

**M** 2015



# **SNP's E RESPOSTA À TERAPIA NEOADJUVANTE NO CARCINOMA DO CÓLON E RETO**

Marcadores genéticos para avaliação de resposta à terapia.

HILDEBERTO EMANUEL LISBOA MOREIRA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM  
ONCOLOGIA



HILDEBERTO EMANUEL LISBOA MOREIRA

SNP's e resposta à terapia neoadjuvante no carcinoma do cólon e reto – Marcadores genéticos para avaliação de resposta à terapia.

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre - Especialização em Oncologia Molecular submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

**Orientador** - Professor Doutor Carlos Alberto da Silva Lopes

**Categoria** - Professor Catedrático Jubilado, Especialista em Patologia, Membro da comissão de acompanhamento do Mestrado em Oncologia

**Afiliação** - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

**Coorientadora** – Dr<sup>a</sup>. Marisa D. Santos

**Categoria** - Medicina

**Afiliação** - Grupo de Patologia Colorectal e Cirurgia do Centro Hospitalar do Porto



## **Informação Técnica**

**TÍTULO:**

SNP's e resposta à terapia neoadjuvante em carcinoma do cólon e reto – Marcadores genéticos para avaliação de resposta à terapia.

Tese de Candidatura ao Grau de Mestre em Oncologia – Especialização em Oncologia Molecular submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

**AUTOR:** Hildeberto Emanuel Lisboa Moreira

**DATA:** Setembro de 2015

**EDITOR:** Hildeberto Emanuel Lisboa Moreira

**CORREIO ELETRÓNICO:** hildebertomoreira@gmail.com

**1ª EDIÇÃO:** Setembro de 2015



*A quem nunca desistiu de acreditar*



*“There is no thrill like that felt by the inventor as he sees his creation unfolding to success.  
Such emotions make a man forget food, sleep, friends, love, everything.”*

*Nikola Tesla*





## AGRADECIMENTOS





Após terminar mais uma etapa do meu percurso académico, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a realização deste projeto.

Quero começar por agradecer à Professora Doutora Berta Martins da Silva, Diretora do Mestrado em Oncologia, pela oportunidade de ingressar neste mestrado abrindo-me desta forma as portas da Universidade do Porto. Agradeço ainda que me tenha confiado o seu laboratório para eu poder desenvolver o meu trabalho, por me ter incutido curiosidade científica e vontade de aprender.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto da Silva Lopes, meu orientador, quero também deixar uma palavra forte de apreço e um grande agradecimento pela oportunidade de trabalhar consigo. Foi para mim uma responsabilidade e uma honra aprender com o Professor. Levo comigo não só conhecimento científico, mas também aprendizagem a nível pessoal, que fazem de mim, atualmente, um aluno mais disciplinado e trabalhador com objetivos claramente definidos.

À Dr.<sup>a</sup> Marisa Santos, minha coorientadora pela oportunidade de realizar um trabalho inserido no seu projeto de Doutoramento. Agradeço toda a ajuda e conhecimento que me prestou durante a realização da minha tese e espero ter contribuído de forma recíproca nesta troca de conhecimentos.

Ao laboratório de Imunogenética do Departamento de Patologia e Imunologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto: Cláudia Carvalho, Bárbara Leal, Daniela Boleixa, Maria Rebelo e Sandra Brás por me terem acompanhado durante todo este trajeto e por me terem ajudado a dar os primeiros passos na investigação científica. O meu muito obrigado a todas por terem contribuído direta ou indiretamente para o meu trabalho e por todos os momentos de boa disposição que vivi convosco.

À Professora Doutora Fátima Gärtner e às Técnicas de Diagnóstico e Terapêutica Alexandra Rema e Maria de Fátima Carvalho pelo auxílio e colaboração neste trabalho.

À Oriana e ao Arnaud, quero agradecer toda a vossa ajuda. Nunca precisei de pedir pois vocês sempre estiveram disponíveis para me ajudar. São exemplos de trabalho que certamente irei seguir.

Aos Serviços de Genética do Instituto Gulbenkian de Ciência e ao Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar do Porto pelas suas respetivas contribuições técnicas e científicas. Sem eles o trabalho não teria sido possível, portanto quero expressar os meus sinceros agradecimentos.

Ao grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO do Porto em especial ao Professor Doutor Rui Medeiros, à Doutora Ana Carina Pereira e à Mestre Francisca Dias por todo o apoio, incentivo e boa disposição. O tempo que passei convosco foi pouco, mas

suficiente para despertar em mim a vontade de querer mais e ser melhor, tanto a nível académico como profissional. Plantaram uma série de ideias que espero cultivar no futuro.

Às minhas companheiras de mestrado e laboratório e mais importante que isso amigas Ana Rosa, Luciana Leite e Rita Ferreira. A viagem foi dura, mas vocês tornaram tudo mais fácil. Obrigado por tudo o que fizeram por mim. Levo cada uma de vós e tudo o que aprendi convosco guardado no coração.

Ao meu companheiro e amigo desde o início deste mestrado Jorge Ferreira pela pessoa incrível que é e quem diria que um par de trabalho iria combinar desta forma. És de facto o “maior”.

A todos os outros colegas de mestrado quero também agradecer. Sei que também tiveram imenso trabalho e este final é uma vitória coletiva.

Aos meus pais, por mais um sacrifício que fizeram por mim. Obrigada por voltarem a acreditar em mais uma etapa e por me incentivarem mesmo quando eu acho que algo está fora do meu alcance.

À minha irmã, que sem questionar se estou certo ou errado me acarinha sempre da mesma forma. Também lutas-te muito e agora é a tua vez de me deixares orgulhoso.

À minha família por estar sempre presente, pelos incríveis momentos que passo convosco e por serem ainda mais estranhos que eu. Não podia estar melhor entregue.

À Marta, porque apesar da vida nos ter criado caminhos diferentes continuaste a dar-me a mão quando precisei e a tua amizade é algo que vou prezar para sempre. Obrigado por tudo.

Aos meus amigos, por todo o apoio, horas de discussão científica e ajuda que me prestaram, fosse no trabalho fosse na minha vida pessoal. Obrigado pela vossa paciência e a espera terminou: hoje estou em casa e vou voltar a estar convosco muitas mais vezes!

O meu muito obrigado a todos por fazerem de mim o aluno e homem que sou hoje.





LISTA DE ABREVIATURAS  
E SÍMBOLOS





## #

°C – Graus Celsius

μL – Microlitro

μm – Micrómetro

χ<sup>2</sup> – Chi-quadrado

% - Percentagem

## A

ABCC4 – “ATP-binding cassette sub-family C member 4”

AINEs – Anti Inflamatórios Não Esteroides

## C

CCND1 – “Cyclin D1”

CCR – Carcinoma do cólon e reto

cf. – “Confer”

CHP – Centro Hospitalar do Porto

CK7 – “Cytokeratin 7”

CK20 – “Cytokeratin 20”

CM – Centímetro

COX-2 – Cicloxigenase 2

## D

dH<sub>2</sub>O – Água destilada

DII – Doença Inflamatório Intestinal

DNA – “Deoxyribonucleic Acid”

dNTPs - Desoxirribonucleotidos fosfatados

dNDPs - Difosfatos de desoxirribonucleótidos

## E

EGFR – “Epidermal Growth Factor Receptor”

EtOH – Etanol

## F

FAP – Polipose Adenomatosa Familiar

FFPE – “Formalin Fixed Paraffin Embedded”

## G

g - Força gravítica

GIST – “Gastrointestinal Stromal Tumors”

## H

HWE – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

HPGD – “Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)”

## I

IGF-1 – “Insulin-like growth factor 1”

IL-10 – Interleucina-10

IPO – Instituto Português de Oncologia

## M

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

mL – Mililitro

mRNA – “Messenger Ribonucleic Acid”

MRP4 – “Multidrug Resistance-associated Protein 4”

## N

NaCl – Cloreto de Sódio

NAT2 – “N-acetyltransferase 2”

## O

OR – “Odds Ratio”

## P

pCRT – quimiorradioterapia pré-operatória

PGs – Prostaglandinas

PGDH – “Hidroxyprostaglandin Dehydrogenase”

PGT – “Prostaglandin Transporter”

PRT - Radioterapia pré-operatória

## R

RORENO – Registo Oncológico Regional do Norte

## S

SLCO2A1 – “Solute carrier organic anion transporter family member 2A1”

SNP – “Single Nucleotide Polymorphism”

SPSS – “Statistical Package for Social Sciences”

## T

T<sub>amb</sub> – Temperatura Ambiente

TME – Excisão Total do Mesorreto

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

## W

WHO - “World Health Organization”



## ÍNDICE

GERAL

FIGURAS

TABELAS

MATERIAL

SUPLEMENTAR



## Conteúdos

RESUMO .....	xxxí
ABSTRACT .....	xxxvi
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Introdução .....	3
1.2 Patologia do adenocarcinoma do cólon e do reto .....	4
1.2.1 Adenomas.....	5
1.2.2 Adenocarcinoma do cólon e reto.....	5
1.3 Epidemiologia e Etiologia .....	7
1.3.1 Fatores etiológicos .....	8
1.4 Rastreo e Diagnóstico.....	9
1.5 Terapia neoadjuvante e influência de polimorfismos.....	9
2. OBJETIVOS .....	14
2.1 Objetivos gerais.....	16
2.1.1 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL & MÉTODOS.....	18
3.1 População em estudo.....	20
3.1.1 Perfil Demográfico.....	20
3.1.2 Resposta do Tumor Primário à Terapia Neoadjuvante .....	21
3.2 Extração e Quantificação de DNA .....	21
3.2.1 Sangue total .....	21
3.2.2 Tecidos .....	22
3.3 Seleção dos Polimorfismos.....	22
3.3.1 Genotipagem.....	24
3.4 Análise Estatística.....	26
4. RESULTADOS .....	28
4.1 Frequência dos Genótipos e Risco .....	30
4.2. Análise de Sobrevida.....	31
4.2.2 Avaliação do Risco de Recidiva.....	34
5. Discussão .....	37
6. CONCLUSÕES GERAIS & PERSPETIVAS FUTURAS .....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	56



## FIGURAS

Figura 1 - Carcinogénese em Cólon e Reto (adaptado de: Kutz H et al. 2004)[4] .....	3
Figura 2 - Adenocarcinoma do Cólon (adaptado de: Wong et al.,2012)[9] .....	6
Figura 3 - CK20 com positividade difusa em células tumorais (adaptado de: Wong et al.,2012)[9] .....	6
Figura 4 - Incidência, Mortalidade e Prevalência Mundial em 2012 (adaptado de: Globocan)[13] .....	7
Figura 5 - % de casos de tumores malignos em Portugal em 2008 (adaptado de: RORENO)[1] ..	8
Figura 6 - Tumores mais frequentes em Portugal em 2008 (adaptado de: RORENO)[1] .....	8
Figura 7 - Efeitos biológicos dos polimorfismos (adaptado de: Monzo et al., 2008)[57] .....	12
Figura 8 - Fases da técnica Sequenom iPLEX Gold (adaptado de: Genotyping with Sequenom) 24	
Figura 9 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram a correlação entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs9821091 em doentes com CCR tratados com QRT neoadjuvante .....	31
Figura 10 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram a correlação entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs9834412 em doentes com CCR tratados com QRT neoadjuvante .....	32
Figura 11 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram a correlação entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs7340717 em doentes com CCR tratados com QRT neoadjuvante .....	32
Figura 12 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram uma correlação que não é estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs4148421 .....	33
Figura 13 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram a correlação entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs8002180 em doentes com CCR tratados com QRT neoadjuvante .....	33
Figura 14 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram uma correlação que não é estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs869951 .....	34
Figura 15 - Transportadores de Fármacos em Humanos (adaptado de: Genomics in Drug Discovery and Development)[75] .....	40



## TABELAS

Tabela 1 - Classificação histológica dos tumores do cólon e do reto, segundo a OMS1[5].....	4
Tabela 2 - Fatores etiológicos em carcinoma do cólon e reto .....	9
Tabela 3 - Descrição dos Participantes.....	20
Tabela 4 - Índice de TGR de Mandard (adaptado de: Santos et al.,)[63, 64] .....	21
Tabela 5 - Frequências dos genótipos dos casos .....	30
Tabela 6 - Estimativa do Risco de Recidiva .....	34



## MATERIAL SUPLEMENTAR

Fluxograma 1 - Esquema de Extração de DNA de Tecidos em Parafina (adaptado de: GRiSP) .. 59





## RESUMO





O adenocarcinoma do cólon e reto é um grave problema de saúde pública. É a terceira malignidade mais comum e a quarta mais mortal, a nível mundial e a segunda causa de morte por malignidade a nível nacional, em ambos os sexos. Esta neoplasia é mais comum das regiões desenvolvidas, reflexo do crescimento populacional, envelhecimento e também do aumento da adoção de um estilo de vida de risco.

Não obstante o facto de ser um dos tipos de neoplasia em que podem ser aplicadas medidas preventivas, a aplicação de medidas mais eficazes de rastreio e diagnóstico nem sempre é exequível o que implica ainda estarmos longe do impacto positivo desejado.

O objetivo principal deste trabalho foi compreender a base molecular de suscetibilidade individual à carcinogénese cólon-retal e determinar como esta pode influenciar a capacidade de resposta ou resistência a agentes anti-tumorais através do estudo de 61 SNPs associados aos genes COX-2, HPGD, SLCO2A1, ABCC4, IL-10, EGFR, TNF, CCND1, NAT2 e IGF-1.

Foi desenvolvido um estudo coorte retrospectivo envolvendo 167 participantes diagnosticados com CCR recrutados pelo departamento de Cirurgia do Centro Hospitalar do Porto (CHP). Os polimorfismos escolhidos foram caracterizados recorrendo a espectrofotometria de massa (Sequenom) pelo Serviço de Genética do Instituto Gulbenkian de Ciência.

Os nossos resultados indicam que quatro polimorfismos genéticos estão implicados na sobrevida livre de doença e na possibilidade de recidiva: rs9821091, rs9834412 e rs7340717 no gene SLCO2A1 e o rs8002180 no gene ABCC4. Doentes com genótipo AA (OR: 4,32  $p < 0,01$ ) do rs9821091 e genótipo AA (OR: 7,65  $p < 0,01$ ) do rs9834412 têm um risco de recidiva, quatro e sete vezes superior, respetivamente, para além do facto de se apresentarem como os indivíduos mais comprometidos a nível da sobrevida livre de doença ( $p = 0,001$  e  $p = 0,039$ , respetivamente).

Indivíduos com genótipo GG do rs7340717 ( $p = 0,039$ ) encontram-se comprometidos a nível da sobrevida livre de doença. Apesar de não ser uma associação estatisticamente significativa, existe uma tendência para que doentes com genótipo GG (OR: 2,27  $p = 0,056$ ) apresentem um risco de recidiva superior. Indivíduos com genótipo TC do rs8002180 também têm uma sobrevida livre de doença comprometida em relação aos restantes genótipos ( $p = 0,030$ ).

Estas associações verificam-se em doentes que aguardaram entre o início da terapia neoadjuvante e a data de cirurgia, um período inferior a 3 meses.

Estes resultados reforçam a importância da via da PGE<sub>2</sub> na carcinogénese cólon-retal mostrando que ainda é necessária uma melhor compreensão

farmacocinética em relação aos transportadores de fármacos em humanos e mais estudos que elucidem a função biológica destes SNPs que não ainda não se encontram descritos na literatura.

O estabelecimento de SNPs como biomarcadores é importante tanto para estratégias de rastreio como para a caracterização de subgrupos de indivíduos em risco de desenvolver a doença e que poderão beneficiar de estratégias neoadjuvantes traduzindo assim o seu efeito biológico para o uso na prática clínica.

**Palavras-chave:** CCR, SNPs, cirurgia, terapia neoadjuvante





## ABSTRACT





Adenocarcinoma of the colon and rectum is a serious public health issue. It is the third most common malignancy and fourth most deadly, worldwide and the second leading cause of death from malignancy nationwide, in both sexes. It is more common in developed regions, reflecting population growth, aging and also increasing adoption of a risky lifestyle.

Notwithstanding the fact that it is one kind of malignancy in which preventive measures can be applied, the screening and diagnosis is not always enforceable what implies that we are still far away from desired positive impact.

The main objective of this study was to understand the molecular basis of individual susceptibility to colorectal carcinogenesis and to determine how this may affect the responsiveness or resistance to anti-tumor agents by studying 61 SNPs associated with COX-2, HPGD, SLCO2A1, ABCC4, IL-10, EGFR, TNF, CCND1, NAT2 and IGF-1 genes.

This study was designed as a retrospective cohort involving 167 participants diagnosed with CRC recruited from the department of surgery of the Centro Hospitalar do Porto (CHP). Polymorphisms were characterized using mass spectrometry (Sequenom) by the Genetics Department at the Gulbenkian Institute of Science.

Our results indicate that four genetic polymorphisms are implicated in disease-free survival and the possibility of relapse: rs9821091, rs9834412 and rs7340717 in SLCO2A1 gene and rs8002180 in ABCC4 gene. Patients with AA genotype (OR: 4.32  $p < 0.01$ ) of the rs9821091 and AA genotype (OR: 7.65  $p < 0.01$ ) of the rs9834412 have a risk of recurrence, four and seven times higher, respectively, besides the fact that they present themselves as the most committed individuals in terms of disease-free survival ( $p = 0.001$  and  $p = 0.039$ , respectively).

Individuals with GG genotype of the rs7340717 ( $p = 0.039$ ) are committed in terms of disease-free survival. Although not a statistically significant association, there is a tendency for patients with GG genotype (OR: 2.27  $p = 0.056$ ) presenting a risk of relapse. Individuals with CT genotype of the rs8002180 also have a disease-free survival committed in comparison to the remaining genotypes ( $p = 0.030$ ).

These associations occur in patients who waited a period inferior to 3 months between the start of neoadjuvant therapy and surgery date.

Our results reinforce the importance of the PGE<sub>2</sub> pathway in colorectal carcinogenesis showing that a better understanding of pharmacokinetics is still needed in relation to drug carriers in humans and further studies are required to elucidate the biological function of these SNPs that have not yet been described in literature.

Establishing SNPs as biomarkers is important for both screening strategies as well as to characterize subgroups of individuals at risk of developing the disease and

may benefit from neoadjuvant strategies thus highlighting its biological effect for use in clinical practice.

**Key words:** CRC, SNP's, surgery, neoadjuvant therapy





## 1. INTRODUÇÃO





## 1.1 Introdução

O adenocarcinoma do cólon e reto é um grave problema de saúde e um desafio para a pesquisa e estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no seu desenvolvimento [2]. Para o desenvolvimento desta neoplasia são conhecidos fatores de risco hereditários e ambientais. Os factores hereditários são decisivos nas seguintes entidades:

- Polipose adenomatosa familiar (FAP) – 1% dos casos;
- Carcinoma do colón e reto hereditário não associado a polipose (HNPCC) – 3 a 5% dos casos;
- Cancro familiar/hereditário ainda sem genes identificados – 30 a 40% dos casos;

Os casos mais relacionados com factores ambientais são designados por esporádicos - 50 a 60% dos casos.

O processo de cancerização do cólon e reto desenvolve-se através de etapas definidas que vão desde **lesões adenomatosas a neoplasia maligna** (Figura 1). Foi estabelecido que os factores hereditários e ambientais contribuem para o desenvolvimento da doença, conforme indicado pela acumulação de mutações – o grau em que ocorrem é definido pelo aumento de agentes endógenos e da predisposição genética, em genes presentes em diversas vias de sinalização [3].

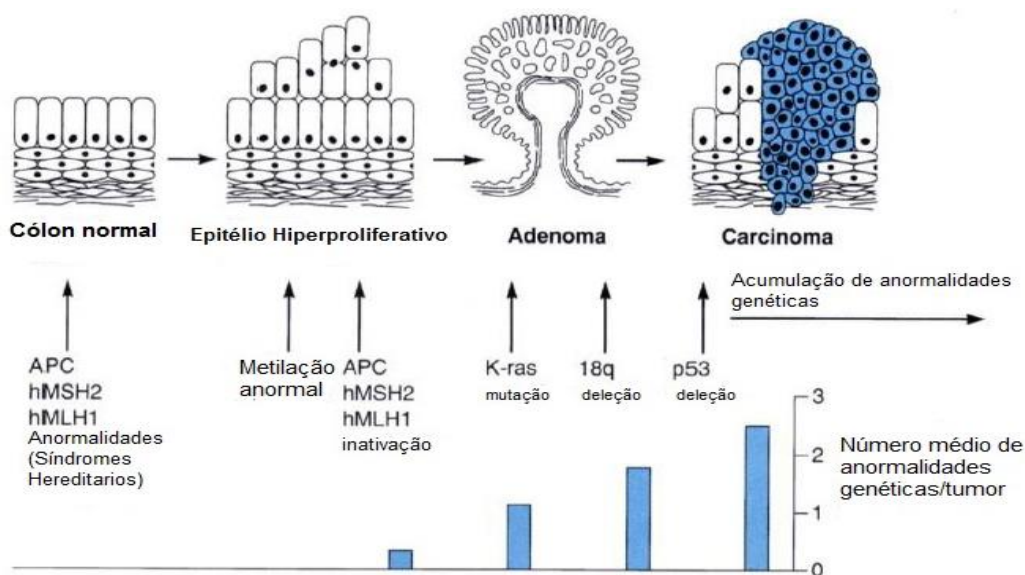


Figura 1 - Carcinogénese em Cólon e Reto (adaptado de: Kutz H et al. 2004)[4]

## 1.2 Patologia do adenocarcinoma do cólon e do reto

No cólon e reto existem as seguintes neoplasias: adenocarcinoma, carcinóides, tumores do estroma gastrointestinal (GIST), linfomas e, muito mais raramente outras neoplasias de acordo com os tecidos existentes [5]. O adenocarcinoma é, contudo e de longe o mais comum. Por isso, quando se aborda cancro do cólon e do reto, estamos a referir-nos, concretamente, ao adenocarcinoma.

Tabela 1 - Classificação histológica dos tumores do cólon e do reto, segundo a OMS1[5]

Tumores epiteliais		Tumores não epiteliais		
Adenoma	Tubular		Lipoma	
	Viloso		Leiomioma	
	Tubulo viloso		Tumores do estroma gastrointestinal (GIST)	
	Serrado		Leiomiosarcoma	
Neoplasia intra-epitelial (displasia) associada a doença inflamatória crónica	Neoplasia intraepitelial <sup>2</sup> glandular de baixo grau		Angiosarcoma	
	Neoplasia intraepitelial glandular de alto grau		Sarcoma de Kaposi	
Carcinoma	Adenocarcinoma		Melanoma maligno	
	Adenocarcinoma mucinoso		Outros	
	Carcinoma de células em anel de sinete		Linfomas malignos	Linfoma de células B de zona marginal tipo MALT
	Carcinoma de pequenas células			Linfoma de células do manto
	Carcinoma de células escamosas	Linfoma difuso de grandes células B		
	Carcinoma adenoescamoso	Linfoma de Burkitt		
	Carcinoma medular	Linfoma de Burkitt atípico		
	Carcinoma indiferenciado	Outros		
Carcinoide (neoplasia endócrina bem diferenciada)	Neoplasma de células enterocromafins produtoras de serotonina	Tumores secundários		-
	Tumor de células L produtor de péptidos PP/PYY	Pólipos		Hiperplásicos
	Outros		Síndrome de Peutz-Jeghers	
Misto carcinoide-adenocarcinoma	-		Juvenil	
Outros	-	-	-	

<sup>1</sup> Esta classificação foi modificada a partir da classificação histológica de tumores prévia da OMS (845) tendo em conta as mudanças na compreensão destas lesões. No caso das neoplasias do sistema endócrino, é baseada na classificação recente da OMS (1784), mas foi simplificada para ser mais intuitiva na classificação morfológica.

<sup>2</sup> Código de Morfologia da Classificação Internacional de Doenças Oncológicas (ICD-O) (542) e Nomenclatura Sistematizada da Medicina (<http://snomed.org>). O comportamento está codificado em /0 para tumores benignos, /3 para tumores malignos, /2 em carcinomas *in situ* e neoplasia intra-epitelial de grau III e /1 para o comportamento não especificado, *borderline* ou incerto. Neoplasia não intra-epitelial não tem um código genérico na ICD-O. Códigos ICD-O estão disponíveis apenas para as lesões classificadas como neoplasia intra-epitelial glandular de grau III (8148/2) e adenocarcinoma *in situ* (8140/2).

### 1.2.1 Adenomas

Os adenomas do cólon, planos ou pediculados, podem ser tubulares e vilosos e são neoplasias não invasivas, que precedem no tempo à formação dos adenocarcinomas. O seu reconhecimento e diagnóstico é importante porque permitem tratar os doentes em fases curativas e, sobretudo, permitem identificar indivíduos como maior ou menor risco de desenvolvimento de adenocarcinomas. Daqui a importância cada vez maior que se dá ao rastreio endoscópico que permite identificar os adenomas e, portanto, a sua exérese [6].

### 1.2.2 Adenocarcinoma do cólon e reto

O adenocarcinoma é o tipo histológico mais comum de neoplasia cólon-retal (98%) [7]. Para além das alterações cito-arquiteturais, a principal característica de malignidade local é a identificação de invasão da parede, com extensão da neoplasia à submucosa (T1), à camada muscular própria (T2), ao tecido subperitoneal (T3) ou a órgãos vizinhos (T4) [5]. O risco de metastização é tanto maior quanto maior for a profundidade de invasão. No adenocarcinoma do cólon e reto, ao contrário do que acontece no estômago, o risco de metastização é praticamente inexistente nos tumores que invadem apenas a lâmina própria e é muito baixo nos que invadem a submucosa (T1) [5]. O fígado e os pulmões são órgãos de metastização mais comuns do adenocarcinoma do colo e reto, o que se relaciona com o modelo de circulação venosa do cólon para esses órgãos.

Macroscopicamente, os adenocarcinomas podem ser do tipo polipoide, ulcerado ou infiltrativo. Quando avançados podem apresentar mais do que um destes aspectos, ditos mistos (por exe.: ulcero-infiltrativo, ulcero-vegetante, polipóide e ulcerativo) [8].

Microscopicamente (Figura 2) o padrão histológico do adenocarcinoma do cólon varia entre os que formam glândulas e adquirem arranjo intestinal com maior ou menor secreção de muco e os que se apresentam com padrão sólido, quase sem glândulas. Entre ambos os extremos existe um padrão intermediário com aspecto glandular em algumas áreas e sólido noutras. Denominam-se de adenocarcinomas bem diferenciados (grau 1), os que têm arranjo glandular em mais de 80% da sua extensão; de grau intermédio (grau 2), os que se apresentam com glândulas em 20 a 70% da sua extensão e com padrão sólido no resto; pouco diferenciados ou indiferenciados (grau 3) os que praticamente não formam glândulas [5].

O adenocarcinoma do cólon e reto apresenta-se, muitas vezes, metastizado. Quando tal acontece, o conhecimento da origem da neoplasia é necessário para o tratamento. O recurso à imunocitoquímica é útil porque o adenocarcinoma do cólon tem padrões de expressão imunocitoquímica relativamente característicos, ao contrário do que acontece no carcinoma do pâncreas e das vias biliares. A principal característica imunofenotípica do adenocarcinoma do cólon e reto é a negatividade para citoqueratina 7 (CK7) e a positividade para citoqueratina 20 (CK20) (Figura 3) [9].

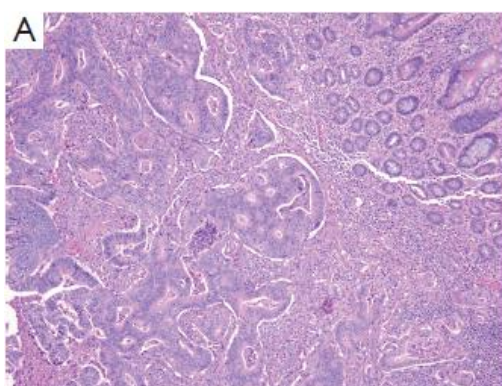


Figura 2 - Adenocarcinoma do Cólon (adaptado de: Wong et al.,2012)[9]

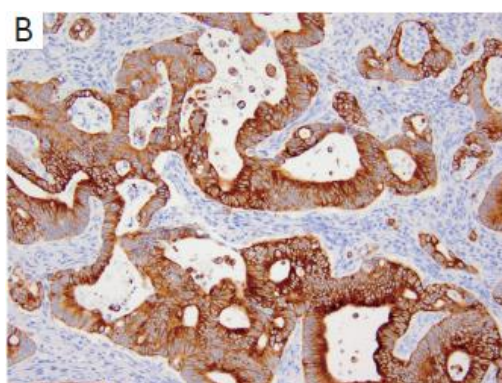


Figura 3 - CK20 com positividade difusa em células tumorais (adaptado de: Wong et al.,2012)[9]

Para além do tipo convencional mais comum do adenocarcinoma cólon-retal descrito, existem variantes que costumam ser individualizadas nas várias classificações histológicas propostas:

O **adenocarcinoma mucinoso**, que é diagnosticado quando mais do que 50% da lesão é composta de lagos de muco extracelular que contêm epitélio maligno como estruturas acinares, aglomerados de células ou células individuais [5]. Muitos carcinomas com instabilidade microssatélite (MSI-H) são deste tipo histopatológico [10].

O **adenocarcinoma de células isoladas**, com células em anel de sinete ou não, é outra variante que se deve considerar pela raridade e agressividade com que se apresenta [11].

O **carcinoma adenoescamoso** caracteriza-se pela coexistência de um componente glandular ao lado de um componente de células escamosas com queratinização mais ou menos acentuada [12].

### 1.3 Epidemiologia e Etiologia

O cancro do cólon e reto é o terceiro tipo mais comum em homens (746.000 casos, 10% do total) e o segundo em mulheres (614 mil casos, 9,2% do total) em todo o mundo, segundo dados da Globocan [13, 14].

Cerca de 55% dos casos ocorrem nas regiões desenvolvidas. A mortalidade é baixa, e atinge o maior índice nas regiões menos desenvolvidas do mundo, refletindo uma sobrevivência pobre das mesmas. Existe uma grande variação geográfica na incidência mundial e os padrões são muito semelhantes entre homens e mulheres [13].

Emigrantes de países cujo risco para CCR é baixo que transitem para países de alto risco tendem a sofrer um aumento de risco típico do novo país hospedeiro [15].

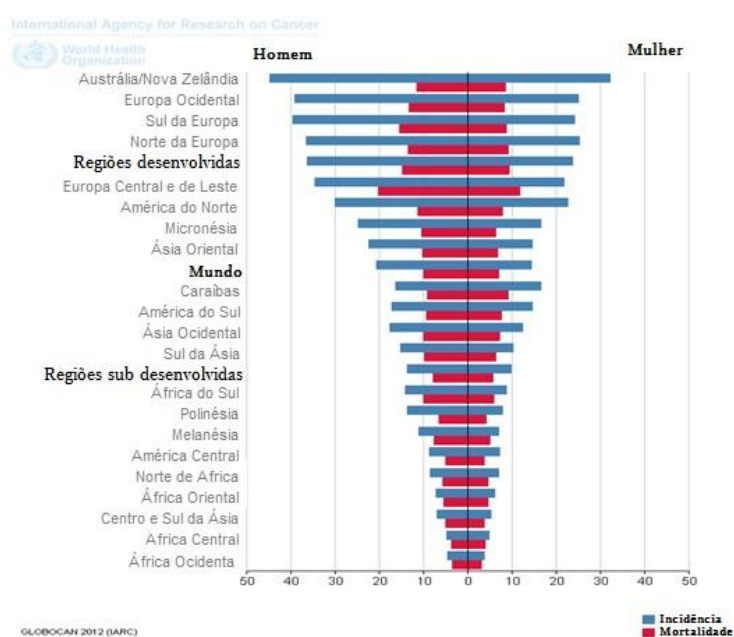


Figura 4 - Incidência, Mortalidade e Prevalência Mundial em 2012 (adaptado de: Globocan)[13]

Em Portugal, ocupa o segundo lugar, estimando-se que a cada ano surjam mais de 7.000 novos casos, com 8 doentes a perderem a vida [16, 17]. Segundo dados do RORENO é o segundo tipo de cancro mais comum em ambos os sexos, somente

ultrapassado pela próstata e mama, verificando-se que os tumores do reto são menos frequentes que os do cólon [1].

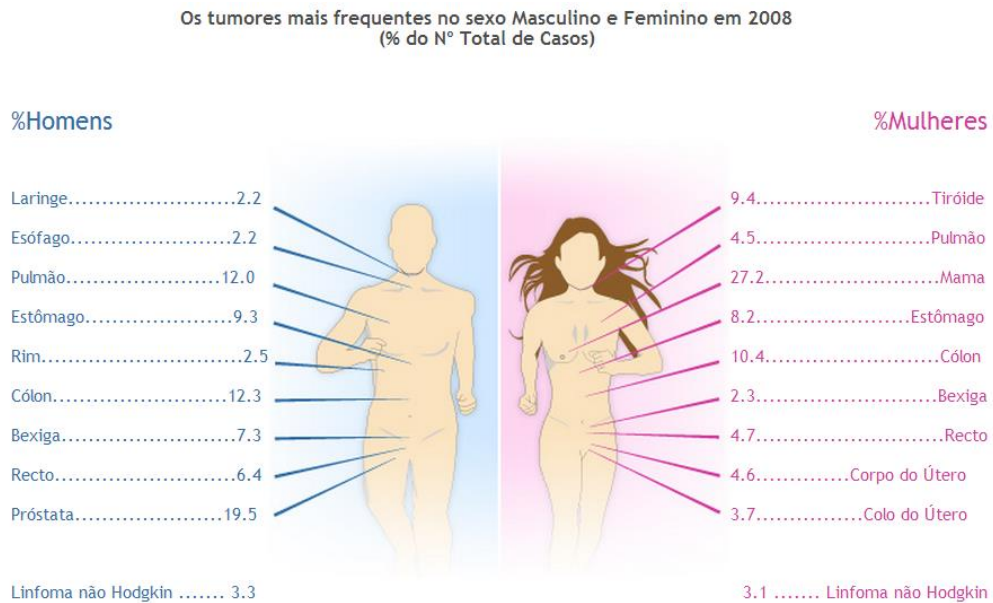


Figura 5 - % de casos de tumores malignos em Portugal em 2008 (adaptado de: RORENO)[1]

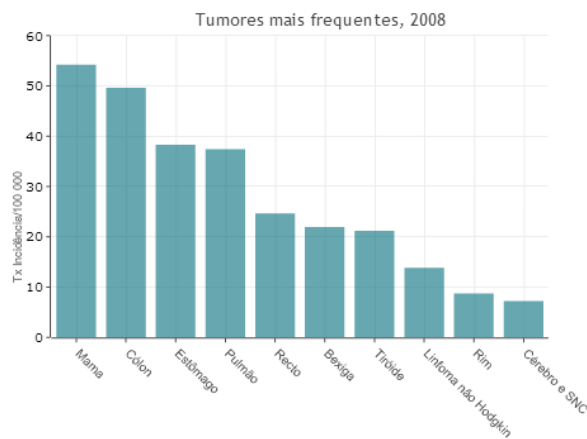


Figura 6 - Tumores mais frequentes em Portugal em 2008 (adaptado de: RORENO)[1]

### 1.3.1 Fatores etiológicos

Como referido anteriormente o adenocarcinoma do cólon e reto tem origem devido a fatores ambientais e hereditários. Como tal é um dos principais tipos de cancro em que algumas das causas podem ser identificadas e em teoria prevenidas [15].

Tabela 2 - Fatores etiológicos em carcinoma do cólon e reto

Fatores Ambientais	Fatores genéticos
Dieta [18]	Pólipos neoplásicos são lesões precursoras de carcinoma [19, 20]
Hábitos tabágicos [21, 22]	Doenças inflamatórias intestinais (DII) - colite ulcerativa e doença de Crohn [23]
Alcoolismo [24]	História familiar [25-27].
Atividade física [20, 28, 29]	

#### 1.4 Rastreio e Diagnóstico

O curso lento de crescimento desde pólipos pré-neoplásicos a carcinoma invasivo oferece uma janela de oportunidade para a prevenção e detecção precoce de doença [30].

Como referido anteriormente a detecção e remoção de pólipos num estádio inicial vai permitir uma terapia com melhores taxas de sucesso, resultando na redução da mortalidade por diminuição da taxa de incidência da doença e aumento da taxa de sobrevivência.

O rastreio é recomendado a homens e mulheres com 50 anos de idade, embora pessoas com maior risco devido a história familiar ou outros fatores de risco devem começar o plano de rastreio mais cedo. A probabilidade de diagnóstico de cancro do cólon e reto aumenta progressivamente após os 40 anos de idade, no entanto, novos dados tentem a sugerir um aumento entre os jovens [25, 31-33]. A colonoscopia é o procedimento recomendado para a maioria dos pacientes neste grupo de risco [34].

#### 1.5 Terapia neoadjuvante e influência de polimorfismos

Como com os demais cancros, existem várias formas de tratar o cancro cólon-retal: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia são formas convencionais e clássicas. Mais recentemente, a identificação de algumas mutações nos genes KRas e EGFR do genoma de alguns tumores, tem trazido novos esquemas de tratamento dirigido, personalizado, “inteligente”, com resultados muito animadores. Durante muito tempo a cirurgia foi a primeira arma de tratamento, mesmo para cancro cólon-retal avançado, com as consequências inerentes e indesejáveis, nomeadamente a exérese do esfíncter anal e a procura de situações de ânus artificial, de carácter permanente ou transitório.

A procura de soluções adequadas para manter o funcionamento do esfíncter anal acabou por dar prioridade de ação à radioterapia e à quimioterapia convencional que,

diminuindo o tamanho do tumor, facilitam que a cirurgia, como adjuvante, possa intervir numa segunda fase sem os efeitos devastadores no funcionamento do esfíncter anal. Por isso é tão importante conhecer cada vez melhor os factores que intervêm na qualidade da resposta à terapia neoadjuvante.

A cirurgia continua a ser a principal terapia no tratamento do cancro do cólon e reto [35-38]. Com base em ensaios clínicos randomizados, o padrão de tratamento para o adenocarcinoma retal localmente avançado é a terapia neoadjuvante - quer como radioterapia pré-operatória (PRT) ou quimioradioterapia (pCRT) - seguido da excisão total do mesorreto (TME) [46-49].

Vantagens da terapia neoadjuvante incluem melhor controlo local, aumento da sobrevivência e redução do tamanho do tumor, que, em teoria, pode aumentar a possibilidade de se realizar uma cirurgia de poupança do esfíncter em tumores de baixo grau. Esta hipótese tem sido investigada em vários ensaios com diferentes regimes de tratamento pré-operatório [39-47].

No entanto, esta abordagem tem sido associada a uma elevada taxa de morbilidade e pode ter um impacto negativo na qualidade de vida (QV): disfunção intestinal/sexual e incontinência fecal [48, 49].

Nos últimos anos foram propostos diferentes regimes de PRT e pCRT de acordo com a fase clínica da doença e num cenário em que várias abordagens estão disponíveis, as vantagens de cada tratamento específico devem ser ponderadas contra o impacto que têm sobre a morbilidade global e sobre a qualidade de vida dos doentes.

Terapia a curto e longo prazo foram comparadas em dois estudos randomizados:

- Segundo Bujko *et al.* em estádios T3/T4 em médio-baixo reto foram encontradas melhores taxas de resposta patológica completa em terapia de longa duração (16%) do que na de curta duração (1%) [50];
- Ngan *et al.* relataram recentemente que em pacientes com tumores distais, a terapia de longo curso parece estar associada a menores taxas de recorrência local [51].

Com base nas evidências disponíveis, pCRT de longa duração parece ser preferível em pacientes com tumores distais ou margens radiais ameaçadas. Para pacientes com tumores pequenos, relativamente proximais para os quais a duração da terapia é uma consideração importante, radiação pré-operatória de curta duração parece ser uma alternativa segura e não compromete os resultados a longo prazo.

Certas variações polimórficas podem influenciar a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA), tradução e interações entre proteínas conduzindo a uma função subótima e a uma expressão de **diferentes graus de sensibilidade à radiação** [52].

A carcinogênese do cólon e reto está associada a diferentes características genéticas, mas os dados, ainda controversos, não são suficientes para suportar a sua biologia molecular distinta. Embora a suscetibilidade genética seja responsável por quase 35% do risco de desenvolver um adenocarcinoma do cólon e reto, mutações em genes de predisposição conhecidos não explicam todos os casos de malignidade. Pelo menos uma parte desta suscetibilidade pode ser encontrada sob a forma de variantes comuns de baixo risco em genes que, individualmente e indiretamente conferem um efeito no risco de doença.

A resposta do tumor à radioterapia neoadjuvante varia amplamente entre os indivíduos e em cancro do cólon e reto pode ser ineficaz em 50% dos casos. A seleção dos pacientes é atualmente baseada em parâmetros clínicos, endossonografia retal e TAC, mas estes parâmetros não são preditores de resposta. A identificação de marcadores preditivos de resposta tem importância clínica passível de permitir uma terapia dirigida [53].

Uma abordagem promissora é o estabelecimento de biomarcadores como é o caso dos polimorfismos genéticos [54, 55].

Os polimorfismos genéticos são definidos como a ocorrência simultânea, numa população, de duas ou mais formas alternativas de um gene ou de uma sequência de DNA em que a variante menos frequente está presentes em pelo menos 1% da população [56].

Os polimorfismos mais frequentes que ocorrem no genoma humano são os chamados SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), que são caracterizados pela alteração de apenas um único nucleótido. Estima-se que ocorra um SNP a cada 200-300 pares de bases [57]. Os SNPs constituem a principal fonte de diversidade uma vez que cada indivíduo é portador de um vasto grupo de polimorfismos que lhe confere um património genético único [58].

Podem ocorrer em qualquer uma das regiões do genoma localizando-se na região promotora, exões e intrões e exercer efeitos na expressão dos genes (Figura 7) [59-61]:

- Quando localizados em regiões promotoras podem aumentar, diminuir ou não afetar a expressão genética;

- Quando ocorrem em exões, estes polimorfismos podem levar à mudança de aminoácido e conseqüentemente afetar a proteína ou serem silenciosos, não afetando a proteína;
- Quando ocorrem em intrões podem alterar a sequência proteica se estiverem localizados numa zona de *splicing* ou alterar a expressão genética se estiverem localizados numa zona codificadora de microRNAs.

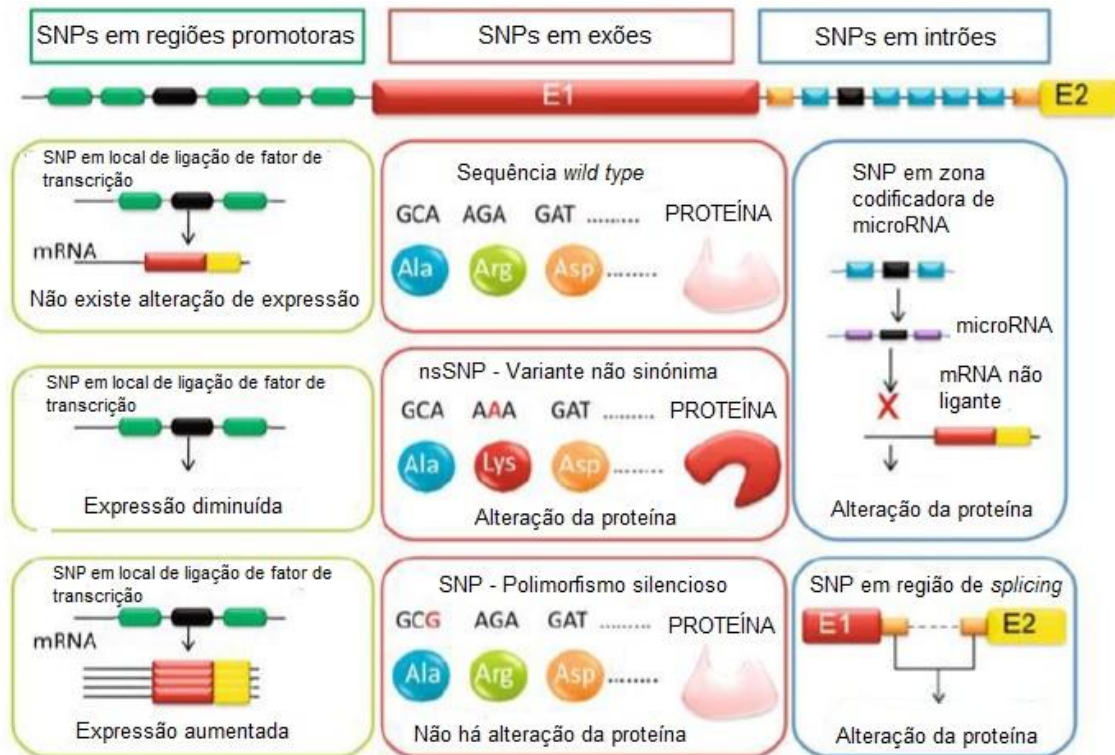


Figura 7 - Efeitos biológicos dos polimorfismos (adaptado de: Monzo et al., 2008)[57]





## 2. OBJETIVOS





## 2.1 Objetivos gerais

Complementar a compreensão da base molecular de suscetibilidade individual à carcinogénese cólon-retal e determinar como esta pode influenciar a capacidade de resposta ou resistência à terapia antineoplásica.

### 2.1.1 Objetivos específicos

Estudo de 61 SNPs associados a 10 genes - COX-2, HPGD, SLCO2A1, ABCC4, IL-10, EGFR, TNF, CCND1, NAT2 e IGF-1 - de modo a avaliar a influência destes polimorfismos na sobrevida livre de doença, recidiva e resposta do paciente à radioterapia neoadjuvante.





### 3. MATERIAL & MÉTODOS





### 3.1 População em estudo

167 doentes foram recrutados pelo Departamento de Cirurgia do Centro Hospitalar do Porto (CHP). Os casos eram adultos com carcinoma do reto diagnosticado histologicamente. As amostras obtidas eram representativas de tumores primários, diagnosticados e sujeitos a quimiorradioterapia neoadjuvante à intervenção cirúrgica, entre os anos de 2003 e 2014. A análise dos SNPs foi realizada por genotipagem após extração de DNA de sangue periférico e blocos de parafina fixados em formol (FFPE).

#### 3.1.1 Perfil Demográfico

A média de idades dos doentes em estudo era de 71 anos (37- 95 anos). Dos 167 doentes elegíveis para o estudo, 105 (63%) eram homens e 62 (37%) eram mulheres. Os estádios tumorais variavam entre IIA e IIIC: IIA em 64 doentes (38%), IIB em 5 doentes (3%), IIIA em 11 doentes (7%), IIIB em 64 doentes (38%) e IIIC em 23 doentes (14%). O tamanho médio do tumor primário no seu diâmetro longitudinal era de 4.9 cm (2-11 cm). Todos os doentes tinham concluído pelo menos 3 meses de *follow up* após QRT (3-139 meses com uma média 53 meses). Reações à terapia neoadjuvante foram avaliadas através do Índice de Mandard.

Tabela 3 - Descrição dos Participantes

		<b>Casos</b>
		<b>N = 167</b>
<b>Perfil Demográfico</b>	<b>Idade (anos)</b>	
	Média	71
	Mediana (min-max)	71 (37- 95)
	<b>Sexo (n, %)</b>	
	Masculino	105 (62,9)
	Feminino	62 (37,1)
<b>Características do Tumor</b>	<b>Localização do Tumor (n, %)</b>	
	Cólon	0 (0%)
	Reto	167 (100%)
	<b>Estádio (n, %)</b>	
	I-II	69 (41,3%)
	III-IV	98 (58,7%)
	<b>Diâmetro Longitudinal Tumor (cm)</b>	
	Média	4.9
	Mediana	4.9 (2-11 cm)
	<b>TRG Mandard (n, %)</b>	
1 2	86 (51,5)	
3 4 5	81 (48,5)	

### 3.1.2 Resposta do Tumor Primário à Terapia Neoadjuvante

Classificação de Regressão Tumoral (*Tumor Regression Grade*, TRG), como medida de resposta à radioterapia neoadjuvante, foi proposta pela primeira vez por Mandard *et al*, em 1994, para uso na avaliação de amostras patológicas em carcinoma de células escamosas do esófago após quimiorradioterapia neoadjuvante [62]. Mandard e colegas classificaram a TRG em cinco graus, com base na presença residual de células malignas e no grau de alterações fibrocísticas:

Tabela 4 - Índice de TGR de Mandard (adaptado de: Santos *et al.*)[63, 64]

TRG1	Não existem células malignas viáveis. Resposta completa.
TRG2	Células individuais ou pequenos grupos de células malignas.
TRG3	Carcinoma residual superado por fibrose.
TRG4	Fibrose significativa superada por carcinoma.
TRG5	Sem fibrose e com área residual maligna extensa.

Uma boa resposta foi definida como TRG 1-2 e a má resposta como TGR 3-4-5. Este índice é um bom preditor da Sobrevida Livre de Doença [63, 64].

A resposta foi avaliada na totalidade dos doentes estudados: 86 doentes (51,5%) eram Mandard 1 ou 2, significativo de boa resposta em 81 doentes (48.5%) eram Mandard 3, 4 ou 5 - má resposta.

A Sobrevida Livre de Doença ou Disease Free Survival (DFS) é o período de tempo que compreende o tratamento primário do carcinoma até ao período inicial de que o doente apresenta sobrevivência sem sinal de malignidade.

## 3.2 Extração e Quantificação de DNA

### 3.2.1 Sangue total

O DNA genómico foi isolado e extraído de leucócitos presentes em 123 amostras de 1,5 mL de sangue total periférico congelado, provenientes do Centro Hospitalar do Porto, utilizando o *Citogene® DNA Blood Kit* – (Citomed, Lisbon, Portugal), seguindo as instruções do fabricante. Este método é baseado no método clássico de “salting out”,

descrito por Miller em 1988 [65] - envolve precipitação das proteínas celulares por desidratação com uma solução saturada de NaCl (cf. Material Suplmentar, protocolo 1).

O DNA obtido foi quantificado através do *Nanodrop* (ND-1000 V3.6.0, *Thermo Scientific*). Foi realizada uma quantificação para cada caso, exceto em casos em que a concentração de DNA era inferior a 15 µg/µL de modo a confirmar se o valor obtido era real, não sendo, a amostra, passível de utilização.

A determinação foi feita por densidade ótica, utilizando o espectrofotómetro a um comprimento de onda de 260 nm.

Foram, também, avaliados os valores obtidos no comprimento de onda de 230 nm e 280 nm: razões de absorvância 260/230 e 260/280 - valores que se encontram entre 1,8-2,0 são indicadores da pureza e qualidade do DNA, ou seja, indicam-nos que a amostra está livre de contaminação quer por sais orgânicos, quer por proteínas, respetivamente.

### 3.2.2 Tecidos

No caso dos indivíduos dos quais era impossível obter uma amostra de sangue, a extração de DNA foi realizada em amostras de tecido tumoral fixado em parafina, gentilmente cedidos pelo Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar do Porto. Foram realizadas 44 extrações com auxílio do GRS® Genomic DNA Kit – Tissue (Grisp, Porto, Portugal). O protocolo do fabricante foi otimizado de modo a garantir os melhores resultados (cf. Material Suplementar, protocolo 2).

### 3.3 Seleção dos Polimorfismos

Um tagSNP é uma representação de um conjunto de SNPs (que se designa de haplótipo) que se encontram em desequilíbrio de ligação entre eles. Estes SNPs estão localizados numa determinada região do genoma e desta forma é possível identificar uma variação genética e associa-la a um fenótipo de doença sem genotipar todos os SNPs de um determinada região cromossómica reduzindo custos e tempo de trabalho.

Usando uma abordagem tagSNP as variantes genéticas foram recuperados a partir de um conjunto de SNPs comuns na população de descendência Europeia do “HapMap Project (CEU)”. Através do uso do “Genome Variation Server (versão 7.00)” foram recuperados tagSNPs tendo em conta os seguintes critérios:

- Frequência alélica igual ou superior a 15%;

- SNPs localizados na região de codificação dos genes e mais 2 kb *upstream* e *downstream*;
- Com  $r^2$  (grau de hereditabilidade) superior a 0,8. Este valor é o valor mínimo para que as variantes seja agrupadas de acordo com o seu padrão genotípico.

Foram capturados um total de 140 tagSNPs: 6, 15, 31 e 88 tagSNPs nos genes COX-2, HPGD, SLCO2A1 e ABCC4, respetivamente e ainda selecionados outros SNPs devido à sua alta probabilidade de sucesso por genotipagem usando a plataforma Sequenom (Sequenom, San Diego, CA). Os SNPs foram organizados por prioridade:

1. Todos os tagSNPs não *singleton* ou *singleton* com repercussão funcional esperada;
2. Substituição dos tagSNPs que tinham baixa probabilidade de genotipagem por variantes representativas;
3. *Singleton* não significativos.

Um *singleton* é um SNP que não tem marcadores contíguos em desequilíbrio de ligação. [66]

Por fim, um total de 55 SNPs foram escolhidos para genotipagem na plataforma Sequenom. A escolha destes polimorfismos deve ser remetida ao trabalho iniciado no mestrado e finalizado no doutoramento da Doutora Ana Carina Pereira à qual agradeço a colaboração.

Foram também selecionados SNPs previamente descritos na literatura, através de uma revisão bibliográfica. No total foram analisados 61 SNPs dos genes COX-2, HPGD, SLCO2A1, ABCC4, IL-10, EGFR, TNF, CCND1, NAT2 e IGF-1.

### 3.3.1 Genotipagem

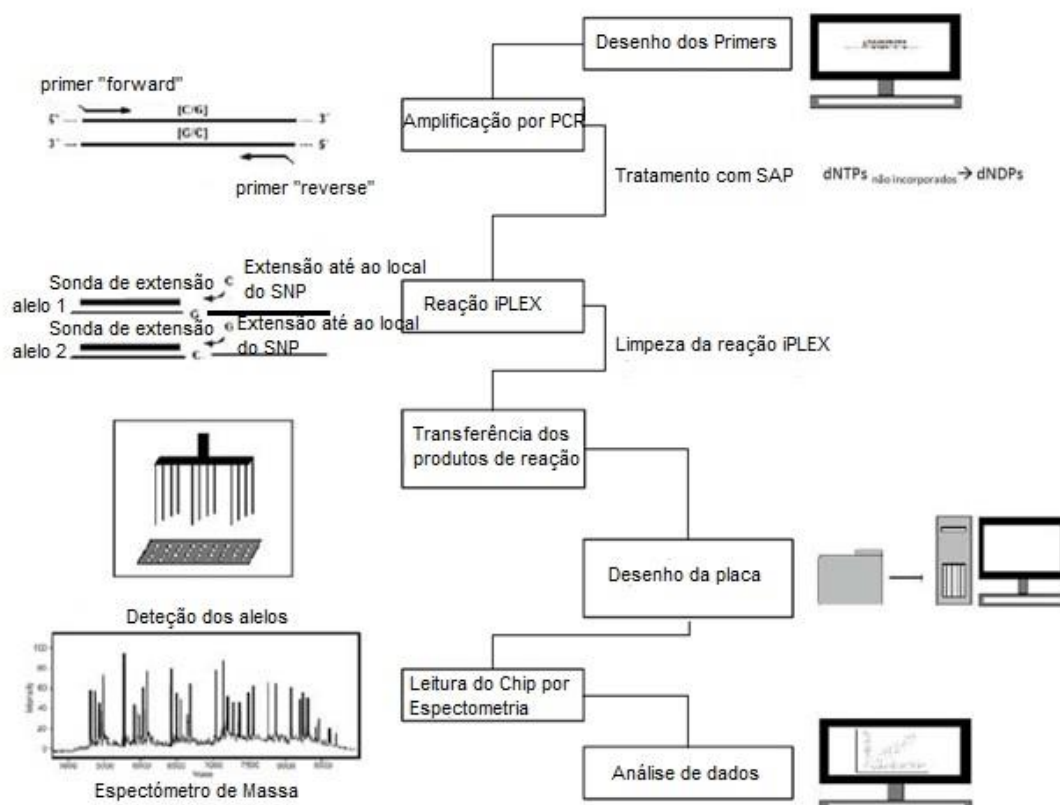


Figura 8 - Fases da técnica Sequenom iPLEX Gold (adaptado de: Genotyping with Sequenom)

A genotipagem foi realizada utilizando a tecnologia “MassARRAY Iplex Gold (Sequenom, San Diego, CA)”. Esta técnica permite analisar diversos SNPs simultaneamente num mesmo ensaio. Para tal, é necessário desenhar primers específicos para cada fragmento de interesse e garantir que, nem as sequências dos primers nem as massas moleculares dos fragmentos se sobrepõe. A utilização do software SEQUENOM’s Assay Design facilita esta tarefa.

A primeira fase da técnica é um PCR convencional, no qual os fragmentos com os SNPs de interesse são amplificados. Através do MassARRAY Liquid Handler (Sequenom, San Diego, Califórnia) a mistura de reação é distribuída pelas placas de 384 poços previamente preparadas com DNA e de seguida, num termociclador convencional, sujeitam-se as amostras a um programa específico de amplificação.

Após a amplificação dos fragmentos é necessário proceder à neutralização dos desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) que não foram incorporados nas cadeias de DNA sintetizadas, convertendo-os em difosfatos de desoxirribonucleótidos (dNDPs), de modo a torna-los inativos em reações futuras. Assim, aos produtos de PCR adiciona-se,

recorrendo ao MassARRAY Liquid Handler (Sequenom, San Diego, Califórnia), uma solução contendo a enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) e incubam-se as placas.

Neutralizados os dNTPs, procede-se à reação de extensão iPLEX Gold. Uma nova mistura de reação é preparada e distribuída pelas placas contendo o produto de PCR e neutralização. Novamente as amostras são sujeitas a um procedimento semelhante ao PCR, mas no qual ocorre um *annealing* de sondas de extensão (que complementam o fragmento amplificado até ao nucleótido imediatamente anterior ao locus do SNP em análise), em vez dos tradicionais *primers*. A etapa da extensão difere igualmente do PCR convencional, na medida em que apenas um nucleótido é incorporado. Este é um nucleótido de terminação que marca o final do fragmento e permite a sua deteção.

Antes de proceder à deteção dos alelos por espectroscopia de massa, é necessário dessalinizar os produtos de extensão e transferi-los para um SpectroCHIP® array, recorrendo ao MassARRAY nanodispenser (Sequenom, San Diego, Califórnia). O SpectroCHIP® array é então analisado pelo MassARRAY analyzer (Sequenom, San Diego, Califórnia), um espectrómetro de massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight) desenhado especificamente para análise genómica. Por fim, os resultados são analisados através do software TyperAnalyzer.

O controlo de qualidade do ensaio foi efetuado através da utilização de indivíduos de genótipo conhecido (HapMap) como controlos positivos; amostras duplicadas na mesma e entre as várias placas como controlos inter-ensaio; amostras de água, sem DNA como controlos negativos e verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) - permite inferir acerca da estabilidade da distribuição das frequências alélicas e genótípicas do SNP na população em geral entre gerações. Sempre que os seus valores são maiores que 0,05 existe evidência da referida estabilidade e, no contexto de genotipagem, uma certeza de que não ocorreu nenhum erro no processo.

Esta técnica foi, gentilmente, realizada pela Unidade de Genómica/Serviço de Genotipagem do Instituto Gulbenkian de Ciência de Oeiras em Portugal, ao qual expresso novamente os meus agradecimentos.

### 3.3.1.1 Controlo de Qualidade

Os genótipos foram excluídos da análise por não respeitarem os seguintes critérios:

- “*Call rate*”, definida como a fração de SNPs por amostra sobre o número total de SNPs no conjunto de dados, inferior a 0,90;

- “*Concordance rate*”, definida como a taxa de probabilidade de que duas pessoas com genes partilhados desenvolvam a mesma doença, inferior a 0,95;
- Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE)  $P < 0,05$ ;
- Interpretação do genótipo a nível informático e também por um investigador de forma independente.

### 3.4 Análise Estatística

A análise de sobrevivência foi realizada utilizando o software “IBM Statistical Package for Social Sciences - SPSS (IBM Corp., Armonk, Nova Iorque, EUA) (versão 20.0)”.

Para análise da distribuição genética, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado pelo teste de chi-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) para comparar a distribuição de genótipos observada [67]. Os cálculos foram confirmados com recurso a folha de cálculo desenvolvida por Michael H.Court (2005-2008).

*Odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança de 95 % (IC) foram calculados com recurso ao programa “Epi Info 7™” e confirmados com o “IBM Statistical Package for Social Sciences - SPSS (IBM Corp., Armonk, Nova Iorque, EUA) (versão 20.0)” como uma medida da associação entre as variantes genéticas e a análise de recidiva.





## 4. RESULTADOS





#### 4.1 Frequência dos Genótipos e Risco

Um total de 61 SNPs foram analisados com o intuito de identificar polimorfismos capazes de influenciar a resposta à terapia neoadjuvante em doentes com CCR. Cinco das amostras utilizadas foram excluídas da análise devido a erros inerentes à técnica de genotipagem. As frequências de todos os SNPs analisados neste estudo encontram-se dentro dos valores de Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0.05$ )

De todos os polimorfismos analisados, quatro SNPs pertencentes aos genes SLCO2A1 e ABCC4, respetivamente, encontram-se associados à resposta à terapia neoadjuvante. Na tabela 5 encontram-se descritas as frequências desses mesmo polimorfismos rs9821091, rs9834412, rs7340717 e rs8002180.

Tabela 5 - Frequências dos genótipos dos casos

Gene/SNP	Genótipo	Casos n (%)	Sem recidiva n (%)	Com recidiva n (%)	Recidiva Total n (%)
<b>SLCO2A1</b>					
rs9821091	GG	77 (45.3)	60 (44.4)	12 (44.4)	72 (44.4)
	GA	69 (40.6)	61 (45.2)	6 (22.2)	67 (41.4)
	AA	24 (14.1)	14 (10.4)	9 (33.3)	23 (14.2)
rs9834412	CC	103 (60.6)	82 (60.7)	14 (51.9)	96 (59.3)
	CA	60 (35.3)	50 (37.0)	9 (33.3)	59 (36.4)
	AA	7 (4.1)	3 (2.2)	4 (14.8)	7 (4.3)
rs7340717	GG	79 (47.0)	57 (42.9)	17 (63.0)	74 (46.2)
	GT	76 (45.2)	65 (48.9)	10 (37.0)	75 (46.9)
	TT	13 (7.7)	11 (8.3)	0 (0)	11 (6.9)
rs4148421*	CC	43 (25.3)	36 (26.7)	5 (18.5)	41 (25.3)
	CA	87 (51.2)	69 (51.1)	14 (51.9)	83 (51.2)
	AA	40 (23.5)	30 (22.2)	8 (29.6)	38 (23.5)
<b>ABCC4</b>					
rs8002180	TT	78 (45.9)	62 (45.9)	13 (48.1)	75 (46.3)
	TC	72 (42.4)	53 (39.3)	14 (51.9)	67 (41.4)
	CC	20 (11.8)	20 (14.8)	0 (0)	20 (12.3)
rs869951*	GG	52 (31.1)	37 (28.0)	11 (40,7)	48 (30.2)
	GC	81 (48.5)	64 (48.5)	14 (51.9)	78 (49.1)
	CC	34 (20.4)	31 (23.5)	2 (7.4)	33 (20.8)

Os polimorfismos assinalados na tabela 5 com um (\*) – rs4148421 e rs869951 foram escolhidos para exemplificar que as associações que iremos observar posteriormente na Análise de Sobrevivência não são validas para todos os SNPs do mesmo gene.

## 4.2. Análise de Sobrevivência

Após estudo da Sobrevida Livre de Doença em doentes submetidos a terapia neoadjuvante observamos que das 15 variações estudadas do gene *SLCO2A1*, três são estatisticamente significativas:

A análise de sobrevivência do rs9821091 demonstra diferenças estatisticamente significativas na Sobrevida Livre de Doença dos diferentes genótipos (GA vs GG vs AA,  $p = 0,001$ )

Para os genótipos GG, GA e AA, verificamos que os portadores têm uma Sobrevida Livre de Doença de 135, 125 e 124 meses, respetivamente (Figura 9).

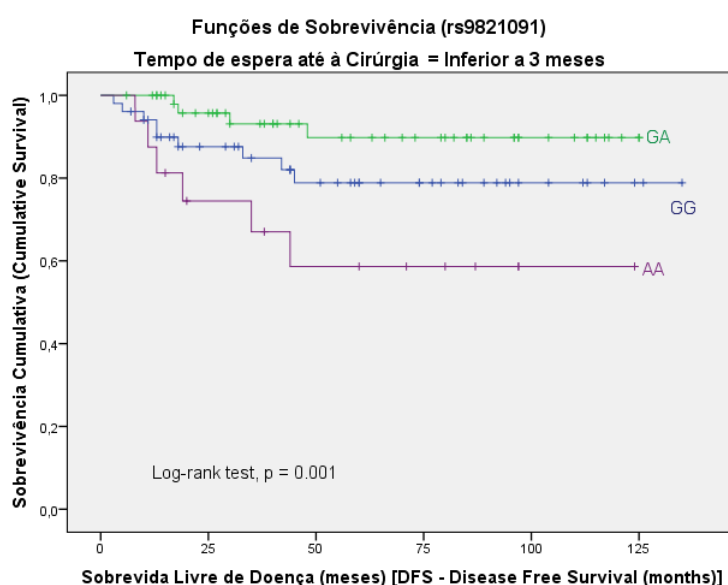


Figura 9 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram a correlação entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs9821091 em doentes com CCR tratados com QRT neoadjuvante

Na análise de sobrevivência do rs9834412 observamos, novamente, diferenças estatisticamente significativas entre a Sobrevida Livre de Doença dos diferentes genótipos (CA vs CC vs AA,  $p = 0,039$ ).

Para os genótipos CC, CA e AA verificamos uma Sobrevida Livre de Doença de 135, 121 e 110 meses, respetivamente (Figura 10). Este padrão de DFS (maior número de meses de sobrevivência para o genótipo CC, mas pior DFS que o genótipo GA), pode ser devido ao tamanho da amostra ou o polimorfismo não ter um impacto acentuado nos genótipos.

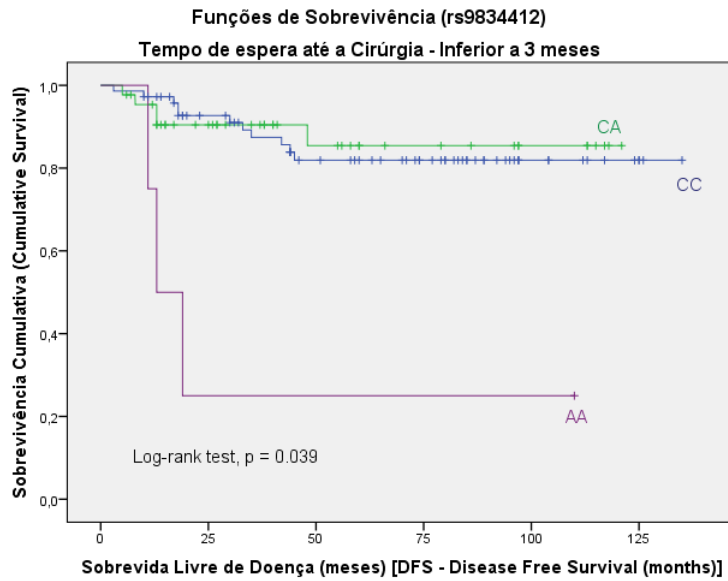


Figura 10 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram a correlação entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs9834412 em doentes com CCR tratados com QRT neoadjuvante

A análise de sobrevivência do rs7340717 demonstra diferenças estatisticamente significativas entre a Sobrevida Livre de Doença dos diferentes genótipos (TT vs GT vs GG,  $p = 0,039$ ).

Para os genótipos GG, GT e TT, verificamos que os portadores têm uma Sobrevida Livre de Doença de 126, 124 e 95 meses, respetivamente (Figura 11).

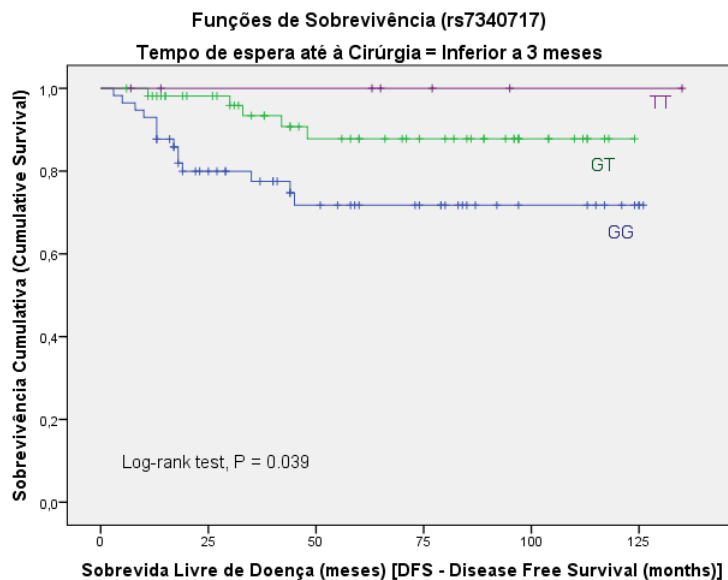


Figura 11 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram a correlação entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs7340717 em doentes com CCR tratados com QRT neoadjuvante

A título de exemplo de que estas associações não se verificam para todos os SNPs do gene *SLCO2A1* temos o rs4148421, para o qual a análise de correlação dos diferentes genótipos e a DFS não é estatisticamente significativa –  $p = 0,989$  (Figura 12).

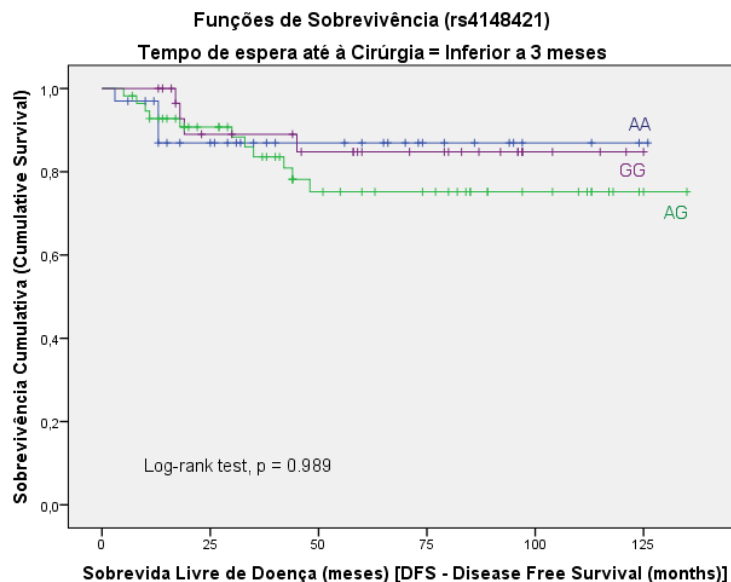


Figura 12 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram uma correlação que não é estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs4148421

Relativamente ao gene *ABCC4*, das 31 variações estudadas, uma é estatisticamente significativa:

Para o rs8002180 foram demonstradas diferenças estatisticamente significativas entre a Sobrevida Livre de Doença dos diferentes genótipos (CC vs TT vs TC,  $p = 0,030$ ).

Para os genótipos TT, TC e CC, verificamos que os portadores têm uma Sobrevida Livre de Doença de 125, 125 e 126 meses, respetivamente (Figura 13).

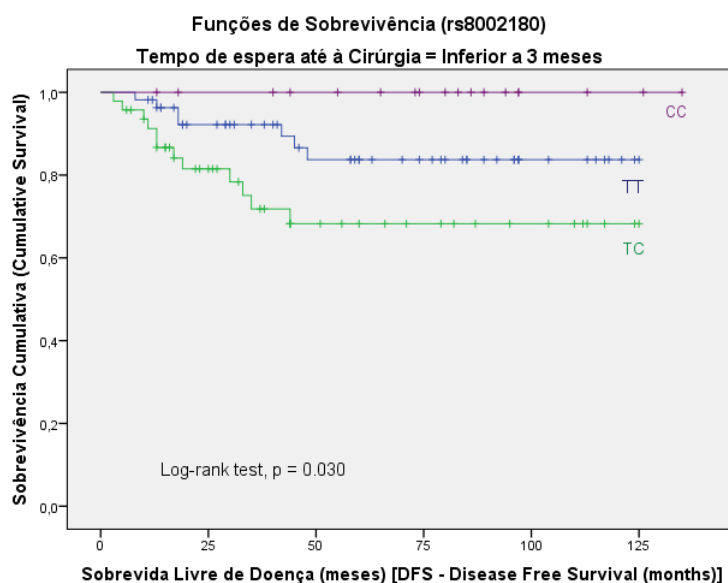


Figura 13 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram a correlação entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs8002180 em doentes com CCR tratados com QRT neoadjuvante

Para o rs869951, temos o exemplo contrário - tal como ocorre no gene SLCO2A1 nem todos os SNPs são preditivos de resposta à terapia neoadjuvante –  $p = 0,435$  (Figura 14).

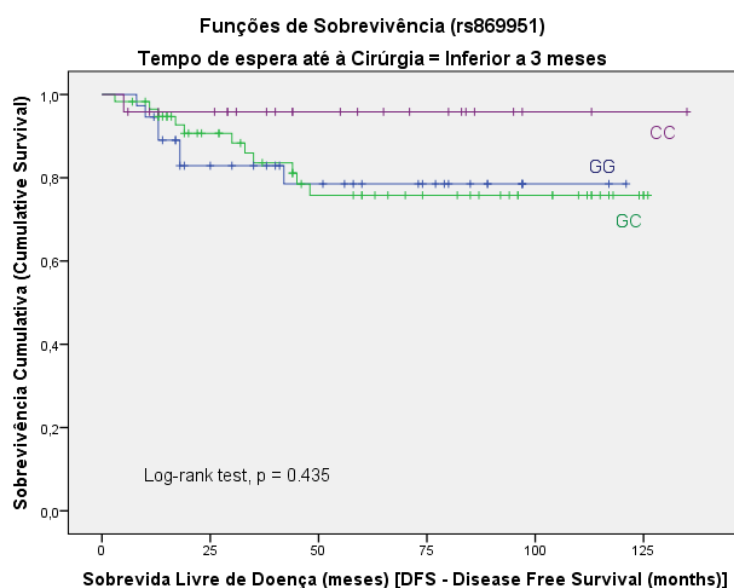


Figura 14 - Curvas de Kaplan-Meier que demonstram uma correlação que não é estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos e sobrevida livre de doença (DFS) para o rs869951

#### 4.2.2 Avaliação do Risco de Recidiva

Tabela 6 - Estimativa do Risco de Recidiva

Gene/SNP	Genótipo/Genótipo de Risco	Sem recidiva n (%)	Com recidiva n (%)	OR*	IC 95%	P value**
<b>SLCO2A1</b>						
rs9821091	GG	60 (44,4)	12 (44,4)	1,00	referência	-
	GA	61 (45,2)	6 (22,2)			
	AA	14 (10,4)	9 (33,3)	4,32	1,63-11,43	< 0,01
rs9834412	CC	82 (60,7)	14 (51,9)	1,00	referência	-
	CA	50 (37,0)	9 (33,3)			
	AA	3 (2,2)	4 (14,8)	7,65	1,61-36,46	< 0,01
rs7340717	TT	11 (8,3)	0 (0)	1,00	referência	-
	GT	65 (48,9)	10 (37,0)			
	GG	57 (42,9)	17 (63,0)	2,27	0,97-5,32	0,056
<b>ABCC4</b>						
rs8002180	CC	20 (14,8)	0 (0)	1,00	referência	-
	TT	62 (45,9)	13 (48,1)			
	TC	53 (39,3)	14 (51,9)	1,67	0,73-3,82	0,225

\*Odds Ratio (OR) calculado entre os sub-grupos de genótipos.

\*\*Teste  $\chi^2$ .

Na tabela 6 está descrita a estimativa de risco de recidiva para cada polimorfismo:

- Doentes com genótipo AA (OR: 4,32  $p < 0,01$ ) do rs9821091 e genótipo AA (OR: 7,65  $p < 0,01$ ) do rs9834412 têm um risco de recidiva, quatro e sete vezes superior, respetivamente, para além do facto de se apresentarem como os indivíduos mais comprometidos a nível da sobrevida livre de doença ( $p = 0,001$  e  $p = 0,039$ , respetivamente);
- Indivíduos com genótipo GG do rs7340717 ( $p = 0,039$ ) encontram-se comprometidos a nível da sobrevida livre de doença. Apesar de não ser uma associação estatisticamente significativa, existe uma tendência para que doentes com genótipo GG (OR: 2,27  $p = 0,056$ ) apresentem um risco de recidiva superior;
- Indivíduos com genótipo TC do rs8002180 também têm uma sobrevida livre de doença comprometida em relação aos restantes genótipos ( $p = 0,030$ ).

Estas associações verificam-se em doentes que aguardaram entre o início da terapia neoadjuvante e a data de cirurgia, um período inferior a 3 meses.





## 5. Discussão





Apesar do adenocarcinoma do cólon e reto ser a neoplasia do trato gastrointestinal com estratégias de prevenção mais antigas e eficazes, continua a ser o terceiro tipo de neoplasia mais frequente no mundo, a segunda mais frequente em Portugal sendo altamente prevalente na região norte do país [13, 16, 17]. A aplicação de medidas mais eficazes de rastreio e diagnóstico nem sempre é exequível o que implica estarmos ainda longe do impacto positivo desejado [68]. Os fatores ambientais e genéticos têm um papel importante na carcinogénese cólon-retal e a identificação de polimorfismos fornece novas perspectivas de auxílio na prevenção, diagnóstico e terapêutica que podem ajudar a diminuir a taxa de mortalidade por CCR. Os SNPs como variações polimórficas podem influenciar a função de determinada proteína levando a expressão de **diferentes graus de sensibilidade à radiação** [52].

Os nossos resultados indicam que quatro polimorfismos genéticos estão implicados na sobrevida livre de doença e na possibilidade de recidiva: rs9821091, rs9834412 e rs7340717 no gene SLCO2A1 e o rs8002180 no gene ABCC4. Doentes com genótipo AA (OR: 4,32  $p < 0,01$ ) do rs9821091 e genótipo AA (OR: 7,65  $p < 0,01$ ) do rs9834412 têm um risco de recidiva, quatro e sete vezes superior, respetivamente, para além do facto de se apresentarem como os indivíduos mais comprometidos a nível da sobrevida livre de doença ( $p = 0,001$  e  $p = 0,039$ , respetivamente).

Indivíduos com genótipo GG do rs7340717 ( $p = 0,039$ ) encontram-se comprometidos a nível da sobrevida livre de doença. Apesar de não ser uma associação estatisticamente significativa, existe uma tendência para que doentes com genótipo GG (OR: 2,27  $p = 0,056$ ) apresentem um risco de recidiva superior. Indivíduos com genótipo TC do rs8002180 também têm uma sobrevida livre de doença comprometida em relação aos restantes genótipos ( $p = 0,030$ ).

Estas associações verificam-se em doentes que aguardaram entre o início da terapia neoadjuvante e a data de cirurgia, um período inferior a 3 meses.

A ativação de vias de fator de crescimento é comum em carcinoma do cólon e reto e um passo inicial e importante no desenvolvimento de um adenoma é a ativação da via de sinalização das prostaglandinas. Esta resposta anormal pode ser induzida por inflamação associada a sobre regulação de Cicloxigenase 2 (COX-2). A COX-2 é um gene de resposta precoce, sobre expresso em 40-50% dos adenomas e 85 % dos CCR sendo responsável pela acumulação de prostaglandinas (PGs) no microambiente celular [69]. Medeia a síntese de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) que vai estimular a proliferação celular, invasão, angiogénese, evasão de apoptose e modulação da resposta imune anti tumoral [70]. A 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase (15-PGDH) atua como antagonista da COX-2 - cataboliza a PGE<sub>2</sub> a um corpo cetónico inativo. É

expressa na mucosa normal e é um dos genes *downregulated* em tumores do cólon e reto, sendo supressor de neoplasia do cólon por diminuição do catabolismo de PGE<sub>2</sub> [71, 72].

Os efeitos biológicos das vias COX-2/PGE<sub>2</sub> não só são regulados pela síntese de COX-2 ou a degradação da 15-PGDH, mas também pelos níveis de PGE<sub>2</sub> no microambiente extracelular. Os níveis de PGE<sub>2</sub> são **regulados por transportadores importantes neste processo** [73, 74].

As proteínas de transporte de fármacos são expressas em diversos tipos de tecido, incluindo **cólon**, fígado, rim e cérebro. São importantes moduladores da absorção e disposição de fármacos e a variabilidade na expressão ou função das proteínas afeta o perfil farmacocinético do fármaco e portanto a sua eficácia.

São, geralmente, classificados em duas categorias (Figura 15): Transportadores de Captação e Transportadores de Efluxo.

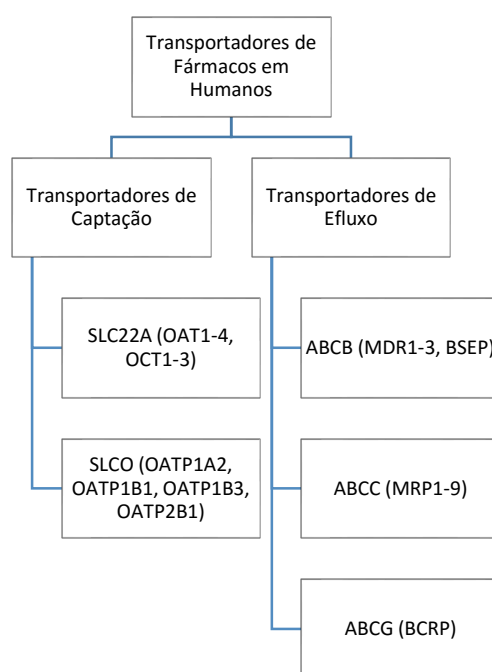


Figura 15 - Transportadores de Fármacos em Humanos (adaptado de: *Genomics in Drug Discovery and Development*)[75]

\*OAT – Transportador de Aniões Orgânico (*Organic Anion Transporter*); OATP – Proteína Transportadora de Aniões Orgânicos (*Organic Anion Transporter Protein*); OCT – Transportador de Catiões Orgânico (*Organic Cation Transporter*); BSEP – Bomba Exportadora de Sais Biliares (*Bile Salt Export Pump*); MDR – Proteína de Resistência a Múltiplos Fármacos (*Multi Drug Resistance Protein*); MRP – Proteína Associada a Resistência a Múltiplos Fármacos (*Multi Drug associated Resistance Protein*); BCRP - Proteína de Resistência em Cancro da Mama (*Breast Cancer Resistance Protein*).

A família de transportadores ABC esta descrita como tendo 48 membros presentes no ser humano [76] e 12 deles são reconhecidos como transportadores de fármacos [77]: incluindo a P-glicoproteína (codificada pelo gene ABCB1), a MDR-1 *associated protein* ou MRP1 (codificada pelo gene ABCC1) e a *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) que é codificada pelo gene ABCG2 [78].

Pacientes com tumores refratários à quimioterapia têm, geralmente, uma expressão aumentada de um determinado transportador ABC. Estes transportadores estão localizados no citoplasma da membrana das células resistentes, o que resulta num aumento do efluxo do fármaco [79].

Os transportadores pertencentes à família SLC (*Solute Carrier Family*) não dependem diretamente da hidrólise de ATP e são em grande parte, mas não exclusivamente, transportadores de captação - isto é, absorvem pequenas moléculas (amino ácidos, oligopéptidos, açúcares, aniões orgânicos e alguns fármacos). Este processo de absorção, sem contrariar o gradiente de concentração é denominado de Difusão Facilitada. A maior parte dos transportadores de efluxo fazem parte da família ABC e utilizam energia da hidrólise do ATP para transportar substâncias, a favor ou contra o gradiente de concentração – Transporte Ativo [75].

As PGs são sintetizadas a partir do ácido araquidônico libertado pelos fosfolípidos de membrana por ações enzimáticas sequenciais no interior da célula e exercem os seus efeitos autócrinos e parácrinos principalmente por ligação a recetores de membrana extracelulares [80, 81]. As PGs são lípidos, pelo que a sua difusão na membrana é dificultada pela sua carga negativa [74]. Assim o transporte de PGs através da membrana celular é realizado por um membro da família ABC denominado de ABCC4 (também conhecido como MRP4) e um membro da família SCL denominado de SCLO2A1 (também conhecido como PGT ou OATP2A1) [82, 83]. O gene ABCC4 atua no efluxo de PGs a partir da célula (transportador de efluxo) [73, 82, 84, 85]. SLCO2A1 medeia o efluxo ou captação, de acordo com o gradiente de concentração de lactato, mas preferencialmente promove a captação de PGs do espaço extracelular (transportador de captação) [86, 87].

A proteína associada a resistência a múltiplos fármacos 4 (MRP4) é responsável pelo efluxo de PGE<sub>2</sub> para o meio extracelular [73]. Por outro lado, a captação ativa para o citoplasma, onde vai PGE<sub>2</sub> ser inativada pela 15-HPGD é efetuada pelo transportador da prostaglandina (PGT) [74]. Holla *et al.*, relataram que os níveis de mRNA de PGT e MRP4 são inversamente proporcionais em CCR – PGT sub expresso e MRP4 sobre expresso em tecidos e linhas celulares conduzindo a níveis mais elevados de PGE<sub>2</sub> no meio extracelular aumentando assim os efeitos biológicos da via COX-2/PGE<sub>2</sub> [88].

Embora permaneçam questões em torno da função biológica de cada SNP ou do seu papel cumulativo geral e interação com fatores ambientais, os polimorfismos estudados, à luz dos resultados obtidos, poderiam ser aplicados numa perspectiva de prática de medicina personalizada. Os resultados obtidos demonstram que para determinados genótipos, os doentes vão apresentar pior sobrevida livre de doença e, em alguns casos, inclusivamente, risco de recidiva. Em termos de tradução para a prática clínica hospitalar, a inclusão do genótipo na estratificação dos doentes seria importante para aferir quais iriam ou não beneficiar mais da terapia neoadjuvante. Não só teríamos uma perspectiva de tratamento animadora em alguns doentes, como doentes com genótipos de risco podiam ser poupados a uma terapia agressiva sem qualquer benefício, o que também se poderá repercutir nos custos do tratamento.





## 6. CONCLUSÕES GERAIS & PERSPETIVAS FUTURAS





A resposta inflamatória anormal está associada a sobre regulação de Cicloxigenase 2 (COX-2). A COX-2 é um gene de resposta precoce, sobre expresso em 40-50% dos adenomas e 85 % dos CCR. É responsável pela acumulação de prostaglandinas (PGs) no microambiente celular [69]. Medeia a síntese de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) que vai estimular a proliferação celular, invasão, angiogênese, evasão de apoptose e modulação da resposta imune anti tumoral [70].

O envolvimento dos genes SLCO2A1 e ABCC4, que codificam a PGT e MRP4, respetivamente é importante no desenvolvimento da doença. O aumento de COX-2 e MRP4 e repressão de 15-HPGD e PGT está associada a altos níveis de PGE<sub>2</sub> no meio extracelular culminando com a ativação de um grande número de vias que potenciam o desenvolvimento do tumor [86, 87].

Neste estudo coorte retrospectivo foi avaliado o envolvimento de 61 SNPs em 10 genes (COX-2, HPGD, SLCO2A1, ABCC4, IL-10, EGFR, TNF, CCND1, NAT2 e IGF-1), em especial o papel chave dos genes SCLO2A1 e ABCC4 na via das Prostaglandinas e como podem contribuir para o desenvolvimento da doença e limitar a resposta a terapia neoadjuvante.

Os nossos resultados indicam que quatro polimorfismos genéticos estão implicados na sobrevida livre de doença e na possibilidade de recidiva: rs9821091, rs9834412 e rs7340717 no gene SLCO2A1 e o rs8002180 no gene ABCC4. Doentes com genótipo AA (OR: 4,32 p < 0,01) do rs9821091 e genótipo AA (OR: 7,65 p < 0,01) do rs9834412 têm um risco de recidiva, quatro e sete vezes superior, respetivamente, para além do facto de se apresentarem como os indivíduos mais comprometidos a nível da sobrevida livre de doença (p = 0,001 e p = 0,039, respetivamente).

Indivíduos com genótipo GG do rs7340717 (p = 0,039) encontram-se comprometidos a nível da sobrevida livre de doença. Apesar de não ser uma associação estatisticamente significativa, existe uma tendência para que doentes com genótipo GG (OR: 2,27 p = 0,056) apresentem um risco de recidiva superior. Indivíduos com genótipo TC do rs8002180 também têm uma sobrevida livre de doença comprometida em relação aos restantes genótipos (p = 0,030).

Estas associações verificam-se em doentes que aguardaram entre o início da terapia neoadjuvante e a data de cirurgia, um período inferior a 3 meses.

O desafio passa por usar SNPs como biomarcadores, que podem ter como alvo as populações de maior risco, tanto em modalidades de quimiorradioterapia preventivas traduzindo o seu efeito biológico para a prática clínica, como para rastreio, mas neste caso implicaria um novo desenho do estudo.

Não existe literatura prévia sobre os efeitos destes SNPs a nível molecular nem quaisquer dados elucidativos de como se dá o aumento de expressão de COX-2 e

consequente aumento da regulação de PGE<sub>2</sub> pós irradiação. Estudos anteriores colocam a hipótese de que a sobre regulação de PGE<sub>2</sub> como consequência da radiação pode ser explicada, pela observação de que pelo menos duas enzimas da via da cicloxigenase - Fosfolipase A2 e **COX-2**, são sensíveis ao *stress* oxidativo e aos radicais livres.

Por estas razões e como perspectivas futuras seria interessante replicar este estudo num maior número de doentes com CCR, sendo a amostra uniformizada, e num rácio de um doente para três controlos. É também importante confirmar os resultados obtidos nas genotipagens por Real Time PCR, que não foi possível devido ao período de tempo de trabalho disponível. Reunir o maior número de informações clínicas dos doentes, como a história pessoal e familiar de neoplasia e doenças inflamatórias intestinais, dieta, estilo de vida (alcoolismo e tabagismo), uso de AINEs, para que a análise possa ser estratificada e também abordada como um efeito cumulativo de vários fatores.

É importante realizar mais estudos de modo a que seja avaliada a consequência funcional que cada SNP tem na respetiva enzima e também elucidar os mecanismos que regulam a sobre expressão de prostaglandinas após irradiação.





6. REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS





1. RORENO. *Estatísticas*. 2008.
2. Pereira, C., et al., *Genetic variability in key genes in prostaglandin E2 pathway (COX-2, HPGD, ABCC4 and SLCO2A1) and their involvement in colorectal cancer development*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e92000.
3. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
4. Kutz H, C.C., *Colon Cancer, Resident Teaching Conference*. 2004.
5. Hamilton SR, B.F., Boffetta P, et al., *Carcinoma of the colon and rectum in WHO Classification of Tumours of the Digestive System*, C.F. Bosman FT, Hruban RH, Theise ND, eds., Editor. 2010, IARC Press: Lyon. p. 134-46.
6. Kubo A, K.Y., Yanagisawa A, Rubio CA, Hiratsuka H, *Serrated adenoma*. Serrated adenoma, 1997(9): p. 559-563.
7. Kang, H., et al., *Rare tumors of the colon and rectum: a national review*. Int J Colorectal Dis, 2007. **22**(2): p. 183-9.
8. Madeira BC, L.P.K., Zettler GC, Cambuzzi E, *The Relation Between Metastases in Regional Lymph Nodes and Prognostic Factors in the Sporadic Adenocarcinoma of the Large Bowel*. Rev bras Coloproct, 2009. **29**(4): p. 472-478.
9. Wong, H.H. and P. Chu, *Immunohistochemical features of the gastrointestinal tract tumors*. J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(3): p. 262-84.
10. Leopoldo, S., et al., *Two subtypes of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: clinicopathological and genetic features*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(5): p. 1429-39.
11. Sasaki, S., et al., *Characteristics in primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum, from clinicopathological observations*. Jpn J Clin Oncol, 1998. **28**(3): p. 202-6.
12. Cagir, B., et al., *Adenosquamous carcinoma of the colon, rectum, and anus: epidemiology, distribution, and survival characteristics*. Dis Colon Rectum, 1999. **42**(2): p. 258-63.
13. Globocan. *Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. 2012 [cited 2014 06/05/2014].
14. Pinheiro, M., et al., *Colorectal carcinomas with microsatellite instability display a different pattern of target gene mutations according to large bowel site of origin*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 587.
15. Johnson, I.T. and E.K. Lund, *Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **26**(2): p. 161-81.
16. Abreu MH, P.F., Rocha R, Pinto J *Rectal cancer epidemiology*. In: Santoro GA, Rectal Cancer - A Multidisciplinary Approach to Management, G. A. Santoro, In Tech., 2010.
17. Abreu, M.H., et al., *Staging and survival of rectal cancer in Vila Nova de Gaia, Portugal*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2010. **22**(2): p. 151-6.
18. Willett, W.C., *Diet and cancer: an evolving picture*. JAMA, 2005. **293**(2): p. 233-4.
19. Labianca, R., et al., *Colorectal cancer: screening*. Ann Oncol, 2005. **16 Suppl 2**: p. ii127-32.
20. de Jong, A.E., et al., *Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(1): p. 139-43.
21. Zisman, A.L., et al., *Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening*. Arch Intern Med, 2006. **166**(6): p. 629-34.
22. Botteri, E., et al., *Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis*. Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 388-95.
23. Kaser, A., S. Zeissig, and R.S. Blumberg, *Inflammatory bowel disease*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 573-621.
24. Poschl, G. and H.K. Seitz, *Alcohol and cancer*. Alcohol Alcohol, 2004. **39**(3): p. 155-65.

25. McMichael, A.J., *Food, nutrition, physical activity and cancer prevention. Authoritative report from World Cancer Research Fund provides global update*. Public Health Nutr, 2008. **11**(7): p. 762-3.
26. DeVita VT Jr, H.S., Rosenberg SA, *Cancer: principles & practice of oncology*. 2001. **6th ed. Philadelphia**: p. 1216–1271.
27. Boardman, L.A., et al., *Colorectal cancer risks in relatives of young-onset cases: is risk the same across all first-degree relatives?* Clin Gastroenterol Hepatol, 2007. **5**(10): p. 1195-8.
28. Boyle, P. and J.S. Langman, *ABC of colorectal cancer: Epidemiology*. BMJ, 2000. **321**(7264): p. 805-8.
29. Lee, K.J., et al., *Physical activity and risk of colorectal cancer in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based prospective study*. Cancer Causes Control, 2007. **18**(2): p. 199-209.
30. Winawer, S.J. and A.G. Zauber, *The advanced adenoma as the primary target of screening*. Gastrointest Endosc Clin N Am, 2002. **12**(1): p. 1-9, v.
31. Ries LAG, M.D., Krapcho M, *SEER cancer statistics review, 1975–2005*. 2008.
32. O'Connell, J.B., et al., *Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults*. Am Surg, 2003. **69**(10): p. 866-72.
33. O'Connell, J.B., et al., *Colorectal cancer in the young*. Am J Surg, 2004. **187**(3): p. 343-8.
34. Levin, B., et al., *Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(3): p. 130-60.
35. Heald, R.J., E.M. Husband, and R.D. Ryall, *The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence?* Br J Surg, 1982. **69**(10): p. 613-6.
36. Kiss, L., et al., *Pathological evidence in support of total mesorectal excision in the management of rectal cancer*. Chirurgia (Bucur), 2011. **106**(3): p. 347-52.
37. Maurer, C.A., et al., *The impact of the introduction of total mesorectal excision on local recurrence rate and survival in rectal cancer: long-term results*. Ann Surg Oncol, 2011. **18**(7): p. 1899-906.
38. MacFarlane, J.K., R.D. Ryall, and R.J. Heald, *Mesorectal excision for rectal cancer*. Lancet, 1993. **341**(8843): p. 457-60.
39. Kapiteijn, E., et al., *Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer*. N Engl J Med, 2001. **345**(9): p. 638-46.
40. Trial, S.R.C., *Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. Swedish Rectal Cancer Trial*. N Engl J Med, 1997. **336**(14): p. 980-7.
41. Camma, C., et al., *Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis*. JAMA, 2000. **284**(8): p. 1008-15.
42. Colorectal Cancer Collaborative, G., *Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials*. Lancet, 2001. **358**(9290): p. 1291-304.
43. Sauer, R., *Adjuvant and neoadjuvant radiotherapy and concurrent radiochemotherapy for rectal cancer*. Pathol Oncol Res, 2002. **8**(1): p. 7-17.
44. Rouanet, P., et al., *Conservative surgery for low rectal carcinoma after high-dose radiation. Functional and oncologic results*. Ann Surg, 1995. **221**(1): p. 67-73.
45. Gerard, J.P., et al., *Improved sphincter preservation in low rectal cancer with high-dose preoperative radiotherapy: the lyon R96-02 randomized trial*. J Clin Oncol, 2004. **22**(12): p. 2404-9.
46. Sebag-Montefiore, D., et al., *Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial*. Lancet, 2009. **373**(9666): p. 811-20.

47. Valentini, V., et al., *Preoperative chemoradiation for extraperitoneal T3 rectal cancer: acute toxicity, tumor response, and sphincter preservation*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998. **40**(5): p. 1067-75.
48. Marijnen, C.A., et al., *Impact of short-term preoperative radiotherapy on health-related quality of life and sexual functioning in primary rectal cancer: report of a multicenter randomized trial*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(9): p. 1847-58.
49. Pucciarelli, S., et al., *Health-related quality of life outcomes in disease-free survivors of mid-low rectal cancer after curative surgery*. *Ann Surg Oncol*, 2008. **15**(7): p. 1846-54.
50. Bujko, K., et al., *Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer*. *Br J Surg*, 2006. **93**(10): p. 1215-23.
51. Ngan, S.Y., et al., *Randomized trial of short-course radiotherapy versus long-course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with T3 rectal cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group trial 01.04*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(31): p. 3827-33.
52. Andreassen, C.N., et al., *Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes*. *Radiother Oncol*, 2003. **69**(2): p. 127-35.
53. Becouam, Y., et al., *Standards, options and recommendations for the management of patients with primary adenocarcinoma of the rectum*. *Presse Med*, 1999. **28**(25): p. 1367-74.
54. Carles, J., et al., *Single-nucleotide polymorphisms in base excision repair, nucleotide excision repair, and double strand break genes as markers for response to radiotherapy in patients with Stage I to II head-and-neck cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006. **66**(4): p. 1022-30.
55. Spindler, K.L., et al., *Prediction of response to chemoradiation in rectal cancer by a gene polymorphism in the epidermal growth factor receptor promoter region*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006. **66**(2): p. 500-4.
56. Knudsen, L.E., S.H. Loft, and H. Atrup, *Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man*. *Mutat Res*, 2001. **482**(1-2): p. 83-8.
57. Monzo, M., et al., *Pharmacogenomics: a tool for improving cancer chemotherapy*. *Clin Transl Oncol*, 2008. **10**(10): p. 628-37.
58. Brookes, A.J., *The essence of SNPs*. *Gene*, 1999. **234**(2): p. 177-86.
59. Pomerantz, M.M., et al., *The 8q24 cancer risk variant rs6983267 shows long-range interaction with MYC in colorectal cancer*. *Nat Genet*, 2009. **41**(8): p. 882-4.
60. Ahmadiyah, N., et al., *8q24 prostate, breast, and colon cancer risk loci show tissue-specific long-range interaction with MYC*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(21): p. 9742-6.
61. Zhang, X., et al., *Integrative functional genomics identifies an enhancer looping to the SOX9 gene disrupted by the 17q24.3 prostate cancer risk locus*. *Genome Res*, 2012. **22**(8): p. 1437-46.
62. Mandard, A.M., et al., *Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations*. *Cancer*, 1994. **73**(11): p. 2680-6.
63. Santos, M.D., et al., *Tumor regression grades: can they influence rectal cancer therapy decision tree?* *Int J Surg Oncol*, 2013. **2013**: p. 572149.
64. Santos, M.D., et al., *Prognostic value of mandard and dworak tumor regression grading in rectal cancer: study of a single tertiary center*. *ISRN Surg*, 2014. **2014**: p. 310542.
65. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(3): p. 1215.
66. Hao, K., *Genome-wide selection of tag SNPs using multiple-marker correlation*. *Bioinformatics*, 2007. **23**(23): p. 3178-84.

67. Ziegler, A., K. Van Steen, and S. Wellek, *Investigating Hardy-Weinberg equilibrium in case-control or cohort studies or meta-analysis*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **128**(1): p. 197-201.
68. Gimeno Garcia, A.Z., *Factors influencing colorectal cancer screening participation*. *Gastroenterol Res Pract*, 2012. **2012**: p. 483417.
69. Eberhart, C.E., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas*. *Gastroenterology*, 1994. **107**(4): p. 1183-8.
70. Wang, D., J.R. Mann, and R.N. DuBois, *The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(5): p. 1445-61.
71. Backlund, M.G., et al., *15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(5): p. 3217-23.
72. Myung, S.J., et al., *15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(32): p. 12098-102.
73. Reid, G., et al., *The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(16): p. 9244-9.
74. Schuster, V.L., *Prostaglandin transport*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. **68-69**: p. 633-47.
75. Dimitri Semizarov, E.B., *Genomics in Drug Discovery and Development*. 2008: Wiley. 448.
76. Gillet, J.P., T. Efferth, and J. Remacle, *Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1775**(2): p. 237-62.
77. Lage, H., *ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers*. *Int J Antimicrob Agents*, 2003. **22**(3): p. 188-99.
78. Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. *Genome Res*, 2001. **11**(7): p. 1156-66.
79. Shaffer, B.C., et al., *Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML*. *Drug Resist Updat*, 2012. **15**(1-2): p. 62-9.
80. Lands, W.E., *The biosynthesis and metabolism of prostaglandins*. *Annu Rev Physiol*, 1979. **41**: p. 633-52.
81. Fortier, M.A., et al., *A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems*. *J Physiol Pharmacol*, 2008. **59 Suppl 1**: p. 65-89.
82. Russel, F.G., J.B. Koenderink, and R. Masereeuw, *Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules*. *Trends Pharmacol Sci*, 2008. **29**(4): p. 200-7.
83. Kanai, N., et al., *Identification and characterization of a prostaglandin transporter*. *Science*, 1995. **268**(5212): p. 866-9.
84. Rius, M., et al., *Prostanoid transport by multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) localized in tissues of the human urogenital tract*. *J Urol*, 2005. **174**(6): p. 2409-14.
85. Lin, Z.P., et al., *Disruption of cAMP and prostaglandin E2 transport by multidrug resistance protein 4 deficiency alters cAMP-mediated signaling and nociceptive response*. *Mol Pharmacol*, 2008. **73**(1): p. 243-51.
86. Chan, B.S., et al., *Identification of lactate as a driving force for prostanoid transport by prostaglandin transporter PGT*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **282**(6): p. F1097-102.
87. Chi, Y., et al., *Identification of a new class of prostaglandin transporter inhibitors and characterization of their biological effects on prostaglandin E2 transport*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **316**(3): p. 1346-50.
88. Holla, V.R., et al., *Regulation of prostaglandin transporters in colorectal neoplasia*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2008. **1**(2): p. 93-9.





7. MATERIAL  
SUPPLEMENTAR



## Material & Métodos - Protocolos de Extração de DNA

### Protocolo 1: Sangue Periférico

#### *Fase 1 – Lise Celular*

1. O primeiro passo do protocolo foi descongelar cada amostra em banho-maria a 42°C.
2. De seguida, o conteúdo do *eppendorf* (sangue total  $\approx$  1,5 mL) foi transferido para um tubo de *Falcon* de 15 mL e foram adicionados 4,5 mL de *Red Blood Cell Lysis (RCLB)* – tampão de lise de eritrócitos que contém 1M de Tris-HCl a pH 7.2, 5M de NaCl e 1M de MgCl<sub>2</sub>).
3. A solução foi homogeneizada por inversão e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após este passo a amostra foi centrifugada a 2000 g durante 20 minutos, à temperatura ambiente, usando a centrífuga Heraeus Megafuge 16R (*Thermo Scientific*).
4. Descartou-se o sobrenadante, deixando apenas o *pellet* e 0,5 mL de solução residual que, posteriormente, foi agitado no *vortex (VM2 Cat)* de modo a voltar a suspender as células.
5. Adicionou-se 1,5 mL de Cell Lysis Solution e agitou-se novamente durante 10 segundos. Procede-se então a uma incubação de 2 horas a 37°C.

#### *Fase 2 – Precipitação das proteínas*

1. O material previamente incubado foi colocado em gelo durante 5 minutos.
2. Dispensou-se 700  $\mu$ L de Protein Precipitation em cada tudo, e agitou-se no *vortex* durante 20 segundos.
3. As amostras foram centrifugadas a 2000 g durante 20 minutos, novamente à temperatura ambiente.

#### *Fase 3 – Precipitação do DNA*

1. Colocou-se o sobrenadante que continha DNA num *Falcon* de 15 mL que continha 2 mL de Isopropanol absoluto.
2. Misturou-se a amostra por inversão e o DNA tornou-se visível. Seguiu-se uma centrifugação de 20 minutos ( $T_{amb}$ ).
3. Removeu-se o sobrenadante, inverteu-se o tubo e deixou-se secar durante 10 minutos.

#### *Fase 4 – Hidratação do DNA*

1. Ao *Falcon*, previamente seco, adicionou-se 100 µL de DNA Hydratation Solution e incubou-se a 55°C durante 1 hora.
2. Após a incubação a amostra foi transferida para um *ependorf*, realizou-se o *spin down (Pulse Continuous)* o DNA estava pronto a ser quantificado. O seu armazenamento pós-quantificação é feito a 4°C para curto prazo e a -20°C para conservação a longo prazo.

#### Protocolo 2 - Tecidos Fixados em Parafina

##### *Fase 1 – Digestão do Tecido, Lise Celular e Desnaturação das Proteínas*

1. Lâminas com cortes com espessura de 10 µm foram incubadas a 55°C durante 30 minutos, desparafinadas com duas mudanças de xilol e lavadas com uma série decrescente de etanol (Absoluto, 90% e 70%) e água destilada (dH<sub>2</sub>O).
2. Sem deixar secar, colocou-se o tecido num *ependorf* de 1,5 mL com uma ponta de pipeta estéril.
3. O tecido foi digerido com 20 µL de proteinase K (10mg/ml), que é também a responsável pela lise celular e desnaturação das proteínas, e 200 µL de buffer BC2. A incubação foi o passo seguinte – Termomixer, 60°C, com agitação, *overnight*.

##### *Fase 2 – Ligação seletiva do DNA, Remoção de contaminantes e Eluição do DNA*

1. Foram adicionados 200 µL de buffer TC1 à amostra que foi novamente incubada (60°C, 40 minutos, em agitação). Durante este período incubou-se também o Elution Buffer.

Se após a incubação ainda existir material insolúvel realiza-se uma centrifugação (16.000 g durante 2 minutos e 45 segundos) e coloca-se o sobrenadante num novo *ependorf*.

2. Adicionou-se 200 µL de Etanol absoluto à amostra e agitou-se vigorosamente durante 10 segundos.
3. Colocou-se a coluna de extração de DNA num tubo de recolha de 2 mL e transferiu-se a amostra, (incluindo o precipitado, se presente) para a coluna.
4. Centrifugou-se a 16.000 g durante 2 minutos e 45 segundos, descartou-se o tubo e colocou-se a coluna num novo tubo de recolha.

5. Seguidamente foram realizadas duas lavagens: a primeira com 400  $\mu$ L de Wash Buffer 1 (centrifugou-se a 16.000 g durante 1 minuto e 45 segundos) e descartou-se o conteúdo do tubo de recolha. A segunda lavagem foi feita com 600  $\mu$ L de Wash Buffer 2 (ao qual foi adicionado etanol previamente), nas mesmas condições.
6. Descartou-se, novamente, o conteúdo do tubo de recolha e centrifugou-se durante 3 minutos e 45 segundos a 16.000 g para secar a matriz da coluna.
7. Transferiu-se a coluna para um *ependorf* de 1,5 mL e pipetou-se 30  $\mu$ L de Elution buffer (solução com baixa concentração de sais) para o centro da coluna, sem tocar nas membranas.
8. A amostra foi incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos. Por fim, centrifugou-se durante 1 minuto e 45 segundos a 16.000 g para obter DNA.



*Fluxograma 1 - Esquema de Extração de DNA de Tecidos em Parafina (adaptado de: GRiSP)*