



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SUZANNY OLIVEIRA MENDES

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO E
RADIOTERAPIA NA EXPRESSÃO DE PHD3, HIF-1 α , VEGF,
SOD-1, RA2_A E FOXP3 EM CÉLULAS DO INFILTRADO
INFLAMATÓRIO DE CÂNCER COLORRETAL INDUZIDO**

**VITÓRIA-ES
2018**

SUZANNY OLIVEIRA MENDES

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO E
RADIOTERAPIA NA EXPRESSÃO DE PHD3, HIF-1 α , VEGF,
SOD-1, RA2_A E FOXP3 EM CÉLULAS DO INFILTRADO
INFLAMATÓRIO DE CÂNCER COLORRETAL INDUZIDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Madeira Álvares da Silva

**VITÓRIA-ES
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

SUZANNY OLIVEIRA MENDES

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO E
RADIOTERAPIA NA EXPRESSÃO DE PHD3, HIF-1 α , VEGF, SOD-1,
RA2_A E FOXP3 EM CÉLULAS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DE
CÂNCER COLORRETAL INDUZIDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Biotecnologia.

Aprovada em: 12/04/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Adriana Madeira Álvares da Silva
(Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Flavia Imbroisi Valle Errera
(Examinadora Interna - RENORBIO-UFES)

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
(Examinador Interno - RENORBIO-UFES)

Prof. Dr. Marcos Brasilino de Carvalho
(Examinador Externo – Hospital Heliópolis-
São Paulo/SP)

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin
(Examinador Externo – UFES)

Dedicatoria

A todos os pacientes oncológicos que estão na torcida para que encontremos uma resposta.

Estamos juntos nessa luta.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado e me iluminado tanto não só durante a minha pesquisa, mas por toda a minha vida.

À professora Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti, minha querida orientadora, que tanto me ensinou, me apoiou e esteve sempre ao meu lado com muito amor e carinho.

Aos professores Dr. Breno Valentim Nogueira, Dra. Flávia Imbroisi Valle Errera, Dr. Leonardo Oliveira Trivilin e Dr. Marcos Brasilino de Carvalho, por terem gentilmente aceitado participar da minha banca e contribuir tanto com a minha pesquisa.

À Universidade Federal do Espírito Santo por ter me proporcionado dez anos de muito estudo, por todo o conhecimento que adquiri, que me possibilitaram um amadurecimento profissional e pessoal.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia-Renorbio pela oportunidade de ter cursado o Doutorado em um programa de pós-graduação respeitado.

Ao Hospital Evangélico, em especial ao oncologista José Zago Pulido, ao radio-oncologista Bruno da Costa Rezende por terem possibilitado a realização de uma parte crucial do presente trabalho, a radioterapia nos modelos experimentais.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Engenharia e Materiais e Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, linha XRF, pela possibilidade de realizar o estudo de caracterização e quantificação elementar de nossas amostras.

À FAPES pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

À Professora Dra. Louisiane de Carvalho Nunes e professora Dra. Jankerle Neves Boeloni, responsáveis pelo Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, por permitirem a utilização do espaço para realização do projeto além de toda a ajuda e apoio fundamentais que me proporcionaram durante a pesquisa.

Ao professor Dr. Christiano Jorge Gomes Pinheiro, por gentilmente ter colaborado enormemente em toda a parte física e de caracterização e quantificação elementar neste trabalho.

A todos os meus amigos do grupo de pesquisa que muito contribuíram para meu conhecimento, crescimento e amadurecimento, que estiveram sempre presentes e dispostos a ajudar, gostaria de fazer um agradecimento especial aos amigos Aline Ribeiro Borçoi, Diego Camuzi Cassiano, Ester Ribeiro Cunha e Leonardo Oliveira Trivilin por todo o apoio e trabalho nesta árdua e maravilhosa caminhada. Sou e sempre serei eternamente grata por tudo.

Aos amigos do LUCCAR e Laboratório de Patologia Animal do HOVET, pela receptividade, auxílio e por todo o apoio durante a parte experimental.

À minha mãe Wagner Gomes de Oliveira Mendes, irmã Samylla Oliveira Mendes e demais familiares, pelo apoio emocional e pelo fortalecimento em toda esta árdua e gratificante trajetória.

Foram muitos os que contribuíram para que fosse possível a conclusão deste trabalho de inúmeras formas. O amor e gratidão que sinto neste momento são realmente inestimáveis. Serei eternamente grata por toda a bondade, ajuda e apoio de todos, foi o que me ajudou a passar por todas as dificuldades que ocorreram ao longo destes anos e me mantiveram forte o suficiente para conseguir seguir em frente e concluir um lindo trabalho.

A todos, minha imensa gratidão!

Epígrafe



*Nossa força motriz não vem
de respostas, mas sim de
perguntas.*

RESUMO

O tabagismo é uma das principais causas de morte evitável do mundo e está relacionado ao surgimento de diversos tipos de tumores, dentre eles o câncer colorretal. Estudos com tumores sólidos mostram que a hipóxia é um importante fator preditor de resposta prognóstica e as vias de hipóxia, estresse oxidativo e imunossupressão podem atuar na progressão tumoral, influenciar a resposta ao tratamento e a resposta imunológica. Uma vez que estas vias podem ter a expressão de seus genes afetada tanto pela exposição à fumaça do cigarro quanto à radioterapia, o presente trabalho buscou investigar a influencia destes fatores de exposição na expressão das proteínas PHD3, HIF-1 α , VEGF, RA2_A e Foxp3 nos infiltrados intra e peritumorais de câncer colorretal induzido. Para tanto, foram utilizados 53 ratos Wistar, 5 com o intestino saudável como controle negativo (G0) e os 48 ratos restantes foram induzidos à tumorigênese colorretal com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e divididos em 4 grupos, Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia (G4). A exposição à fumaça do cigarro dos grupos G3 e G4 ocorreu em câmara de inalação e correspondeu a 12 cigarros por dia/grupo durante 20 semanas. Na 21^a semana, os animais do grupo G2 e G4 foram submetidos a três sessões de radioterapia na dose de 700 cGy cada, totalizando 2500 cGy. Na 22^a semana, os animais foram eutanasiados e as lesões fixadas, processadas e coradas com hematoxilina e eosina para diagnóstico. As lesões classificadas como Adenocarcinoma Tubular foram submetidas à Imunohistoquímica para as proteínas PHD3, HIF-1 α , VEGF, da via de hipóxia, SOD-1 da via de estresse oxidativo e RA2_A e Foxp3 da via de imunossupressão. Todas as amostras tumorais e controles foram analisadas nos infiltrados intra e peritumoral de forma semi-quantitativa e avaliados quanto à exposição à fumaça do cigarro e radioterapia na modulação da expressão destas proteínas. A resposta à radioterapia também foi avaliada pelo índice apoptótico através do anticorpo da caspase-3 clivada nas amostras pertencentes aos grupos G2 e G4. Os resultados mostraram uma relação entre a exposição à fumaça do cigarro e radioterapia com alteração da expressão das proteínas nos infiltrados inflamatórios intra e peritumorais. A expressão das proteínas pode diferir entre os tipos de infiltrado inflamatório, bem como da

expressão em células tumorais, mostrando a importância da função diferencial destas células no microambiente tumoral. Além disso, o grupo exposto à fumaça e radioterapia apresentou melhores características histopatológicas em relação à malignidade e melhor resposta terapêutica. Assim concluímos que os ratos expostos à fumaça do cigarro e tratados com radioterapia apresentaram melhores parâmetros histoquímicos dos marcadores de morte celular, inflamação, progressão tumoral, estresse oxidativo e resposta à radioterapia do que os não expostos à fumaça do cigarro. Uma vez que a fumaça é consagrada como indutora de tumor em vários estágios da tumorigênese, e que nossos resultados mostraram características opostas, sugerimos a necessidade de novos estudos que confirmem o real impacto do tabagismo nos processos de tumorigênese, inflamação e na resposta ao tratamento radioterápico.

Palavras-chave: Câncer Colorretal, Expressão Gênica, Progressão Tumoral, Estresse Oxidativo, Imunossupressão

ABSTRACT

Smoking is the most leading cause of preventable death in the world, and is linked to the emergence of various types of tumors, including colorectal cancer. Studies with solid tumors show hypoxia as an important prognostic predictor and hypoxia and oxidative stress pathways, as well as immunosuppression, may influence tumor progression, treatment and immune response. Since these pathways may have its genes expression altered by smoke and radiotherapy exposure, the present study sought to investigate explosion influence on PHD3, HIF-1 α , VEGF, RA2_A e Foxp3 protein expression in intra and peritumoral infiltrates of induced colorectal cancer. For this, 53 Wistar rats were used, 5 as negative control (G0) and the remaining 48 were induced to colorectal tumorigenesis with 1,2-dimethylhydrazine (DMH) and divided into 4 groups, DMH Group (G1), DMH/Radiotherapy Group (G2), DMH/Smoke Group (G3) and DMH/Smoke/Radiotherapy Group (G4). Exposure to cigarette smoke from G3 and G4 groups occurred in a inhalation chamber and corresponded to 12 cigarettes per day/group for 20 weeks. On 21st week, the animals of group G2 and G4 were submitted to three sessions of radiotherapy at the dose of 700 cGy each, totaling 2500 cGy. At 22nd week, animals were euthanized and the entire large intestine was open for removal of lesions, which were fixed and processed for inclusion in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin for diagnosis. Lesions classified as Tubular Adenocarcinoma were submitted to immunohistochemistry for PHD3, HIF-1 α , VEGF, hypoxia pathway, SOD-1 oxidative stress pathway and RA2_A and Foxp3 immunosuppressive pathways. All tumor samples and controls were analyzed in intra- and peritumoral infiltrates semi-quantitatively and evaluated for exposure to cigarette smoke and radiotherapy in modulating the expression of these proteins. The response to radiotherapy was also evaluated by apoptotic index through caspase-3 cleaved antibody in samples belonging to groups G2 and G4. The results showed a relationship between exposure to cigarette smoke and radiotherapy with altered expression of proteins in intra- and peritumoral inflammatory infiltrates. Protein expression may differ between inflammatory infiltrates, and differ from expression in tumor cells, it shows the importance of differential function of these cells in the tumor microenvironment. In addition, the group exposed to smoke and radiotherapy presented better histopathological characteristics in relation to

malignancy and better therapeutic response. Thus, we concluded that mice exposed to cigarette smoke and treated with radiotherapy presented better histochemical parameters of markers of cell death, inflammation, tumor progression, oxidative stress and response to radiotherapy than those not exposed to cigarette smoke. Since smoke is consecrated as a tumor inducer in several stages of tumorigenesis, and our results showed opposite characteristics, we suggest the need for new studies that confirm the real impact of smoking in the processes of tumorigenesis,

Keywords: Colorectal Cancer, Gene Expression, Tumor Progression, Oxidative Stress, Immunossupression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Os domínios bHLH e PAS da HIF-1 α mediam a dimerização com a proteína HIF-1 β e a ligação do complexo ao DNA. Os domínios N-TAD e C-TAD são requeridos para hidroxilação da proteína HIF-1 α e também para a ativação da transcrição gênica. As interações proteína-proteína são indicadas por setas para os dois sentidos. Modificado de Sitkovsky e Lukashev (2005).36
- Figura 2** - Na presença do oxigênio a proteína PHD hidroxila o domínio ODD da HIF-1 α , em seguida é reconhecida pela pVHL para posterior degradação proteossomal.36
- Figura 3** - Esquema de formação do Complexo HIF-1 em condições de hipóxia, em que a proteína PHD em conjunto com a proteína pVHL não são responsáveis pela degradação da HIF-1 α , a qual se transloca para o núcleo e se dimeriza à HIF-1 β para compor o complexo HIF-1 e transcrever os genes da região HRE.37
- Figura 4** - Regulação (in)dependente de O₂ de HIF-1 α no microambiente inflamatório. Múltiplos sinais afetam transcrição, tradução ou modificações pós-traducionais de HIF-1 α . Estes múltiplos sinais, exemplificado por macrófagos, afetam a quantidade de proteína HIF-1 α , a atividade de HIF-1 e concomitantemente genes alvo de expressão. Vias que bloqueiam a atividade da PHD são marcadas em vermelho. Vias de sinalização que conduzem à formação do heterodímero HIF-1 α /HIF-1 β ativo são mostrados em azul. Fonte: DEHNE e BRUNE, 2009.....38
- Figura 5** – Extensão do intestino grosso com extensão do ceco ao ânus, removido de animal experimental após eutanásia, com evidência para as lesões encontradas.54
- Figura 6** - Fotomicrografia de Adenocarcinoma Tubular colorretal proveniente de modelo experimental com carcinogênese induzida por 1,2-dimetilhidrazina evidenciando a expressão de Caspase-3 clivada, após Radioterapia. A) Amostra proveniente de animais não expostos à fumaça do cigarro (G2). B) Amostra proveniente do grupo exposto à fumaça do cigarro (G4). Objetiva de 100x.58

Figura 7 - Diferença de expressão da proteína PHD3 nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal de modelo experimental. * $p < 0,0001$ – G0 em relação aos grupos G1, G2, G3 e G4. Kruskal-Wallis seguido de Post Hoc de Dunn.....60

Figura 8 – Fotomicrografias de expressão da proteína PHD3 em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia, com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.....61

Figura 9 - Fotomicrografias de expressão da proteína HIF-1 α em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia, com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.....63

Figura 10 - Análise de expressão de HIF-1 α nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral de adenocarcinoma tubular de câncer colorretal em modelo experimental. O escore de expressão de HIF-1 α no infiltrado intratumoral foi semelhante em todos os grupos experimentais. Notar diferença no escore de expressão da proteína HIF-1 α . * $p < 0,05$ – G0 em relação aos grupos G1 e G3 e, • $p < 0,05$ G1 em relação aos grupos G2 e G4. One Way ANOVA seguido de Post Hoc de Tukey.....64

Figura 11 - Análise dos escores de expressão de HIF-1 α sob influência de fumaça e radioterapia. O escore de expressão nos indivíduos submetidos à radioterapia foi significativamente maior em relação aos grupos não expostos. * $p < 0,05$ Two Way ANOVA.....64

Figura 12 - Análise de expressão de HIF-1 α no infiltrado intratumoral, peritumoral e célula tumoral nos grupos experimentais G1, G2, G3, G4 ilustrando diferença significativa de expressão entre os tipos celulares. * $p < 0,05$ One Way ANOVA seguido de Post Hoc de Tukey.....65

Figura 13 - Análise de expressão de VEGF nos infiltrados intra e peritumoral de adenocarcinoma tubular de câncer colorretal em modelo experimental. O escore de expressão de VEGF foi semelhante em todos os grupos experimentais no infiltrado inflamatório intratumoral e no peritumoral.66

Figura 14 - Fotomicrografias de expressão da proteína VEGF em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia, com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.....67

Figura 15 - Análise de expressão de SOD-1 nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral de adenocarcinoma tubular de câncer colorretal em modelo experimental. Notar diferença no escore de expressão da proteína SOD-1. * $p < 0,05$ em relação aos grupos G2 e G3 e, $< 0,05$ em relação ao grupo G4 em infiltrado intratumoral. E no infiltrado peritumoral, * $p < 0,05$ em relação aos grupos G1 e G4. One Way ANOVA seguido de Post Hoc de Tukey.68

Figura 16 - Fotomicrografias de expressão da proteína SOD-1 em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia, com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.....69

Figura 17 - Análise de expressão de SOD-1 no infiltrado inflamatório intratumoral, peritumoral e célula tumoral nos grupos experimentais G1, G2, G3, G4 ilustrando diferença significativa de expressão entre os tipos celulares. * $p < 0,05$ One Way ANOVA seguido de Post Hoc de Tukey.70

Figura 18 - Análise de expressão de RA2A nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral de adenocarcinoma tubular de câncer colorretal em modelo experimental. Notar diferença no escore de expressão de RA2A. * $p < 0,05$ em relação aos grupos G1 e G2 no infiltrado inflamatório intratumoral e, * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos (G1, G2, G3 e G4).Kruskal-Wallis com Post Hoc de Dunn.72

Figura 19 - Fotomicrografias de expressão da proteína RA2A em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia, com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.....73

Figura 20 - Análise de expressão de RA2A no infiltrado inflamatório intratumoral, peritumoral e célula tumoral nos grupos experimentais G1, G2, G3, G4 ilustrando diferença significativa de expressão entre os tipos celulares. A e C) A expressão de RA2A foi semelhante entre os tipos celulares. B e D) Não foi possível avaliar diferença, pois a expressão de RA2A foi negativa em ambos os infiltrados inflamatórios.....74

Figura 21 - Fotomicrografias de expressão da proteína Foxp3 em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia (G4), com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.....76

Figura 22 - Análise de expressão de Foxp3 nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral de adenocarcinoma tubular de câncer colorretal em modelo experimental. Notar diferença no escore de expressão de Foxp3. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos no infiltrado inflamatório intratumoral e * $p < 0,05$ em relação a G2, G3 e G4 no infiltrado peritumoral.77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Relação do número, porcentagem e diagnóstico das lesões obtidas em cada um dos grupos experimentais.....55
- Tabela 2** - Comparativo em número e percentual das características histopatológicas, nos grupos experimentais, encontradas em mucosa colorretal de ratos induzidos a carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina.57
- Tabela 3** – Análise de variação e correlação da expressão de SOD-1 no infiltrado intratumoral em relação à expressão na célula tumoral e no infiltrado peritumoral...71
- Tabela 4** - Análise de variação e correlação da expressão de RA2_A no infiltrado intratumoral em relação à expressão na célula tumoral e no infiltrado peritumoral...75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AK – Adenosino Kinase

AKT – Serina/Treonina quinase, também conhecida como Protein Kinase B (PKB)

AMP – Adenosina Monofosfato

AOM – Azoximetano

APCs – *Antigen Presenting Cells* (Células Apresentadoras de Antígeno)

ARNT – *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (Translocador receptor de aril hidrocarboneto nuclear)

ATP – Adenosina Trifosfato

bHLH – *basic helix-loop-helix* (Hélice-Alça-Hélice)

bHLH-PAS – *basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim* (b hélice-alça-hélice-Per-ARNT-Sim)

cAMP – Adenosina cíclica 3',5'- monofosfato

CCR – Câncer Colorretal

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

C-TAD – Domínio C-terminal

CTLs – *Cytotoxic T Lymphocytes* (Linfócitos T Citolíticos)

DMH – 1,2- dimetilhidrazina

FIH – Fator de inibição da HIF

HIF-1 – *Hypoxia-inducible factor 1* (Fator induzível por hipóxia -1)

HIF-1 α – *Hypoxia-inducible factor 1 alpha* (Fator induzível por hipóxia -1 alpha)

HIF-1 β – *Hypoxia-inducible factor 1 beta* (Fator induzível por hipóxia -1 beta)

HREs – *Hypoxia response element* (Elementos Responsivos à hipóxia)

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)

IFN- γ – Interferon-gama

IL – Interleucina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MAM – Metilazoximetanol

MHC – *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

NF- κ B – *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Fator nuclear da cadeia kappa de células B)

NO – Óxido Nítrico, espécie reativa de nitrogênio

NT5 – 5'-nucleotidase

N-TAD – Domínio N terminal

ODD – *Oxygen-dependent degradation* (Domínio de degradação regulado por oxigênio)

OS-9 – OS-9 – Osteosarcoma amplified 9

PGF – *Placental Growth Factor* (Fator de Crescimento Placentário).

PAS – Per-ARNT-Sim

PHD – Prolil Hidroxilase

PI3K – Phosphatidylinositol-3-kinase

pVHL – proteína Von Hippel-Lindau

RA2_A – Receptor de Adenosina 2_A

RA2_B – Receptor de Adenosina 2_B

ROS – *Reactive Oxygen Specie* (Espécie Reativa de Oxigênio)

SOD – Superóxido Dismutase

SSAT2 – *Spermidine/spermine-N-acetyl-transferase 2*

TAD – Domínio de Transativação

TCR – *T Cell Receptor* (Receptor de Células T)

TGF – *Transforming Growth Factor* (Fator Transformador do Crescimento)

Th1 – *T helper 1* (T auxiliar 1)

Th2 – *T helper 2* (T auxiliar 2)

TNF α – *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)

Treg – T reguladoras

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos	25
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1. Câncer e Tabagismo	26
2.2. Inflamação e Câncer	27
2.2.1. Resposta Imunológica Frente a Neoplasias	27
2.2.2. O Papel do Sistema Imunológico na Promoção e Progressão Tumoral	28
2.2.3. Imunossupressão	30
2.3. As Vias de Hipóxia, Estresse Oxidativo e Imunossupressão no Câncer	31
2.3.1. PHD3	33
2.3.2. HIF-1 α	35
2.3.3. VEGF.....	39
2.3.4. SOD-1.....	40
2.3.5. Receptor de Adenosina 2 _A	41
2.3.6. Foxp3.....	43
2.4. Aplicação Clínica na Resposta Terapêutica	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1. Aspectos Éticos	48
3.2. Procedimento Experimental	48
3.3. Imunohistoquímica	50
3.4. Análise de Expressão.....	51
3.5. Avaliação da Resposta à Radioterapia.....	52
3.6. Análise Estatística	52

4. RESULTADOS	54
4.1. Avaliação do número e diagnóstico de lesões em mucosa colorretal	54
4.2. Distribuição das Características Histopatológicas por Grupo	56
4.3. Estudo do Efeito da Radioterapia na Ativação da Apoptose Celular	58
4.4. Estudo de Expressão das Proteínas nos Infiltrados Inflamatórios Intra e Peritumoral.....	59
4.4.1. PHD3	59
4.4.2. HIF-1 α	62
4.4.3. VEGF	66
4.4.4. SOD-1.....	68
4.4.5. RA2 _A	71
4.4.6. Foxp3.....	75
5. DISCUSSÃO.....	79
5.1. Características Histopatológicas	79
5.2. Expressão de Proteínas	80
6. CONCLUSÕES.....	90
7. REFERÊNCIAS	91
ANEXO I – Pedido Comitê de Ética	104
ANEXO II – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética	105

1. INTRODUÇÃO

O tabagismo é uma das principais causas de morte evitável do mundo, e está relacionado com o surgimento de várias doenças crônicas como isquemia, doenças cardiovasculares, enfisema pulmonar, derrame cerebral, alergias e câncer (INCA, 2010; OMS, 2007; WHO, 2015).

A maneira pela qual o tabagismo está relacionada ao surgimento de diversos tipos de tumores pode estar relacionada à composição da fumaça do cigarro, a qual contém mais de 7.000 substâncias químicas, dentre elas substâncias carcinogênicas, co-carcinogênicas e outras reforçadoras deste efeito, além da presença de vários tipos de metais que podem exercer uma modulação na expressão de muitas proteínas (FOWLES e DYBING, 2003; SALNIKOW *et al.*, 2000).

Uma importante via que pode ser modulada pela fumaça do cigarro em tumores sólidos é a via de hipóxia. Em condições de baixa taxa de oxigênio ocorre a ativação do complexo HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1* – Fator Induzível por Hipóxia-1), responsável pela transcrição de mais de 100 genes envolvidos em resposta celular à hipóxia, metabolismo de glicose, angiogênese, reoxigenação, crescimento celular entre outras características, que quando elevadas, podem culminar com a progressão tumoral (SEMENZA, 2012b).

Além de seu papel na progressão tumoral, a expressão da HIF-1 α em tumores sólidos pode gerar uma modificação na resposta ao tratamento radioterápico, o qual necessita de oxigênio para a geração de radicais livres que danificam células tumorais na resposta apoptótica (MOELLER E DEWHRIST, 2006). Em contrapartida, a radioterapia também pode alterar a expressão de HIF-1 α através da presença de radicais livres no tumor após o tratamento (MOELLER *et al.*, 2004; MOELLER e DEWHRIST, 2006)

A expressão desta proteína também está relacionada à alteração da resposta imunológica contra tumores, de modo que, em condições de elevada expressão e atividade do complexo HIF-1 pode ocorrer a inativação de células linfoides, essenciais para o combate ao tumor (SITKOVSKY E LUKASHEV, 2005; THIEL *et al.*, 2007).

Grande parte dos estudos de expressão das proteínas da via de hipóxia é realizada no tecido tumoral como um todo, ou apenas em células tumorais. No entanto, o desenvolvimento do tumor depende da “orquestra funcional” de todas as células presentes no microambiente, com a presença de células tumorais e células inflamatórias, em que cada tipo celular exerce funções e expressões proteicas diferentes.

Um estudo publicado por nosso grupo em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço mostrou uma forte relação entre a elevada expressão de HIF-1 α no infiltrado inflamatório peritumoral e um pior prognóstico avaliado pela sobrevida global e livre de doença dos pacientes (MENDES *et al.*, 2014). Este pior prognóstico pode ter sido modulado pela expressão de HIF-1 α e seus transcritos fatores de crescimento de progressão tumoral, como o VEGF, ou também da inativação das células imunes do infiltrado inflamatório tumoral, promovendo um microambiente imunossuprimido (SEMENZA, 2012b, THIEL *et al.*, 2007).

Uma vez que a exposição à fumaça do cigarro e radioterapia podem alterar as vias de hipóxia, progressão tumoral e imunossupressão há a necessidade de se avaliar o quanto estes fatores podem alterar a expressão das proteínas destas vias. Desta forma, este trabalho busca parâmetros de expressão que possam ser utilizados no futuro como preditivos no curso da doença, no prognóstico, na resposta e até na escolha terapêutica.

Logo, é necessário verificar se as células do infiltrado inflamatório tumoral de organismos expostos à fumaça do cigarro e radioterapia continuam a exercer função anti-neoplásica, ou se após esta exposição, existe alteração da expressão dos genes da via de hipóxia, resultando no crescimento tumoral e imunossupressão.

Esta avaliação também é importante para a aplicação clínica uma vez que a exposição à fumaça do cigarro pode interferir na ativação da via de hipóxia e, por conseguinte, na resposta à radioterapia. Portanto este trabalho visou elucidar os processos tumorais moleculares e prever o possível curso da doença, bem como esclarecer fatores que podem auxiliar uma melhor escolha terapêutica aos pacientes por meio da avaliação de células da imunidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da exposição à fumaça do cigarro e radioterapia na expressão das proteínas PHD3, HIF-1 α , VEGF, SOD-1, RA2_A e Foxp3 em células do infiltrado inflamatório intra e peritumoral

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar o número de lesões e composição das características histopatológicas das mesmas sob exposição da fumaça do cigarro e radioterapia;
- Investigar quais proteínas estão associadas a uma melhor resposta à radioterapia;
- Analisar a presença e a variação da expressão das proteínas no infiltrado inflamatório intra e peritumoral em cada um dos grupos avaliados;
- Analisar a diferença de expressão das proteínas entre os infiltrados intra e peritumoral e na célula tumoral;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Câncer e Tabagismo

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial de Saúde – World Health Organization (WHO) como a principal causa de morte evitável em todo o mundo (WHO, 2015). Mais da metade dos usuários vão a óbito e não há forma segura de exposição. Estima-se que um terço da população mundial adulta, representada por mais de um bilhão de pessoas, sejam tabagistas (WHO, 2015).

Este aumento das taxas de morte causadas pelo tabagismo ocorre em virtude de suas várias doenças decorrentes como: isquemia, enfisema pulmonar, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, pneumonia, alterações na resposta imunológica e câncer (INCA, 2010; OMS, 2007; WHO, 2015).

O tabagismo pode influenciar o surgimento de tumores de diversas formas, e a relação positiva entre o consumo de tabaco e o surgimento de diferentes tipos de câncer já é bem estabelecida (INCA, 2010), pois a fumaça do cigarro contém mais de 7.000 substâncias, muitas carcinogênicas, co-carcinogênicas e outras que podem auxiliar no processo tumorigênico (FOWLES e DYBING, 2003; SALNIKOW *et al.*, 2000).

Muitos dos metais presentes na fumaça do cigarro podem substituir o núcleo metálico de metaloproteínas, e acabam por alterar a atividade da proteína prejudicando a homeostase do organismo (SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008), de modo que esta substituição também pode afetar a regulação da expressão de proteínas (CARUSO *et al.*, 2014; KASPRZAK e BUZARD, 2000).

É importante observar que muitas dessas proteínas agem como fatores de transcrição ou complexos transcricionais, portanto, caso haja uma interferência na função das mesmas, a regulação da expressão gênica consequentemente será prejudicada (KARACZYN, GOLEBIEWSKI e KASPRZAK, 2006; LEE *et al.*, 1995).

2.2. Inflamação e Câncer

O infiltrado inflamatório tumoral é observado em vários tipos de tumor, e possui um significado clínico bem compreendido em tumores colorretais sendo interpretados no laudo patológico como fatores preditivos de prognóstico (MOHAMED et al., 2012; TOUGERON et al., 2013).

Desde o relato da presença de células inflamatórias no tecido neoplásico por Rudolph Virchow em 1863, imagina-se uma relação entre inflamação e câncer (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; VAN KEMPEN et al., 2006; GRIVENNIKOV et al., 2010; MACARTHUR, HOLD e EL-OMAR, 2004). Seguindo esta linha, na década de 1950 com os estudos de Lewis Thomas, surgiram indícios de uma função fisiológica do sistema imunológico em evitar o crescimento de células neoplásicas (INCA, 2010).

E no final dos anos de 1960, McFarlane Burnet definiu o termo vigilância imunológica, que propunha que o sistema imunológico estaria em um estágio de constante alerta para evitar o crescimento de células transformadas, destruindo-as antes que se tornassem tumores lesivos. Desde então, a inflamação tem sido relacionada ao câncer em muitos aspectos do comportamento tumoral e o sistema imunológico pode apresentar duas respostas diferentes e antagônicas em relação ao tumor, a resposta anti-tumoral e a tumorigênese (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010; MANTOVANI *et al.*, 2008).

2.2.1. Resposta Imunológica Frente a Neoplasias

As respostas imunológicas anti-tumorais em geral são induzidas pelo reconhecimento de antígenos tumorais por células do sistema imune (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007). O reconhecimento do corpo estranho induz um complexo programa de células imunológicas, as quais são designadas para destruir e remover os invasores (DEHNE e BRUNE, 2009).

Ao surgir uma célula neoplásica, ela passa a expressar vários tipos de moléculas diferentes de células normais, e, portanto podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico como algo não próprio, neste caso, antígenos tumorais (ABBAS,

LICHTMAN e PILLAI, 2007). Ao reconhecer uma célula neoplásica, as Células Apresentadoras de Antígeno locais (APCs) realizam a fagocitose, e esses antígenos tumorais são processados e exibidos em sua superfície via MHC de classe I e II. Então elas migram até os órgãos linfoides e apresentam estes antígenos para subpopulações de Células Linfoides, incluindo Linfócitos T auxiliares e Linfócitos T citolíticos ou citotóxicos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007).

O principal mecanismo imunológico de erradicação tumoral é realizado por linfócitos T citolíticos (CTLs), da linhagem T CD8+, que quando ativados para antígenos tumorais, migram até o local onde se encontra o tumor e liberam citocinas citolíticas que desencadeiam um processo de morte da célula tumoral (ABBAS, LICHTMAN E PILLAI, 2007), enquanto que os linfócitos T CD4+ ou T helpers da linhagem de células pró-inflamatórias (Th1) secretam IFN- γ que ativa os macrófagos que tenham fagocitado uma célula neoplásica resultando no aumento da atividade desses, e conseqüentemente, morte do material fagocitado (BENJAMINI, COICO e SUNSHINE, 2002).

Mas também há outra subpopulação de T helpers (Th2) que quando ativadas, produzem várias citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, que inibem a ativação de células mieloides. Portanto, a resolução da inflamação será determinada pelo equilíbrio entre a ação pró-inflamatória e anti-inflamatória em resposta ao tumor (FOWELL *et al.*, 1991; SAKAGUCHI e SAKAGUCHI, 1994; SHIMIZU, YAMAZAKI e SAKAGUCHI, 1999).

2.2.2. O Papel do Sistema Imunológico na Promoção e Progressão Tumoral

Além da proteção contra o câncer, o sistema imunológico pode contribuir para o desenvolvimento tumoral. Há muito tempo, a inflamação crônica tem sido reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento de tumores em muitos tecidos diferentes (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010), inclusive, alguns cânceres associados a infecções são considerados um resultado indireto dos efeitos carcinogênicos dos estados inflamatórios crônicos que são induzidos pelos microrganismos infecciosos (FERREIRA e ROCHA, 2010; LOPES, CHAMMAS e IYAYASU, 2013).

Enquanto que as células do sistema imunológico adquirido são os principais mecanismos efetores na resposta anti-tumoral, as células do sistema imunológico natural (ou inato) são consideradas os mais diretos responsáveis por promover tumores dentre as células imunes. Macrófagos associados a tumor (MATs) são componentes importantes desta resposta e estão fortemente relacionados à intensidade da inflamação tumoral. Estes macrófagos associados ao tumor (MATs) podem polarizar para dois tipos de células, M1 ou M2 (SCHOPPMANN *et al.*, 2006).

Presentes quando há um aumento no perfil de citocinas Th1, ou seja, pró-inflamatórias, os Macrófagos do tipo 1 (M1), podem destruir células tumorais e também provocar reações de destruição tecidual, principalmente no endotélio vascular (LEEK *et al.*, 1998; BALKWILL e MANTOVANI, 2001). Esse perfil tem como papel clássico a defesa contra células tumorais e produzem eficientemente moléculas efetoras como ROS, NO, TNF-alpha, IL-6 e IL-1beta (SICA e MANTOVANI, 2012).

Ao contrário dos macrófagos M1, os macrófagos M2 se diferenciam na presença de citocinas anti-inflamatórias (perfil Th2) como IL-4 e IL-13. Essas citocinas inibem a ativação da resposta Th1 e levam à resposta, conhecida como alternativa, para macrófagos M2 (GORDON e TAYLOR, 2005; NOEL *et al.*, 2004). Além de suprimirem a resposta Th1, eles participam na resolução da inflamação, cicatrização de feridas, angiogênese e reparo tecidual (BISWAS e MANTOVANI, 2010).

Os M2 podem produzir fatores de crescimento e angiogênicos, assim como proteases que degradam a matriz extracelular facilitando a metástase, podendo assim, estimular a proliferação de células tumorais, promover a angiogênese e favorecer a invasão e metástase (BALKWILL e MANTOVANI, 2001).

Ademais, as células imunes naturais também podem contribuir para a transformação maligna de células, ao gerarem radicais livres que causam dano ao DNA e levam a mutações nos genes supressores de tumor e oncogenes. Além disso, mastócitos, neutrófilos e macrófagos secretam fatores solúveis que podem promover a progressão do ciclo celular e a sobrevivência de células tumorais (ABBAS, LICHTMAN E PILLAI, 2007).

O desafio para os oncologistas é encontrar um equilíbrio benéfico no qual as respostas imunológicas adquiridas não sejam comprometidas, enquanto as reações inflamatórias crônicas, potencialmente prejudiciais, sejam controladas.

De modo geral, a modulação da resposta imunológica para um perfil anti-inflamatório imunossupressor é de grande valia para a manutenção tecidual do organismo, no entanto, defeitos no ajuste fino de regulação do microambiente tecidual inflamatório contribuem para a persistência dos sinais gerados resultando em um efeito promotor tumoral. A reparação do tecido danificado é um processo normal de defesa que ocorre após quase toda resposta inflamatória. Entretanto a indução da tumorigênese ocorre apenas em caso de desequilíbrio, defeito do ajuste desta resposta.

2.2.3. Imunossupressão

A imunossupressão é um poderoso mecanismo evolutivo responsável por proteger o organismo contra os efeitos lesivos da resposta imunológica e manter tecidos saudáveis e órgãos vitais. Pois, embora as atividades das células imunológicas sejam necessárias para o sucesso da destruição do corpo estranho, a falta de controle das células imunológicas hiperativas ou inflamação prolongada pode levar a níveis inaceitáveis de danos colaterais ao hospedeiro (SITKOVSKY e OHTA, 2005).

Nas respostas inflamatórias contra outros tipos de patógenos, as células imunológicas remanescentes ainda ativas são suficientes para o combate e eliminação do corpo estranho. Entretanto o mesmo não se aplica a tumores, pois seu crescimento descontrolado sobrepuja à resposta inflamatória, que por sua vez continua a causar danos ao tecido saudável, resultando em um pior prognóstico para o hospedeiro (ABBAS, LICHTMAN E PILLAI, 2007).

Nas reações mais fortes, enzimas provenientes do fagolisossomo das APCs como oxidase fagocitária, proteases lisossômicas, espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) e enzimas citotóxicas provenientes dos linfócitos T CD8+ podem ser liberadas no espaço extracelular e causar lesão nos tecidos do hospedeiro (ABBAS, LICHTMAN E PILLAI, 2007). Quando a resposta inflamatória é exacerbada e causa lesão tecidual, muitas proteínas são liberadas como prostaglandinas,

catecolaminas, dopamina e histamina, para que seja ativado um complexo mecanismo anti-inflamatório prevenindo o dano colateral excessivo e destruição dos tecidos normais (SITKOVSKY, 2003; SITKOVSKY et al., 2004).

Como visto, o sistema imunológico apresenta diversas funções que podem resultar tanto na ativação da tumorigênese, como na imunossupressão da defesa anti-neoplásica. Sendo assim, o que define o seguimento de uma via ou outra é a regulação da função de vários genes e proteínas das células presentes neste microambiente, de modo que a resposta destas células no microambiente tumoral, cujo metabolismo é altamente influenciado pelos fatores ambientais, dependerá da regulação da expressão gênica.

2.3. As Vias de Hipóxia, Estresse Oxidativo e Imunossupressão no Câncer

Uma via bem estabelecida da progressão tumoral é conhecida como via de Hipóxia. A hipóxia é um componente importante de várias doenças, incluindo acidente vascular cerebral, doenças inflamatórias e a progressão de tumores sólidos (RANTANEN *et al.*, 2008).

Esta baixa tensão de oxigênio tem sido demonstrada em vários tecidos normais, inflamados e tumorais (DEHNE e BRUNE, 2009; SEMENZA 1999) e pode prejudicar o metabolismo celular, em vista que estas necessitam de suprimentos adequados de oxigênio para a obtenção de energia (SEMENZA, 2012a).

Sendo assim, as células apresentam uma necessidade de controle da homeostase do oxigênio para manutenção da fisiologia e bioquímica, essenciais para a sobrevivência da célula, portanto, as concentrações de oxigênio devem ser rigidamente controladas (SEMENZA, 2012b).

Mecanismos protetores contra a hipóxia são importantes no desenvolvimento e progressão de tumores sólidos, pois para seu desenvolvimento, o tumor age prevenindo a morte celular até mesmo em condições de baixas taxas de oxigênio (FILLIES *et al.*, 2005). Os tumores sólidos apresentam graus diferentes de taxa de oxigênio ao longo de seu tecido em virtude de alterações estruturais ou quantitativas nos vasos sanguíneos (SCHÖDER *et al.*, 2009).

Estudos mostram que hipóxia e densidade vascular reduzida estão relacionadas a um pior prognóstico e são responsáveis pela resistência à quimioterapia e radioterapia (SCHÖDER *et al.*, 2009), em vista que células hipóxicas requerem de 2 a 3 vezes a dose de radiação para produzirem o mesmo nível de apoptose quando comparado a células apresentando níveis normais de oxigênio.

Além disso, células que sobrevivem ao severo estresse hipóxico proveniente do tratamento radioterápico adquirem resistência a diversas alterações fisiológicas e não fisiológicas (SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008). Estas alterações fisiológicas também podem ter um impacto sobre a resposta anti-tumoral exercida pelo sistema imune pois respostas inflamatórias normalmente ocorrem em microambientes hipóxicos (DEHNE e BRUNE, 2009).

A hipóxia no microambiente inflamatório se deve ao fato do elevado consumo de oxigênio destas células por conta de seu metabolismo acelerado, e, além disso, o suprimento sanguíneo é normalmente interrompido em virtude dos vasos obstruídos por fagócitos ou vasoconstritos por citocinas, gerando esta baixa taxa de oxigênio no tecido em questão (SITKOVSKY e LUKASHEV, 2005).

Sendo assim, em situações de combate ao tumor, o sucesso da eliminação de células neoplásicas demanda de um metabolismo eficiente das células imunológicas em todos os microambientes do tecido e requer uma adaptação dessas em reduzida disponibilidade de oxigênio ou hipóxia (DEHNE e BRUNE, 2009; SEMENZA, 2003).

No caso da resposta imunológica contra o câncer colorretal, a homeostase do oxigênio é um pouco mais complexa, pois o intestino apresenta um perfil de oxigenação próprio. Apesar da lâmina própria do intestino ser altamente vascularizada, sua posição anatômica é bem próxima à luz do intestino a qual é anaeróbia, sendo assim, é possível observar um gradiente de concentração de oxigênio da serosa à luz intestinal (SHEPHERD, 1982; ALBENBERG *et al.*, 2014).

No intestino há uma série de fatores que afetam a concentração e distribuição do oxigênio como o fluxo contra-corrente do sangue (SONNWEBER *et al.*, 2014), flutuação de perfusão sanguínea ao longo do dia (COLGAN, 2010) e difusão de oxigênio até o lúmen (SHEPHERD, 1982). Todas estas condições resultam em uma baixa pressão de oxigênio <10mmHg quando comparada à pressão de oxigênio em

alvéolos saudáveis que apresentam uma pressão de oxigênio de 100-110mmHg, isto mostra que no intestino ocorre uma hipóxia fisiológica independente de mazelas ocorridas (KARHAUSEN *et al.*, 2004; ALBENBERG *et al.*, 2014; SCHAIBLE *et al.*, 2010).

Em condições de hipóxia, muitas células não conseguem continuar a exercer seu metabolismo e entram em apoptose, no entanto, células de mamíferos desenvolveram um elaborado sistema para manter a homeostase fisiológica e sistêmica do oxigênio a fim de prevenir a morte celular em condições de hipóxia que agem tanto na regulação como na distribuição do oxigênio (BRUICK, 2003; SEMENZA, 1999 ; STIEHL *et al.*, 2006).

O Complexo HIF-1 (*Hypoxia Inducible factor* – Fator Induzível por Hipóxia) é o principal mecanismo regulador da homeostase celular e sistêmica e age como fator de transcrição para expressão de mais de 100 genes envolvidos na resposta celular à hipóxia, essenciais para a sobrevivência destas células em condições de baixas taxas de oxigênio, assim como de genes de metabolismo celular, angiogênese, eritropoiese, transporte de glicose, glicólise, entre outros (SEMENZA, 2012b).

Este complexo transcricional é um heterodímero proteico composto por duas subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β . A subunidade HIF-1 β é constitutivamente expressa, com níveis de mRNA e de proteína constantes na célula, contudo a subunidade HIF-1 α é geralmente regulada pelas proteínas da família das dioxigenases ferro e 2-oxoglutarato-dependentes, como por exemplo, as PHDs (HIF proil hidrosilases) (WANG e SEMENZA, 1993; KAELIN e RATCLIFFE, 2008)

2.3.1. PHD3

As Prolil-4-hidroxilases (PHDs) são proteínas pertencentes à família das dioxigenases e são dependentes de Ferro II (Fe²⁺), Oxigênio 2 (O₂) e 2-oxoglutarato (2-OG) como substratos para sua atividade catalítica efetiva (BRUICK e MCKNIGHT, 2001). Esta proteína tem sido conhecida como sensor de oxigênio pois sua afinidade com este elemento é em torno de 2 a 10 vezes superior às concentrações fisiológicas (HIRSILA *et al.*, 2003).

A taxa de oxigênio intracelular permite que a atividade da PHD seja modulada ao longo de toda gama fisiológica (KAELIN e RATCLIFFE, 2008), normalmente, as PHDs realizam a hidroxilação de resíduos prolil nas subunidades alpha do fator induzível por hipóxia (HIF1- α) para serem degradadas posteriormente. No entanto, em condições hipóxia, a atividade enzimática das PHDs é inibida, levando ao acúmulo de HIF-1 (SCHOFIELD e RATCLIFFE, 2004; FONG e TAKEDA, 2008; KAELIN e RATCLIFFE, 2008).

A sensibilidade das PHDs para Ferro II (Fe²⁺), Oxigênio 2 (O₂), 2-oxoglutarato (2-OG) e estado redox da célula é mais notável num microambiente de grave distúrbio metabólico e estresse oxidativo, muitas vezes observado em um microambiente tumoral, como é no câncer colorretal (CHANDEL *et al.*, 2000; DEHNE e BRUNE, 2009; PLACE e DOMANN, 2013). Outro fator ambiental capaz de alterar a atividade das proteínas PHDs é a concentração de diferentes tipos de metais no ambiente pois o organismo não apresenta um mecanismo de expulsão desses na célula, tendo, portanto, acesso irrestrito aos sítios de ligação de ferro das dioxigenases, causando inibição funcional dessa família de enzimas (CHEN e COSTA, 2009; SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008).

A PHD é conhecida como um supressor tumoral devido à sua função de regulação da via de HIF, e sua ausência é relacionada à tumorigênese de câncer colorretal (XUE *et al.*, 2010). A contribuição desta proteína para o fenótipo celular depende de várias condições, incluindo sua abundância relativa em um tecido específico (JOKILEHTO e JAAKKOLA, 2010), de modo que as alterações na expressão das proteínas PHD3, também podem resultar numa alteração da taxa de hidroxilação da HIF1- α (APPELHOFF *et al.*, 2004; SOILLEUX *et al.*, 2005).

Uma vez que a Prolil-4-hidroxilase apresenta tão amplo e profundo efeito sobre tumorigênese, estudos sobre a expressão destas enzimas podem auxiliar na nossa compreensão da progressão do câncer colorretal. Além disso, uma vez que a proteína PHD3 é peça chave para o controle da via de hipóxia, ao estudarmos esta via é necessário avaliar sua expressão antes de buscarmos entender os fatores ambientais envolvidos na regulação da expressão das proteínas que compõem a via de hipóxia

2.3.2. HIF-1 α

HIF-1 α , também conhecida como *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT), pertence à família de proteínas *basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim* (bHLH-PAS) e sua expressão é constantemente suprimida na presença de O₂ (KAELIN e RATCLIFFE, 2008). Sua transcrição e síntese proteica são constitutivas e particularmente não são afetadas pelo teor de oxigênio (WANG e SEMENZA, 1993), porém a presença do oxigênio atua na regulação da HIF-1 α por modificações pós-traducionais, como hidroxilação e ubiquitinação para que ela seja degradada pelo sistema proteossomal (BRAHIMI-HORN, MAZURE e POUYSSEGUR, 2005).

A proteína HIF-1 α possui domínios como o PAS (Per-ARNT-Sim), que interage com o domínio PAS da HIF-1 β para dimerização (CHOWDHURY, HARDY e SCHOFIELD, 2008). Existem também outros dois domínios localizados na porção N-terminal (N-TAD) e na C-terminal (C-TAD), os quais atuam na ativação da transcrição gênica, como por exemplo, interagindo com o co-ativador transcricional CBP/p30056 (LANDO *et al.*, 2002). Tanto na porção N-terminal como na C-terminal existe o importante domínio ODD (*Oxygen-dependent degradation*) que atua na mediação da estabilidade da HIF-1 α de acordo com a disponibilidade de oxigênio, uma vez que neste domínio estão localizados sítios para a hidroxilação dependente de oxigênio (Figura 1) (PUGH *et al.*, 1997; RUAS, POELLINGER e PEREIRA, 2002).

Sob condições de normóxia, a proteína PHD utiliza o oxigênio como cofator enzimático e transfere um grupo hidroxila para o domínio ODD da HIF-1 α (KAELIN e RATCLIFFE, 2008). Após a hidroxilação, esta é reconhecida pela proteína supressora de tumor pVHL (von Hippel-Lindau), que recruta um complexo ubiquitina ligase para marcar a proteína HIF-1 α e promover sua degradação proteossomal (Figura 2) (BAEK *et al.*, 2005).

Em condições de hipóxia, a atividade da proteína PHD decresce e a degradação da HIF-1 α é reduzida. Uma vez estabilizada, esta é translocada para o núcleo e se dimeriza com a subunidade HIF-1 β , formando o complexo HIF-1 transcricionalmente ativo, o qual irá reconhecer uma região no genoma chamada HRE (*hypoxia response elements*) ativando a transcrição de seus diversos genes alvo (Figura 3) (SCHARTE, 2003; SEMENZA, 1999).

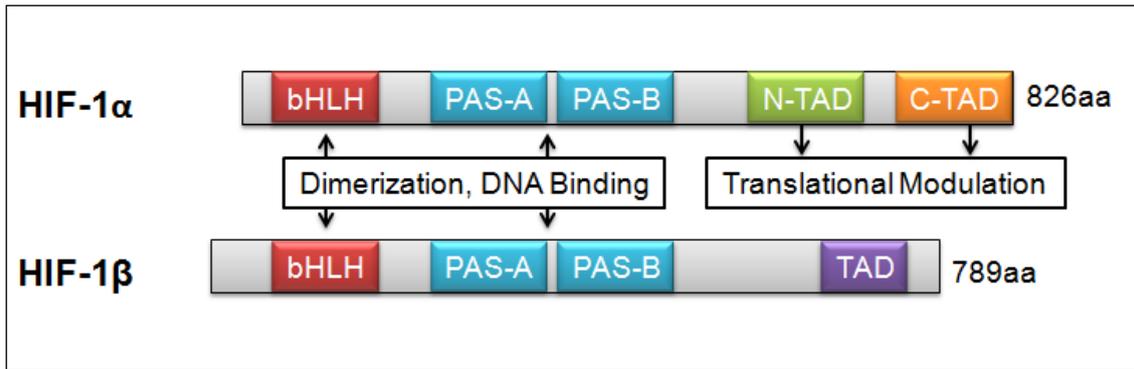


Figura 1 - Os domínios bHLH e PAS da HIF-1 α mediam a dimerização com a proteína HIF-1 β e a ligação do complexo ao DNA. Os domínios N-TAD e C-TAD são requeridos para hidroxilação da proteína HIF-1 α e também para a ativação da transcrição gênica. As interações proteína-proteína são indicadas por setas para os dois sentidos. Modificado de Sitkovsky e Lukashev (2005).

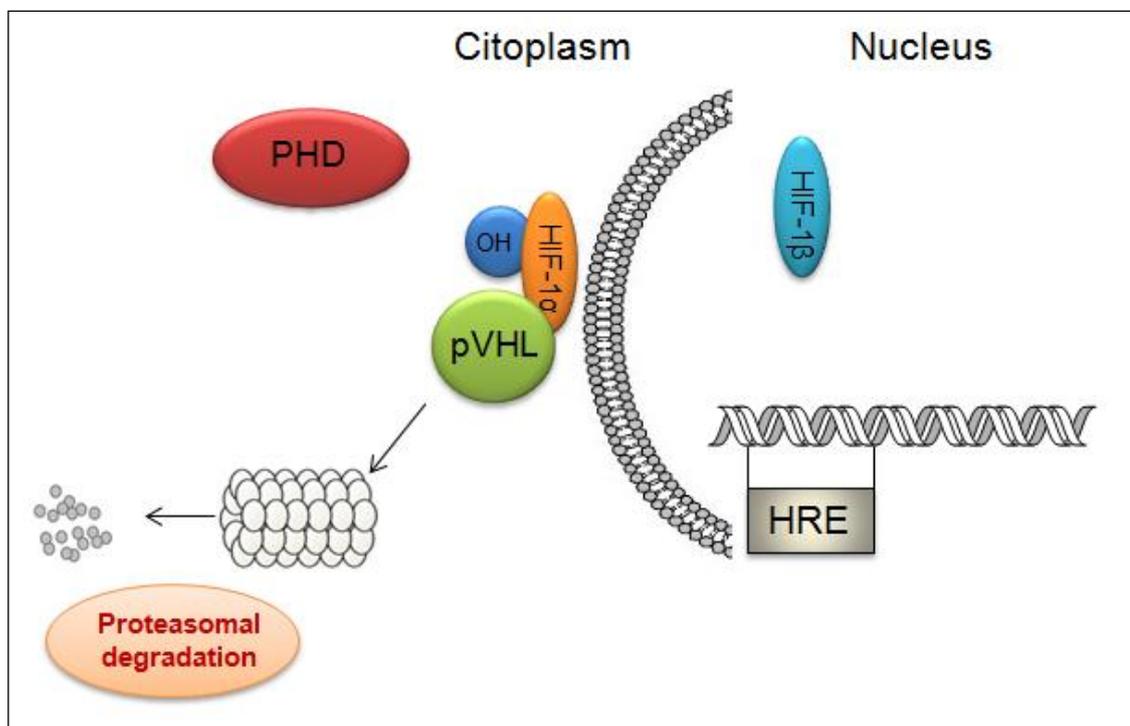


Figura 2 - Na presença do oxigênio a proteína PHD hidroxila o domínio ODD da HIF-1 α , em seguida é reconhecida pela pVHL para posterior degradação proteossomal.

Além do seu papel na homeostase do oxigênio há evidências de um importante função da HIF-1 α em reações imunológicas. Várias citocinas e outros mediadores inflamatórios têm sido descritos como envolvidos na promoção da expressão da proteína HIF-1 α , bem como a ligação do complexo HIF-1 ao DNA sob condições de hipóxia, ou até mesmo normóxia (SCHARTE *et al.*, 2003).

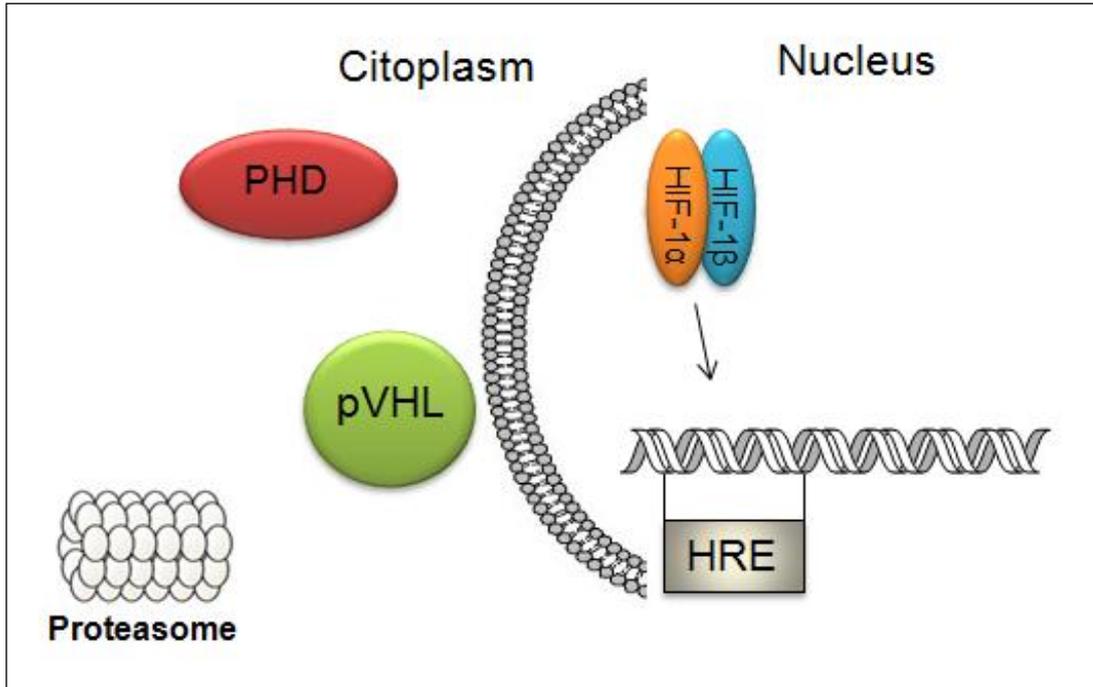


Figura 3 - Esquema de formação do Complexo HIF-1 em condições de hipóxia, em que a proteína PHD em conjunto com a proteína pVHL não são responsáveis pela degradação da HIF-1 α , a qual se transloca para o núcleo e se dimeriza à HIF-1 β para compor o complexo HIF-1 e transcrever os genes da região HRE.

Em microambientes inflamatórios, a ativação das células imunológicas promove a produção de uma variedade de citocinas como TNF- α e IL-1, além de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) que também aumentam a expressão da HIF-1 α . De forma que na inflamação inicial, os macrófagos e neutrófilos produzem uma explosão de ROS, que é crítica para a ação antitumoral dos fagócitos, uma vez que a produção de ROS resulta num aumento de HIF-1 α , a qual irá participar na ativação de diversas vias responsáveis por aprimorar o metabolismo dessas células na resposta antitumoral (Figura 4) (DEHNE e BRUNE, 2009).

Uma consequência do aumento de ROS é a oxidação do Fe(II) no sítio catalítico das PHDs, ocasionando bloqueio de sua atividade, sendo assim, a PHD não irá hidroxilar a HIF-1 α para que ela seja degradada (GERALD *et al.*, 2004). Outra possibilidade é que ROS iniba as prolil hidroxilases pela oxidação irreversível do sítio ativo de aminoácidos, com resíduos de histidina, resultado na inativação da enzima por oxidação induzida. Portanto essas considerações implicam que, um aumento de ROS durante a inflamação pode contribuir para um acúmulo de HIF-1 α

e a ativação do complexo HIF-1 (DEHNE e BRUNE, 2009; KAE LIN e RATCLIFFE, 2008).

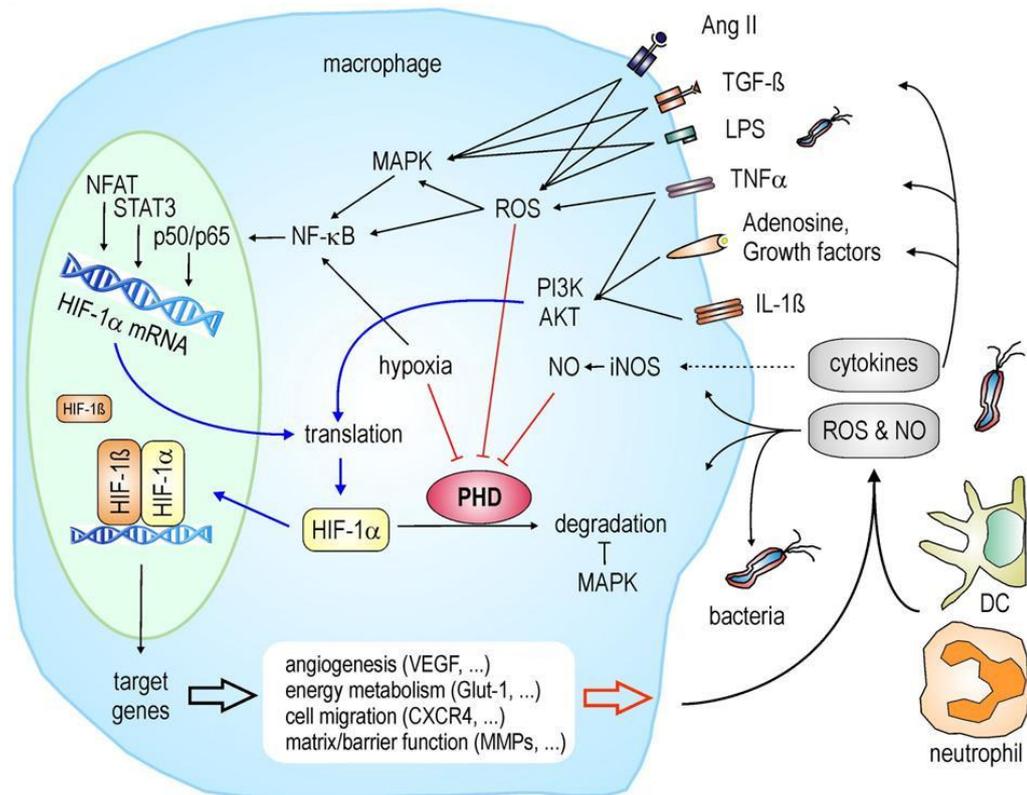


Figura 4 - Regulação (in)dependente de O₂ de HIF-1α no microambiente inflamatório. Múltiplos sinais afetam transcrição, tradução ou modificações pós-traducionais de HIF-1α. Estes múltiplos sinais, exemplificado por macrófagos, afetam a quantidade de proteína HIF-1α, a atividade de HIF-1 e concomitantemente genes alvo de expressão. Vias que bloqueiam a atividade da PHD são marcadas em vermelho. Vias de sinalização que conduzem à formação do heterodímero HIF-1α/ HIF-1β ativo são mostrados em azul. Fonte: DEHNE e BRUNE, 2009.

Adicionalmente, o NO atenua a ubiquitinação da HIF-1α e atua na redução da atividade da PHD pela alteração do Fe(II) do sítio catalítico destas. Como resultado, ocorre a estabilização da HIF-1α (BRUNE e ZHOU, 2007). Também foi proposto que o aumento da expressão da PI3K aumenta os níveis de HIF-1α em resposta ao NO (BRUNE e ZHOU, 2007). Além disso, espécies ROS e NO, ativam vias a partir de TNF-α e IL-1β, que induzirão a produção de PI3K e/ou NF-κB que por sua vez, irão ativar o complexo HIF-1 (BRUNE e ZHOU, 2007; HELLWIG-BÜR GEL, *et al.*, 1999).

Além da regulação dependente de oxigênio, a glicose, presente em altas taxas no intestino, também afeta a expressão da HIF1-α neste órgão, influenciando a

estabilidade e ativação desta, a qual pode ser observada em altas taxas de expressão no intestino saudável em virtude desta regulação por glicose (MALHOTRA *et al.*, 2002; VORDERMARK *et al.*, 2005; STAAB *et al.*, 2007), e em resposta, a HIF1- α regula a expressão de enzimas envolvidas no processo de captação de glicose e glicólise (CHEN *et al.*, 2001; VORDERMARK *et al.*, 2005; STAAB *et al.*, 2007).

Os efeitos da proteína HIF-1 α em células tumorais já foram descritos e relacionados com o prognóstico (DONG *et al.*, 2013; KAYA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012), entretanto não há muitos dados na literatura acerca da expressão da HIF-1 α em linfócitos, tampouco sua expressão em infiltrado inflamatório tumoral (MENDES *et al.*, 2014; THIEL *et al.*, 2007). Essa questão pode ser importante devido à relação entre a HIF-1 α , microambiente tumoral e inflamatório (SITKOVSKY e LUKASHEV, 2005; THIEL *et al.*, 2007) e também a sua relação com a sobrevida de pacientes (MENDES *et al.*, 2014).

2.3.3. VEGF

O complexo HIF-1 também é responsável pela transcrição de fatores de crescimento que podem promover um aumento da taxa de proliferação e redução da morte celular (SEMENZA, 2012b). Um importante fator de crescimento ressurgente desta via é o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor* – Fator de Crescimento Endotelial Vascular), que regula a angiogênese tanto fisiológica quanto patológica, e é considerada a molécula mais importante na formação de novos vasos sanguíneos, pois inicia e modula todas as etapas deste processo (CARMELIET e JAIN, 2011). Este fator pertence a uma família multigênica composta por outros quatro membros: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, P1GF (fator de crescimento placentário). O VEGF é essencial para o crescimento, migração e sobrevivência de células endoteliais, assim como para a morfogênese de vasos sanguíneos (KOWANETZ e FERRARA, 2006).

A formação de novos vasos sanguíneos é reconhecida como elemento chave em diversos eventos fisiológicos e patológicos que envolvem neovascularização, como a embriogênese, crescimento tumoral e cicatrização de feridas (HANAHAN e

WEINBERG, 2011; HORMBREY *et al.*, 2002). De modo geral, a angiogênese é uma resposta do organismo à falta de oxigênio, pois sem o devido suprimento de nutrientes e oxigênio, as células tumorais têm sua capacidade de colonização reduzida e pode entrar em apoptose, no entanto, quando este mecanismo é ativado em tumores sólidos, favorece o crescimento tumoral e aumenta as chances de ocorrência de metástase (ELLIS *et al.*, 2000; DURANYILDIZ *et al.*, 2009).

Além das células tumorais, células do infiltrado inflamatório também podem promover a angiogênese pela expressão de VEGF e estimular o crescimento tumoral (DE NARDO e COUSSENS, 2007; GRIVENNIKOV *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2006; POLLARD, 2008). O VEGF é mediador de diversas etapas da vasculogênese tumoral, incluindo proliferação celular endotelial, permeabilidade vascular e vasodilatação, além de ser responsável pela migração, invasão, sobrevivência e recrutamento de células inflamatórias (ADAMS *et al.*, 2000; ELLIS e HICKLIN, 2008; POLLARD, 2008). Sendo assim, o VEGF se tornou um alvo para terapias anti-tumorais uma vez que a inibição do VEGF leva à regressão tumoral (LEE *et al.*, 2007).

2.3.4. SOD-1

Células têm desenvolvido um sistema para contrapor os radicais livres intracelulares, e dentre as proteínas que compõem a rede antioxidante, as superóxido dismutases (SODs) são enzimas que catalizam a degradação de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, subsequentemente convertido em água e oxigênio pela glutathione peroxidase (GSH-Px) e/ou catalase (CAT) (LIOCHEV e FRIDOVICH, 2010; FRANCO *et al.*, 2013; McCORD e FRIDOVICH, 1969; EVANS *et al.*, 2000).

A família das superóxido dismutases apresenta três tipos de isoenzimas, e a Cu/Zn-superóxido dismutase (SOD-1) contribui com aproximadamente 70-80% para a atividade das SODs na célula. Esta proteína é amplamente distribuída no citosol, núcleo, peroxissomo e espaço intermembrana das mitocôndrias em células de mamíferos, e é formada por duas subunidades idênticas pesando em torno de 32 kDa cada, contendo um sítio ativo constituído por um átomo de cobre e um de zinco,

ligados entre si por uma ponte de histidina (BANCI *et al.*, 2002; LIOCHEV e FRIDOVICH, 2010).

Inúmeros fatores de transcrição regulam a expressão de SOD, principalmente aqueles sensíveis ao estresse oxidativo, como a proteína AP-1 e o NF- κ B, que estão entre os componentes importantes da resposta celular em situação de estresse oxidativo, além de participarem decisivamente nas questões de sobrevivência ou morte celular (KARIN, 1999; SHAULIAN e KARIN, 2002; BUBICI *et al.*, 2006).

Estudos mostram que células tumorais parecem ter um nível baixo de ROS devido à maior expressão de moléculas de eliminação de radicais livres como SOD-1 (CASARIL *et al.*, 1994, VAN DRIEL *et al.*, 1997; JUNG *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2005). O aumento de SOD-1 no meio intracelular pode promover mecanismos de resistência à radioterapia visto que SOD-1 está envolvida na detoxificação celular por transformar os radicais livres (tóxicos) em peróxidos (não tóxicos), em contraste, um suprimento insuficiente de enzimas antioxidantes no meio intracelular, especialmente SOD-1 pode causar uma superprodução de ROS, levando à necrose e apoptose (JIN *et al.*, 2001).

Desta forma, num estudo que visa avaliar inflamação, exposição à fumaça do cigarro e radioterapia, é essencial que seja verificada a presença de proteínas antioxidantes, como a SOD-1, pois, sua elevada expressão está relacionada a uma baixa taxa de radicais livres, o que pode levar a uma pior resposta à radioterapia (MOELLER e DWEHRIST, 2006; ROOTS e SMITH, 1974). Além disso, foi visto que os radicais livres podem diminuir a atividade da proteína PHD3 (CHANDEL *et al.*, 2000; DEHNE e BRUNE, 2009), então uma elevada expressão de SOD-1 poderia atenuar a presença dos radicais livres intracelulares, culminando com uma boa atividade da PHD3 em regular a expressão do complexo HIF-1, resultando em uma baixa oxigenação local e conseqüentemente uma pior resposta à radioterapia.

2.3.5. Receptor de Adenosina 2_A

Além do Complexo HIF-1 ativar a progressão tumoral através da transcrição de genes de fatores de crescimento, ele também pode permitir o crescimento tumoral

pela ativação de uma via imunossupressora regulada pelo Receptor de Adenosina 2_A (RA2_A).

Como visto, em caso de resposta exacerbada do sistema imunológico, ocorre a ativação de vias imunossupressoras a fim de evitar que ocorram mais danos ao tecido saudável. E o dano colateral menos tolerado durante uma resposta imune é o dano às estruturas da microcirculação, o que se reflete imediatamente na interrupção do suprimento sanguíneo local. A diminuição local no suprimento de oxigênio e a hipóxia tecidual local resultantes são os principais eventos que indicam a necessidade de se interromper o dano colateral por células imunes hiperativas (SITKOVSKY e OHTA, 2005).

Esta condição de dano à microcirculação gera uma hipóxia local (além da hipóxia comumente observada em microambientes inflamatórios) que altera o metabolismo celular e causa um forte acúmulo extracelular de adenosina. Até curtos períodos de hipóxia pode permitir o acúmulo de adenosina em virtude do elevado gasto e baixa produção de ATP levando ao acúmulo de AMP (SITKOVSKY *et al.*, 2004).

Enzimas com regulação mediada por hipóxia estão envolvidas no acúmulo de adenosina como Adenosino Kinase (AK) e 5'-nucleotidase (NT5), transcrita pelo complexo HIF-1. A Adenosino Kinase, a qual tem a função de refosforilar a adenosina e convertê-la em AMP, é inibida em hipóxia, enquanto que a 5'-nucleotidase tem a função de clivar o AMP em Adenosina e fosfato (DECKING *et al.*, 1997; KOBAYASHI, ZIMMERMANN e MILLHORN, 2000; SYNNESTVEDT *et al.*, 2002)

A adenosina tem um importante papel imunossupressor, pois ativa vias de sinalização para a expressão de Receptores de Adenosina que podem agir como reguladores de células imunológicas (HUANG *et al.*, 1996; SITKOVSKY *et al.*, 2004). A concentração de adenosina extracelular irá determinar a intensidade de sinalização e expressão dos Receptores de Adenosina (SITKOVSKY e OHTA, 2005).

Existem quatro Receptores de Adenosina que podem ser distribuídos na superfície da célula: RA1, RA2_A, RA2_B e RA3 (FREDHOLM *et al.*, 2001; LINDEN, 2001). Os receptores RA1 e RA3 são acoplados a proteínas G inibitórias (Gi), e os receptores

RA2_A e RA2_B são acoplados a proteínas G estimuladoras (Gs) de sinalização através dos quais resulta em aumento das concentrações de cAMP (HUANG *et al.*, 1997; KOSHIBA *et al.*, 1997; LUKASHEV *et al.*, 2003).

Linfócitos T expressam, principalmente, os receptores RA2_A e RA2_B, entretanto os RA2_A têm uma alta afinidade pela enzima Adenilil Ciclase, portanto são os maiores responsáveis pela imunossupressão em linfócitos (SITKOVSKY *et al.*, 2004). De importância, o aumento de cAMP provocado pela ativação dos receptores RA2_A resulta em bloqueio do TCR (*T Cell Receptor* – Receptor de Células T) e consequentemente inibição do reconhecimento de antígeno tumoral, ativação celular e expansão clonal (SITKOVSKY e OHTA, 2005), além de inibir a produção e exocitose de citocinas pró-inflamatórias, citocinas citotóxicas, grânulos e FasL (HUANG *et al.*, 1997; KOSHIBA *et al.*, 1997; MARONE, PLAUT e LICHENSTEIN, 1978). Este aumento de cAMP mediado por RA2_A também é responsável pela *upregulation* de citocinas anti-inflamatórias e indução de apoptose, pois todos os linfócitos T ativados para o antígeno tumoral que forem suprimidos serão induzidos à anergia, seguida de apoptose (SITKOVSKY, 2003; SITKOVSKY *et al.*, 2004).

O número de receptores RA2_A por célula eventualmente irá determinar a intensidade da imunossupressão causada pela adenosina. De fato, a quantidade de cAMP induzida pela adenosina em células T é dependente do número de receptores RA2_A (ARMSTRONG, *et al.*, 2001). As respostas causadas por cAMP tem um efeito a longo prazo, então uma vez que esta molécula ativa os mecanismos anti-inflamatórios, estes são irreversíveis (SITKOVSKY, 2003).

2.3.6. Foxp3

Outra forma de imunossupressão não mediada pela via de hipóxia ocorre pela ativação de células Treg. Estas células são consideradas como os mais importantes agentes supressores num organismo e apresentam como principal função a de prevenir respostas imunes descontroladas, que muitas vezes podem ser autodestrutivas (FEUERER *et al.*, 2009; YAN e LIU, 2009).

Células Treg são caracterizadas pela expressão do marcador Foxp3 (do inglês *Forkhead Box p3*), um fator de transcrição considerado o marcador mais específico para células Treg, cuja principal função é reprimir vários sinais de ativação de células imune (HORI, NOMURA e SAKAGUCHI, 2003; SCHEREIBER, 2007; SOLOMON e MAGRO, 2008; WADA, 2009).

Assim, as células Treg exercem uma função supressiva em células T, B e dendríticas através do contato direto ou por secreção de citocinas como IL-2 e IL-5, e causam anergia destas células (AZAB *et al.*, 2008; HORI, NOMURA e SAKAGUCHI, 2003). Desta forma a Treg apresenta um papel importante na resolução e término da resposta imune (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007).

Neste sentido, o equilíbrio entre as funções regulatórias e efectoras das células imunológicas é de extrema importância para a manutenção de respostas imunes eficientes no combate ao tumor e também para a prevenção da lesão tecidual (SUGYUAMA *et al.*, 2005). Ou seja, a atividade funcional das células T efectoras e das células Treg deve estar em condições equilibradas para possibilitar respostas imunes adequadas.

Portanto, como desejamos observar o perfil de imunossupressão no microambiente tumoral, além da avaliação da expressão de RA2_A que é um imunossupressor provindo da via de hipóxia, será necessário avaliar o principal marcador imunossupressor Foxp3.

2.4. Aplicação Clínica na Resposta Terapêutica

Muitos trabalhos científicos descrevem novos marcadores moleculares, como os de prognóstico, de progressão tumoral, porém, na prática clínica os painéis aplicáveis são ainda pouco utilizados e mal compreendidos pela equipe multidisciplinar. A exemplo disso, temos inúmeros trabalhos que mostram as vias da hipóxia com implicação clínica e de resposta terapêutica e mais recentemente os estudos de imunomodulação e imunoterapia com alguma aplicação clínica, porém ainda distantes da realidade da maioria dos pacientes (BENCI *et al.*, 2016; CATAKOVIC *et*

al., 2017; MENDES *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2012; WISTUBA-HAMPRECHT *et al.*, 2017).

A proteína HIF-1 α desempenha um importante papel no câncer ao regular vários mecanismos. Sua estabilidade permite a formação do complexo HIF-1, que promove numerosas transcrições gênicas e facilita mudanças fenotípicas completas dentro do microambiente tumoral. Muitas destas alterações culminam em características essenciais à eficácia da radioterapia, uma vez que a radiação atua preferencialmente sobre os tipos de células com níveis mais elevados de oxigênio e um metabolismo rápido (MOELLER e DEWHIRST, 2006).

De fato, os efeitos do complexo HIF-1 ajudam a célula a adaptar-se ao estresse hipóxico, uma vez que as alterações fenotípicas do tumor podem ter um impacto na radiosensibilidade, positiva ou negativamente, que pode variar de um tumor para outro (MOELLER e DEWHIRST, 2006).

Em tumores sólidos, existem tanto células hipóxicas como células ainda oxigenadas devido à sua proximidade com os vasos e, portanto, mais acessíveis à fonte de oxigênio (MOELLER *et al.*, 2004). A radiação, caracteristicamente, atinge células oxigenadas com metabolismo acelerado, portanto, após um regime de radiação, a morte das células libera oxigênio, tornando-o disponível para distribuição em outras áreas anteriormente hipóxicas. Este processo melhora o fornecimento de nutrientes e oxigênio para a região, tornando-o mais responsivo à radiação (MOELLER e DEWEHRIST, 2006; ROOTS e SMITH, 1974).

Uma *upregulation* do complexo HIF-1 ocorre sob condições hipóxicas (SEMENZA, 1999), Mas no caso de tumores irradiados, a reoxigenação também será responsável por um aumento de sua expressão (e atividade). Isto ocorre devido ao estresse oxidativo da reoxigenação tumoral, de modo que as espécies reativas de oxigênio (ROS) acumulam-se nos tumores após a irradiação, promovendo a expressão do complexo HIF-1 (MOELLER *et al.*, 2004). Assim, a reoxigenação induzida altera o ambiente redox do tumor e causa um acúmulo de HIF-1 (MOELLER e DEWHIRST, 2006).

Comumente, tumores hipóxicos são resistentes à radioterapia e quimioterapia pois estes tratamentos dependem da geração de espécies reativas de oxigênio para

induzir danos letais ao DNA (GATENBY *et al.*, 1988; TOMIDA e TSURUO, 1999). No entanto, a hipóxia promove a expressão de HIF-1 α e os tumores que apresentam esta característica ativam o complexo HIF-1. Isso conseqüentemente desencadeia a transcrição de genes associados à angiogênese, induz o aumento da vascularização do tumor, aumento da oxigenação e da concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pós-radioterapia, que por sua vez torna estes tumores mais responsivos a este tratamento.

Seria, portanto, razoável esperar uma maior taxa de sucesso da radioterapia quando as concentrações de oxigênio no tecido e suas espécies reativas são altas, levando à morte de células tumorais de forma mais eficiente (MOELLER e DEWHIRST, 2006; ROOTS e SMITH, 1974). Isto pode ser explicado pelo fato do oxigênio aumentar a citotoxicidade da radiação em aproximadamente três vezes a do seu efeito sobre as células hipóxicas (MOELLER e DEWHIRST, 2006). Este fenômeno é conhecido como o efeito do oxigênio, em grande parte atribuído à capacidade do oxigênio de modificar quimicamente o DNA, induzindo o dano da radiação criando os adutos que não são reparados facilmente pelas células, conduzindo assim à sua morte (ROOTS e SMITH, 1974).

Assim, os dados acima sugerem que o HIF-1 influencia a radiosensibilidade do tumor, mas o grau em que afeta a capacidade de resposta à radiação pode depender do contexto. Em geral, o tratamento radioterápico desempenha um papel chave no tratamento do câncer, sendo indicada para mais da metade dos pacientes, com eficácia variável (DELANEY *et al.*, 2005), e este tratamento tem como agente terapêutico a radiação ionizante que promove ionização no meio onde incide, tornando-o eletricamente instável (CLARKE *et al.*, 2005; NATTINGER *et al.*, 2001).

A Radiação ionizante pode agir diretamente sobre o DNA levando à morte ou à perda da capacidade reprodutiva da célula, mas pode também induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) devido à radiólise da molécula de água e ionização direta das moléculas alvo, a qual poderia resultar em dano oxidativo e citotoxicidade a biomoléculas importantes da célula, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (JHAM e FREIRE, 2006; RILEY, 1994).

Em relação à resposta terapêutica e sistema imune, sabe-se que o infiltrado inflamatório desempenha um papel importante em alguns tumores, como no câncer colorretal (MOHAMED *et al.*, 2012; TOUGERON *et al.*, 2013). Os laudos da anatomia patológica trazem a intensidade da inflamação dos tumores, porém, de fato, poucos estudos consideram a expressão de proteínas em células do infiltrado inflamatório e o efeito que a alteração de expressão delas pode trazer para o microambiente tumoral e para o paciente. Desta forma, os dados de expressão de proteínas e a função delas na modulação da resposta imunológica e terapêutica ainda não são muito bem compreendidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

Os animais usados neste estudo foram mantidos de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Saúde e Cuidados no uso de Animais de Laboratório (NIH Publications Nº 8023), revisado em 2011 e com a Lei Brasileira de Procedimentos para Uso Científico de Animais (#11794/2008). Os procedimentos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética e Utilização de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo de acordo com o protocolo 003/2014 (ANEXO I e II).

3.2. Procedimento Experimental

No presente estudo foram utilizados 53 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar obtidos no Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo, machos jovens, pesando em média 181,35 g ($\pm 18,7$ g) no início do experimento, mantidos em sala com temperatura controlada entre 21° e 24°C, umidade relativa do ar entre 45 e 55%, ciclo luz escuridão de 12 horas, ração comercial para a espécie e água *ad libitum*. Todos os animais estudados foram obtidos e tratados no Biotério do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo no campus de Alegre-ES.

Os animais foram divididos de modo que 5 (cinco) foram mantidos saudáveis para controle negativo e comparação de expressões das proteínas (G0) e os 48 restantes foram induzidos à tumorigênese colorretal com o agente químico 1,2-dimetilhidrazina (DMH) de acordo com metodologia de Nauss *et al.* (1984) modificada por Laranjeira *et al.* (1998), onde o DMH foi dissolvido em solução de NaCl 0,9% e EDTA 1,5% com pH 6,5. A aplicação do agente químico ocorreu por via subcutânea, uma vez por semana, por um período de cinco semanas, na dose de 65mg/kg/semana.

Ao início do processo de indução e promoção do câncer colorretal, os 48 animais experimentais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com 12 animais cada, sendo eles:

- Grupo G1 – DMH;
- Grupo G2 – DMH/Radioterapia;

- Grupo G3 – DMH/Fumaça;
- Grupo G4 – DMH/Fumaça/Radioterapia.

A exposição à fumaça do cigarro dos grupos DMH/Fumaça (G3) e DMH/Fumaça/Radioterapia (G4) foi realizada de acordo com metodologia modificada de Paiva *et al.* (2003) em câmara de inalação equipada com *puff* de fumaça, e correspondeu à queima de 12 cigarros popularmente comercializados por dia/grupo, divididos em dois turnos (seis cigarros pela manhã e seis cigarros a tarde) de exposição de 60 minutos cada, em que a queima durou um minuto e o descanso entre os cigarros foi de 10 minutos. Ao todo foram utilizados 3232 cigarros contendo 8 mg de alcatrão, 0,7 mg de nicotina e 7 mg de monóxido de carbono por maço de 20 cigarros, segundo informação do fabricante, durante 140 dias de exposição (20 semanas), tempo previsto para obtenção de lesões macroscopicamente visíveis (PERŠE e CERAR, 2011) e tempo de exposição à fumaça do cigarro proporcionalmente ao de humanos que corresponderia a 15 anos de hábito tabagista (ROMANOVA *et al.*, 2004).

Na 21^a semana de experimento, os animais dos grupos DMH/Radioterapia (G2), e DMH/Fumaça/Radioterapia (G4) foram anestesiados com a associação ketamina (75mg/Kg) + xilasina (6mg/Kg) e submetidos a três sessões de radioterapia na dose de 700 cGy cada, totalizando 2500 cGy. O tratamento foi elaborado e acompanhado por um médico radio-oncologista no Hospital Evangélico de Cachoeiro do Itapemerim (ES) sob supervisão de um oncologista.

Todos os animais foram eutanasiados na vigésima segunda semana, necropsiados e tiveram toda a extensão do intestino grosso aberto pela inserção do mesentério para a retirada das lesões acima de 0,1 centímetro em sua maior porção e nos indivíduos controle foram coletadas as mucosas do intestino grosso por completo.

Os tecidos coletados foram fixados em formalina 10% tamponada e submetidos ao processamento rotineiro de inclusão em parafina e coradas com hematoxilina e eosina para diagnóstico. Todas as amostras dos grupos experimentais, com exceção do Grupo G0 (intestinos normais que não sofreram indução neoplásica, tampouco exposição à fumaça do cigarro e radioterapia) foram diagnosticadas de acordo com Perše e Cerar (2011).

A fim de manter a homogeneidade da amostra para o estudo de expressão gênica, dentre todas as lesões obtidas, foram selecionadas apenas as amostras classificadas como adenocarcinoma tubular nos grupos experimentais de G1 a G4, e intestino saudável (G0) para a aplicação da técnica imunohistoquímica, por ser o tipo de neoplasia mais frequente encontrada nos animais.

3.3. Imunohistoquímica

A partir do bloco de tecido parafinizado, foram realizados cortes de 3 μ m de espessura e dispostos em lâminas histológicas silanizadas. A seguir, todos os tecidos foram desparafinizados, re-hidratados e submetidos à recuperação antigênica, bloqueio de peroxidase endógena e bloqueio de proteínas inespecíficas com tempos e reagentes demonstrados no Quadro 1. A cada troca de etapa as lâminas foram lavadas em solução de TRIS pH 7,4.

Para a reação imunohistoquímica de cada antígeno foram realizados um controle positivo e dois controles negativos utilizando tecidos com expressão previamente conhecida conforme indicação do fabricante. O primeiro controle negativo foi realizado sem o anticorpo primário, incubando apenas o diluente de anticorpo, e o segundo, sem o anticorpo secundário, incubando o tecido com o tampão de lavagem TRIS pH 7,4. Os anticorpos primários utilizados, bem como sua diluição e tempo de incubação estão dispostos no Quadro 1.

Após a incubação do anticorpo primário foram realizados três banhos de 5 minutos em 1x TRIS e as lâminas foram incubadas com o sistema de detecção de tecido de rato (N-Histofine – Simple Stain Max PO Rat, 414191F, NICHIREI®) a 25°C durante 30 minutos. Após três lavagens com 1x TRIS, a coloração foi visualizada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO). Todas as lâminas foram contrastadas com hematoxilina de Harris durante 1 minuto, desidratadas em etanol, limpas em xileno e montadas com Tissue Tek (Tipo Entellan, Sakura®).

	Recuperação Antigênica	Bloqueio Peroxidase	Bloqueio Proteínas	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Revelação
PHD3	Citrato pH6 15 min	Peróxido de Hidrogênio 30% 30 min	3% leite em pó diluído em Tris 60 min	anti-PHD3 1:250 AB30782, Abcam 60 minutos	N-Histofine – Simple Stain Max PO Rat, 414191F, NICHIREI®)	3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO)
HIF-1α	Citrato pH6 15 min	Peróxido de Hidrogênio 30% 30 min	3% leite em pó diluído em Tris 60 min	anti-HIF-1 α 1:2000 AB51608, Abcam 60 minutos	N-Histofine – Simple Stain Max PO Rat, 414191F, NICHIREI®)	3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO)
VEGF	Citrato pH6 15 min	Bloqueador de Peroxidase (Spring - DHP-125) 30 min	Protein Block (Spring - DPB-125) 20 min	anti-VEGFA 1:250 AB1316, Abcam Overnight	N-Histofine – Simple Stain Max PO Rat, 414191F, NICHIREI®)	3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO)
SOD-1	Citrato pH6 15 min	Peróxido de Hidrogênio 30% 30 min	3% leite em pó diluído em Tris 60 min	anti-SOD-1 1:150 AB13498, Abcam 60 minutos	N-Histofine – Simple Stain Max PO Rat, 414191F, NICHIREI®)	3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO)
RA2_A	Citrato pH6 15 min	Bloqueador de Peroxidase (Spring - DHP-125) 30 min	Protein Block (Spring - DPB-125) 20 min	anti-Adenosine Receptor A2a 3 μ g/ml AB115250, Abcam <i>Overnight</i>	N-Histofine – Simple Stain Max PO Rat, 414191F, NICHIREI®)	3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO)
Foxp3	Citrato pH6 15 min	Bloqueador de Peroxidase (Spring - DHP-125) 30 min	Protein Block (Spring - DPB-125) 20 min	anti-FOXP3 1:100 AB22510, Abcam <i>Overnight</i>	N-Histofine – Simple Stain Max PO Rat, 414191F, NICHIREI®)	3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO)

Quadro 1 - Etapas e reagentes utilizados no processo de imunohistoquímica, em tecidos de adenocarcinoma tubular, de acordo com cada anticorpo utilizado.

3.4. Análise de Expressão

A análise semi-quantitativa foi realizada por meio de microscopia óptica no equipamento Olympus CX40 em aumento de 400 vezes e foram avaliadas as expressões de cada uma das proteínas nas células linfoides no grupo G0 e do infiltrado inflamatório intratumoral e peritumoral nos grupos experimentais (G1 a G4). Em outro momento, a fim de elucidar questões relacionadas à expressão das

proteínas, as células epiteliais em G0 e as células tumorais em G1 a G4 também foram avaliadas.

A expressão foi classificada de forma semiquantitativa e escores foram atribuídos a cada tipo de classificação. A intensidade de marcação foi pontuada como negativa (0), fraca (1), moderada (2) e forte (3) e, considerando a porcentagem de células imunorreativas, a pontuação 0 foi dada quando todas as células eram negativas; 1 quando 1-25% das células eram positivas, 2 quando 25-50% das células eram positivas e 3 quando >50% das células eram positivas. Ambas as pontuações foram multiplicadas e escores foram obtidos variando de 0 a 9 (Mendes *et al.*, 2014).

Uma média dos escores provindos da observação em duplicata foi realizada e utilizada como escore final para análise de expressão quantitativa. Para a análise de expressão qualitativa as pontuações foram categorizadas em negativa (0), fraca (≤ 3) e forte (> 3) para as proteínas PHD3, HIF-1 α , RA2_A e Foxp3 e, negativa (0), em fraca (≤ 6) e forte (> 6) para VEGF e SOD-1 (Mendes *et al.* 2014, Peterle *et al.*, 2014)

3.5. Avaliação da Resposta à Radioterapia

A avaliação da resposta à radioterapia foi obtida por meio do índice apoptótico das amostras pertencentes aos grupos DMH/Radioterapia (G2) e DMH/Fumaça/Radioterapia (G4). Este foi obtido individualmente de cada amostra analisada e calculado a partir da média de cinco campos aleatórios sob microscopia óptica em aumento de 400X da seguinte forma: número de células imunopositivas para caspase-3 clivada/número total de células x 100.

3.6. Análise Estatística

O Teste Qui-Quadrado de Independência foi utilizado para análise de associação das características histopatológicas e número de lesões, e também foi aplicado para a análise categórica das expressões das proteínas em relação às características histopatológicas.

Para as análises quantitativas, foi realizada uma estatística descritiva e o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para o cálculo de distribuição normal. Quando os valores assumiam normalidade foram utilizados testes paramétricos, e quando não assumiam, testes não-paramétricos foram aplicados.

Para a análise de variância de expressão das proteínas entre grupos e entre infiltrado inflamatório intra e peritumoral e células tumorais foram utilizados o Teste ANOVA de uma via com post hoc de Tukey, e seu equivalente não paramétrico, o teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. No estudo de diferença entre duas variáveis foram utilizados o Teste t não-pareado, e seu equivalente não paramétrico U Mann-Whitney. E para a análise de Influência de duas variáveis, o teste Two-Way ANOVA foi utilizado.

Para o estudo de correlação entre as expressões das proteínas foram utilizadas a Correlação de Pearson em valores paramétricos e Correlação de Spearman em valores não paramétrico.

Em todas as análises foi utilizado o teste Bicaudal, e os resultados estatisticamente significativos foram indicados por $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada com o software SPSS e GraphPad Prism® 6 Demo.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do número e diagnóstico de lesões em mucosa colorretal

Antes de iniciarmos o estudo sobre a expressão das proteínas nos infiltrados intra e peritumorais, um estudo geral sobre número e diagnóstico das lesões obtidas foi realizado.

O processo de carcinogênese colorretal com a substância DMH promoveu o surgimento de várias lesões com características semelhantes às encontradas em humanos conforme descrito na Tabela 1 e exposto na Figura 5.

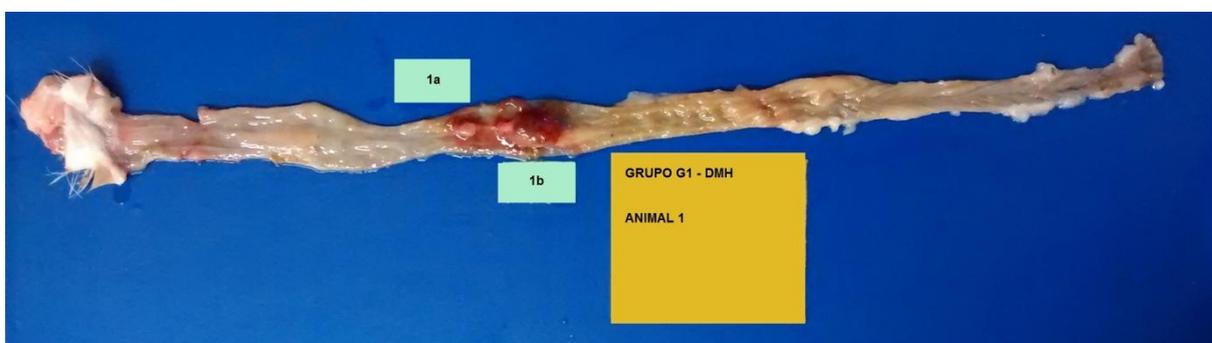


Figura 5 – Extensão do intestino grosso com extensão do ceco ao ânus, removido de animal experimental após eutanásia, com evidência para as lesões encontradas.

No grupo G1 (DMH) foram encontradas 26 lesões, com uma média de 2,6 lesões por animal, número mínimo de uma e máximo de oito lesões por animal. O grupo G2 (DMH/Radioterapia) apresentou 18 lesões, com média de 2,25 lesões por animal, sendo no mínimo uma e no máximo quatro lesões. No grupo G3 (DMH/Fumaça) foram encontradas 33 lesões, média de 2,75 lesões por animal, com número mínimo de uma lesão e máximo de nove. Por fim, no grupo G4 (DMH/Fumaça/Radioterapia) foram encontradas 19 lesões, com média de 2,71 lesões, com número mínimo de uma lesão e máximo de oito lesões por animal.

Não houve diferença significativa no número de tumores por grupo ($p=0,9905$). No entanto, o Teste de Qui Quadrado mostrou haver uma relação do diagnóstico das lesões com os grupos experimentais ($p=0,005$). A seguir, para o estudo das características histopatológicas foram utilizadas apenas as neoplasias. Displasias foram excluídas.

Tabela 1 – Relação do número, porcentagem e diagnóstico das lesões obtidas em cada um dos grupos experimentais.

	G1		G2		G3		G4		Valor p		
	n	%	n	%	n	%	n	%			
Displasia	2	7,7	0	0,0	4	12,1	0	0,0	0,005		
Benigna											
			Adenoma Tubular	2	7,7	2	11,1	0	0,0		
			Adenocarcinoma Tubular	18	69,2	11	61,1	21	63,6	15	78,9
Maligna			Adenocarcinoma Anel em Sinete	2	7,7	0	0,0	3	9,1	0	0,0
			Carcinoma <i>in situ</i>	1	3,8	0	0,0	5	15,1	0	0,0
			Adenocarcinoma Mucinoso	1	3,8	1	5,5	0	0,0	0	0,0
Não foi possível diagnosticar	0	0,0		4	22,2	0	0,0	4	21,1		
TOTAL	26	100		18	100	33	100	19	100		

4.2. Distribuição das Características Histopatológicas por Grupo

De modo geral, as características histopatológicas não diferiram entre os grupos, mas algumas características importantes apresentaram diferença significativa como inflamação ($p < 0,0001$), figuras de mitose ($p < 0,0001$) e necrose ($p < 0,0001$) (Tabela 2).

No grupo G1 a inflamação das lesões foi predominantemente moderada, seguida de inflamação grave. Quando os animais foram expostos à radioterapia (grupo G2), a inflamação das lesões era predominantemente leve, com pouca inflamação moderada e severa. O grupo que sofreu exposição à fumaça (grupo G3) apresentou inflamação moderada na maioria das lesões, com algumas lesões apresentando inflamação leve, e poucas com inflamação severa. No grupo G4 a inflamação foi leve em 100% dos casos.

Em relação ao número de figuras de mitose presente nas lesões, apenas o grupo G1 apresenta mais de 3 figuras de mitose por campo, e por outro lado, no grupo G4 é onde a figura de mitose mais esteve ausente. A exposição à fumaça associada a radioterapia reduziram a presença de células em atividade mitótica, diminuindo a chance de células tumorais se multiplicarem. Em relação às características histopatológicas de inflamação e figuras de mitose, o grupo G1 acompanha o perfil de malignidade enquanto que G4 segue com características menos malignas.

A necrose foi outra característica histopatológica altamente relacionada aos grupos, pois ela era maior nos grupos submetidos à radioterapia (G2 e G4). No grupo G1 quase não foi observada necrose nas lesões, no grupo exposto apenas à fumaça do cigarro (G3), a necrose esteve presente em 53% das lesões, no entanto, quando a exposição à fumaça do cigarro era concomitante com a radioterapia, a necrose esteve presente em 100% das lesões. Diminuindo o número de células tumorais naquele microambiente.

Como a necrose esteve muito mais presente no grupo exposto à radioterapia e fumaça do cigarro, buscamos avaliar também a apoptose das células nos grupos submetidos à radioterapia (G2 e G4). Assim, avaliamos o índice apoptótico por meio da caspase 3 clivada mostrada a seguir.

Tabela 2 - Comparativo em número e percentual das características histopatológicas, nos grupos experimentais, encontradas em mucosa colorretal de ratos induzidos a carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina.

Características Histopatológicas de Lesões em relação aos grupos avaliados												
CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS		GRUPOS								valor p		
		G1		G2		G3		G4			Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Inflamação												
	Leve	4	9,8	9	22,0	9	22,0	19	46,3	41	100,0	<0,0001 ***
	Moderada	12	40,0	4	13,3	14	46,7	0	0,0	30	100,0	
	Severa	7	50,0	3	21,4	4	28,6	0	0,0	14	100,0	
Pleomorfismo												
	Leve	6	31,6	3	15,8	7	36,8	3	15,8	19	100,0	0,126
	Moderado	11	23,4	6	12,8	14	29,8	16	34,0	47	100,0	
	Forte	6	35,3	5	29,4	6	35,3	0	0,0	17	100,0	
Figuras de Mitose												
	Ausente	1	4,8	1	4,8	3	14,3	16	76,2	21	100,0	<0,0001 ***
	<3/campo	20	33,3	13	21,7	24	40,0	3	5,0	60	100,0	
	>3/campo	2	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	100,0	
Invasão de Submucosa												
	Ausente	5	26,3	5	26,3	6	31,6	3	15,8	19	100,0	0,665
	Presente	18	26,9	10	14,9	23	34,3	16	23,9	67	100,0	
Desmoplasia												
	Ausente	8	23,5	8	23,5	12	35,3	6	17,6	34	100,0	0,563
	Presente	15	30,0	7	14,0	15	30,0	13	26,0	50	100,0	
Debris Glandulares												
	Ausente	0	0,0	1	16,7	3	50,0	2	33,3	6	100,0	0,433
	Presente	23	29,5	14	17,9	24	30,8	17	21,8	78	100,0	
Necrose												
	Ausente	22	53,7	4	9,8	15	36,6	0	0,0	41	100,0	<0,0001 ***
	Presente	1	2,2	13	28,3	13	28,3	19	41,3	46	100,0	
Grau de Diferenciação •												
	Muito	6	54,5	1	9,1	4	36,4	0	0,0	11	100,0	0,276
	Moderadamente	9	26,5	7	20,6	11	32,4	7	20,6	34	100,0	
	Pouco	8	21,6	6	16,2	12	32,4	11	29,7	37	100,0	

• Diferenciado

** p<0,05

***p<0,0001

4.3. Estudo do Efeito da Radioterapia na Ativação da Apoptose Celular

Para verificar a morte celular nos grupos submetidos à radioterapia (G2 e G4), foi realizado um estudo da presença de Caspase-3 clivada por imunohistoquímica nas células tumorais, que são o alvo do tratamento radioterápico e avaliar a eficiência da resposta à radioterapia nestes grupos.

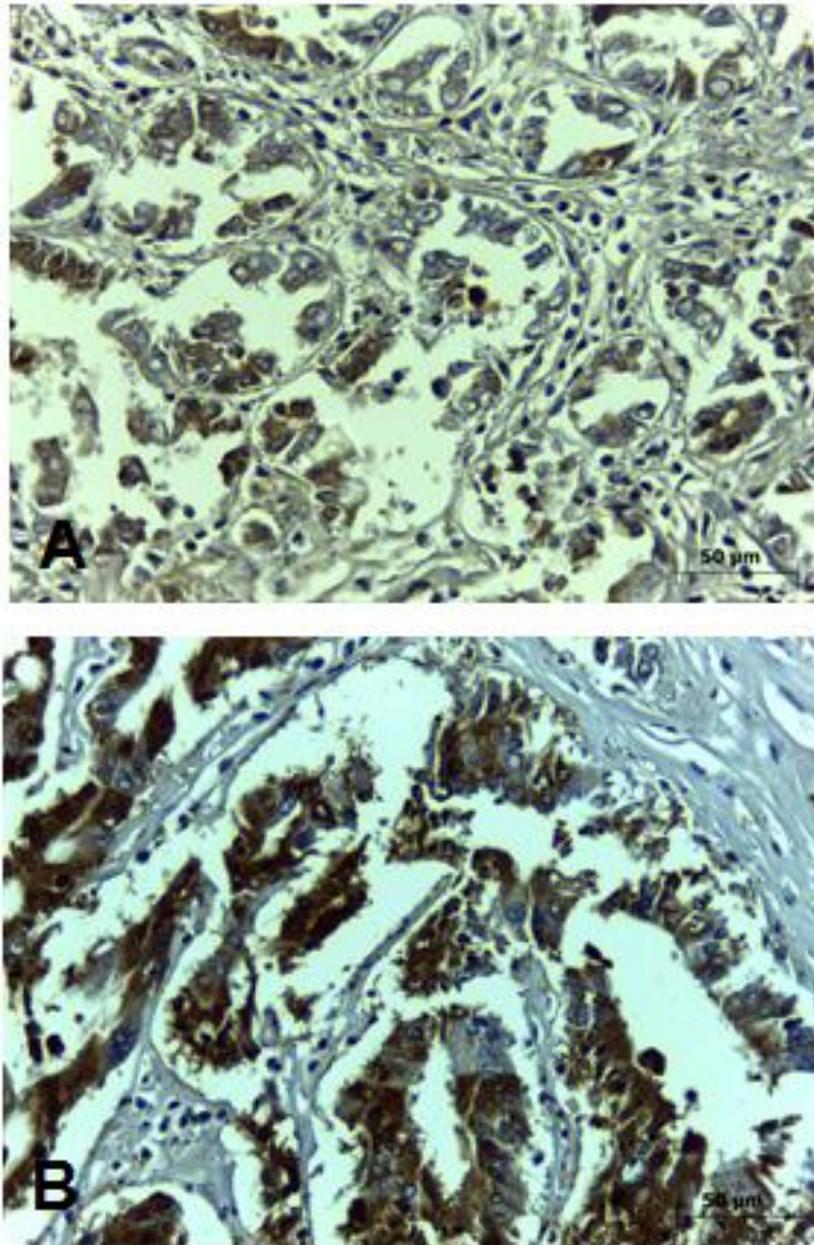


Figura 6 - Fotomicrografia de Adenocarcinoma Tubular colorretal proveniente de modelo experimental com carcinogênese induzida por 1,2-dimetilhidrazina evidenciando a expressão de Caspase-3 clivada, após Radioterapia. A) Amostra proveniente de animais não expostos à fumaça do cigarro (G2). B) Amostra proveniente do grupo exposto à fumaça do cigarro (G4). Objetiva de 100x.

O índice apoptótico foi maior no grupo G4(DMH/Fumaça/Radioterapia) do que no Grupo G2 (DMH/Radioterapia) ($p=0,0289$). No grupo exposto à fumaça do cigarro (G4) o índice apoptótico médio foi de 97%, com o mínimo de 78,79% e o máximo de 100% de células apoptóticas. Enquanto que no grupo não exposto à fumaça do cigarro (G2), o índice apoptótico médio encontrado foi 77%, sendo que o menor índice observado foi 9,72% e o maior índice 100% de células em apoptose em adenocarcinoma tubular colorretal.

4.4. Estudo de Expressão das Proteínas nos Infiltrados Inflamatórios Intra e Peritumoral

Como mencionado anteriormente, apenas as lesões classificadas como Adenocarcinomas Tubulares foram selecionadas para o estudo de expressão das proteínas, pois este tipo de neoplasia esteve presente em maior quantidade e assim poderíamos efetuar nossos estudos em uma amostra mais homogênea.

Uma análise semi-quantitativa foi realizada para o estudo de expressão das proteínas imunomarcadas pela técnica de imunohistoquímica em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para todos os grupos estudados, a saber, G1 (DMH), G2 (DMH/Radioterapia), G3 (DMH/Fumaça), G4 (DMH/Fumaça/Radioterapia).

4.4.1. PHD3

Na análise de expressão de PHD3 no infiltrado inflamatório intratumoral, não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais avaliados [$F(3, 69) = 0,332$; $p=0,80222$] (Figura 7 e 8).

No estudo do infiltrado peritumoral, com adição do grupo G0 (intestino saudável), foi mostrada uma diferença significativa entre os grupos avaliados ($p<0,0001$) de modo que a expressão de PHD3 era maior em G0 do que nos grupos com câncer, ($p<0,0001$), os quais não diferiram entre si ($>0,9999$).

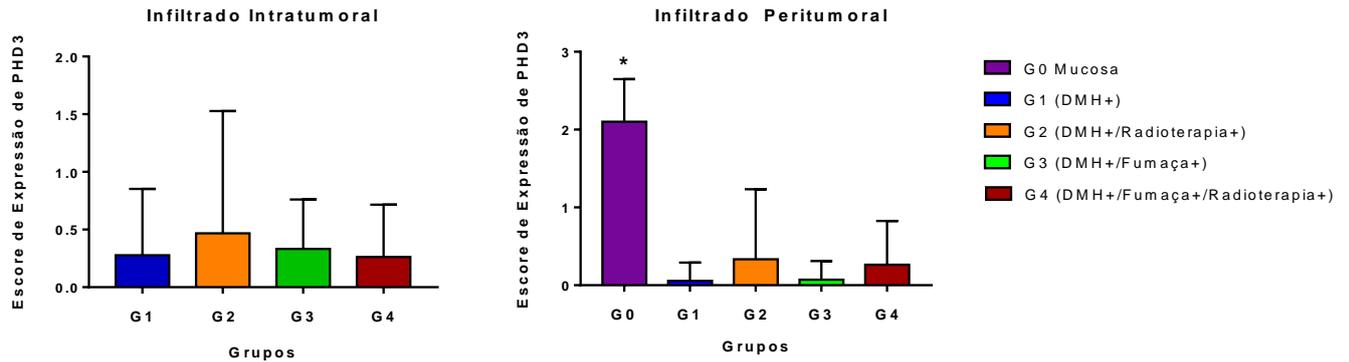


Figura 7 - Diferença de expressão da proteína PHD3 nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral em adenocarcinoma tubular de modelo experimental para câncer colorretal de modelo experimental. * $p < 0,0001$ – G0 em relação aos grupos G1, G2, G3 e G4. Kruskal-Wallis seguido de Post Hoc de Dunn.

Apesar da expressão da proteína PHD3 ter sido positiva nos infiltrados inflamatórios intra e peritumorais em todos os grupos avaliados (G0, G1, G2, G3 e G4), sua expressão esteve baixa em todos os grupos com câncer, enquanto que sua expressão no tecido saudável foi maior.

Também foi realizado um estudo a fim de se verificar se a expressão de PHD3 entre os infiltrados intra e peritumoral se correlacionavam ou se eram diferentes entre si, e nos grupos G1, G2 e G4 a expressão de PHD3 nos infiltrados inflamatórios apresentou uma correlação positiva moderada/forte, e não se diferiu significativamente. Com exceção do grupo G3 em que as expressões entre os infiltrados que se diferiram ($p=0,0246$) e não estavam correlacionadas ($p=0,5956$; $r=0,1229$), de modo que a expressão no infiltrado intratumoral se encontrava maior do que a expressão no infiltrado peritumoral.

Uma vez que a proteína PHD3 mostrou-se presente e invariável nos grupos experimentais (G1 a G4), temos a possibilidade de avaliar a alteração de expressão de HIF-1 α , sem que esta análise seja prejudicada por níveis variados de PHD3 entre os grupos, e que a possível variação encontrada na expressão de HIF-1 α poderia ser em virtude dos fatores expostos.

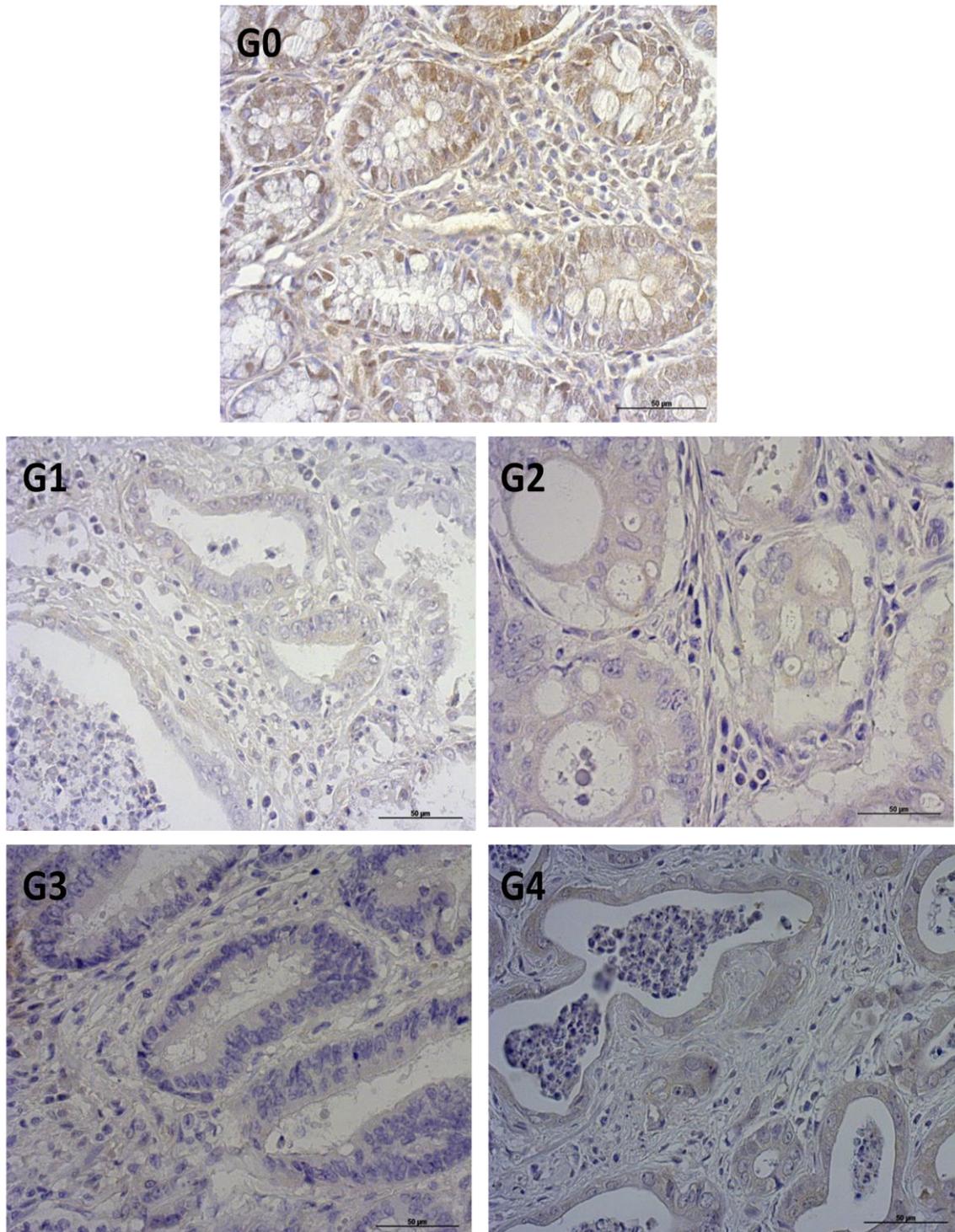


Figura 8 – Fotomicrografias de expressão da proteína PHD3 em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia, com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.

4.4.2. HIF-1 α

A expressão de HIF-1 α foi avaliada nas células dos Infiltrados Inflamatórios intra- e peritumorais a fim de se verificar sua presença nos grupos estudados e a variação de sua expressão de acordo com os tratamentos recebidos em cada um dos grupos, uma vez que tanto a exposição à fumaça do cigarro como à radioterapia podem alterar esta expressão.

No infiltrado inflamatório intratumoral a expressão de HIF-1 α foi positiva em todos os grupos, e o Teste One Way ANOVA mostrou não haver diferença significativa na expressão entre os grupos avaliados [F (3, 69)=1.361; p=0,2621] (FIGURA 9 e 10). O teste Two Way ANOVA confirmou que nem a exposição à fumaça do cigarro (p=0,0589) nem à radioterapia (p=0,9397), ou ambos os efeitos combinados (p=0,6949), foram capazes de induzir uma alteração na expressão de HIF-1 α a ponto de diferir entre os grupos avaliados.

Por outro lado, ao considerar a expressão de HIF-1 α no infiltrado inflamatório peritumoral de todos os grupos com câncer (G1 a G4) e também na mucosa saudável (G0), houve uma diferença significativa entre os grupos [F (4,73)=4,988; p=0,0013], sendo que a expressão de HIF-1 α em G0 era maior do que nos com câncer não expostos à radioterapia G1 (p=0,0024) e G3 (p=0,0378) (Figura 10).

Além disso, também houve diferença significativa na expressão de HIF-1 α do grupo apenas com câncer (G1) em relação aos dois grupos submetidos à radioterapia G2 (p=0,0397) e G4 (p= 0,0404) em que a expressão em G1 (DMH) é significativamente menor do que nos grupos com radioterapia, onde houve um aumento de expressão da proteína.

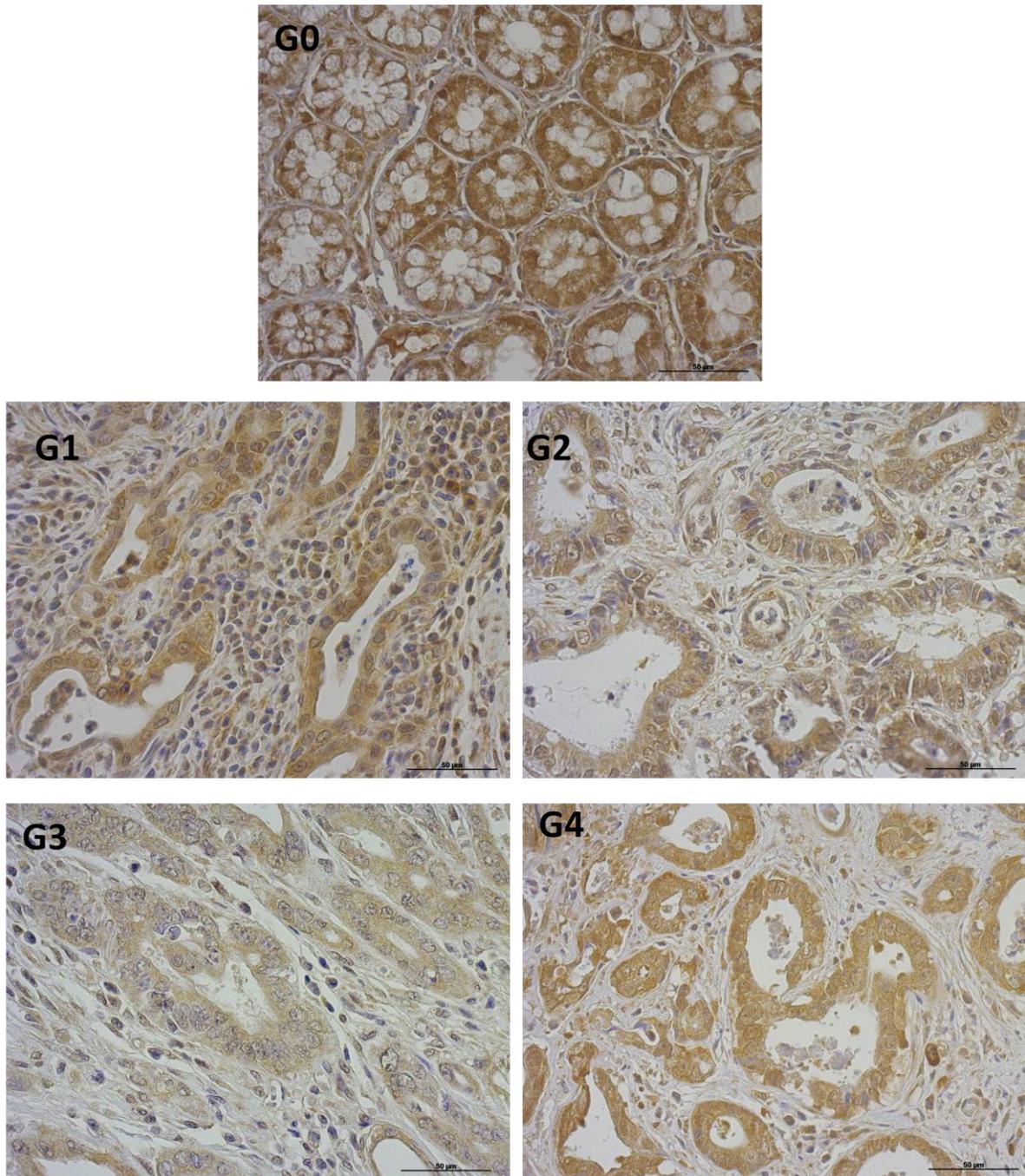


Figura 9 - Fotomicrografias de expressão da proteína HIF-1 α em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia, com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.

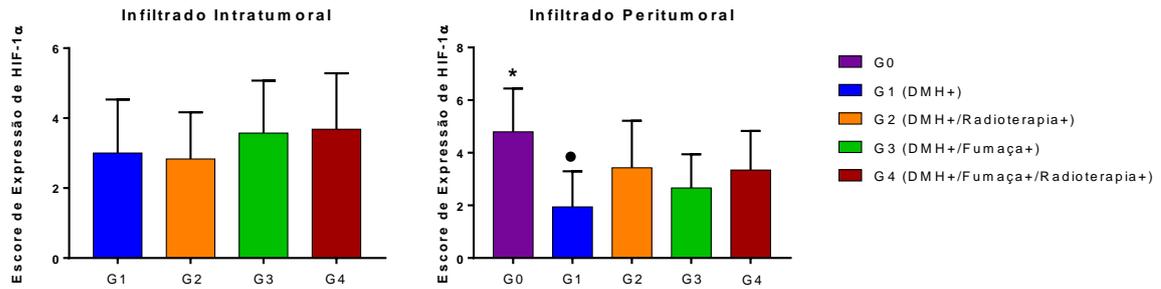


Figura 10 - Análise de expressão de HIF-1 α nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral de adenocarcinoma tubular de câncer colorretal em modelo experimental. O escore de expressão de HIF-1 α no infiltrado intratumoral foi semelhante em todos os grupos experimentais. Notar diferença no escore de expressão da proteína HIF-1 α . * $p < 0,05$ – G0 em relação aos grupos G1 e G3 e, * $p < 0,05$ G1 em relação aos grupos G2 e G4. One Way ANOVA seguido de Post Hoc de Tukey.

No Infiltrado Peritumoral, o teste Two Way ANOVA confirmou que a exposição à radioterapia tem influência significativa no aumento de expressão de HIF-1 α ($p = 0,0025$). O teste também mostrou que nem a exposição à fumaça do cigarro ($p = 0,3643$) nem a combinação de fumaça e radioterapia ($p = 0,2431$) tiveram efeito sob a expressão de HIF-1 α (Figura 11).

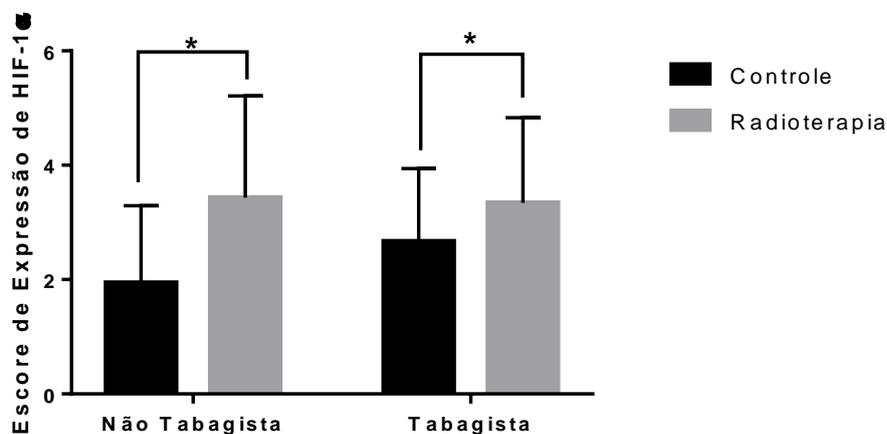


Figura 11 - Análise dos escores de expressão de HIF-1 α sob influência de fumaça e radioterapia. O escore de expressão nos indivíduos submetidos à radioterapia foi significativamente maior em relação aos grupos não expostos. * $p < 0,05$ Two Way ANOVA.

Uma vez que não foi encontrada diferença na expressão de HIF-1 α no infiltrado inflamatório intratumoral entre os diferentes grupos, avaliamos a diferença e também a correlação da expressão de HIF-1 α no infiltrado intratumoral em relação à célula tumoral e ao infiltrado peritumoral, para averiguar se este fator poderia estar

envolvido com a persistência e invariância desta expressão no interior do microambiente tumoral. Assim,

Nos grupos G1, G2 e G3, a expressão de HIF-1 α no infiltrado intratumoral se assemelhava tanto à expressão na célula tumoral como no infiltrado peritumoral, com exceção do grupo G4 em que o infiltrado intratumoral foi semelhante ao peritumoral ($p=0,8443$), mas diferiu da célula tumoral ($p=0,0115$) (Figura 12).

Concordando com estes dados, as análises de correlação mostrou que a expressão de HIF-1 α no infiltrado intratumoral esteve correlacionada com o infiltrado peritumoral em todos os grupos (G1 a G4), e que em relação à célula tumoral, houve correlação nos grupos G1 e G4 ($p=0,0001$; $r=0,7807$ e $p=0,0306$; $r= 0,4965$ respectivamente), mas não houve correlação nos grupos G2 e G3 ($p=0,4009$; $r=0,2342$ e $p=0,0665$; $r=0,4133$, respectivamente).

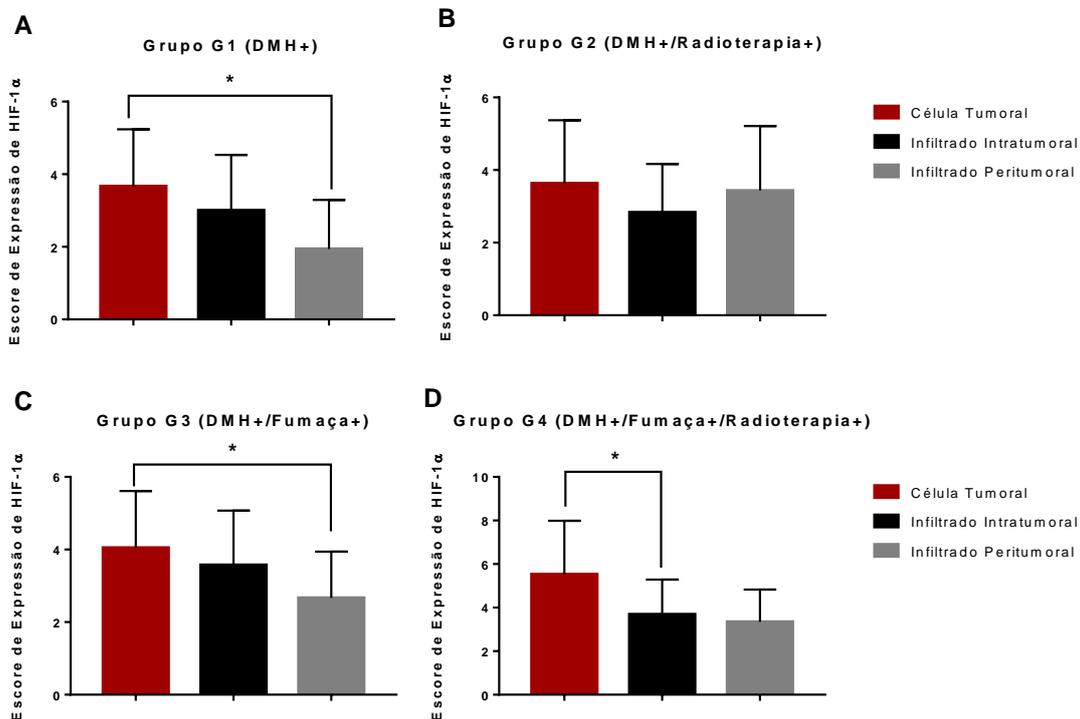


Figura 12 - Análise de expressão de HIF-1 α no infiltrado intratumoral, peritumoral e célula tumoral nos grupos experimentais G1, G2, G3, G4 ilustrando diferença significativa de expressão entre os tipos celulares. * $p<0,05$ One Way ANOVA seguido de Post Hoc de Tukey.

Sendo assim, a expressão de HIF-1 α não alterou no infiltrado intratumoral, mas no infiltrado peritumoral foi visto que a exposição à radioterapia pode aumentar os níveis de expressão desta proteína. E para verificarmos a funcionalidade de HIF-1 α , estudamos a expressão de um de seus transcritos.

4.4.3. VEGF

A fim de se verificar o efeito da função HIF-1 α em transcrever seus genes alvo, realizamos também o estudo da expressão de VEGF nos infiltrados intra e peritumoral, em vista que este é um fator de crescimento importante para o crescimento e progressão tumoral da via de hipóxia.

Neste estudo, a expressão de VEGF não diferiu nem no infiltrado intra- [F(3,69)=1,86; p=0,5998] nem no infiltrado peritumoral [F(4,73)=1,408; p=0,3075] entre os grupos avaliados (Figura 13 e 14). Este resultado foi confirmado pelo teste Two Way ANOVA em que nem a exposição à fumaça e nem a radioterapia apresentaram influência na expressão desta proteína.

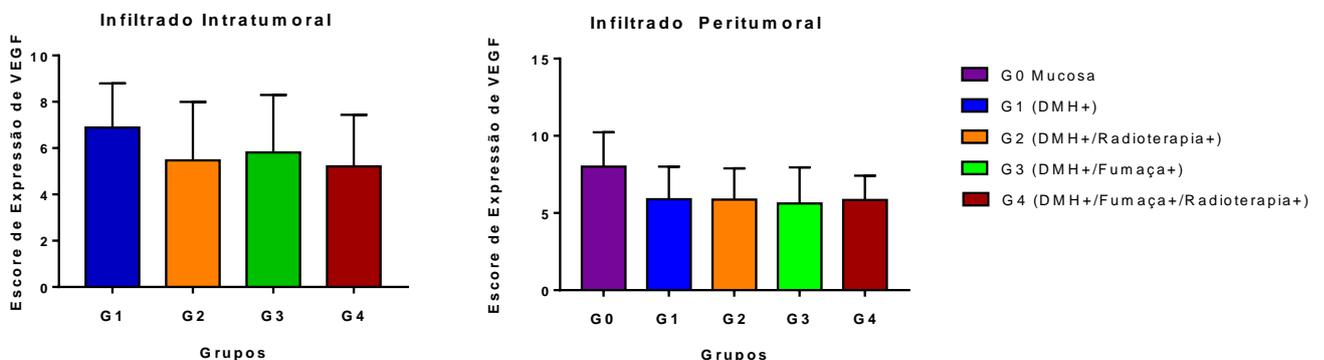


Figura 13 - Análise de expressão de VEGF nos infiltrados intra e peritumoral de adenocarcinoma tubular de câncer colorretal em modelo experimental. O escore de expressão de VEGF foi semelhante em todos os grupos experimentais no infiltrado inflamatório intratumoral e no peritumoral.

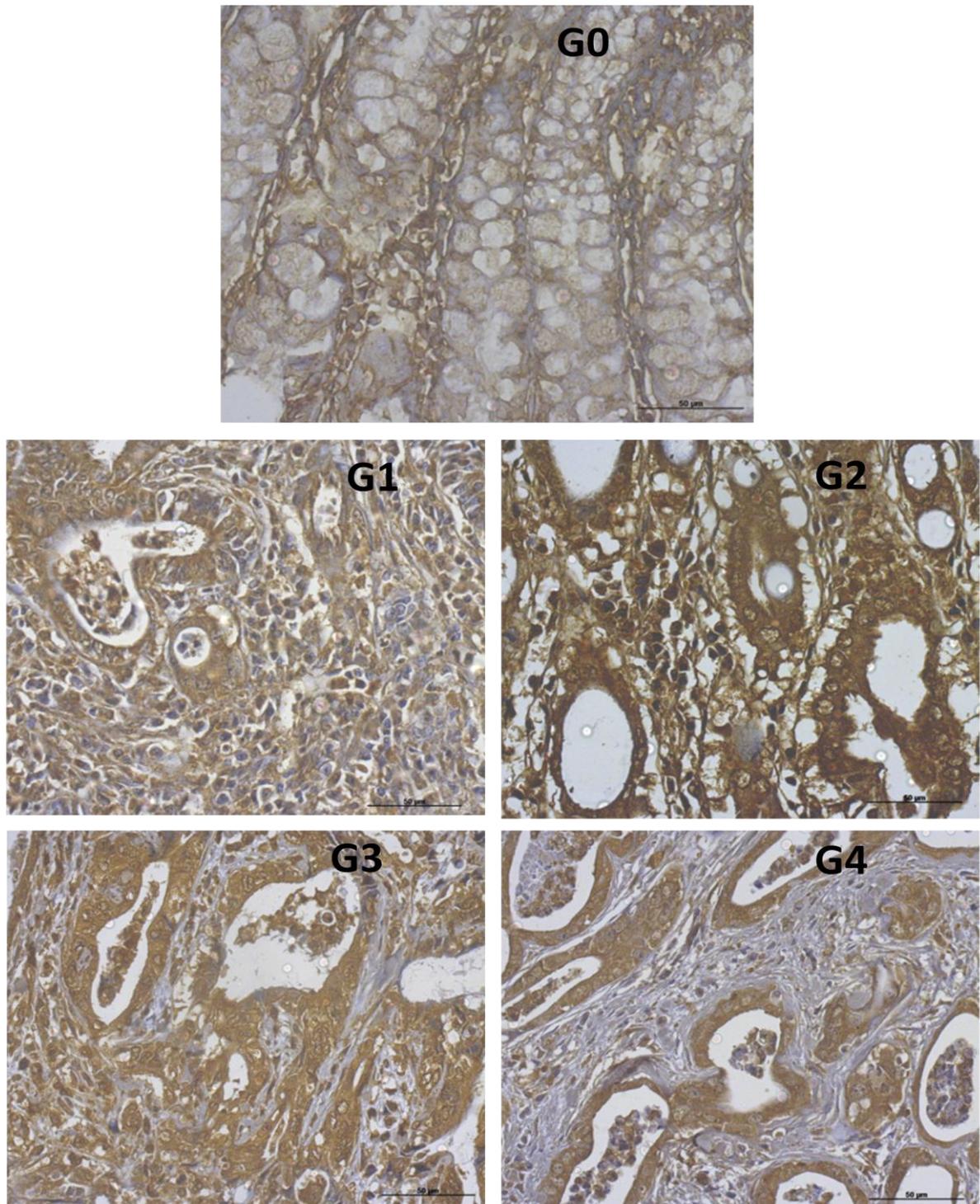


Figura 14 - Fotomicrografias de expressão da proteína VEGF em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia, com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.

Além disso, também foi avaliada a diferença e correlação da expressão de VEGF entre o infiltrado intratumoral, peritumoral e célula tumoral, e também não houve diferença significativa na expressão de VEGF entre estes tipos celulares. Ou seja, a expressão de VEGF esteve semelhante em todos os grupos e em todos os tipos celulares, não havendo qualquer tipo de variação.

Assim, a expressão de VEGF não acompanhou as alterações de expressão observadas em HIF-1 α , não houve nenhum tipo de variação do VEGF, ele esteve similar e forte em todo o microambiente.

4.4.4. SOD-1

Uma vez que o estresse oxidativo pode influenciar positiva ou negativamente na resposta à radioterapia e na função das células imunológicas componentes dos infiltrados inflamatórios tumorais, a expressão de SOD-1 também foi estudada a fim de se avaliar o estresse oxidativo do microambiente, que pode ter sido alterado tanto pela influência da fumaça do cigarro, quanto da radioterapia.

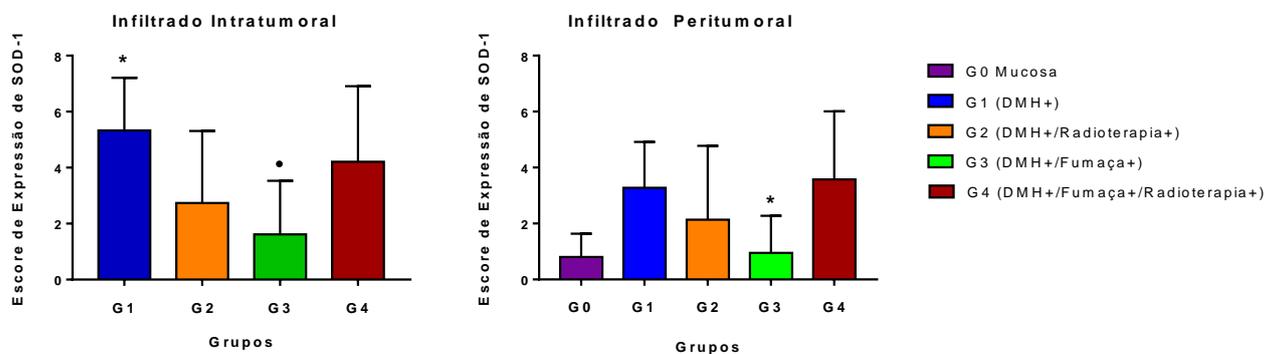


Figura 15 - Análise de expressão de SOD-1 nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral de adenocarcinoma tubular de câncer colorretal em modelo experimental. Notar diferença no escore de expressão da proteína SOD-1. * $p < 0,05$ em relação aos grupos G2 e G3 e, $< 0,05$ em relação ao grupo G4 em infiltrado intratumoral. E no infiltrado peritumoral, * $p < 0,05$ em relação aos grupos G1 e G4. One Way ANOVA seguido de Post Hoc de Tukey.

A análise mostrou que a expressão de SOD-1 foi positiva em todos os grupos avaliados (Figura 16). No infiltrado intratumoral, houve diferença significativa na expressão de SOD-1 entre os grupos [$F(3,69) = 9,851$; $p < 0,0001$], de modo que o grupo apenas com câncer (G1) apresentou expressão de SOD-1 maior do que o

grupo exposto à fumaça (G3 - $p < 0,0001$) e à radioterapia (G2 - $p = 0,0089$), mas foi significativamente semelhante ao grupo G4 que foi exposto a ambos os fatores ($p = 0,4427$) onde a expressão de SOD-1 se encontrava elevada. Além disso, a expressão de G3 foi menor do que em G4 ($p = 0,0033$) (Figura 15 e 16).

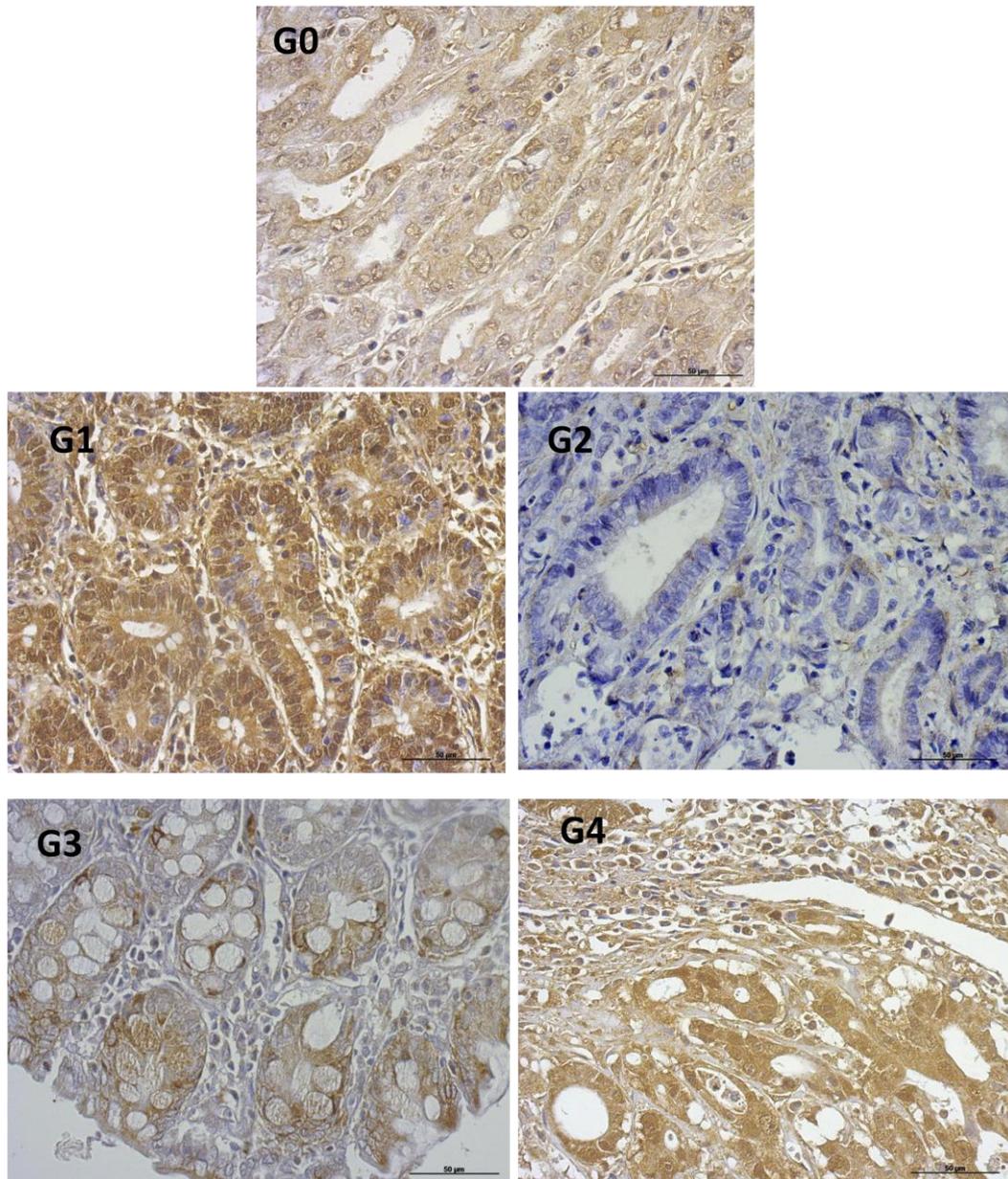


Figura 16 - Fotomicrografias de expressão da proteína SOD-1 em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia, com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.

No Infiltrado Inflamatório Peritumoral também houve diferença significativa na expressão de SOD-1 entre os grupos [F (4,73) = 6,211; p=0,0002] e o Post Hoc de Tukey mostrou que a expressão de SOD-1 foi menor no grupo G3 em relação aos grupos G1 e G4 (p=0,0044 e p=0,0007, respectivamente), mas não diferiu significativamente de G2 (p >0,9999).

Para tentarmos entender como as expressões podem alterar e não ter influência dos fatores fumaça e radioterapia associadas buscou-se averiguar se esta alteração poderia estar sendo influenciada pela expressão de SOD nas células adjacentes como na célula tumoral. Assim, buscamos realizar um teste de variância da expressão de SOD-1 no infiltrado intratumoral em relação à célula tumoral e ao infiltrado peritumoral.

Também buscamos avaliar a diferença e correlação da expressão de SOD-1 no infiltrado intra-, no infiltrado peritumoral e na célula tumoral. A expressão de SOD-1 no infiltrado inflamatório intratumoral foi semelhante à expressão na célula tumoral apenas em G1 (p= 0,4084), enquanto que nos grupos G2, G3 e G4 essa expressão se assemelhou à do infiltrado inflamatório peritumoral (Figura 17).

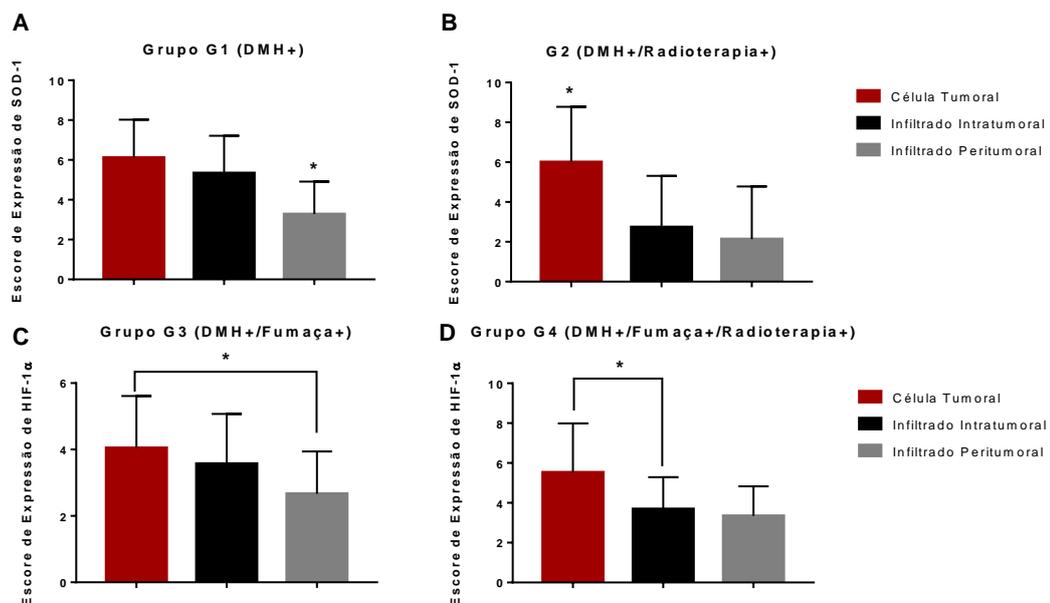


Figura 17 - Análise de expressão de SOD-1 no infiltrado inflamatório intratumoral, peritumoral e célula tumoral nos grupos experimentais G1, G2, G3, G4 ilustrando diferença significativa de expressão entre os tipos celulares. *p<0,05 One Way ANOVA seguido de Post Hoc de Tukey.

Apesar da expressão de SOD-1 no infiltrado intratumoral ser semelhante à das células tumorais apenas em G1, sua expressão se correlacionou positivamente em todos os grupos. E em relação ao infiltrado peritumoral, a expressão de SOD-1 se correlacionou nos grupos G2, G3 e G4 (Tabela 3). Neste sentido podemos ver que a expressão de SOD-1 no infiltrado intratumoral está frequentemente relacionada às suas células adjacentes, o que talvez possa explicar a falta de influência das variáveis na alteração desta expressão.

Tabela 3 – Análise de variação e correlação da expressão de SOD-1 no infiltrado intratumoral em relação à expressão na célula tumoral e no infiltrado peritumoral.

	Célula Tumoral		Infiltrado Peritumoral	
	Variância p valor	Correlação p valor; r	Variância p valor	Correlação p valor; r
G1	0,4084	0,0019; 0,6789 **	0,0037**	0,5790; 0,1402
G2	0,0141*	0,0269; 0,569 *	>0,9999	<0,0001; 0,8706 ***
G3	0,0228*	<0,0001; 0,7496 ***	0,8329	0,0475; 0,4207 *
G4	0,0005**	0,0082; 0,5871 **	0,6866	<0,0001; 0,8176 ***

* p<0,05

** p<0,002

*** p<0,0001

A avaliação da expressão de SOD-1 nos permite observar que o estresse oxidativo variou de acordo com cada exposição em que os grupos foram submetidos. E o efeito que os fatores de exposição exercem no estresse oxidativo pode modular a resposta à radioterapia bem como a resposta das células imunológicas presentes no microambiente.

4.4.5. RA2_A

A análise de RA2_A também foi realizada nos infiltrados tumorais nos grupos avaliados, uma vez que a alteração de expressão na via de hipóxia pode interferir em sua expressão e resultar num perfil de imunossupressão. A análise semi-quantitativa mostrou não haver expressão de RA2_A nos dois grupos submetidos à

radioterapia (G2 e G4), havendo expressão positiva apenas nos grupos não submetidos à radioterapia.

O infiltrado inflamatório intratumoral apresentou diferença significativa na expressão de RA2_A entre os grupos avaliados ($p=0,0065$). E na comparação múltipla foi observada diferença de expressão entre o grupo G1 e os dois grupos submetidos à radioterapia onde não houve expressão da proteína G2 $p=0,0213$ e G4 $p=0,0117$. No entanto, G1 não apresentou diferença significativa com G3, seu correspondente submetido apenas à exposição da fumaça do cigarro ($p=0,3704$) (Figura 18 e 19).

Também foi observada diferença significativa na expressão RA2_A entre os grupos no infiltrado peritumoral ($p<0,0001$) de modo que a expressão em G0 foi significativamente maior em relação aos grupos com câncer (G1 a G4) com $p<0,0001$. Estes por sua vez, não apresentaram diferença na expressão da proteína.

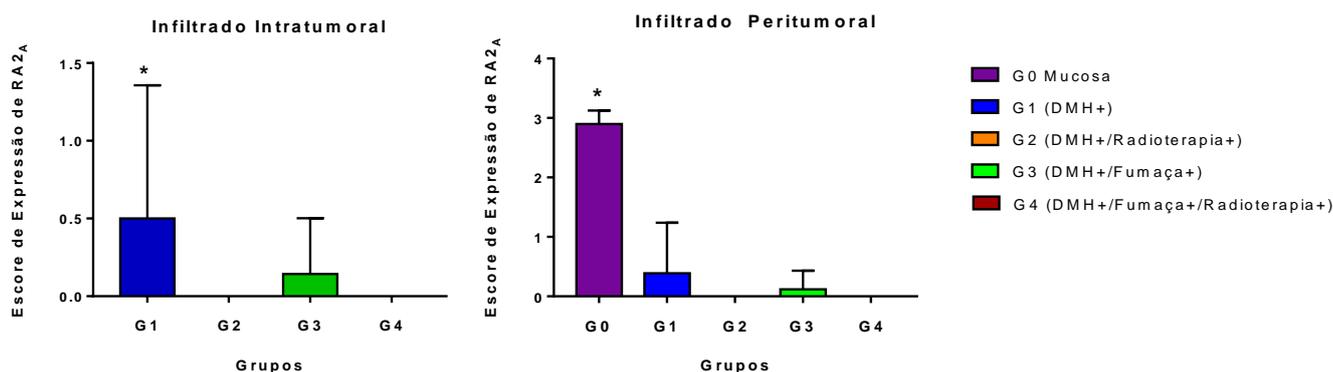


Figura 18 - Análise de expressão de RA2A nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral de adenocarcinoma tubular de câncer colorretal em modelo experimental. Notar diferença no escore de expressão de RA2A. * $p<0,05$ em relação aos grupos G1 e G2 no infiltrado inflamatório intratumoral e, * $p<0,05$ em relação aos demais grupos (G1, G2, G3 e G4).Kruskal-Wallis com Post Hoc de Dunn.

O teste de Two Way ANOVA confirma estes resultados de modo que a radioterapia apresenta uma influência significativa na expressão desta proteína tanto no infiltrado intratumoral ($p=0,0048$), como no infiltrado peritumoral ($p= 0,0205$). A radioterapia parece ser um fator determinante para que não haja expressão RA2_A nas células dos infiltrados intra- e peritumoral, visto que não houve expressão da proteína nos grupos submetidos à radioterapia independente da exposição à fumaça do cigarro.

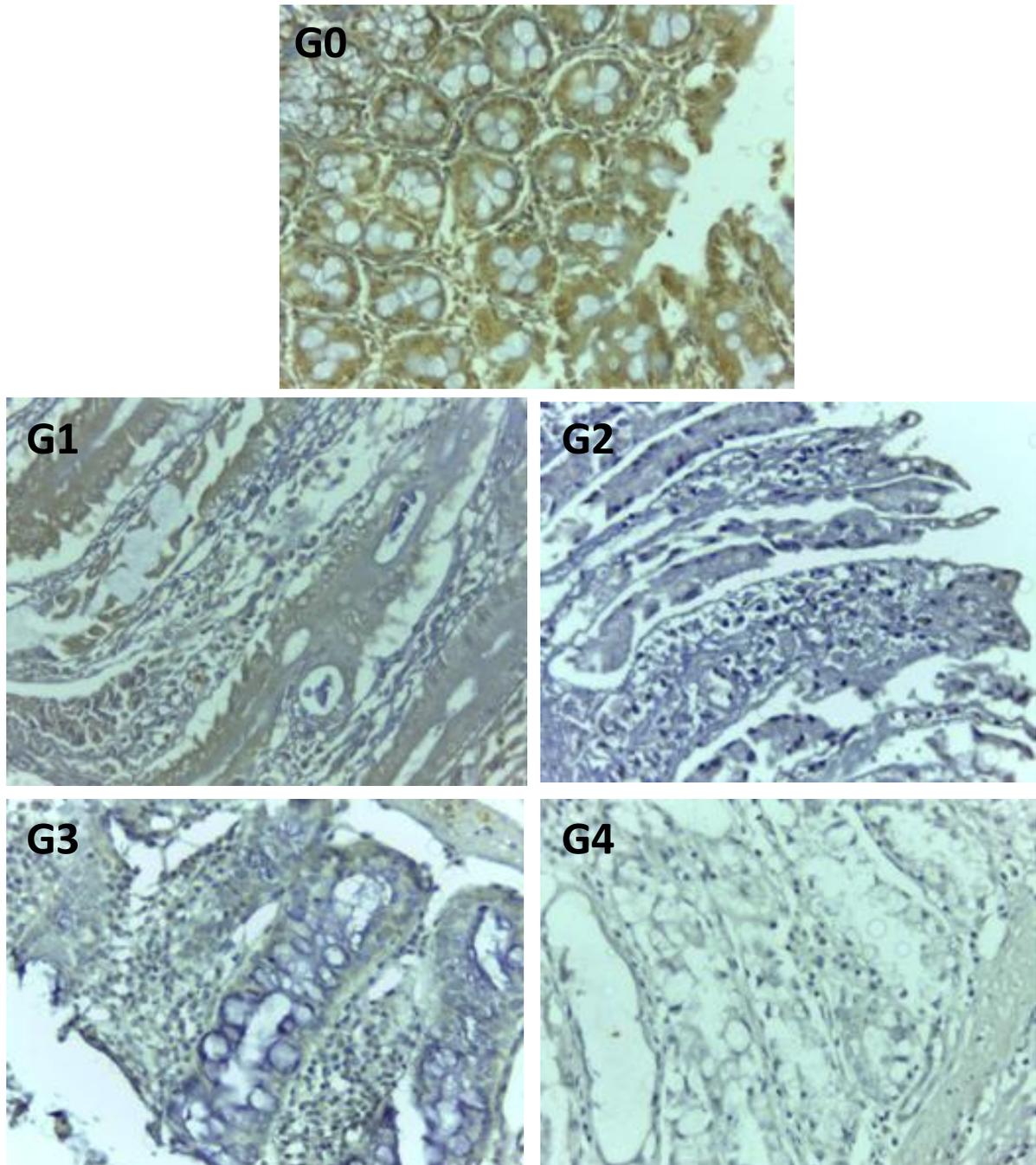


Figura 19 - Fotomicrografias de expressão da proteína RA2A em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia, com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.

A avaliação da expressão de RA2_A se assemelhou ou se diferiu entre os infiltrados tumorais e a célula tumoral, principalmente para averiguar se o efeito da radioterapia

nesta expressão ocorria apenas nas células imunológicas, uma vez que cada célula exerce função diferente e pode ter tido regulações e expressões diferentes.

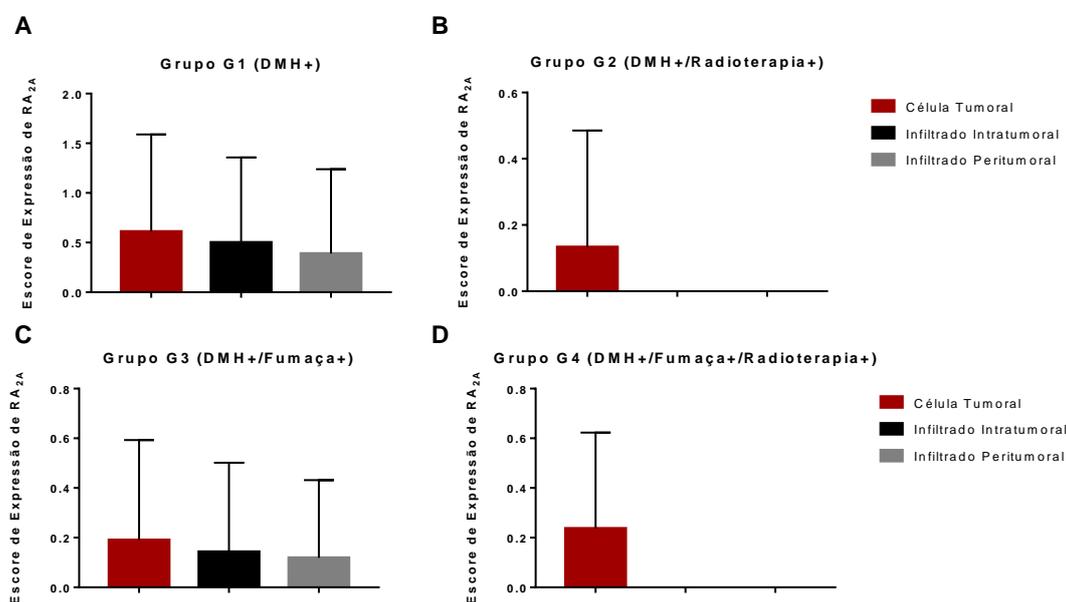


Figura 20 - Análise de expressão de RA_{2A} no infiltrado inflamatório intratumoral, peritumoral e célula tumoral nos grupos experimentais G1, G2, G3, G4 ilustrando diferença significativa de expressão entre os tipos celulares. A e C) A expressão de RA_{2A} foi semelhante entre os tipos celulares. B e D) Não foi possível avaliar diferença, pois a expressão de RA_{2A} foi negativa em ambos os infiltrados inflamatórios.

A expressão RA_{2A} no infiltrado intratumoral se assemelhou tanto à expressão nas células tumorais como no infiltrado peritumoral nos grupos G1 e G3 com $p > 0,9999$. Além disso, a expressão de RA_{2A} no infiltrado intratumoral se correlacionou tanto à expressão nas células tumorais como no infiltrado peritumoral também nos grupos G1 e G3 (Figura 20 e Tabela 4). Não foi possível avaliar a diferença e correlação nos grupos submetidos à radioterapia (G2 e G4), pois a expressão de RA_{2A} tanto no infiltrado intra- como no peritumoral foi negativa em ambos os grupos.

Esperava-se que com o aumento de expressão das proteínas da via de hipóxia, também haveria aumento do RA_{2A}. No entanto, enquanto que a radioterapia esteve relacionada com a expressão negativa de RA_{2A}, a fumaça do cigarro apresentou um efeito apenas de diminuir sua expressão.

Sendo assim, também buscamos verificar a imunossupressão local por outra via, que não fosse relacionado com a via de hipóxia estudando um marcador de imunossupressão relacionado apenas à inflamação, para assim verificarmos a

influência da fumaça do cigarro e da radioterapia no perfil de imunossupressão do microambiente.

Tabela 4 - Análise de variação e correlação da expressão de RA2_A no infiltrado intratumoral em relação à expressão na célula tumoral e no infiltrado peritumoral.

	Célula Tumoral		Infiltrado Peritumoral	
	Variância p valor	Correlação p valor; r	Variância p valor	Correlação p valor; r
G1	>0,9999	<0,0001***; 0,8186	>0,9999	0,0006**; 0,7315
G2	-	-	-	-
G3	>0,9999	p<0,0001***; 0,9974	>0,9999	0,0225*; 0,4951
G4	-	-	-	-

* p<0,05

** p<0,002

***p<0,0001

4.4.6. Foxp3

Para o estudo da resposta imunossupressora nos grupos avaliados também foi verificada a imunoexpressão da proteína Foxp3 nos infiltrados intra e peritumoral, onde ocorreu expressão positiva em todos os grupos exceto no grupo G4 em ambos os infiltrados inflamatórios.

No infiltrado intratumoral houve diferença significativa na expressão de Foxp3 entre os grupos (p<0,0001), esta expressão no grupo G1 foi significativamente maior em comparação aos demais grupos (G2, G3 e G4) com p<0,0001 em cada uma das combinações, mas os demais grupos não diferiram entre si (>0,9999) (Figura 21 e 22).

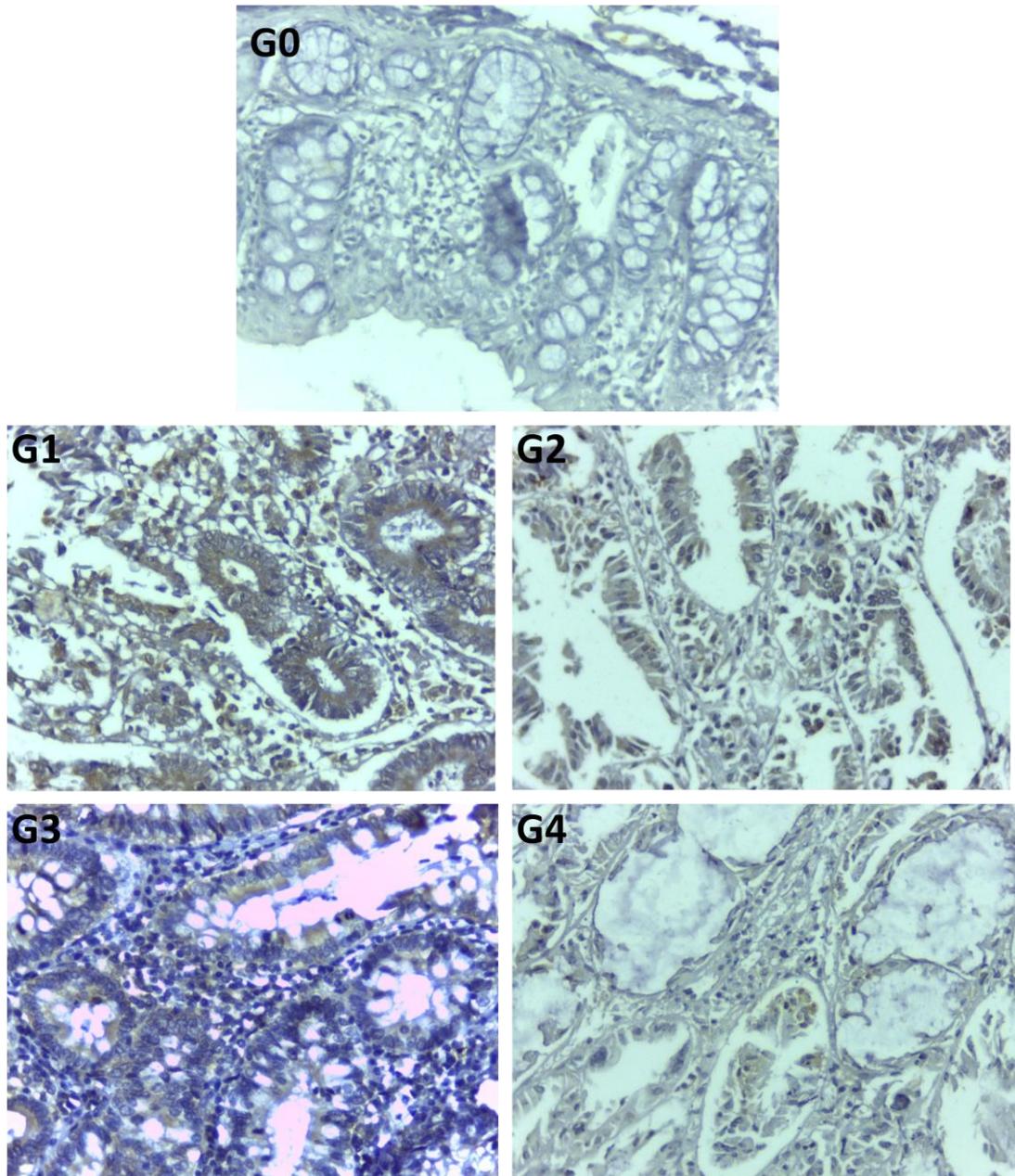


Figura 21 - Fotomicrografias de expressão da proteína Foxp3 em lesões em mucosa colorretal de ratos submetidos à carcinogênese com 1,2-dimetilhidrazina pertencentes ao Grupo saudável (G0), Grupo DMH (G1), Grupo DMH/Radioterapia (G2), Grupo DMH/Fumaça (G3) e Grupo DMH/Fumaça/Radioterapia (G4), com aumento de 400 vezes ilustrando o infiltrado inflamatório intratumoral.

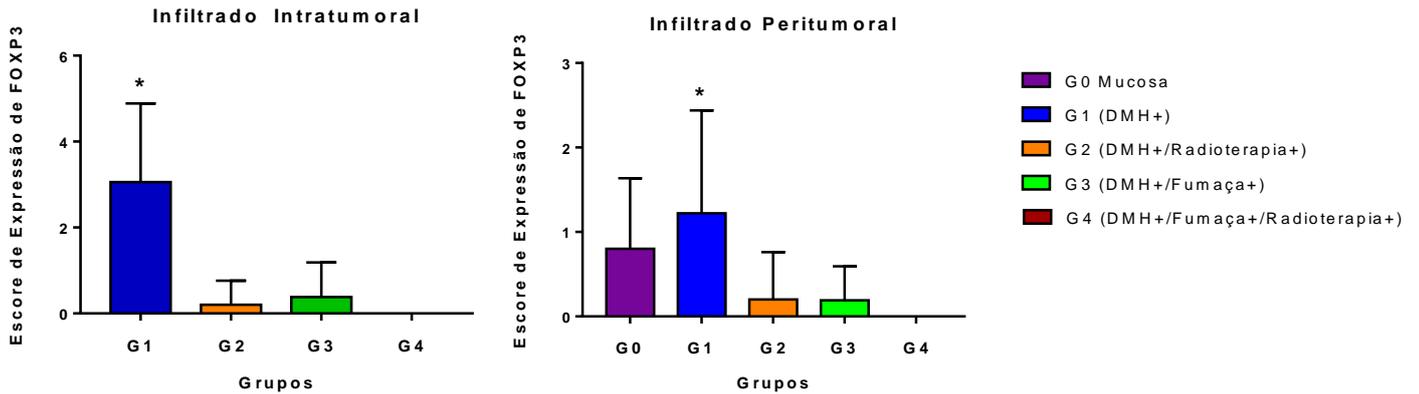


Figura 22 - Análise de expressão de Foxp3 nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral de adenocarcinoma tubular de câncer colorretal em modelo experimental. Notar diferença no escore de expressão de Foxp3. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos no infiltrado inflamatório intratumoral e * $p < 0,05$ em relação a G2, G3 e G4 no infiltrado peritumoral.

O infiltrado peritumoral também apresentou diferença significativa na expressão de Foxp3 nos grupos estudados ($p < 0,0001$), de modo que a diferença ocorria entre o grupo G1 em relação aos demais grupos com câncer (G2 $p = 0,0018$, G3 $p = 0,0012$ E G4 $p < 0,0001$), mas não houve diferença significativa entre o grupo G0 e G1 $p > 0,9999$.

No infiltrado inflamatório intratumoral o Two Way mostrou que a radioterapia e a exposição à fumaça do cigarro, bem como ambos em interação, apresentaram influência significativa na alteração de expressão de Foxp3 ($p < 0,0001$ para cada fator). De forma semelhante, os mesmos fatores apresentam influência significativa na alteração da expressão de Foxp3 no infiltrado inflamatório peritumoral (radioterapia - $p = 0,0004$, fumaça - $p = 0,0003$; interação entre radioterapia e fumaça - $p = 0,0127$).

Neste estudo também foi averiguada a diferença e correlação na expressão de Foxp3 entre os infiltrados intra- e peritumoral e a célula tumoral. Em todos os grupos, a expressão de Foxp3 no infiltrado inflamatório intratumoral era diferente da expressão em células tumorais e também não se correlacionavam. A expressão de Foxp3 foi semelhante apenas entre os infiltrados intra e peritumoral nos grupos G2 e G3, mas só se correlacionou em G3 ($p < 0,0001$; $r = 0,8059$). Além disso, a expressão negativa de Foxp3 ocorreu em ambos os infiltrados tumorais no grupo G4 (Figura 23).

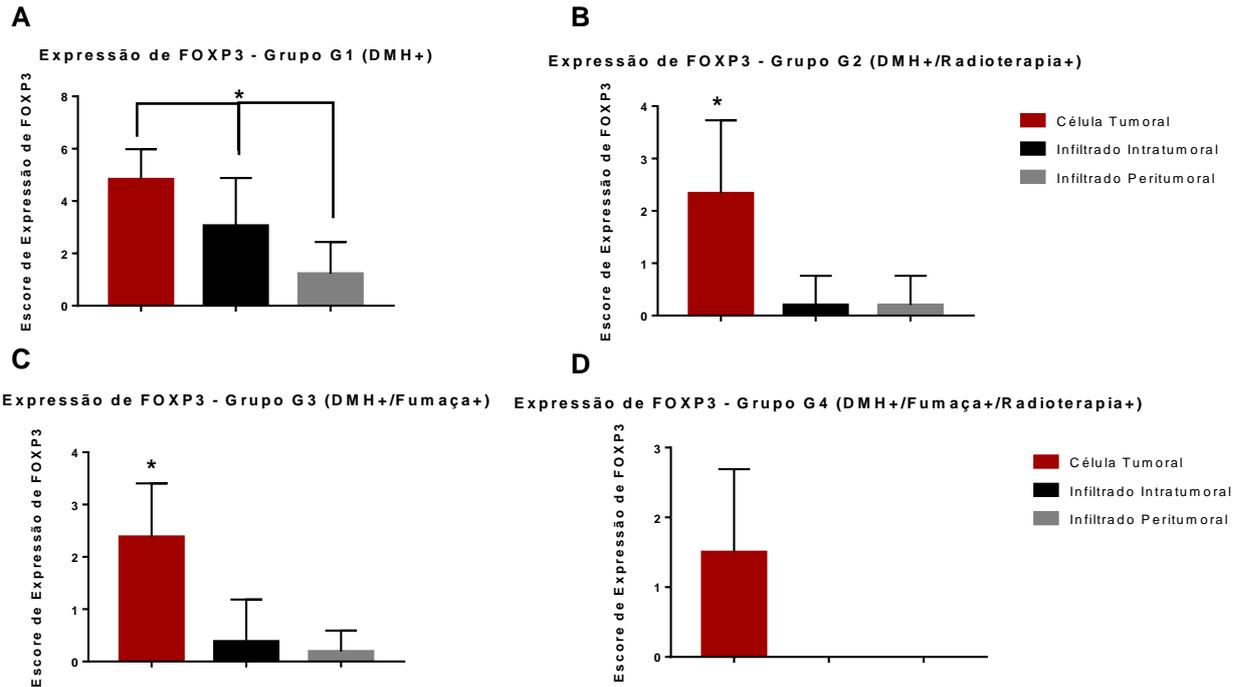


Figura 23 - Análise de expressão de Foxp3 no infiltrado inflamatório intratumoral, peritumoral e célula tumoral nos grupos experimentais G1, G2, G3, G4 ilustrando diferença significativa de expressão entre os tipos celulares. A) A expressão de Foxp3 foi diferente entre os três tipos celulares. B e C) A expressão de Foxp3 foi diferente apenas na célula tumoral. D) A expressão de Foxp3 no infiltrado intra e peritumoral foi negativa. * $p < 0,005$ Kruskal-Wallis com Post Hoc de Dunn.

A diferença de expressão de Foxp3 entre os tipos celulares nos diferentes grupos ocorreu de forma diversa. No entanto, em todos os grupos, esta expressão no infiltrado intratumoral era diferente da expressão na célula tumoral. E a baixa expressão de Foxp3 nos infiltrados intra- e peritumoral nos grupos expostos à fumaça do cigarro e/ou à radioterapia seguiu o perfil de expressão mostrado por RA2_A.

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na discussão foram divididos em tópicos para melhor compreensão, conforme dispostos abaixo.

5.1. Características Histopatológicas

Nossos resultados não mostraram diferença nas características histopatológicas e no número de lesões por grupo, mesmo sendo submetidos à exposição de diferentes fatores como fumaça do cigarro e radioterapia. A semelhança destas características nos diferentes grupos mostra a eficácia do DMH na indução de lesões homogêneas num trabalho em que se almejava estudar a expressão das proteínas de acordo com os fatores de expressão com o mínimo de interferência possível.

Outro ponto importante do presente estudo foi a similaridade apresentada entre as características histopatológicas dos tumores do modelo experimental com aquelas encontradas em seres humanos, o que nos permite extrapolar os dados aqui apresentados para o estudo em neoplasias humanas (FLEMING *et al.*, 2012; PERSE e CERAR, 2011).

Algumas características histopatológicas como inflamação, figuras de mitose e necrose, apresentaram um aspecto mais maligno no grupo G1, que não foi exposto a nenhum fator, e este aspecto ia perdendo a malignidade à medida em que os grupos foram sendo submetidos à exposição da fumaça e radioterapia, até que no grupo G4, exposto a ambos os fatores, estas características apresentavam um perfil ainda menos maligno, sugerindo uma relação inversa entre a exposição à fumaça e radioterapia com características histopatológicas mais brandas.

Interessantemente, quanto à análise de necrose do tecido após a radioterapia, o grupo exposto à fumaça do cigarro (G4) apresentava muito mais necrose do que o grupo não exposto (G2). Esses achados foram confirmados pela avaliação do índice apoptótico verificado por imunohistoquímica da caspase3-clivada que se mostrou maior no grupo exposto à fumaça e radioterapia (G4) do que no grupo exposto apenas à radioterapia (G2). Ou seja, parece que os indivíduos expostos à fumaça do

cigarro apresentaram uma melhor responsividade ao tratamento radioterápico do que os não expostos na morte de células tumorais.

Os dados apresentados acima nos pareceram bastante diferentes do esperado, uma vez que a fumaça do cigarro é amplamente conhecida por conter compostos carcinogênicos e co-carcinogênicos (FOWLES e DYBING, 2003; SALNIKOW *et al.*, 2000) que deveriam promover piores características histopatológicas e uma pior resposta à radioterapia nos indivíduos tabagistas.

No entanto, de acordo com estes resultados obtidos, é possível sugerir que entre os componentes do cigarro, que são mais de 7.000 (e não foram objeto deste estudo), existam alguns com atividade protetora, anti-inflamatória e até citoprotetora que possam favorecer aspectos histopatológicos de menor malignidade e melhor resposta ao tratamento radioterápico.

De fato, após a revisão da literatura, alguns estudos mostram que a fumaça do cigarro não causa danos histopatológicos ou macroscópicos no intestino, e, de modo geral, o fumo parece exercer um efeito favorável no cólon, sendo a maioria deles de caráter “tolerogênico”, tolerando mais os danos sofridos (CABRAL e BARBOSA, 2014), mostrando um efeito protetor da fumaça do cigarro no intestino de modelo experimental de inflamação.

5.2. Expressão de Proteínas

Este estudo analisou a diferença de expressão das proteínas PHD3, HIF-1 α , VEGF, SOD-1, RA2_A e Foxp3 nos infiltrados inflamatórios intra e peritumorais, de acordo com a exposição à fumaça do cigarro e/ou radioterapia.

A proteína PHD3, reguladora do complexo HIF-1 esteve presente em todos os grupos estudados e, como esperado, não variou com a exposição à fumaça ou à radioterapia. Sua expressão foi verificada neste estudo para que fosse possível avaliar se, na ocorrência de alteração de expressão de HIF-1 α , ela estaria sendo modificada apenas por fatores ambientais e não pela expressão assimétrica de PHD3 entre os grupos.

No entanto, PHD3 se apresentou maior no grupo sem câncer (G0) do que nos grupos experimentais com câncer (G1 a G4). É possível que esta baixa expressão de PHD3 encontrada nos tecidos tumorais seja devido ao controle epigenético comumente observado em câncer colorretal.

Os mecanismos pelos quais a PHD3 pode ser regulada ainda não estão completamente elucidados. Interessantemente, estudos mostraram que a hiper ou hipometilação ilha CpG na região promotora dos genes de PHD estão relacionados com alterações de sua expressão (KONDO, 2009). Em câncer colorretal, foram identificados níveis aumentados da metilação destes genes, quando comparados com o epitélio do cólon normal observados nos mesmos indivíduos. Estas alterações epigenéticas foram associadas a uma diminuição significativa dos níveis de expressão da PHD3 em pacientes com câncer colorretal (RAWLUSZKO *et al.*, 2013).

Em relação à expressão de HIF-1 α , ao ser avaliada no infiltrado peritumoral e no infiltrado presente na mucosa saudável (G0) foi visto que sua expressão foi maior no tecido saudável do que no tecido tumoral, um resultado também inesperado, pois a literatura mostra que a expressão de HIF-1 α é maior em tumores sólidos em virtude do ambiente hipóxico e devido a alterações do microambiente tumoral (SEMENZA, 2003; SEMENZA, 2012a; SEMENZA, 2012b).

No entanto, esta elevada expressão de HIF-1 α no intestino saudável pode ter ocorrido pois, como visto, este tecido apresenta uma hipóxia fisiológica em virtude de uma série de fatores que afetam a concentração e distribuição do oxigênio neste órgão como o fluxo contra-corrente do sangue (SONNWEBER *et al.*, 2014; ZHENG, KELLY e COLGAN, 2015), flutuação de perfusão sanguínea ao longo do dia (COLGAN, 2010) e difusão de oxigênio até o lúmen (SHEPHERD, 1982).

Em relação à expressão de HIF-1 α no infiltrado inflamatório intratumoral, nem a fumaça do cigarro nem a radioterapia exerceram influência para que houvesse alteração de sua expressão em qualquer um dos grupos estudados. Esta expressão no infiltrado intratumoral se mostrou bastante homogênea em todos os grupos, o que nos levou a considerar a possibilidade de que algum fator pudesse permitir essa manutenção de expressão, uma vez que no infiltrado inflamatório peritumoral houve alteração de expressão da HIF-1 α sob exposição à fumaça e radioterapia.

Nesse caso, é possível que exista uma interação das células do sistema imune com as células tumorais no microambiente tumoral, modulado de maneira própria, mantendo a expressão de HIF-1 α inalterada neste local, porém com alteração na expressão no infiltrado peritumoral. Estes dados concordam com o que foi exposto por Mendes *et al.* (2014) em que a expressão de HIF-1 α no infiltrado inflamatório peritumoral exerce um efeito muito mais significativo no prognóstico dos pacientes em relação à mesma expressão no infiltrado intratumoral, que não era tão decisiva na prognóstico.

Já no infiltrado inflamatório peritumoral, foi observada alteração da expressão de HIF-1 α entre os grupos. Interessantemente a exposição à fumaça do cigarro não modulou a expressão desta proteína como esperado. A alteração da expressão de HIF-1 α ocorreu apenas sob exposição à radioterapia (grupos G2 e G4), que aumentou sua expressão independente da presença ou não da fumaça do cigarro. Neste sentido, a literatura mostra que a radioterapia pode elevar a expressão de HIF-1 α , pois, após a irradiação, ocorre uma reoxigenação do microambiente, que resulta na geração de estresse oxidativo promovendo a expressão desta proteína (MOELLER *et al.*, 2004; MOELLER e DEWHIRST, 2006).

Além disso, a literatura também mostra que a expressão de HIF-1 α pode promover uma melhor resposta à radioterapia em vista que o complexo HIF-1 desencadeia a transcrição de genes associados à angiogênese que induz a vascularização do tumor, aumento da oxigenação e da concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pós-radioterapia, que poderia tornar estes tumores mais responsivos ao tratamento radioterápico (MOELLER e DEWHIRST, 2006; ROOTS e SMITH, 1974).

No entanto, nossos resultados não mostraram a influência da expressão de HIF-1 α na melhor resposta à radioterapia, pois sua expressão era similar tanto nos indivíduos expostos (G4) quanto nos não expostos à fumaça do cigarro (G2). Entretanto nossos dados mostraram que os tabagistas (G4) apresentaram melhor resposta à radioterapia do que os não tabagistas (G2), então parece que a HIF-1 α não esteve relacionada à melhor resposta ao tratamento, e que, talvez esta melhor resposta ao tratamento não tenha sido em virtude desta expressão e sim por outros fatores como o estresse oxidativo do microambiente, discutido a diante.

Apesar de não termos mostrado que a melhor resposta à radioterapia ocorreu em virtude da expressão de HIF-1 α , todos estes dados se cruzam no grupo G4, onde os indivíduos foram expostos à fumaça e à radioterapia, apresentaram uma maior expressão de HIF-1 α e também uma melhor resposta ao tratamento radioterápico (evidenciado pelo número de mortes de células tumorais).

Neste sentido, extrapolando hipoteticamente para humanos, é possível que haja uma pior resposta à radioterapia em pacientes não tabagistas decorrente de menor apoptose de células tumorais. Porém após a radioterapia, é esperado que ocorra aumento da expressão de HIF-1 α no infiltrado inflamatório peritumoral que ficará presente no microambiente com a transcrição de genes de progressão tumoral e imunossupressão e, por consequência, promoção de um pior prognóstico. Essa hipótese está embasada por Mendes e colaboradores (2014) que observaram um pior prognóstico relacionado à elevada expressão de HIF-1 α no infiltrado inflamatório peritumoral.

Desta forma, o presente estudo mostra uma grande importância na avaliação da expressão de HIF-1 α nos infiltrados inflamatórios tumorais e sua correlação com os hábitos do pacientes, pois esta conduta pode permitir uma melhor tomada de decisão para a escolha terapêutica dos pacientes com câncer, pois, uma vez que os efeitos desta proteína no tumor e no paciente são bem conhecidos, tal avaliação indicaria os possíveis caminhos que podem ser tomados pela doença após expressão e efeito desta proteína.

Ainda sobre o desenvolvimento e progressão tumoral, um importante fator de crescimento relacionado a este processo é o VEGF que age na formação de novos vasos sanguíneos e pode auxiliar no crescimento tumoral (CARMELIET e JAIN, 2011; HANAHAN e WEINBERG, 2011). No entanto, nossos resultados não mostraram qualquer alteração na expressão de VEGF independente dos fatores a que os grupos foram expostos (fumaça e radioterapia).

Por muito tempo o VEGF tem sido considerado um dos principais fatores de crescimento envolvidos na progressão tumoral transcrito do complexo HIF-1. Desta forma, esperávamos que uma elevada expressão de HIF-1 α estivesse relacionada a um aumento de expressão de VEGF, contudo mesmo com a expressão de HIF-1 α sendo alterada pelos fatores de exposição, a expressão de VEGF se manteve

constante de modo que, além de não variar entre os grupos, ele também não variou entre infiltrado intratumoral, peritumoral, ou célula tumoral, ou seja, em todos os grupos e tipos celulares, sua expressão se manteve semelhante.

Para o nosso estudo o VEGF não foi um fator que nos permitiu observar qual grupo estaria mais propício a desenvolver uma maior progressão tumoral, nem melhor resposta à radioterapia. Pois em todas as situações a sua expressão foi a mesma.

Porém, esta elevada e constante expressão de VEGF nos infiltrados tumorais pode ser explicada pela literatura, que mostra que o VEGF apresenta uma grande relação com a inflamação (ARDELEAN *et al.*, 2014; SHAIK-DASTHAGIRISAHEB *et al.*, 2013). Como visto, microambientes inflamatórios normalmente são hipóxicos, e a efetividade das células inflamatórias depende de um bom fluxo, aporte e fonte de oxigênio (DEHNE e BRUNE, 2009; SEMENZA, 2003; SITKOVSKY e LUKASHEV, 2005). Neste caso, é comum ocorrer a expressão desta proteína em células inflamatórias apontando uma atividade pró-inflamatória destas células, pois é uma proteína efetora naquele microambiente e normalmente tem sua expressão induzida por citocinas (BOESIGER *et al.* 1998; YAMAUCHI *et al.*, 2009).

Além de sua importância na ação pró-inflamatória, a expressão de VEGF também é importante na resolução de respostas imunológicas, homeostase e reparo do tecido local, pois, após exagerada resposta imunológica comumente ocorre lesão tecidual, e a expressão de VEGF é benéfica nestes casos auxiliando na revascularização do tecido promovendo sua recuperação (HORMBREY *et al.*, 2002).

Uma vez que a exposição à fumaça do cigarro e radioterapia pode alterar o estresse oxidativo do microambiente tumoral e a expressão das proteínas do presente estudo, também buscamos estudar a expressão da Superóxido Dismutase-1, envolvida no bloqueio de radicais livres, nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral para averiguação do estresse oxidativo após a exposição a estes fatores.

Como esperado, a expressão de SOD-1 nos intestinos saudáveis (G0) foi baixa, e no grupo com câncer (G1), sua expressão foi elevada. No entanto, nos grupos expostos à radioterapia (G2) ou à fumaça do cigarro (G3) sua expressão foi

reduzida. A exposição tanto à fumaça do cigarro quanto à radioterapia (G4) aumentou a expressão de SOD-1 significativamente.

No microambiente tumoral, é comum que haja uma elevada expressão de SOD-1, uma vez que este microambiente é frequente a presença de espécies reativas em virtude do metabolismo aberrante (PLACE e DOMANN, 2013). Desta forma, são vários os fatores de transcrição que regulam a expressão de SOD-1, principalmente os que são sensíveis ao estresse oxidativo, como a proteína AP-1 e o NF- κ B, que estão entre os componentes importantes da resposta celular em situação de estresse oxidativo e que também participam da sobrevivência ou morte celular em caso de elevados níveis de radicais livres (KARIN, 1999; SHAULIAN e KARIN, 2002; BUBICI *et al.*, 2006).

Nos grupos expostos ou à radioterapia (G2) ou à fumaça do cigarro (G3) a expressão de SOD-1 foi menor do que em G1 e em G4. Neste sentido, estudos mostram que quando a expressão de SOD-1 é silenciada, o estresse oxidativo aumenta (SAJESH e MCMANUS, 2015). Esta afirmação nos faz questionar se o resultado desta baixa expressão em SOD-1 pode ter permitido a ocorrência de mais radicais livres no ambiente.

É possível que em G2 e em G3 possa ter ocorrido uma menor taxa de radicais livres, que não foram capazes de induzir o aumento da expressão de SOD-1. Isto pode estar relacionado ao fato de que em G2 foi observada a uma pior resposta à radioterapia, provavelmente porque não foi gerada uma taxa de radicais livres tão alta a ponto de lesionar um maior número de células tumorais.

Além disso, os dados histopatológicos em G3 eram brandos, e como comentado anteriormente, a fumaça apresentou um efeito tolerogênico no intestino, o que pode estar relacionado também a uma baixa taxa de radicais livres presentes no microambiente resultando na baixa expressão de SOD-1.

Já no grupo G4, em relação à expressão de SOD-1 após tratamento radioterápico, sugerimos que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, geradas pela radioterapia e fumaça em sinergia, tenha exigido a transcrição de maior número de moléculas dessa enzima antioxidante. Este aumento de estresse oxidativo evidenciado pela forte expressão de SOD-1 no grupo G4 pode ter sido decisivo na

melhor resposta à radioterapia encontrada neste grupo e que, após a expressão e função de SOD-1, pode ter ocorrido uma redução no estresse oxidativo que fosse capaz de causar danos lesivos ao tecido. Mantendo talvez a quantidade mínima de radicais livres responsáveis pela ação pró inflamatória anti neoplásica das células inflamatórias.

Com este estudo podemos observar como estaria o estresse oxidativo na presença e ausência da exposição à fumaça e radioterapia nas células inflamatórias, e talvez relacionar o estresse oxidativo com sua função inflamatória em tumores de pacientes nestas condições, uma vez que a presença de radicais livres é uma característica comum da resposta pró-inflamatória (DEHNE e BRUNE, 2009) e de resposta à radioterapia (MOELLER *et al.*, 2004; MOELLER E DEWHRIST, 2006).

Buscando entender as razões pelas quais a expressão de HIF-1 α no infiltrado inflamatório peritumoral poderia estar relacionada a um pior prognóstico, a literatura mostra que esta expressão poderia ser capaz de induzir a imunossupressão pela expressão do imunossupressor RA2_A. Visto que os fatores de exposição poderiam afetar a expressão de HIF-1 α , imaginamos que esta exposição também poderia afetar todo o resultado de sua via.

Neste contexto, a exposição à radioterapia, de modo geral, diminuiu a expressão de RA2_A em células do infiltrado inflamatório peritumoral. De fato, a expressão desta proteína esteve mais forte no tecido normal, menor no tecido tumoral e, negativa nos grupos submetidos à radioterapia (G2 e G4). Esses dados são interessantes na melhora da vigilância imunológica e na resposta anti-neoplásica após a radioterapia, pois na ausência de um imunossupressor, as células do sistema imune ainda presentes no microambiente possuem atividade pró-inflamatória e podem ser capazes de combater o tumor até a total resolução desta resposta anti-neoplásica.

Adicionalmente, nos grupos com radioterapia (G2 e G4), a expressão de RA2_A nos infiltrados intra e peritumoral foi negativa, no entanto, havia expressão nas células tumorais. Isto pode indicar que o efeito da radioterapia não ocorreu no microambiente tumoral como um todo na expressão de RA2_A, seu efeito se deu apenas nas células dos infiltrados tumorais.

Uma das possibilidades decorrente do efeito da radioterapia na eliminação das células tumorais e da indução de resposta inflamatória pelas células do sistema imune, com isso, ocorre a diminuição da imunossupressão gerada por RA2_A, com supressão da expressão após o tratamento.

Para melhor avaliação do perfil imunossupressor nestes indivíduos, de acordo com os fatores expostos, buscou-se também estudar a expressão de Foxp3, o principal marcador para imunossupressão.

No grupo apenas com câncer, sem exposição aos fatores, a expressão de Foxp3 esteve bem elevada, possivelmente pelo fato de que no tumor, de modo geral, ocorre uma atividade imunossupressora como um mecanismo de escape da vigilância imunológica do tumor, permitindo o crescimento tumoral (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007).

Desta forma, a elevada de Foxp3 no grupo com câncer (G1) estaria relacionada a uma maior probabilidade de progressão tumoral, e, porventura, um pior prognóstico dos indivíduos nestas condições.

Nos grupos G2 e G3 a expressão de Foxp3 foi menor, concordando com os dados apresentados por RA2_A em que a radioterapia elimina as células tumorais que poderiam ser responsáveis por induzir sua expressão, e a fumaça apresenta um efeito tolerogênico além de todas as características tumorais mais brandas, então é plausível que haja uma menor imunossupressão neste grupo também.

Como comentado anteriormente, a expressão do Foxp3 caracteriza células T reguladoras e, o impacto da presença destas células tem sido demonstrado como relacionada à redução destas células em sangue periférico de pacientes com câncer colorretal, o que leva a um aumento das respostas T efetoras contra o crescimento tumoral (BONERTZ *et al.*, 2009; CLARKE *et al.*, 2006), então é possível que o mesmo possa ocorrer na redução destas células no microambiente tumoral.

Avaliando a expressão desta proteína no infiltrado intra e peritumoral e na célula tumoral, foi observado que nesta última, a expressão de Foxp3 era alta, como ocorria também na expressão de RA2_A, em que o efeito da radioterapia na alteração de sua expressão ocorreu apenas nas células inflamatórias e provavelmente, a presença desta proteína nas células tumorais poderia estar relacionada à tentativa

de escape da vigilância imunológica por meio da produção de fatores de imunossupressão.

O conjunto destas proteínas foi avaliado quanto à sua expressão, pois Mendes e colaboradores em 2014 mostraram que a elevada expressão de HIF-1 α no infiltrado inflamatório peritumoral estava relacionada a um pior prognóstico, e, com base na literatura, este pior prognóstico poderia ter ocorrido em virtude da transcrição de fatores de crescimento (como o VEGF) responsáveis pela progressão tumoral, ou também pela indução da imunossupressão ativando a expressão de RA2_A. No entanto, nossos dados não mostraram influência da expressão de HIF-1 α na expressão de VEGF mesmo sob exposição à fumaça e radioterapia. Além disso, HIF-1 α não induziu o aumento de RA2_A em nosso trabalho, como proposto pela literatura.

Nos grupos submetidos à radioterapia (G2 e G4) a expressão de HIF-1 α foi elevada, no entanto, nestes dois grupos a expressão de RA2_A foi negativa, mostrando que, provavelmente, a regulação da expressão deste receptor não foi modulada por HIF-1 α , mas por outros mecanismos moleculares que nosso trabalho não avaliou, apesar de sabermos quais os fatores de exposição estiveram relacionados à esta expressão.

Efetivamente, o presente estudo mostrou um resultado interessante no grupo G4 (DMH/Fumaça/Radioterapia) que nos leva a hipotetizar a seguinte situação: com uma melhor resposta à radioterapia, maior taxa de morte de células tumorais, elevada expressão de SOD-1, presente para eliminar os radicais livres que poderiam ser prejudiciais aos tecidos, com isso, haveria uma melhor recuperação do local e impedindo que houvesse uma nova situação de iniciação carcinogênica.

Além disso, neste grupo não houve expressão dos imunossupressores RA2_A e Foxp3, mesmo com células inflamatórias ali presentes, ou seja, uma vez que estas células não estão imunossuprimidas, elas podem ser células efetoras que provavelmente irão exercer sua função anti-neoplásica e combater as células tumorais restantes ali naquele microambiente.

Apesar do esperado, de que a fumaça estaria relacionada à piores características histopatológicas e moleculares, foi observado que a submissão destes indivíduos ao

tratamento radioterápico alterou o perfil das características tumorais para um estado mais benéfico.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho avaliou a influência da exposição à fumaça do cigarro e radioterapia na expressão das proteínas PHD3, HIF-1 α , VEGF, SOD-1, RA2_A e Foxp3 em células do infiltrado inflamatório intra e peritumoral de câncer colorretal induzido em ratos.

A exposição à fumaça e a radioterapia não alterou o número de lesões entre os grupos, mas gerou melhores características histopatológicas e moleculares além de melhor resposta à radioterapia, enquanto que apenas a presença do tumor, sem a exposição a estes fatores resultou em características histopatológicas relacionadas a uma maior malignidade, que provavelmente poderia estar relacionada a um pior prognóstico.

A exposição a estes fatores também alterou a expressão das proteínas estudadas nos infiltrados inflamatórios intra e peritumoral. Isto evidencia o quanto os dados na literatura ainda podem ser controversos necessitando de mais estudos para elucidar estas questões.

A expressão das proteínas difere entre o infiltrado inflamatório intratumoral, peritumoral e célula tumoral, evidenciando a importância do estudo de expressão e função das proteínas em células diferentes que podem ter resultados e aplicações diferentes.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª edição, São Paulo, Elsevier Editora Ltda. 2007.

ADAMS J, CARDER PJ, DOWNEY S, FORBES MA, MACLENNAN K, ALLGAR V, et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Breast Cancer: Comparison of Plasma, Serum, and Tissue VEGF and Microvessel Density and Effects of Tamoxifen. *Cancer Res*. 2000;60:2898–905.

ALBENBERG, L.; ESIPOVA, T. V.; JUDGE, C. P.; BITTINGER, K.; CHEN, J.; LAUGHLIN, A.; GRUNBERG, S.; BALDASSANO, R. N.; LEWIS, J. D.; LI, H.; THOM, S. R.; BUSHMAN, F. D.; VINOGRADOV, S. A.; WU, G. D. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology*, v. 18, 2014, p. 1055–1063.

APPELHOFF, R. J.; TIAN, Y. M.; RAVAL, R. R.; TURLEY, H.; HARRIS, A. L.; PUGH, C. W.; RATCLIFFE, P. J.; GLEADLE, J. M: Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 279, n. 37, 2004, p. 38458–38465.

ARMSTRONG, J.M.; CHEN, J. F.; SCHWARZSCHILD, M. A.; APASOV, S.; SMITH, P. T.; CALDWELL, C.; CHEN, P.; FIGLER, H.; SULLIVAN, G.; FINK, S.; LINDEN, J.; SITKOVSKY, M. Gene dose effect reveals no Gs-coupled A2A adenosine receptor reserve in murine T-lymphocytes: studies of cells from A2A-receptor-gene- deficient mice. *Biochem. J*. v. 354, 2001p. 123–130,.

BAEK JH, MAHON PC, OH J, et al. OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1_α and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1 α . *Mol Cell*. 2005; 17: 503–512

BALKWILL F, MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539–45.

BANCI, L.; BERTINI, I.; CRAMARO, F.; DEL CONTE, R.; VIEZZOLI, M. S. The solution structure of reduced dimeric copper zinc superoxide dismutase. The structural effects of dimerization. *European Journal of Biochemistry*, v. 269, n. 7, 2002, p. 1905–1915

BENCI, JL, XU B, QIU Y, WU TJ, DADA H, VICTOR CTS, CUCOLO L, LEE DSM, PAUKEN KE, HUANG AC, GANGADHAR TC, AMARAVADI RK, SCHUCHTER LM, FELDMAN MD, ISHWARAN H, VONDERHEIDE RB, MAITY A, WHERRY EJ, MINN A. Tumor interferon signaling regulates a multigenic resistance program to immune checkpoint blockade. *Cell*. 2016 Dec 1;167(6):1540-1554.e12

BENJAMINI, E., COICO, R. e SUNSHINE, G. *Imunologia*. 4ª edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A. 2002.

BOESIGER J, TSAI M, MAURER M, YAMAGUCHI M, BROWN LF, CLAFFEY KP, DVORAK HF, GALLI SJ. Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of Fcε receptor I expression. *J Exp Med* 1998; 188:1135-45

BONERTZ A, WEITZ J, PIETSCH DH, RAHBARI NN, SCHLUDE C, GE Y, JUENGER S, VLODAVSKY I, KHAZAIE K, JAEGER D, REISSFELDER C, ANTOLOVIC D, AIGNER M, KOCH M, BECKHOVE P. Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma. *J Clin Invest*, 2009, 119(11):3311–3321

BRAHIMI-HORN C, MAZURE N, POUYSSEGUR J. Signalling via the hypoxia inducible factor-1α requires multiple post translational modifications. *Cell Signal*. 2005; 17:1-9.

BRAMBILLA, E.; PONTE, M. D.; RUSCHEL, L. G.; BOSI, H. R.; BRAGA, G. L.; SILVA, P. G. Staging of colorectal cancer in the private service versus Brazilian National Public Health System: what has changed after five years? *Journal of Coloproctology*. v. 32, n. 2, 2012, p. 144-147.

BRUICK RK, MCKNIGHT SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001; 294:1337-40.

BRUICK RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(16):9082-7.

BRUICK RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev*. 2003; 17(21):2614-23

BRUNE B, ZHOU J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovasc*. 2007; 75 275–282.

BUBICI, C.; PAPA, S.; PHAM, C. G.; ZAZZERONI, F.; FRANZOSO, G. The NF-κB-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histology and Histopathology*, v. 21, 2006, p. 69–80.

CABRAL, P.; BARBOSA, E. Tobacco and inflammatory bowel disease. *Revista Portuguesa de Coloproctologia*, mai/out, 2014, p. 14-22.

CARMELIET, P.; JAIN, R. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, v.473, 2011.

CARUSO R V, O'CONNOR, R J, STEPHENS W E, CUMMINGS M, FONG G T. Toxic Metal Concentrations in Cigarettes Obtained from U.S. Smokers in 2009:Results from the International Tobacco Control (ITC) United States Survey

Cohort. *International Journal Environmental Research and Public Health*, 2014, 11, 202-217.

CASARIL, M.; CORSO, F.; BASSI, A.; CAPRA, F.; GABRIELLI, G. B.; STANZIAL, A. M.; NICOLI, N.; CORROCHER, R. Decreased activity of scavenger enzymes in human hepatocellular carcinoma, but not in liver metastases. *International Journal of Clinical and Laboratorial Research*, v. 24, 1994, p. 94–97.

CHANDEL, N. S.; McCLINTOCK, D. S.; FELICIANO, C. E.; WOOD, T. M.; MELENDEZ, J. A.; RODRIGUEZ, A. M.; SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 275, n. 33, 2000, p. 25130-8.

CHEN, F.; DING, M.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. Carcinogenic metals and NF- κ B activation. *Mol Cell Biochem*, v. 222, 2001.p. 159–171.

CHEN, H.; COSTA, M. Iron- and 2-oxoglutarate-dependent Dioxygenases: an emerging group of molecular targets for nickel toxicity and carcinogenicity. *Biometals*. v. 22, n. 1, 2009 p. 191–196.

CHOWDHURY R, HARDY A, SCHOFIELD CJ. The human oxygen sensing machinery and its manipulation. *Chem Soc Rev*. 2008; 37:1308–1319.

CLARKE SL, BETTS GJ, PLANT A, WRIGHT KL, EL-SHANAWANY TM, HARROP R, TORKINGTON J, REES BI, WILLIAMS GT, GALLIMORE AM, GODKIN AJ. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS One*, 2006, 1:e129

COLGAN, S. P.; TAYLOR, C. T. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 7, 2010, p. 281–287.

CORPET, D. E. e PIERRE, F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *European Journal of Cancer*, v. 41, 2005, p. 1911-1922.

CUNNINGHAM, D.; ATKIN, W; LENZ, H. J.; LYNCH, H. T.; MINSKY, B.; NORDLINGER, B.; STARLING, N. Colorectal cancer. *Lancet*. v.375, 2010, p. 1030-47.

DECKING, U. K.; SCHLIEPER, G.; KROLL, K.; SCHRADER, J. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ. Res*, v.81, 1997.p.154–164.

DEHNE N, BRUNE B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Exp. Cell.* 2009; 315:1791-1797.

DELANEY G. et al. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal from a review of evidencebased clinical guidelines. *Cancer*, v. 104, 2005.p. 1129-1137.

DENARDO DG, COUSSENS LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2007;9(212):1-10.

DONG M, WAN X, YUAN ZY, et al. Low expression of Beclin 1 and elevated expression of HIF-1a refine distant metastasis risk and predict poor prognosis of ER-positive, HER2-negative breast cancer. *Med Oncol.* 2013; 30:355

ELLIS LM, HICKLIN DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8):579–91.

ELLIS LM, HICKLIN DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8):579–91.

EVANS AR, LIMP-FOSTER M, KELLEY MR: Going APE over ref-1. *Mutat Res*, v. 461(2), 2000, p. 83-108.

FEMIA, A. P. e CADERNI, G. Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Medica*, v. 74, n. 13, 2008, p. 1602-1607.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C.C. *Oncologia Molecular*. 2ª Edição, São Paulo, Editora Atheneu, 2010

FIALA, E. S. e STATHOPOULOS, C. Metabolism of methylazoxymethanol acetate in the F344 rat and strain-2 guinea pig and its inhibition by pyrazole and disulfiram. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 108, 1984, p. 129-134.

FIGUEIREDO, J. A.; CAMPOS, F. F.; MARCOS, A. J. F.; MAFRA, M. M. M.; MEYER DE, BARBOSA, S. D.; CUNHA JÚNIOR, G. F. Avaliação retrospectiva da sobrevida de 171 pacientes com câncer colorretal após seguimento de três anos. *Revista Médica de Minas Gerais*. v. 24, supl. 6, 2014, p. S72-S77.

FILLIES T, WERKMEISTER R, DIEST PJV, et al. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer.* 2005; 5:84

FLEMING, M.; RAVULA, S.; TATISHCHEV, S. F.; WANG, H. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. v. 3, n. 3, 2012, p. 153-173.

FOWLES J, DYBING E. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. *Tob Control*. 2003;12(4):424–430.

FRANCO, M. C.; DENNYS, C. N.; ROSSI, F. H.; ESTÉVEZ, A. G. Superoxide Dismutase and Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: ESTÉVEZ, A. *Current Advances in Amyotrophic Lateral Sclerosis*, Rijeka: InTech, 2013, p. 141-158. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/current-advances-in-amyotrophic-lateral-sclerosis/superoxide-dismutase-and-oxidative-stress-in-amyotrophic-lateral-sclerosis>> Acesso em 05 de fevereiro de 2017.

GATENBY, R. A.; KESSLER, H. B.; ROSENBLUM, J. S.; COIA, L. R.; MOLDOFSKY, P. J.; HARTZ, W. H.; BRODER, G. J. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v 14, 1988, p. 831–838.

GERALD D, BERRA E, FRAPART YM, et al. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*. 2004; 118 781–794.

GIOVANNUCCI, E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 10, n. 7, 2001, p. 725-731.

GRIVENNIKOV SI, GRETEN FR, KARIN M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883–99.

HANAHAN D, WEINBERG R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.

HELLWIG-BURGEL T, RUTKOWSKI K, METZEN E, et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factoralpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*. 1999; 94, 1561–1567.

HIRSILA, M.; KOIVUNEN, P.; GUNZLER, V.; KIVIRIKKO, K.I.; MYLLYHARJU, J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 278, 2003, p. 30772–30780.

HORMBREY E, GILLESPIE P, TURNER K, HAN C, ROBERTS A, MCGROUTHER D, ET AL. A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: is the current literature meaningful? *Clinical Exp Metastas*. 2002;19(8):651–63.

HUANG, L. E.; ARANY, Z.; LIVINGSTON, D. M.; et al. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*, v. 271, 1996 p.32253-32259.

HUANG, S.; APASOV, S.; KOSHIBA, M.; SITKOVSKY, M. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood*, v. 90, 1997 p.1600-1610.

IARC, International Agency for Research on cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal>. Acesso em: 03 fev. 2017

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2008/09: incidência de câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Rio de Janeiro, Brasil. 2010; www.inca.gov.br.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015, 122p. <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

INCA. Instituto nacional do câncer. Tipos de câncer, colorretal. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/tratamento>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

JHAM, B.C.; FREIRE, A.R.S. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e Pescoço. *Rev Bras Otorrinolaringol*, v.72, n.5, 2006.p.704-708.

JIN LH, BAHN JH, EUM WS, KWON HY, JANG SH, HAN KH, KANG TC, WON MH, KANG JH, CHO SW, et al : Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 2001, 31: 1509– 1519.

JOKILEHTO, T. e JAAKKOLA, P. M. The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. v. 14, n. 4, 2010, p. 758– 770.

JUNG, K.; SEIDEL, B.; RUDOLPH, B.; LEIN, M.; CRONAUER, M. V.; HENKE, W.; HAMPEL, G.; SCHNORR, D.; LOENING, S. A. Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 23, 1997, p. 127–133.

KAELIN WG JR, RATCLIFFE PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008; 30: 393–402.

KAELIN, W. G. JR. e RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell*. v. 30, 2008, p. 393–402.

KARACZYN AA, GOLEBIOWSKI F, KASPRZAK KS. Ni(II) affects ubiquitination of core histones H2B and H2A. *Exp Cell Res* 2006;312:3252–3259.

KARHAUSEN, J.; FURUTA, G. T.; TOMASZEWSKI, J. E.; JOHNSON, R. S.; COLGAN, S. P.; HAASE, V. H. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 114, 2004, p. 1098 – 1106.

KARIN, M. How NF- κ B is activated: the role of I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, v. 18, 1999, p. 6867–6874.

KASPRZAK, K.S., BUZARD, G.S. The role of metals in oxidative damage and redox cell signaling derangement. In: Koropatnick, J., Zalups, R. (Eds.), *Molecular Biology and Toxicology of Metals*. Taylor and Francis, London, 2000, pp. 477 – 527.

KAYA AO, GUNEL N, BENEKLI M, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha and carbonic anhydrase IX overexpression are associated with poor survival in breast cancer patients. *J Buon*. 2012; 17 (4) 663-8.

KOBAYASHI, S.; ZIMMERMANN, H.; MILLHORN, D. E. Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport. *J. Neurochem*, v. 74, 2000, p. 621–632.

KONDO, Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Medical Journal*, v. 50, n. 4, 2009, p. 455-463.

KOPKE LFF, BASTOS JCF, ANDRADE FILHO JS, GOUVÊA PS. Margem de segurança: um conceito antigo e relativo. *An Bras Dermatol*. 2005;80:279-86.

LANDO D, PEET DJ, GORMAN JJ, et al. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 2002; 16:1466-71.

LARANGEIRA, L. L. S.; TAHA, M. O.; FERME, A.; LEMOS, R.; PLAPLER, H. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1, 2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 13, n. 3, 1998.

LEE S, CHEN TT, BARBER CL, JORDAN MC, MURDOCK J, DESAI S, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*. 2007;130(4):691–703

LEE YW, KLEIN CB, KARGACIN B, SALNIKOW K, KITAHARA J, DOWJAT K, ZHITKOVICH A, CHRISTIE NT, COSTA M. Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Mol Cell Biol* 1995;15:2547–2557.

LEE, D. C.; SOHN, H. A.; PARK, Z. Y.; OH, S.; KANG, Y. K.; LEE, K. M.; KANG, M.;

LEEK RD, LANDERS R, FOX SB, NG F, HARRIS A L, LEWIS CE. Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. *Brit J Cancer*. 1998;77(12):2246–51.

LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, v. 41, 2001, p. 775–787.

LIOCHEV SI, FRIDOVICH I: Mechanism of the peroxidase activity of Cu, Zn superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 2010, 48: 1565 – 1569

LIU, E. S. L.; YE, Y.; SHIN, V. Y.; YUEN, S.; LEUNG, S.; WONG, B. C. Y.; CHO, C. Cigarette smoke exposure increases ulcerative colitis-associated colonic adenoma formation in mice. *Carcinogenesis*. v. 24, n. 8, 2003, p.1407-1413.

LOPES. A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, H. *Oncologia para a Graduação*. 3ª Edição, São Paulo, Editora Lemar, 2013.

MACARTHUR M, HOLD GL, EL-OMAR EM. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 286: 515-520.

MALHOTRA, R.; TYSON, D. G.; SONE, H.; AOKI, K.; KUMAGAI, A. K.; BROSIUS, F. C. Glucose uptake and adenoviral mediated GLUT1 infection decrease hypoxia-induced HIF-1alpha levels in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. v. 34, 2002, p. 1063-1073.

MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A, et al. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454: 436-444.

MARONE, G.; PLAUT, M.; LICHENSTEIN, L. M. Characterization of a specific adenosine receptor on human lymphocytes. *J Immunol*, v. 121, 1978, p.2153-2159.

McCORD, JM; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* , v. 244, 1969, p. 6049-6055.

MENDES SO, SANTOS MD, PETERLE GT, et al. HIF-1alpha Expression Profile in Intratumoral and Peritumoral Inflammatory Cells as a Prognostic Marker for Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *PLoS ONE*. 2014; 9(1): e84923.

MOELLER BJ, DEWHIRST MW. HIF-1 and tumour radiosensitivity. *Br J Cancer*. 2006; 95 (1):1-5.

MOELLER, B. J.; CAO, Y.; LI, C. Y.; DEWHIRST, M. W. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: Role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*, v. 5, n. 5, 2004, p. 429-41.

MOELLER, B. J.; DREHER, M. R.; RABBANI, Z. N.; SCHROEDER, T.; CAO, Y.; LI, C. Y.; DEWHIRST, M. W. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radio-sensitivity. *Cancer Cell*, v8, 2005, p. 99 – 110.

MOHAMMED ZMA, GOING JJ, EDWARDS J, et al. The role of the tumor inflammatory cell infiltrate in predicting recurrence and survival in patients with primary operable breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2012; 38: 943-955.

NAUSS, K. M.; LOCNISKAR, M.; PAVLINA, T.; NEWBERNE, P. M. Morphology and distribution of 1, 2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced colon tumors and their relationship to gut-associated lymphoid tissue in the rat. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 73, n. 4, 1984, p. 915-924.

NOEL W, RAES G, HASSANZADEH GG, DE BAETSELIER P, BESCHIN A. Alternatively activated macrophages during parasite infection. *Trends in Parasitology*. 2004;20(3):126-33.

PERŠE, M. e CERAR, A Dimethylhydrazine model is not appropriate for evaluating effect of ethanol on colorectal cancer. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, v. 99, 2007, p. 463-466.

PERŠE, M. e CERAR, A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011, :473964.

PETERLE GT, SANTOS M, MENDES SO, CARVALHO-NETO PB, MAIA LL, STUR E, AGOSTINI LP, SILVA CVM, TRIVILIN LO, NUNES FD, CARVALHO MB, TAJARA EH, LOURO ID, SILVA-CONFORTI AMA. FAS Ligand Expression in Inflammatory Infiltrate Lymphoid Cells as a Prognostic Marker in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Genetic Molecular Research* 2015. 14 (3):11145-11153
PLACE, T. L.; DOMANN, F.E. Prolyl-hydroxylase 3: Evolving roles for an ancient signaling protein. *Hypoxia*. v. 1, 2013, p. 13–17.

POLLARD, P. J.; LOENARZ, C.; MOLE, D. R.; McDONOUGH, M. A.; GLEADLE, J. N.; SCHOFIELD, C. J.; RATCLIFFE, P. J. Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *Biochem. J.*, v. 416, 2008, p. 387–394.

PUGH CW, O'ROURKE JF, NAGAO M, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*. 1997; 272:11205-14.

RANTANEN K, PURSIHEIMO J, HÖGEL H, et al. Prolyl Hydroxylase PHD3 Activates Oxygen-dependent Protein Aggregation. *Molecular Biology of the Cell*. 2008; 19:2231-2240.

RILEY PA: Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994, 65: 27– 33

ROOTS, R.; SMITH, K. C. On the nature of the oxygen effect on x-ray-induced DNA single-strand breaks in mammalian cells. *International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics Chemistry & Medicine*, v.26, 1974, p. 467 – 480.

ROSENBERG, D.; GIARDINA, C. e TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 30, n. 2, 2009, p. 183-196.

ROYNETTE, C. E.; CALDER, P. L.; DUPERTUIS, Y. M.; PICHARD, C. n-3 Polynsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clinical Nutrition*, v.23, 2004, p.139-151.

RUAS JL, POELLINGER L, PEREIRA T. Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem*. 2002; 277:38723-30.

SAJESH, B. V. e McMANUS, K. J. Targeting SOD1 induces synthetic lethal killing in BLM and CHECK2-deficient colorectal cancer cells. *Oncotarget*, v. 6, n. 29, 2015, p. 27907-27922.

SAKAGUCHI, S., e SAKAGUCHI, N. Thymus, T cells and autoimmunity: various causes but a common mechanism of autoimmune disease. In *Autoimmunity: Physiology and Disease*. Wiley-Liss, New York. 1994.

SALNIKOW K, ZHITKOVICH A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis nickel, arsenic and chromium. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21(1):28-44.

SALNIKOW, K.; BLAGOSKLONNY, M. V.; RYAN, H.; JOHNSON, R.; COSTA, M. Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. *Cancer Research*. v. 60, n. 1, 2000, p. 38-41.

SANTOS MD, MERCANTE AMDC, LOURO ID, et al. HIF1-Alpha Expression Predicts Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *PLoS ONE*; 2012; 7(9): e45228.

SCHAIBLE, B.; SCHAFFER, K.; TAYLOR, C. T. Hypoxia, innate immunity and infection in the lung. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, v. 174, 2010, p. 235– 243.

SCHARTE, M., HAN, X., BERTGES, D.J., FINK, M.P. AND DELUDE, R.L. Cytokines induce HIF-1 DNA binding and the expression of HIF-1-dependent genes in cultured rat enterocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2003; 284, 373–384.

SCHÖDER H, FURY M, LEE N, KRAUS D. Monitoring of therapy response in head and neck squamous cell carcinoma. *J Nucl Med. Pet* 2009 1:74-88.

SCHOFIELD, C. J. e RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. v. 5, 2004, p. 343-354.

SCHOPPMANN SF, FENZL A, NAGY K, UNGER S, BAYER G, GELEFF S, et al. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery*. 2006;139(6):839–46.

SEMENZA GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Bio*. 1999; 15: 551–78.

SEMENZA GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(10):721-32.

SEMENZA, GL. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell*. 2012a; 148(3):399-408.

SEMENZA, GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2012b; 33(4):207-14.

SHAULIAN, E. e KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology*, v. 4, 2002, E131–E136.

SHEPHERD, A. P. Metabolic control of intestinal oxygenation and blood flow. *Federation Proceedings*, v. 41, 1982, p. 2084 –2089.

SHIMIZU, J., YAMAZAKI, S. e SAKAGUCHI, S. Induction of Tumor Immunity by Removing CD25⁺ CD4⁺ T Cells: A Common Basis Between Tumor Immunity and Autoimmunity. *J Immunol* 1999; 163:5211-5218

SICA A, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012; 122(3):787-95.

SIEGEL, R.; DESANTIS, C.; JEMAL, A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. v. 62, n. 2, 2014, p. 104-117.

SITKOVSKY, M. V. Use of the A_{2A} adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. *Biochemical Pharmacology*, v. 65, 2003, p. 493-501.

SITKOVSKY, M. V.; OHTA, A. The ‘danger’ sensors that STOP the immune response: the A₂ adenosine receptors? *Trends in Immunology*, v. 26, n. 6, 2005.

SITKOVSKY, M., E LUKASHEV, D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF-1 α and adenosine receptors. *Nat. Rev. Immunol*. 2005; 5: 712–721

SOILLEUX, E. J.; TURLEY, H.; TIAN, Y. M.; PUGH, C. W.; GATTER, K. C.; HARRIS, A. L. Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues. *Histopathology*, v. 47, n. 6, 2005, p. 602– 610.

SOINI Y, KAHLOS K, PUHAKKA A, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. *Br J Cancer*. 2000; 3: 880-886.

SONNWEBER, T.; NACHBAUR, D.; SCHROLL, A.; NAIRZ, M.; SEIFERT, M.; DEMETZ, E.; HASCHKA, D.; MITTERSTILLER, A. M.; KLEINSASSER, A.; BURTSCHER, M.; TRUBSBACH, S.; MURPHY, A. T.; WROBLEWSKI, V.; WITCHER, D. R.; MLECZKO-SANECKA, K.; VECCHI, C.; MUCKENTHALER, M. U.; PIETRANGELO, A.; THEURL, I.; WEISS, G. Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. *Gut*, v. 63, 2014, p. 1951– 1959.

STAAB, A.; LÖFFLER, J.; SAID, H. M.; KATZER, A.; BEYER, M.; POLAT, B.; EINSELE, H.; FLENTIE, M.; VORDERMARK, D. Modulation of glucose metabolism inhibits hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Strahlentherapie und Onkologie*. V. 183, 2007, p. 366-373.

STIEHL DP, WIRTHNER R, KÖDITZ J, et al. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels: evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem*. 2006; 281(33):23482-91.

SUMAN, S.; FORNACE JR, A. J. e DATTA, K. Animal Models of Colorectal Cancer in Chemoprevention and Therapeutics Development. In: ETTARH, R. *Colorectal Cancer - From Prevention to Patient Care*, Rijeka: InTech, 2012, p. 277-300. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/colorectal-cancer-from-prevention-to-patient-care/animal-models-ofcolorectal-cancer-in-chemoprevention-and-therapeutics-development>. Acesso em 05 de fevereiro de 2016.

THIEL M, CALDWELL CC, KRETH S, et al. Targeted Deletion of HIF-1a Gene in T Cells Prevents their Inhibition in Hypoxic Inflamed Tissues and Improves Septic Mice Survival. *PLoS ONE*. 2007; 2(9): e853.

TOMIDA, A.; TSURUO, T. Drug resistance mediated by cellular stress response to the microenvironment of solid tumors. *Anticancer Drug Design*, v.14, 1999, p. 169– 177.

TOUGERON D, MABY P, ELIE N, et al. Regulatory T Lymphocytes Are Associated with Less Aggressive Histologic Features in Microsatellite-Unstable Colorectal Cancers. *PLoS ONE*; 2013; 8(4): e61001.

VAN DRIEL, B. E.; LYON, H.; HOOGENRAAD, D. C.; ANTEN, S.; HANSEN, U.; VAN NOORDEN, C. J. Expression of CuZn- and Mn-superoxide dismutase in human colorectal neoplasms. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 23, 1997, p. 435–444.

VORDERMARK, D.; KRAFT, P.; KATZER, A.; BÖLLING, T.; WILLNER, J.; FLENTJE, M. Glucose requirement for hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Cancer Letters*. v. 230, 2005, p. 122-133.

WANG GL, SEMENZA GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:4304-8.

WANG, S. H.; WANG, Y. Z.; ZHANG, K. Y.; SHEN, J. H.; ZHOU, H. Q.; QIU, X. Y. Effect of superoxide dismutase and malondialdehyde metabolic changes on carcinogenesis of gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, v. 11, 2005, p. 4305–4310.

WANG, Y.; LIU, Y. F.; CHENG, Y.; YI, D. H.; LI, P.; SONG, W. Q.; FU, D. Z.; WANG, X. Prognosis of colorectal cancer with liver metastasis: value of a prognostic index. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 43, n. 11, 2010, p. 1116-22.

WHO – World Health Organization - Disponível em: <<http://www.who.int/tobacco>> Acesso em: 17 janeiro de 2017.

WISTUBA-HAMPRECHT K, MARTENS A, HEUBACH F, *et al*. Peripheral CD8 effector-memory type 1 T-cells correlate with outcome in ipilimumab-treated stage IV melanoma patients. *European Journal of Cancer*. 73, 2017, 61-70.

XUE, J.; LI, X.; JIAO, S.; WEI, Y.; WU, G.; FANG, J. Prolyl Hydroxylase-3 is down-regulated in Colorectal Cancer Cells and Inhibits IKKB Independent of Hydroxylase Activity. *Gastroenterology*, v.138, 2010; p. 606-615.

YAMAUCHI H, CRISTOFANILLI M, NAKAMURA S, HORTOBAGYI GN, UENO NT. Molecular targets for treatment of inflammatory breast cancer. *Nat Rev Clin Onco* 2009; 6(7):387-94.

ZHENG L, KELLY CJ, COLGAN SP. Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol* 309; 2015, C350-C360.

ANEXO I – Pedido Comitê de Ética

Preencha este formulário e depois imprima



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde

PROJETO DE PESQUISA COM ANIMAIS – APROVADO PELA CEUA-UFES

Nº CEUA: 03/2014

Título do projeto:

AVALIAÇÃO DO PAPEL EPIGENÉTICO DO NÍQUEL SOBRE A EXPRESSÃO E SILENCIAMENTO DE GENES DE HIPÓXIA E SUA RELAÇÃO COM A RADIOTERAPIA

Responsável pelo projeto: *MSc. Leonardo Oliveira Trivilin*

Instituição / departamento: *UFES/CCA*

Telefones para contato: (28) 3552-8649 (28) 99972-1538 Fax: ()

E-mail:

- Espécie(s) e linhagem(ns): *Rattus norvegicus, linhagem Wistar*
- Sexo: *Macho* Idade: *45 dias* Peso: *200-250g*
- Previsão do número de animais para experimentos piloto/treino: *12*
- Previsão do número de animais para os protocolos experimentais: *72*
- Previsão para execução (mês/ano): *Início em Junho / 2014 Término em Junho / 2019*

EQUIPE ENVOLVIDA

(técnicos, alunos ou pesquisadores autorizados a solicitarem animais ao biotério, incluindo o responsável pelo projeto):

Nome	Cargo/função
<i>Leonardo Oliveira Trivilin</i>	<i>Professor/Coordenador</i>
<i>Adriana Madeira Alvares da Silva Conforti</i>	<i>Professora/Colaboradora</i>
<i>Suzanny Mendes Oliveira</i>	<i>Doutoranda/Colaboradora</i>
<i>José Zago Pulido</i>	<i>Médico/Colaborador</i>

Data, carimbo e assinatura (CEUA – UFES)



Para informações sobre as reuniões da CEUA e projetos aprovados, entre em contato:
Secretaria Tel.: (27) 3335-7211 – E-mail: ceua.ufes@hotmail.com
www.ccs.ufes.br/uso-de-animais

ANEXO II – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 003/2014, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do papel epigenético do níquel sobre a expressão e silenciamento de genes e de hipóxia e sua relação com a radioterapia.**" que tem como responsável o (a) docente **Leonardo Trivilin**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 09/05/14.

Vitória (ES), 09 de maio de 2014.


Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES