO H, KOJIRO M, SATA M. Involvement of p21(WAF1/Cip1), p27(Kip1), and p18(INK4c) in troglitazone-induced cell-cycle arrest in human hepatoma cell lines. **Hepatology**, v.33, n.5, May, p.1087-97. 2001.
29. KOMAR CM. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function--implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. **Reprod Biol Endocrinol**, v.30, n.3, Aug, p.41. 2005.
30. LIBUTTI SK, SALTZ LB, TEPPER JE. Colon cancer. In: DeVita Jr V, Lawrence TS, Rosenberg AS, editors. **DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of Oncology**. 8^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p.1232-85. 2008.
31. LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, Dec, p.402-8. 2001.
32. MCALPINE CA, BARAK Y, MATISE I, CORMIER RT. Intestinal-specific PPARgamma deficiency enhances tumorigenesis in ApcMin/+ mice. **Int J Cancer**, v.119, p.2339-46. 2006.
33. MEHTA RG, WILLIAMSON E, PATEL MK, KOEFFLER HP. A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. **J Natl Cancer Inst**, v.92, n.5, Mar, p.418 -23. 2000.
34. MOIEL D, THOMPSON J. Early detection of colon cancer-the kaiser permanente northwest 30-year history: how do we measure success?

Is it the test, the number of tests, the stage, or the percentage of screen-detected patients? **Perm J**, v.15, n.4, Fall, p.30-8. 2011.

- 35.MUELLER E, SARRAF P, TONTONNOZ P, EVANS RM, MARTIN KJ, ZHANG M, FLETCHER C,SINGER S, SPIEGELMAN BM. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. **Mol Cell**, v.1, n.3, Feb, p.465-70. 1998.
- 36.NCCN. National Comprehensive Cancer Network. **Guidelines for Colon Cancer (Version 2.2016)**. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf . Acessado em janeiro, 2016.
- 37.NELSON H, PETRELLI N, CARLIN A, ET AL. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. **J Natl Cancer Inst**, v.93, p.583-96. 2001.
- 38.O`CONNELL MJ, MAILLIARD JA, KAHN M, ET AL. Controlled trial of fluorouracil and low dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. **J Clin Oncol**, v.15, p.246-50. 1997.
- 39.UGINO S, SHIMA K, BABA Y, NOSHO K, IRAHARA N, KURE S, CHEN L, TOYODA S, KIRKNER GJ, WANG YL, GIOVANNUCCI EL, FUCHS CS. Colorectal cancer expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG, PPARGgamma) is associated with good prognosis. **Gastroenterology**, v.136, n.4, Apr, p.1242-50. 2009.
- 40.PANCIONE M, FORTE N, SABATINO L, TOMASELLI E, PARENTE D, FEBBRARO A, COLANTUONI V. Reduced beta-catenin and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression levels are associated with colorectal cancer metastatic progression: correlation with tumor-associated macrophages, cyclooxygenase 2, and patient outcome. **Hum Pathol**, v.40, n.5, May, p.714-25. 2009.
- 41.PANCIONE M, SABATINO L, FUCCI A, CARAFA V, NEBBIOSO A, FORTE N, FEBBRARO A, PARENTE D, AMBROSINO C,

- NORMANNO N, ALTUCCI L, COLANTUONI V. Epigenetic silencing of peroxisome proliferator-activated receptor γ is a biomarker for colorectal cancer progression and adverse patients' outcome. **PLoS One**, v.5, n.12, Dec 3, e14229. 2010.
42. PANG T, KAUFMAN A, CHOI J, GILL A, DRUMMOND M, HUGH T, SAMRA J. Peroxisome proliferator-activated receptor- α staining is associated with worse outcome in colorectal liver metastases. **Mol Clin Oncol**, v.3, n.2, Mar, p.308-316. 2015.
43. PARK JI, KWAK JY. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in colorectal cancer. **PPAR Res**. v.2012, p.876418. 2012.
44. SABATINO L, FUCCI A, PANCIONE M, COLANTUONI V. PPARG Epigenetic Deregulation and Its Role in Colorectal Tumorigenesis. **PPAR Res**, v.2012, p.687492. 2012.
45. SABATINO L, PANCIONE M, VOTINO C, COLANGELO T, LUPO A, NOVELLINO E, LAVECCHIA A, COLANTUONI V. Emerging role of the β -catenin-PPAR γ axis in the pathogenesis of colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, v.20, n.23, Jun 21, p.7137-51. 2014.
46. SARRAF P, MUELLER E, SMITH WM, ET AL. Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. **Mol Cell**, v.3, n.6, p.799. 1999.
47. SORBY LA, ANDERSEN SN, BUKHOLM IRK, JACOBSEN MB. Evaluation of suitable reference genes for normalizations of real-time reverse transcription PCR analysis in colon cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v,29, p.144. 2010.
48. TAYLOR WE, DONOHUE JH, GUNDERSON LL, NELSON H, NAGORNEY DM, DEVINE RM, HADDOCK MG, LARSON DR, RUBIN J, O'CONNELL MJ. The Mayo Clinic experience with multimodality treatment of locally advanced or recurrent colon cancer. **Ann Surg Oncol**, v.9, n.2, Mar, p.177-85. 2002.

49. WANG D, FU L, NING W, GUO L, SUN X, DEY SK, CHATURVEDI R, WILSON KT, DUBOIS RN. Peroxisome proliferator-activated receptor δ promotes colonic inflammation and tumor growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.111, n.19, May 13, p.7084-9. 2014.
50. WANG D, DUBOIS RN. PPAR δ and PGE(2) signaling pathways communicate and connect inflammation to colorectal cancer. **Inflamm Cell Signal**, v.1, n.6, Oct 19. 2014.
51. WANG H, YANG B, GENG T, LI B, DAI P, CHEN C. Tissue-specific selection of optimal reference genes for expression analysis of anti-cancer drug-related genes in tumor samples using quantitative real-time RT-PCR. **Experimental and Molecular Pathology**, v.98, p.375-381. 2015.
52. YANG Y, YANG JJ, TAO H, JIN WS. New perspectives on β -catenin control of cell fate and proliferation in colon cancer. **Food Chem Toxicol**, v.74, Dec, p.14-9. 2014.
53. YOH T, YAMAMICHI K, OISHI M, IWAKI R, MOTOHIRO T. A case of effective neoadjuvant chemoradiotherapy with capecitabine for locally advanced sigmoid colon cancer. **Gan To Kagaku Ryoho**, v.38, n.6, Jun, p.1021-4. 2011.
54. YOSHINAGA M, TAKI K, SOMADA S, SAKIYAMA Y, KUBO N, KAKU T, TSURUTA S, KUSUMOTO T, SAKAI H, NAKAMURA K, TAKAYANAGI R, MUTO Y. The expression of both peroxisome proliferator-activated receptor delta and cyclooxygenase-2 in tissues is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. **Dig Dis Sci**, v.56, n.4, Apr, p.1194-1200. 2011.

8. ANEXOS

A decorative L-shaped line consisting of a horizontal segment and a vertical segment meeting at a right angle, positioned below the section header.

ANEXO 1.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNA DA PPARG E SEU IMPACTO EM TUMORES DE CÓLON E RETO

Pesquisador: omar feres

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 50403415.0.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.489.953

Apresentação do Projeto:

Resumo:

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNA DA PPARG E SEU IMPACTO EM TUMORES DE CÓLON E

RETOINTRODUÇÃO: O câncer colorretal é uma doença com alta morbi mortalidade em nível mundial. O reconhecimento de fatores prognósticos associado ao tratamento multidisciplinar tem melhorado as taxas de sobrevidas desses pacientes. Entretanto paciente com o mesmo estadiamento apresentam desfechos diferentes. O PPARG compõe uma família de receptores nucleares envolvidos na regulação da resposta imune, modulam a inflamação e desencadeiam ações antiproliferativas e pró- apoptóticas em células epiteliais, apresentando um papel importante na supressão tumoral. **OBJETIVOS:**

Avaliar a expressão de PPARG e sua validação gênica, através da análise do RNA por PCR, em amostras de tumor de pacientes portadores de câncer de cólon e reto, e o impacto na sobrevida global e livre de recidiva destes pacientes, tratados com cirurgia, associada ou não à quimioterapia adjuvante. **JUSTIFICATIVA:** Em estudos prévios, a expressão imunoistoquímica de PPARG se associou, de maneira estatisticamente significativa, a piores taxas de sobrevida global e sobrevida câncer-específica. Pretendemos obter validação gênica através da análise do RNA desta proteína,

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.469.953

para possível utilização da

mesma na prática médica, como sendo um fator de maior risco e pior prognóstico, podendo interferir na indicação de tratamentos adjuvantes. **MATERIAIS E MÉTODO:** Estudo de coorte retrospectivo envolvendo 50 pacientes com diagnóstico de carcinoma de cólon e reto alto, operados no HC-FMRP-USP, e que tenham cedido seu material para o Banco de Tumores da instituição. Os dados clínicos dos pacientes serão extraídos dos prontuários médicos. Quantificaremos através de rt-PCR a expressão da PPARG nestes tumores e relacionaremos este dado com diversas variáveis como: idade, sexo, estadiamento ao diagnóstico, níveis de CEA pré operatório, sobrevida livre de recidiva e sobrevida global.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão de PPARG e sua validação gênica, através da análise do RNA por PCR, em amostras de tumor de pacientes portadores de câncer de cólon e reto, e o impacto na sobrevida global e livre de recidiva destes pacientes, tratados com cirurgia, associada ou não à quimioterapia adjuvante.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Por se tratar de um estudo retrospectivo, utilizando material de Banco de Tumores, de pacientes já previamente tratados, este projeto trará riscos mínimos para a quebra de sigilo e confidencialidade dos dados, e quase nenhum risco para a saúde ou bem estar dos pacientes.

Benefícios: A correlação da expressão de uma proteína à fatores prognósticos, pode mudar a prática clínica, influenciando na indicação de terapias adjuvantes, e ajudando pacientes com tumores colorretais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia Proposta:

Estudo de coorte retrospectivo envolvendo pacientes com diagnóstico de carcinoma de cólon e reto, operados no Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Método de extração de RNA total e síntese de cDNA. As amostras de RNA total serão extraídas a partir de tecidos tumoral e normais (adjacente ao tumor) a fresco. A concentração do RNA total de cada amostra será determinada por leitura em espectrofotômetro e a qualidade será avaliada em gel de agarose 0,8%. Reação de Transcriptase reversa (RT). O RNA total será convertido em cDNA pela reação da transcriptase reversa. RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Para a análise de RT-qPCR serão desenhados pares de iniciadores (primers) representativos do gene PPARG (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), mapeado em

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.469.953

3p25. Os iniciadores serão desenhados usando o programa Primer-Blast (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A curva-padrão será realizada para determinação da eficiência de amplificação (90-110%), usando cinco pontos de diluições seriadas de amostras de cDNA (1:4, de 80ng a 0,31ng). Para maior precisão das reações de amplificação, será utilizado o pipetador automático QIAgility (Qiagen, Courtaboeuf, France). As reações serão realizadas em um volume total de 12,5L contendo Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Foster City, CA), 20ng de cDNA

e 200nM de cada iniciador (forward e reverse). Todas as amostras serão analisadas em duplicata e submetidas às seguintes condições: aquecimento inicial de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto. Para as reações será utilizado o equipamento 7500 Real time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). A qualidade de amplificação será verificada pela análise da curva de dissociação (avaliação da especificidade) e comparação de variações nas duplicatas. Um pool de cDNA de amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis será incluído em todas as placas para cada par de iniciadores testado (referência calibradora entre cada placa). O gene de referência selecionado pela literatura foi o GAPDH (Wang et al, 2015) e pela base de dados Genevestigator foi o gene IGHMBP2. A quantificação relativa será calculada pelo método 2-Ct.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados: Projeto de pesquisa – 2ª versão - corrigida em Março/2016, Dispensa TCLE – 2ª versão – corrigida em Março/2016 para pacientes que tem amostras guardadas em banco, Carta de Criação de Biorrepositório e Termo de Consentimento para guarda de material biológico.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o Projeto de pesquisa – 2ª versão - corrigida em Março/2016, Carta de Criação de Biorrepositório, assim como a Dispensa TCLE – 2ª versão – corrigida em Março/2016 para pacientes que tem amostras guardadas em banco e o termo de Consentimento de guarda de material biológico podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.469.953

forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_546747.pdf	23/03/2016 19:39:25		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	carta_CEP_032016.doc	23/03/2016 19:37:29	omar feres	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_032016.doc	23/03/2016 19:36:08	omar feres	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE_032016.doc	23/03/2016 19:34:54	omar feres	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TermoConsentimentoBiorrepositorio3.jpg	21/03/2016 15:44:52	omar feres	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TermoConsentimentoBiorrepositorio2.jpg	21/03/2016 15:44:37	omar feres	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TermoConsentimentoBiorrepositorio1.jpg	21/03/2016 15:44:23	omar feres	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio2.jpg	21/03/2016 15:44:03	omar feres	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio1.jpg	21/03/2016 15:43:44	omar feres	Aceito
Outros	UPC0005.jpg	24/10/2015 11:43:34	omar feres	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	Dispensa_TCLE.doc	17/09/2015 11:28:57	omar feres	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.469.953

Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.doc	17/09/2015 11:28:57	omar feres	Aceito
Orçamento	orcamento_PPARG.txt	17/09/2015 11:27:59	omar feres	Aceito
Folha de Rosto	folharosto_PlataBrasil.pdf	09/09/2015 14:19:51	omar feres	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Mestrado USP - PPARG.doc	27/07/2015 19:39:30		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 30 de Março de 2016

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

ANEXO 2.**TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL
BIOLÓGICO**

Nós, professores Prof. Dr. Omar Feres, Prof. Dr. Joaquim José Ribeiro e Profª. Dra. Fernanda Maris Peria, responsáveis pelo biorrepositório BIORREPOSITÓRIO PROCTOLOGIA FMRP/USP, declaramos que o referido Biorrepositório está vinculado ao projeto de pesquisa denominado “ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PPARG E SEU IMPACTO EM TUMORES DE CÓLON E RETO”.

Salientamos que o Biorrepositório foi criado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP/USP com o objetivo de guardar amostras biológicas de tecido e sangue de pacientes portadores de doenças colorretais para fins de pesquisa científica. As amostras armazenadas podem ser empregadas na área médica para análises de biologia molecular, seja no diagnóstico ou tratamento dos pacientes.

Portanto, gostaríamos de convidá-lo (a) para guardar amostras de tecido e sangue, e informamos que sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que suas amostras sejam guardadas, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Este material será coletado durante cirurgia da Divisão de Proctologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP. Após coletado será guardado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP em nitrogênio líquido ou freezer -80°C.

Nós, como responsáveis pela pesquisa, nos comprometemos a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra biológica será identificada por meio de sigla e número.

Quanto à coleta de material, será coletado 10ml (aproximadamente 1 colher de sopa) de sangue e 5 fragmentos (aproximadamente 5 grãos de feijão) de tecido

colorretal. Em decorrência da coleta não haverá riscos, pois, o tecido biológico e o sangue serão obtidos durante a cirurgia, não necessitando novos acessos.

Solicitamos também os dados de contato do (a) senhor (a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos autorização, caso seja necessário, para o descarte do material armazenado em caso de encerramento do Biorrespositório.

CONSENTIMENTO

Declaro estarem claros para mim quais são os objetivos desta atividade, e como participarei, que terei garantia de confidencialidade e a certeza de que obterei esclarecimentos a qualquer momento. Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento.

Se os meus materiais biológicos guardados no BIORREPOSITÓRIO PROCTOLOGIA FMRP/USP forem utilizados em pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, escolho livremente a opção abaixo assinalada:

- ☐ Autorizo a utilização dos meus materiais biológicos sem necessidade de novo consentimento a cada pesquisa.
- ☐ Desejo ser contactado para autorizar o uso dos meus materiais biológicos a cada pesquisa.

Dados do doador:

Nome: _____, RG: _____
Endereço: _____, nº _____,
bairro _____, cidade _____, telefone _____

Solicitamos sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de que suas amostras de material biológico sejam

armazenadas no BIORREPOSITÓRIO PROCTOLOGIA FMRP/USP na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP/USP, sob a responsabilidade dos Professores Prof. Dr. Omar Feres, Prof. Dr. Joaquim José Ribeiro e Profa. Dra. Fernanda Maris Peria, para fins de pesquisa e análise científica. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada será entregue ao senhor (a).

Abaixo também seguem os dados de contato dos pesquisadores responsáveis, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente. Para esclarecimentos de questões éticas, o(a) senhor(a) também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, que aprovou este biorrepositório, pelo telefone (16) 3602-2228.

Dados dos pesquisadores responsáveis:

Nome legível: Prof. Dr. Omar Feres

Telefone para contato: 16-3602-2509

Assinatura:

Data: 10/03/16

Prof. Dr. Omar Feres
Docente da Div. Proctologia
FMRP-USP

Nome legível: Prof. Dr. José Joaquim Ribeiro

Telefone para contato: 16-3602-2509

Assinatura:

Data: 10/03/16

Prof. Dr. José Joaquim Ribeiro da Rocha
Chefe da Divisão de Coloproctologia
FMRP-USP

Nome legível: Profa. Dra. Fernanda Maris Peria

Telefone para contato: 16-3602-2304

Assinatura:

Data: 10/03/2016

Dados do participante (doador):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do responsável legal pelo doador ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____