

**Luciana Teixeira de Siqueira**



**UFPE**

**Associação entre obesidade e câncer: análise  
proteômica**

**Recife, 2014**



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

**Luciana Teixeira de Siqueira**

---

## **Associação entre obesidade e câncer: *análise proteômica***

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Cirurgia.

Orientador

**Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz**

Prof. Adjunto do Departamento de Cirurgia, CCS-UFPE

Co-orientadora

**Dra. Marcela Silvestre Outtes Wanderley**

Pesquisadora do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA

### **Linha de Pesquisa**

Bases fisiopatológicas do tratamento cirúrgico da obesidade e

Síndrome Metabólica

Carcinogênese

---

RECIFE, 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária: Mônica Uchôa. CRBA-1010

O69c Siqueira, Luciana Teixeira.  
Associação entre obesidade e câncer: análise proteômica / Luciana  
Teixeira de Siqueira. – 2014.  
121 f.: il.; tab. 30 cm.

Orientador: Álvaro Antônio Bandeira Ferraz  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2014.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Obesidade. 2. Câncer. 3. Biomarcadores. 4. Proteômica. I. Ferraz,  
Álvaro Antônio Bandeira (Orientador) II. Título.

612.665

CDD (23.ed)

UFPE (CCS2014-087)

**OBESIDADE E CÂNCER: ANÁLISE PROTEÔMICA.**

**LUCIANA TEIXEIRA DE SIQUEIRA**

APROVADA EM: 10/02/2014

ORIENTADOR INTERNO: DRº. ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

**PROFº. DR. EDMUNDO MACHADO FERRAZ (PRESIDENTE) CCS/UFPE**

---

**PROFº. DR. JOSEMBERG MARINS CAMPOS - CCS/UFPE**

---

**PROFº. DR. FERNANDO RIBEIRO DE MORAES NETO - CCS/UFPE**

---

**PROFº. DR. JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO- LIKA/UFPE**

---

**PROFº. DR. AUREO LUDOVICO DE PAULA - FMSP**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

**REITOR**

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITOR**

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Francisco de Sousa Ramos

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DIRETOR**

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**

**DIRETOR SUPERINTENDENTE**

Prof. Frederico Jorge Ribeiro

**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**

**CHEFE**

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA  
COORDENADOR NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO**

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

**VICE-COORDENADOR**

Prof. Josemberg Marins Campos

**CORPO DOCENTE**

Prof. Álvaro Antonio Bandeira Ferraz  
Prof. Carlos Teixeira Brandt  
Prof. Cláudio Moura Lacerda  
Prof. Edmundo Machado Ferraz  
Prof. Fábio de Oliveira Vilar  
Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto  
Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar  
Prof. Josemberg Marins Campos  
Prof. Lúcio Vilar Rabelo Filho  
Prof. Magdala de Araújo Novaes  
Prof. Salvador Vilar Correia Lima  
Prof. Sílvio da Silva Caldas Neto

Aos meus pais, **Noêmia e José Alves** (in memoriam),  
referências máximas em minha vida.

# *Agradecimentos*

A *Deus*, presença constante em minha vida. Sem *Ele*, nada é possível.

A *Philipe e minha família*, mainha, irmãs, irmão e sobrinhos, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo apoio incondicional nos momentos críticos.

Ao *Prof. Edmundo Machado Ferraz*, pelos ensinamentos, que me conduziram até os dias atuais à admiração pelo profissional dedicado aos pacientes e às atividades científicas, contribuindo efetivamente na minha formação humana, acadêmica e profissional.

Ao *Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz*, meu orientador e coordenador da Pós-graduação em Cirurgia, pelo exemplo de dedicação ao Programa, estimulando, de maneira peculiar e competente, o interesse científico através de brilhantes idéias, além da sólida amizade, confiança e cumplicidade conquistadas ao longo dos últimos anos.

À *Dra. Marcela Silvestre Outtes Wanderley*, minha co-orientadora, pela honra em tê-la conhecido, por acreditar neste projeto, conduzindo-me de forma paciente, competente e segura durante todo o trabalho, solidificando em mim o interesse pela vida acadêmica. Minha eterna gratidão.

Ao *Prof. José Luiz de Lima Filho*, diretor do LIKA, que cedeu a estrutura do laboratório e os excelentes profissionais para participarem deste trabalho.

Aos pesquisadores do LIKA, *Roberto Afonso da Silva e Adriana Andrade Pereira*, pelo auxílio imprescindível e dedicação sem medidas a este trabalho, sempre prestativos e competentes na análise proteômica e com os quais pretendo manter longa parceria e verdadeira amizade.

Ao *Dr. Djalma Agripino de Melo Filho*, pela imensa generosidade e inteligente análise estatística, minha gratidão pelo apoio à realização deste trabalho.

Às amigas e excelentes profissionais, *Dra. Teresa Cristina Coelho Rocha, Dra. Maria Lucia de Melo Wanderley, Dra. Djanira Calixto, Dra. Isadora Hetzel e Dra. Simone Buonora*, pelo auxílio com extrema dedicação e cuidado na coleta do material antes dos procedimentos cirúrgicos.

Ao *Dr. Josemberg Campos*, pelo reencontro junto às atividades científicas e ao Programa de Residência em Cirurgia do Hospital das Clínicas, a quem devo pelo aprendizado e interesse à vida acadêmica.

Aos amigos da turma *Doutorado 2010*, pela troca de conhecimentos e momentos únicos.

Aos *pacientes* por viabilizarem esta pesquisa, confiando suas vidas e disponibilizando sua contribuição ao trabalho.

“Se você puder chegar através da neve, da tempestade e da chuva, saberá  
que poderá chegar quando brilhar o sol e tudo estará bem.”

Malcolm X

# Resumo

**Introdução:** A obesidade tem sido associada ao desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de câncer. Vários mecanismos tentam explicar essa associação, mas há uma necessidade de melhor compreensão dos processos biológicos relacionando câncer e obesidade. A análise proteômica poderá fornecer o conhecimento a nível molecular de fatores envolvidos nesta associação, inferindo-a na prática clínica a partir de novas alternativas de prevenção e tratamento.

**Objetivos:** Analisar o perfil de proteínas significativamente expressas no plasma de pacientes obesos no pré-operatório e seis meses após a cirurgia, avaliando, de maneira prospectiva, os efeitos da perda de peso na regulação da expressão de proteínas relacionadas ao aparecimento de tumores, através do IMC e percentual de perda de peso, bem como avaliar a influência da insulina na expressão das proteínas potencialmente carcinogênicas antes e após a cirurgia bariátrica.

**Métodos:** Foram estudados 40 pacientes, selecionados em dois grupos: controle (n=10) e obesos (n=30), o último foi estratificado, para afastar variáveis de confusão, de acordo com a técnica cirúrgica (Derivação gástrica em Y de Roux, DGYR, n=11 e Gastrectomia vertical, GV, n=19), o IMC ( $\leq 40 \text{ kg/m}^2$  e  $>40 \text{ Kg/m}^2$ ) e concentração sérica de insulina ( $\leq 21 \text{ mU/L}$  e  $>21 \text{ mU/L}$ ). Foram coletadas amostras de sangue para análise proteômica, através do plasma, utilizando a eletroforese bidimensional. As proteínas foram identificadas pelo *TagIdent tool Expert protein Analysis System* (Expasy), através do ponto isoelétrico (pI) e peso molecular da proteína; espécie *Homo sapiens*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

**Resultados:** Foram identificadas seis proteínas relacionadas à carcinogênese, hiperexpressas nos pacientes obesos, que não estavam presentes no grupo controle e tornaram-se ausentes após a cirurgia. Tais proteínas foram o Receptor da apolipoproteína B, o Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas, a Trombospondina- 2, o receptor da Lipoproteína de baixa densidade, a Transtirretina e a Podoplanina. Ainda, foram identificadas duas proteínas carcinogênicas hiperexpressas em todos os subgrupos, mais nos pacientes com obesidade grave (IMC $>40 \text{ Kg/m}^2$ ) e hiperinsulinemia ( $>21 \text{ mU/L}$ ), a saber: a tetraspanina-13 e a proteína de ligação de ácido graxo hepática (FABPL). Essas não foram mais expressas após o procedimento cirúrgico. A apolipoproteína A1 estava hiperexpressa em todos os subgrupos no pré-operatório, permanecendo após a cirurgia, independente do percentual de perda de peso, porém desapareceu nos pacientes com hiperinsulinemia. Finalmente, a Calicreína 11, foi detectada em todos os grupos de obesos, pré-operatório, permanecendo presente após a cirurgia, exceto no grupo com obesidade grave e hiperinsulinemia e no grupo que apresentou menor percentual de perda de peso.

**Conclusão:** Na amostra estudada, foram identificadas proteínas potencialmente carcinogênicas nos pacientes portadores de obesidade: Receptor da apolipoproteína B, o Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas, a Trombospondina- 2, o receptor da Lipoproteína de baixa densidade, a Transtirretina e a Podoplanina. A perda de peso induzida pela cirurgia promoveu o desaparecimento dessas proteínas. A mudança nos níveis séricos de insulina influenciou na expressão da ApoA1 após a cirurgia; A calicreína 11 não foi influenciada pela perda de peso nem pela mudança nos níveis de insulina.

**Palavras-chave:** Obesidade, Câncer, Biomarcadores, Proteômica, Cirurgia bariátrica, ApoA1

# Abstract

## Obesity and cancer: proteomic analysis

**Introduction:** Obesity has been associated with the development and progression of different types of cancer. Various mechanisms have been tried in an attempt to explain this association, but a greater understanding of the biological processes relating cancer and obesity is required. Proteomic analysis can provide molecular level knowledge of the factors involved in this association, improving clinical practice through new methods of prevention and treatment.

**Aim:** Analysis of proteins significantly expressed in the plasma of obese pre-operative patients and patients six months after surgery, evaluating, in a prospective manner, the effects of weight loss in the regulation of the expression of proteins related to the appearance of tumors, through BMI and weight loss percentage, as well as analyzing the influence of insulin in the expression of potentially carcinogenic proteins before and after bariatric surgery.

**Methods:** A total of 40 patients were divided into two groups: control (n=10) and obese (n=30). The latter group was stratified to remove confounding variables, in accordance with surgical technique used (Roux-En-Y gastric bypass, RYGB, n=11 and Sleeve Gastrectomy, SG, n=19), BMI ( $\leq 40 \text{ kg/m}^2$  and  $>40 \text{ Kg/m}^2$ ) and serum insulin concentration ( $\leq 21 \text{ mU/L}$  and  $>21 \text{ mU/L}$ ). Blood samples were collected for proteomic analysis from plasma using two-dimensional electrophoresis. Proteins were identified using the *TagIdent Expert protein Analysis System* (Expasy) tool, through isoelectric point (pI) and molecular weight of protein; species *Homo sapiens*. The study was approved by the Ethics Committee in Research of Human Beings of the Centro de Ciências da Saude of the Universidade Federal de Pernambuco.

**Results:** Six proteins related to carcinogenesis were hyperexpressed in obese patients, which were not present in the control group and absent following surgery. These proteins were the receptor of apolipoprotein B, the beta receptor of platelet derived growth factor, thrombospondin- 2, the low density lipoprotein receptor, transthyretin and podoplanin. Two carcinogenic proteins were hyperexpressed in all the subgroups, more frequently in patients with severe obesity (BMI $>40 \text{ Kg/m}^2$ ) and hyperinsulinism ( $>21 \text{ mU/L}$ ), namely: tetraspanin-13 and the fatty acid binding protein of the liver (FABPL). These were not expressed after surgery. The apolipoprotein A1 was hyperexpressed in all the pre-operative subgroups, and remained after surgery, irrespective of the weight loss percentage, but disappeared in patients with hyperinsulinism. Finally, Kallikrein 11, was detected in all groups of obese pre-operative patients, and remained after surgery except in the group with severe obesity and hyperinsulinism and in the group with lowest weight loss percentage.

**Conclusion:** In the sample group studied, the following potentially carcinogenic patients were identified in obese patients: receptor of apolipoprotein B, the beta receptor of the platelet derived growth factor, thrombospondin- 2, the low density lipoprotein receptor, transthyretin and podoplanin. Surgical weight loss resulted in the disappearance of these proteins. A change in insulin serum levels influenced the expression of ApoA-1 following surgery; Kallikrein 11 was not influenced by weight loss or by changes in insulin levels.

**Key-words:** Obesity, Cancer, Biomarkers, Proteomics, Bariatric surgery, ApoA1

# *Lista de Ilustrações*

Quadro 1	Classificação da obesidade baseando-se no IMC, em Kg/m <sup>2</sup> , e risco de doenças associadas	29
Quadro 2	Classificação da obesidade na Ásia de acordo com o IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	29
Figura 1	Fisiologia do eixo GH-IGF e repercussões do efeito da insulina	36
Figura 2	Hipótese insulina-IGF como mecanismo responsável pela associação entre obesidade e câncer, “formato simples”	38
Figura 3	Aspectos bioquímicos e hormonais (hormônios sexuais) relacionados à obesidade e câncer endometrial	41
Figura 4	“Formato complexo” da hipótese insulina-câncer e inter-relações entre obesidade, resistência à insulina e carcinogênese	46
Figura 5	Mecanismos do efeito da obesidade visceral sobre a carcinogênese no aparelho digestivo	48
Figura 6	Componentes das ciências ômicas e suas respectivas áreas de atuação	51
Tabela 1	Biomarcadores proteicos relacionados às neoplasias de pâncreas, cólon, mama e endométrio, identificados por suas características isoelétricas: peso molecular (MW), em Da, e ponto isoelétrico teórico (pI theo)	54
Figura 7	Fluxograma do estudo	62
Tabela 2	Valores das estatísticas descritivas relativas às variáveis antropométricas e laboratoriais referentes ao grupo de obesos (n=30)	70
Tabela 3	Valores das estatísticas descritivas relativas às variáveis antropométricas e laboratoriais referentes ao grupo controle (n=10)	71
Tabela 4	Distribuição da população por sexo	71
Tabela 5	Distribuição do percentual de perda de peso (%PP) no grupo de obesos seis meses após o procedimento cirúrgico n=30	
Tabela 6	Comparação de médias e desvios-padrão de IMC, em Kg/m <sup>2</sup> ,	

	insulina, em mU/L, e peso, em Kg, pré e pós-operatório no grupo de obesos, segundo a técnica DGYR	72
Tabela 7	Comparação de médias e desvios-padrão de IMC, em Kg/m <sup>2</sup> , insulina, em mU/L, e peso, em Kg, pré e pós-operatório no grupo de obesos, segundo a técnica gastrectomia vertical	73
Tabela 8	Diferença de perda de peso, em percentual, entre as duas técnicas cirúrgicas no grupo de obesos após seis meses	73
Tabela 9	Proteínas identificadas pelo <i>Tag Ident tool Expert Protein Analysis System</i> (ExOasy), através do pI e peso molecular dos <i>spots</i> ; espécie <i>Homo sapiens</i>	74
Figura 8	Gel analítico de eletroforese bidimensional de proteínas plasmáticas do <i>Pool</i> de pacientes obesos, pré-operatório, corado pelo Coomassie-Blue.	76
Figura 9	Gel analítico de eletroforese bidimensional de proteínas plasmática do <i>Pool</i> de pacientes eutróficos (grupo controle) corado pelo Coomassie-Blue.	77
Figura 10	Gel analítico de eletroforese bidimensional de proteínas plasmática do <i>Pool</i> de pacientes obesos, pós-operatório, corado pelo Coomassie-Blue.	78
Figura 11	Gel analítico de eletroforese bidimensional de proteínas plasmáticas do <i>Pool</i> de pacientes obesos, pré-operatório, evidenciando a expressão dos <i>spots</i> 1, 2, 3 e 4 em todos os subgrupos, corado pelo Coomassie-Blue.	78
Figura 12	Gel analítico de eletroforese bidimensional de proteínas plasmáticas do <i>Pool</i> de pacientes obesos, pré e pós-operatório, evidenciando a ausência de expressão dos <i>spots</i> 1 e 2 em todos os subgrupos, após o procedimento, corado pelo Coomassie-Blue.	79
Figura 13	Gel analítico de eletroforese bidimensional da Apo A-1, identificada no <i>spot</i> 9 do <i>Pool</i> de pacientes obesos, pós-operatório, evidenciando a ausência de expressão nos grupos PBIA e PAIA. Corado pelo Coomassie-Blue.	80
Figura 14	Gel analítico de eletroforese bidimensional da Caliceína 11, identificada no <i>spot</i> 10 do <i>Pool</i> de pacientes obesos, pós-operatório,	

evidenciando a ausência de expressão apenas nos grupos PPA e PAIA. Corado pelo Coomassie-Blue.

# *Lista de Abreviaturas e Siglas*

<b>Apo A-1</b>	Apolipoproteína A-1
<b>Apo B</b>	Apolipoproteína B
<b>ASC</b>	Células estromais adiposas
<b>ALS</b>	Subunidade proteica ácido-lábil
<b>2DE</b>	Eletroforese bidimensional
<b>V DHEA</b>	Deidroepiandrosterona V
<b>DHEA sulfato</b>	Deidroepiandrosterona sulfato
<b><math>\Delta</math>-4-DHEA</b>	Delta-4-androstenediona
<b>DM 2</b>	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>DGYR</b>	Derivação gástrica em Y de Roux
<b>FABPL</b>	Proteína de ligação do ácido graxo hepática
<b>FASN</b>	Ácido Graxo Sintase
<b>GH</b>	Hormônio do crescimento
<b>GHBP</b>	Proteína de ligação do hormônio de crescimento
<b>GHRH</b>	Hormônio liberador do hormônio de crescimento
<b>GUCY2C</b>	Guanilato Ciclase C
<b>HC</b>	Hospital das Clínicas
<b>HE4</b>	Proteína epidídimo humano 4
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator Indutor de Hipóxia - 1 $\alpha$
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Oxigênio
<b>IGF</b>	Fator de crescimento insulina-like
<b>IGFBP</b>	Proteína de ligação do fator de crescimento insulina-like
<b>IGF-1R</b>	Receptor do fator de crescimento insulina-like 1
<b>IGF-2R</b>	Receptor do fator de crescimento insulina-like 2
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6

<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corpórea
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>IRS</b>	Proteínas do substrato do receptor de insulina
<b>KLK 11</b>	Calicreína 11
<b>LDLR</b>	Receptor da lipoproteína de baixa densidade
<b>LIKA</b>	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
<b>LPA</b>	Ácido lisofosfatídico
<b>MAGL</b>	Monoacilglicerol lipase
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada pelo mitógeno
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática do monócito
<b>MSC</b>	Células estromais mesenquimais
<b>NK cells</b>	Células Natural Killer
<b>NO</b>	Óxido Nitroso
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PAF</b>	Fator Ativador de Plaquetas
<b>PAI-1</b>	Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1
<b>PCR</b>	Proteína C Reativa
<b>PDPN</b>	Podoplanina
<b>PGFR<math>\beta</math></b>	Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>PI3K-Akt</b>	Fosfoinositol-3-quinase
<b>SHBG</b>	Globulina ligadora de hormônios sexuais
<b>SM</b>	Síndrome metabólica
<b>SOP</b>	Síndrome dos Ovários Policísticos
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Program for The Social Sciences</i>
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>S1P</b>	Esfingosine-1-fosfatase

<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral Alfa
<b>TPS2</b>	Trombospondina 2
<b>TSN13</b>	Tetraspanina 13
<b>TTR</b>	Transtirretina
<b>TZDs</b>	Tiazolidinedionas
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial

# *Sumário*

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1 Apresentação do problema	19
1.2 Justificativa do estudo	22
1.3 Definição dos objetivos	23
1.3.1 Geral	23
1.3.2 Específicos	23
<b>2. LITERATURA</b>	<b>24</b>
2.1 Obesidade	25
2.1.1 Epidemiologia	25
2.1.2 Diagnóstico e Classificação	26
2.2 Câncer	28
2.2.1 Epidemiologia	28
2.2.2 Associação epidemiológica entre obesidade e câncer	29
2.3 Mecanismos Fisiopatológicos entre obesidade e câncer	30
2.3.1 Aspectos gerais	30
2.3.2 Eixo IGF	31
2.3.3 Eixo GH-IGF	33
2.3.4 Mecanismos envolvidos na carcinogênese	39
2.4 Obesidade e câncer do Aparelho Digestivo	45
2.4.1 Obesidade e câncer do Aparelho Digestivo	45
2.5 As ciências ômicas e sua compreensão na carcinogênese e obesidade	47
2.5.1 Biologia Molecular do câncer	47
2.5.2 Ciências ômicas	48
2.6 Perspectivas da análise proteômica na pesquisa de biomarcadores neoplásicos na obesidade	54
2.7 Cirurgia da obesidade e câncer: resultados	55
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>57</b>
3.1 Local do estudo	58
3.2 População do estudo	58

3.3 Desenho do estudo	58
3.4 Elenco de variáveis	61
3.5 Procedimentos	62
3.5.1 Coleta de dados	62
3.5.2 Procedimentos antropométricos	62
3.5.3 Procedimentos laboratoriais	63
3.5.4 Procedimentos cirúrgicos	63
3.5.5 Estudo proteômico	64
3.6 Plano de descrição e análise	65
3.7 Aspectos éticos	66
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>67</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>79</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>113</b>
<b>Apêndice 1.</b> Termo de consentimento livre e esclarecido	114
<b>Apêndice 2.</b> Protocolo de Pesquisa	115
<b>ANEXO</b>	<b>116</b>
<b>Anexo 1.</b> Aprovação do Comitê de Ética	117

# *Introdução*

## 1.1 Apresentação do problema

A obesidade é um dos principais problemas de saúde pública da atualidade com prevalência crescente, sobretudo nas duas últimas décadas. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente, a estimativa é de que pouco mais de um bilhão de adultos apresentem sobrepeso, dos quais um total de mais de meio milhão sejam obesos<sup>1</sup>.

Tal doença pode ser avaliada pela adiposidade central através da razão cintura-quadril e medida da circunferência abdominal, entretanto o índice de massa corporal (IMC) é o parâmetro aceito mundialmente para classificá-la, associando-a ao risco de outras morbidades. Assim, uma pessoa com IMC maior ou igual a 30 Kg/m<sup>2</sup> apresenta maior risco de desenvolvimento de doenças que se associam à diminuição da sobrevida, como aterosclerose e hipertensão arterial sistêmica, Diabetes Mellitus (DM) tipo 2, apnéia do sono, dislipidemia e câncer<sup>2</sup>, aumentando os gastos com as políticas de saúde pública voltadas para a obesidade.

O câncer é uma doença associada a diferentes fatores, apresentando alta incidência no mundo e no Brasil. Nas últimas décadas, ganhou maior dimensão, tornando-se uma preocupante condição clínica para as políticas de saúde a nível mundial<sup>3</sup>. Além disso, representa a segunda causa de morte no mundo, atingindo 12,5% da população global, prevendo-se um aumento de novos casos para 15 milhões em 2020 e 27 milhões em 2030, com 17 milhões de mortes anualmente<sup>3-5</sup>. Devido ao recente envelhecimento da população e crescimento progressivo na incidência de obesidade, é possível identificar um aumento expressivo na sua prevalência, o que demanda do Sistema Único de Saúde (SUS) imenso esforço para a oferta de atenção adequada aos doentes.

De acordo com relatos científicos, a obesidade tem sido associada ao desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias hormônio-dependentes e do sistema digestivo, estando presente em até 40-50% dos casos de neoplasias de endométrio e esôfago, 20-30% das neoplasias renais e 50% dos casos de mama após a menopausa<sup>6</sup>. Aproximadamente 14% dos homens e 20% das mulheres que morrem por câncer são obesos<sup>6</sup>. Destacam-se as neoplasias de cólon e reto<sup>6-14</sup>, mama<sup>6,7,9-13</sup>, endométrio<sup>6,7,9-13,15</sup>, esôfago<sup>6,7,9-13,16</sup>, vesícula biliar<sup>6,7,10-13</sup>, pâncreas<sup>6,7,10-13,17</sup>, rins<sup>6,7,9-13,18</sup>, próstata<sup>6,7,10-13</sup>, colo uterino e ovários e, em menor proporção, Linfoma não Hodking, mieloma múltiplo, estômago e fígado<sup>6,7,9-13,19,20</sup>.

De forma geral, os possíveis mecanismos responsáveis por esta associação incluem a distribuição da gordura corporal e alterações nos padrões hormonais, como o eixo insulina e Fator de Crescimento Insulina Like (eixo Insulina-IGF), esteróides sexuais e adipoquinas

(leptina e adiponectina), levando à resistência insulínica e consequente hiperinsulinemia crônica. Esta última condição favorece o crescimento tumoral a partir de seus efeitos mitogênicos, anti-apoptóticos e angiogênicos, atuando diretamente sobre seus receptores nas células ou, indiretamente, por mudanças no metabolismo de hormônios endógenos<sup>10-13,21-25</sup>. Entretanto, as explicações são escassas quanto a essas hipóteses, sendo propostos novos mecanismos, como a hipóxia tecidual induzida pela obesidade, a susceptibilidade genética, a migração de células adiposas, alterações nos marcadores inflamatórios e imunológicos relacionados à obesidade, mudanças no Sistema fator- $\kappa$ B e o estresse oxidativo<sup>24-26</sup>.

O modelo mais estudado que tenta explicar o desenvolvimento de neoplasias associadas à obesidade envolve a hiperinsulinemia compensatória e prolongada, devido à resistência insulínica, levando ao aumento na concentração sérica de Fatores de Crescimento Insulina Like (IGF) livres e bioativos e diminuição de suas proteínas ligantes, IGFbps 1 e 2, agindo sobre seus receptores com efeitos mitogênicos e antiapoptóticos, semelhantes à insulina<sup>7,21,22</sup>. Entretanto, existem outras vias moleculares ligadas ao excesso de peso que podem ser relevantes na carcinogênese, algumas vem recebendo maior atenção da comunidade científica nos últimos cinco anos. Esses sistemas não são exclusivos do eixo Insulina-IGF, mas suas regulações estão interligadas.

Assim, pode-se destacar a influência da Síndrome Metabólica (SM)<sup>27</sup>, que contribui para resistência insulínica e hiperinsulinemia compensatória; a ação dos IGFs sobre o fígado, reduzindo a síntese da globulina ligadora de hormônios sexuais, aumentando a quantidade de hormônios sexuais livres<sup>7,22-25,28</sup>; a diminuição na concentração de adiponectina e hiperleptinemia prolongada<sup>24,29</sup>; a liberação de mediadores inflamatórios por hipóxia local induzida pelo tecido adiposo em expansão<sup>24</sup>; o estresse oxidativo causado pela produção irregular nos adipócitos de citocinas, adiponectina, leptina, resistina, PAI-1, IL-6 e proteína quimiotática de monócitos-1<sup>30</sup>; os fatores genéticos, cujos estudos vem progredindo desde a descoberta de quinze novos *loci* associados ao IMC<sup>31</sup>; a sinalização lipídica e a diminuição da imunocompetência<sup>24</sup>.

Esquemas terapêuticos foram propostos para a obesidade grave, porém se revelaram ineficazes com o manuseio clínico para emagrecimento e a manutenção da perda de peso<sup>32</sup>. A cirurgia é considerada, atualmente, a medida mais efetiva no controle desta doença e suas morbidades, proporcionando importante diminuição da mortalidade a longo prazo (0,35%)<sup>33</sup>. Assim, de acordo com a resolução do Conselho Federal de Medicina, de número 1.942/2010, e Ministério da Saúde, que estabelecem normas seguras para o tratamento cirúrgico, definindo

indicações, procedimentos e equipe, a cirurgia bariátrica está indicada para obesos quando o IMC for acima de 35 Kg/m<sup>2</sup> com comorbidades ou acima de 40 Kg/m<sup>2</sup>, independente de comorbidades<sup>34</sup>. No entanto, Pories *et al.* em 2010 sugeriram a reavaliação das diretrizes atuais para cirurgia bariátrica<sup>35</sup>, pois a restrição a esse nível de IMC como principal requisito para indicação parece não refletir o grau ou distribuição de obesidade, discriminando injustamente a composição da gordura corporal e metabólica.

Estudos já relataram efeitos positivos da cirurgia de obesidade no risco de doenças como o câncer, além de reduzir distúrbios metabólicos e DM tipo 2<sup>32,36</sup>, apesar de já ter sido evidenciado que o efeito da cirurgia sobre a curva ponderal não é sempre acompanhado por diminuição comparável no risco de neoplasias<sup>37,38</sup>. Atualmente, a cirurgia bariátrica mais utilizada no Brasil e no mundo é a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR). Porém, a gastrectomia vertical, ou *sleeve gastrectomy*, vem apresentando resultados satisfatórios quanto à curva ponderal e melhora de comorbidades, inclusive efeitos comprovados sobre a SM<sup>39,40</sup>.

Diante das evidências, é necessário investigações para melhor compreensão dos mecanismos moleculares que ligam a função irregular do tecido adiposo ao câncer, de forma a fornecer novas estratégias terapêuticas para prevenir e tratar esta doença. Não obstante, combater e tratar a obesidade é, também, uma prioridade a fim de reduzir a mortalidade por neoplasias a ela relacionadas. Com a evidência e evolução das ciências ômicas, tornou-se possível explorar as mudanças do genoma na expressão do perfil genético relacionado à obesidade e ao câncer, abrindo um caminho promissor para uma melhor compreensão, a nível molecular, sobre os possíveis fatores que influenciam nessa relação.

A proteômica é uma tecnologia que permite o estudo do produto da expressão gênica através de amostras biológicas. O estudo proteômico permite analisar como as proteínas interagem com outras moléculas, induzem e controlam as vias metabólicas, influenciando na proliferação celular, crescimento, apoptose e senescência, oferecendo-se, assim, uma única compreensão dos complexos sistemas biológicos<sup>41</sup>. Recentemente, o termo oncoproteômica tem sido usado para descrever abordagens na pesquisa do câncer que permite a investigação da expressão de proteínas que poderiam ser marcadores sensíveis de doenças malignas<sup>42</sup>, denominadas biomarcadores. A detecção dessas moléculas deve ser minimamente invasiva, sensível, específica, simples e de baixo custo<sup>43</sup>, além de prontamente acessível através da coleta de fluidos corporais de fácil acesso, como sangue, urina ou saliva<sup>41</sup>.

Nos últimos anos, a proteômica vem sendo aplicada a fim de elucidar uma variedade de vias de detecção e discriminação de enzimas lipolíticas em pacientes obesos<sup>44</sup>, além do perfil intra-

abdominal e subcutâneo de adipoquinas<sup>45</sup>. No entanto, dados sobre investigação proteômica em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica ainda são limitados<sup>46-50</sup>. Por isso, a grande demanda por técnicas sofisticadas justificaria a aplicação da proteômica para melhor definir as consequências metabólicas e, talvez relacionadas à carcinogênese, antes e após a cirurgia bariátrica.

Dessa forma, a caracterização proteômica do plasma obtido de pacientes com obesidade para a identificação de potenciais biomarcadores de doenças específicas promete ser uma poderosa ferramenta de diagnóstico para a definição do início, progressão e prognóstico de neoplasias<sup>41</sup>.

Além disso, independente do impacto individual das vias metabólicas envolvidas na fisiopatologia e progressão do câncer, é evidente que esta doença caminha lado a lado com a obesidade. Assim, é fundamental um profundo entendimento dos mecanismos envolvidos nesta associação. Considerando que o tecido adiposo pode estar envolvido na formação de alguns processos neoplásicos, é possível reduzir o risco de desenvolvimento dessa doença não apenas pelo seu tratamento, mas também pelo tratamento da obesidade em si. Desse modo, a identificação e compreensão sobre o comportamento de marcadores biomoleculares no processo da carcinogênese associada à obesidade torna-se imprescindível.

## **1.2 Justificativa do estudo**

O aumento na prevalência da obesidade e suas morbidades, bem como do câncer, exige ações de prevenção e controle. O tratamento cirúrgico da primeira, além do baixo índice de mortalidade, mostrou-se eficaz no controle da doença e suas complicações, beneficiando uma parte da população de interesse do sistema público de saúde, devido ao elevado custo terapêutico na sua assistência. Por outro lado, enquanto políticas de saúde pública estão sendo implementadas com o objetivo de controlar as causas básicas da obesidade, existe, em paralelo, uma necessidade de melhor compreensão dos processos biológicos associando câncer e obesidade como pré-requisito para o desenvolvimento de novas abordagens de prevenção e tratamento, além do que não existe estudo na população brasileira que avalie o impacto do risco de câncer relacionado à obesidade e seu comportamento após o tratamento cirúrgico. A introdução de novos e acessíveis procedimentos para a análise de genes e proteínas torna possível a realização de estudos capazes de identificar suas respectivas participações na biologia celular em condições teciduais normais e patológicas. A compreensão da expressão das proteínas

relacionadas à carcinogênese, após o tratamento cirúrgico da obesidade, permite a ampliação no arsenal diagnóstico e terapêutico para essas duas entidades.

Diante desse grupo de evidências, são lançadas as seguintes perguntas condutoras:

- 1) O perfil proteômico na obesidade pode revelar proteínas potencialmente carcinogênicas?
- 2) A hiperinsulinemia influencia na expressão dessas proteínas?
- 3) A perda de peso induzida pelo tratamento cirúrgico da obesidade influencia no perfil proteômico potencialmente carcinogênico?

### **1.3 Definição dos objetivos**

#### 1.3.1 Geral

Avaliar, de maneira prospectiva, os efeitos da perda de peso induzida pelo tratamento cirúrgico da obesidade na expressão de proteínas relacionadas ao aparecimento de tumores.

#### 1.3.2 Específicos

1. Analisar o perfil de proteínas significativamente expressas no plasma de pacientes obesos no pré-operatório e seis meses após a cirurgia;
2. Avaliar o efeito da queda do IMC na regulação da expressão dessas proteínas potencialmente carcinogênicas;
3. Avaliar o efeito do percentual da perda de peso na regulação da expressão das proteínas potencialmente carcinogênicas;
4. Avaliar os efeitos da mudança dos níveis plasmáticos de insulina, induzidos pela perda de peso, sobre a expressão do perfil proteômico potencialmente carcinogênico.

*Literatura*

## 2.1 Obesidade

### 2.1.1 Epidemiologia

A obesidade é um dos principais problemas de saúde pública da atualidade com prevalência crescente, sobretudo nas duas últimas décadas. Tornou-se uma pandemia de elevado custo terapêutico que tem contribuído para o aumento da mortalidade<sup>1</sup>.

Segundo dados da OMS, 35% dos adultos apresentaram sobrepeso em 2008, predominando ligeiramente no sexo feminino (34% dos homens e 35% das mulheres), e a obesidade foi registrada em 10% dos homens e 14% das mulheres. Atualmente, estima-se que pouco mais de um bilhão de adultos apresentem sobrepeso, dos quais um total de mais de meio milhão sejam obesos. Além disso, a previsão é de que em 2015, 2,3 bilhões de adultos apresentem sobrepeso e mais de 700 milhões sejam obesos<sup>1</sup>.

Na faixa etária infantil, a obesidade também representa um grave problema de saúde pública, afetando países de baixa e média rendas, especialmente em ambientes urbanos<sup>1</sup>. Ainda de acordo com a OMS, o número de crianças em 2010 abaixo de cinco anos com sobrepeso foi estimado em mais de 42 milhões, sendo 17 milhões portadoras de obesidade e 35 milhões localizadas em países em desenvolvimento<sup>51</sup>. Crianças com sobrepeso tendem a ficar obesas na idade adulta e mais propensas ao desenvolvimento de doenças não transmissíveis, como alterações cardiovasculares e diabetes em idade mais jovem<sup>1</sup>. Além disso, como os índices de obesidade infantil seguem em progressão, o risco de desenvolvimento de neoplasias é significativamente mais alto<sup>1</sup>.

A prevalência da obesidade aumenta com o nível socioeconômico dos países, onde a diferença passa de 7% em países de renda média inferior para 24% em países de renda média alta<sup>1</sup>. Em todo o mundo, esta enfermidade representa o quinto fator de risco de morte, matando 2,8 milhões de pessoas anualmente, devido às complicações a ela relacionadas<sup>1</sup>.

Por outro lado, no Brasil, a prevalência de obesos vem aumentando, sobretudo na população de baixo nível socioeconômico e acima dos 40 anos<sup>52</sup>. Quanto à obesidade infantil, a Pesquisa de Orçamento Familiar de 2009 evidenciou que 21,7% da população entre 10 e 19 anos apresentava excesso de peso<sup>53</sup>.

O Ministério da Saúde apresenta dois estudos nacionais, cujo objetivo é contribuir para a formulação de políticas públicas que promovam a melhoria da qualidade de vida da população brasileira, e evidencia que a proporção de habitantes com sobrepeso cresceu de 42,7% para

48,5% entre os anos de 2006 e 2011, variando de 39,8% em São Luís a 55,4% em Porto Alegre e maior no sexo masculino (52,6%) em relação ao feminino (44,7%). A maior frequência de sobrepeso em homens foi observada no estrato de maior escolaridade e, em mulheres, no estrato de menor escolaridade<sup>54,55</sup>.

Ainda de acordo com esses estudos, a incidência de obesidade subiu de 11,4% para 15,8%, variando entre 12,5% em Palmas e 21,4% em Macapá. No sexo masculino, sua frequência triplicou da faixa de 18 a 24 anos de idade para a faixa de 35 a 44 anos, declinando em idades mais avançadas e, no sexo feminino, a frequência aumentou até os 64 anos, declinando ligeiramente após<sup>54,55</sup>.

### 2.1.2 Diagnóstico e classificação

O excesso de peso corporal é de caráter multifatorial, relacionado a fatores genéticos, psicossociais, culturais, nutricionais, hormonais, metabólicos (estresse oxidativo) e comportamentais (diminuição de atividade física e aumento no consumo de alimentos calóricos com baixa ingestão de fibras). Esta complexa etiologia torna a sua prevenção e tratamento especialmente desafiadores. Nela, observa-se um desequilíbrio do balanço energético, onde o ganho é maior que o gasto, o quociente respiratório está elevado, há resistência periférica à insulina, hiperinsulinismo compensatório e acúmulo excessivo de gordura visceral.

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo, sendo dividido em tecido adiposo marrom (especializado na termogênese, participando do controle da temperatura corporal) e tecido adiposo branco, hoje conhecido como um órgão endócrino, além da sua capacidade de armazenar energia na forma de triacilglicerol<sup>56</sup>. O tecido adiposo branco é dividido em tecidos subcutâneo e visceral, o qual é metabolicamente mais ativo que o primeiro, possuindo alta atividade lipolítica com consequente liberação de ácidos graxos livres na circulação portal. Essas alterações, assim como a resistência insulínica, são as principais responsáveis pelas complicações metabólicas associadas à obesidade. Dessa forma, com evidências aumentadas dos riscos à saúde associados ao acúmulo de gordura visceral, duas medidas da adiposidade central, a razão cintura-quadril e a medida da circunferência abdominal, são usadas junto ao IMC, sendo o último aceito mundialmente para classificar a obesidade e o risco de doenças associadas. Por outro lado, embora seja a medida mais utilizada, estudos epidemiológicos recentes indicam que ele não é o melhor preditor para o risco de doença cardiovascular em comparação a outras medidas<sup>57</sup>, além de não refletir o grau ou distribuição de

obesidade, discriminando injustamente gênero, idade, aptidão física e composição da gordura corporal e metabólica. Segundo a OMS, considerando-se o IMC, a obesidade é classificada de acordo com o quadro 1.

Quadro 1. Classificação da obesidade baseando-se no índice de massa corporal (IMC), em kg/m<sup>2</sup>, e no risco de doenças associadas<sup>1</sup>.

<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Classificação</b>	<b>Classe/grau de obesidade</b>	<b>Risco</b>
<18,5	Magreza	0	Baixo
18,5-24,9	Normal	0	Normal
25-29,9	Sobrepeso	0	Pouco elevado
30-34,9	Obesidade Leve	I	Elevado
35-39,9	Obesidade Moderada	II	Muito elevado
≥40	Obesidade Grave	III	Muitíssimo elevado

Na Ásia, esses critérios foram modificados, sendo proposta uma nova classificação para essa população (Quadro 2), pois apesar da prevalência da obesidade nesses países ser de 3%, o que é inferior aos países ocidentais, há uma maior proporção de gordura visceral para determinado peso<sup>58</sup>.

Quadro 2. Classificação da obesidade na Ásia de acordo com o IMC (Kg/m<sup>2</sup>)<sup>58</sup>.

<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Classificação</b>	<b>Risco</b>
<18,5	Magreza	Baixo
18,5-22,9	Normal	Normal
>23	Sobrepeso	Elevado
>25	Obesidade Leve	Moderado
>30	Obesidade Moderada	Severo

Uma pessoa com IMC maior ou igual a 30 Kg/m<sup>2</sup> apresenta maior risco de desenvolvimento de doenças que se associam à diminuição da sobrevida, como alterações cardiovasculares, DM tipo 2, apnéia do sono, dislipidemia e câncer<sup>2</sup>, aumentando os gastos com as políticas de saúde pública voltadas para esta doença. Assim, em 2010, o SUS gastou com todas as doenças relacionadas à obesidade aproximadamente 2,1 bilhões de dólares, 68,4% devido a hospitalizações, cujo índice foi mais alto entre os homens. Em contrapartida, o custo com o tratamento ambulatorial foi maior entre as mulheres. As neoplasias responderam pelo segundo maior investimento financeiro, perdendo, apenas, para as doenças cardiovasculares<sup>59</sup>.

## 2.2 Câncer

### 2.2.1 Epidemiologia

O câncer é uma doença associada a diferentes fatores, apresentando alta incidência no mundo e no Brasil. Nas últimas décadas, ganhou maior dimensão, tornando-se um preocupante problema de saúde pública mundial<sup>3</sup>. Esta patologia representa a segunda causa de morte no mundo, atingindo 12,5% da população global, prevendo-se um aumento de novos casos para 15 milhões em 2020 e 27 milhões em 2030, com 17 milhões de mortes anualmente (OMS). O maior efeito desse aumento vai incidir principalmente nos países em desenvolvimento<sup>3-5</sup>.

Globalmente, as neoplasias de pulmão, mama, estômago, próstata, cólon e reto causam a maioria das mortes e predominam nos países com grande volume de recursos financeiros. Em países com baixos e médios recursos, as neoplasias predominantes são as de estômago, fígado, cavidade oral e colo do útero. Para tal, evidencia-se a influência de importantes fatores de risco tais como o uso de tabaco, a dieta insalubre, a inatividade física, o consumo excessivo de álcool e a obesidade<sup>5</sup>.

No Brasil, os registros estatísticos sobre o câncer para o ano de 2012, também válidos para o ano de 2013, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos. De acordo com os dados absolutos sobre a incidência e mortalidade no Brasil, as regiões Norte e Nordeste são as mais atingidas<sup>3</sup>. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os tipos mais incidentes no país, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina<sup>3</sup>. Estas informações têm sido úteis no planejamento de ações

para o controle do câncer e são elementos fundamentais para o entendimento desta doença enquanto problema de saúde pública e análise das ações previstas na política de controle.

A distribuição dos diferentes tipos de câncer no país sugere uma transição epidemiológica em andamento. Com o recente envelhecimento da população, que projeta o crescimento exponencial de idosos, além do aumento da obesidade, é possível identificar um aumento expressivo na sua prevalência, o que demanda do SUS imenso esforço para a oferta de atenção adequada aos doentes. Esta perspectiva deixa clara a necessidade de grande investimento na promoção de saúde e na busca de conhecimento e modificação dos padrões de exposição aos fatores de risco para o câncer<sup>3</sup>.

### 2.2.2 Associação epidemiológica entre obesidade e câncer

A obesidade tem sido associada ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, estando relacionada a 10% de todas as mortes oncológicas em não fumantes<sup>7,60-62</sup> e presente em aproximadamente 14% de todas as mortes por câncer em homens e 20% em mulheres<sup>6</sup>. Dados combinados de 57 estudos de coorte sugerem que a cada 5 kg/m<sup>2</sup> de aumento no IMC aumenta o risco de mortalidade por neoplasias em até 10%<sup>63</sup>.

No subgrupo de obesos classe I, não tabagista, o risco de morte por câncer pode chegar a 38% nos homens e 33% nas mulheres e, comparando à população não obesa, as pessoas do sexo masculino com obesidade grave tem uma chance 52% maior de morrer por câncer, sendo o risco mais acentuado nas mulheres (62% maior)<sup>6</sup>.

O percentual de ocorrência de câncer relacionado ao sobrepeso e obesidade depende do órgão acometido pelo tumor, destacando-se as neoplasias do aparelho digestivo, como cólon e reto<sup>6-14</sup>, esôfago<sup>6,7,9-13,16</sup>, vesícula biliar<sup>6,7,10-13</sup>, pâncreas<sup>67, 10-13,17</sup>, estômago e fígado<sup>6,7,9-13,19,20</sup>, e neoplasias hormônio-dependentes como mama<sup>6,7,9-13</sup>, endométrio<sup>6,7,9-13,15</sup>, colo uterino e ovários. Outras neoplasias também associadas à obesidade incluem rins<sup>6,7,9-13,20</sup> e, em menor proporção, próstata, Linfoma não Hodking e mieloma múltiplo<sup>6,7, 10-13</sup>.

Assim, a obesidade pode estar presente em até 40-50% dos casos de neoplasias de endométrio e esôfago, 20-30% das neoplasias renais e até 50% dos casos de mama após a menopausa<sup>6</sup>. Foi observado relação inversa entre IMC e neoplasias de mama antes da menopausa e pulmão, porém há provável evidência que a obesidade abdominal aumente o risco de neoplasias de pâncreas, endométrio e mama<sup>64</sup>.

A associação entre obesidade e câncer também é específica por sexo. Assim, uma metanálise realizada por Renehan *et al* avaliou estudos prospectivos para 20 diferentes tipos de câncer. Entre os homens, os resultados confirmaram forte relação entre o excesso de peso (com base em 5 kg/m<sup>2</sup> de aumento no IMC) e adenocarcinoma de esôfago, bem como neoplasias de tireóide, rim e cólon. Entre as mulheres, os resultados também confirmaram forte relação entre obesidade e neoplasias de endométrio, vesícula biliar, rins e esôfago. Associações fracas no sexo masculino foram encontradas para o melanoma, câncer retal, leucemia e linfoma não-Hodgkin; no sexo feminino, houve fraca associação com leucemia, tireóide, pâncreas, cólon e linfoma não-Hodgkin<sup>62</sup>.

Outro estudo de metanálise evidenciou a associação entre obesidade e as neoplasias gastrintestinais. Nessa investigação, o grupo de trabalho criado pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer estimou que o aumento de peso responde por 11% dos casos de neoplasia de cólon e 39% dos casos de adenocarcinoma de esôfago. Correlacionando obesidade, neoplasia gastrintestinal e sexo, observou-se um aumento no risco de câncer de cólon em homens, mas não foi encontrada esta associação em mulheres. Em ambos sexos, o risco de adenocarcinoma esofágico foi elevado e não houve associação com neoplasias de pâncreas e estômago<sup>36</sup>.

A atividade física reduz o risco de doenças crônicas e, conseqüentemente, a taxa de mortalidade por qualquer causa, independente do grau de excesso de peso. Porém, em relação às neoplasias, o benefício da atividade física reduz o risco em até 20 a 40% para cólon, endométrio e mama<sup>63</sup>.

### **2.3. Mecanismos fisiopatológicos entre obesidade e câncer**

#### **2.3.1 Aspectos gerais**

Os possíveis mecanismos responsáveis pela associação entre obesidade e câncer incluem a distribuição da gordura corporal e alterações nos padrões hormonais, envolvendo o eixo Insulina-IGF, estrogênios e progesterona e adipocitoquinas produzidas no tecido adiposo visceral. Esse conjunto de fatores promove a resistência insulínica e aumento na produção de insulina pelo pâncreas para compensar o metabolismo da glicose. Esta última condição favorece o crescimento tumoral a partir de seus efeitos mitogênicos, anti-apoptóticos e angiogênicos, atuando

diretamente sobre seus receptores nas células ou, indiretamente, por mudanças no metabolismo de hormônios endógenos<sup>10-13,21-25</sup>.

Entretanto, as explicações são escassas quanto a essas hipóteses, sendo propostos novos mecanismos, como a hipóxia tecidual induzida pela obesidade, a susceptibilidade genética, a migração de células adiposas, alterações nos marcadores inflamatórios e imunológicos relacionados à obesidade, mudanças no Sistema fator- $\kappa$ B e o estresse oxidativo<sup>24-26</sup>.

Por outro lado, sabe-se que a frequência de SM e o DM tipo2 aumentam com o IMC, associando-se ao aumento no risco de desenvolvimento de neoplasias, sobretudo do sistema digestivo<sup>65</sup>, não se observando o mesmo no DM tipo 1, reforçando o papel carcinogênico dos altos níveis de insulina. Particularmente em relação ao câncer de pâncreas, o risco permanece significativamente alto após a exclusão dos casos nos quais o diagnóstico de câncer foi feito entre um e cinco anos após o diagnóstico de DM tipo 2<sup>66</sup>.

### 2.3.2 Eixo IGF

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina, também conhecidos como somatomedinas ou IGFs (*Insulin-like growth factor*) são polipeptídeos com sequências similares da insulina e codificados por genes que se localizam no braço longo do cromossomo 12 (IGF-1 ou somatomedina C) e no braço curto do cromossomo 11 (IGF-2 ou somatomedina A), em regiões próximas aos proto-oncogenes<sup>67</sup>. Sua secreção ocorre à medida que são produzidos, exercendo ações autócrinas, parácrinas e endócrinas sobre o metabolismo intermediário, proliferação, crescimento e diferenciação celular. Esses fatores são parte de um sistema complexo (referido como "eixo IGF"), que consiste em dois receptores de superfície (IGF-1R e IGF-2R) e dois ligantes (IGF-1 e IGF-2) que se associam com elevado grau de especificidade e afinidade a uma família de seis proteínas carreadoras (IGFBP-1 a IGFBP-6), as quais modulam suas atividades. A maioria das ações conhecidas dos IGFs é exercida mediante sua ligação ao receptor tipo 1 (IGF-1R), não sendo ainda claro o papel fisiológico do receptor tipo 2 (IGF-2R)<sup>22</sup>. Há indícios de que o IGF-2R possa participar da remoção do IGF-2 do ambiente extracelular. Assim, múltiplas vias de sinalização, entre elas, a via da fosfoinositol-3-quinase (PI3K) e da proteína quinase ativada pelo mitógeno (MAP quinase), são ativadas pela interação entre os IGFs e seus receptores. Essas vias estão envolvidas no transporte de glicose, na regulação da síntese de glicogênio e de uma variedade de reguladores de sobrevivência celular, além de inibição da apoptose<sup>67</sup>.

A síntese de IGFs envolve fatores reguladores como o Hormônio do Crescimento (GH), considerado um dos principais promotores desta síntese, porém o estado nutricional e o aporte proteico-calórico apresentam papel relevante na produção das somatomedinas<sup>67</sup>. No homem, o IGF-1 sérico encontra-se diminuído em situações de restrição calórica ou proteica, tornando-se normal com a realimentação. Por outro lado, a hiperalimentação não é capaz de elevar a concentração de IGF-1. A diminuição dos sítios hepáticos do GH pelo aumento da insulina no estado de ingestão calórica e a redução da expressão gênica do IGF-1 parecem estar envolvidas nesse processo. Os hormônios tireoideanos também participam desta regulação ao aumentar a ligação hepática do GH e, conseqüentemente, a síntese de IGF-1. Em contrapartida, a ação estimuladora do GH sobre a secreção de IGF-2 é discreta<sup>67</sup>.

Os IGFs se associam à família de proteínas transportadoras denominadas *insulin-like growth factor binding proteins* ou IGFbps, as quais também são produzidas em diversos órgãos e tecidos sob estímulo do GH. Cada IGFbp pode apresentar ações independentes dos IGFs na apoptose e no crescimento celular<sup>67</sup>. A IGFbp-1, bem como a IGFbp-2, tem suas concentrações correlacionadas inversamente à concentração de insulina podendo ser suprimidas logo após a alimentação e elevadas com o jejum. O glucagon e o cortisol também estimulam sua secreção em situações de insulinemia controlada ou hipoinsulinemia, embora a insulina seja o principal regulador dessas duas proteínas de ligação<sup>67</sup>. A IGFbp-3 é a mais abundante na circulação, ligando-se a aproximadamente 85 a 90% dos IGFs circulantes; IGFbp-4 tem sua secreção aumentada pela vitamina D e pelo paratormônio (PTH); A IGFbp-5 tem como principal regulador de sua secreção o GH, ação que independe do IGF-1; A IGFpb-6 difere das demais pela sua afinidade à IGF-2 e, junto à IGFbp-2, é a mais abundante no líquido cefalorraquidiano<sup>67</sup>.

A maioria dos IGFs é encontrada na circulação como integrante de um complexo tenário, formado por uma proteína transportadora (IGFBP-3) e uma subunidade proteica ácido-lábil (ALS). Neste complexo, cujos integrantes tem sua secreção estimulada pelo GH, encontram-se 85 a 90% dos IGFs circulantes, pois devido ao seu peso molecular, a molécula IGF-IGFBP-3-ALS não transpõe a barreira endotelial. Tanto a IGF-1 quanto o IGFBP-3 tem sua secreção também influenciada pela idade e pelo gênero<sup>22</sup>. A IGFBP-3, secretada no sangue, entra no fígado e irá se juntar ao IGF-1 e à ALS, ambos secretados pelos hepatócitos, de tal modo que a formação do complexo não ocorrerá até que todos os componentes estejam na circulação<sup>67</sup>. Estudos epidemiológicos atuais sobre o câncer têm focado, principalmente, sobre essas duas proteínas, o IGF-1 e o IGFpb-3<sup>22</sup>.

Em termos de ativação de receptor, o IGF-1 se liga com alta afinidade ao IGF-1R e com baixa afinidade ao receptor de insulina (IR), ocorrendo o inverso com a insulina<sup>22</sup>. A semelhança estrutural entre o IGF-1R e o IR permite que receptores híbridos compostos por um hemi-IGF-1R e um hemi-IR sejam formados em células que expressam os dois receptores. Esses receptores híbridos apresentam afinidade pelos IGFs compatível ao IGF-1R e afinidade de 15 a 50 vezes menor pela insulina<sup>67</sup>.

### 2.3.3 Eixo GH-IGF

A secreção hipofisária de GH tem controle hipotalâmico, exercido pelo GHRH (hormônio liberador do GH), somatostatina e, em menor intensidade, pela grelina. O GHRH e a grelina estimulam a secreção, enquanto a somatostatina exerce ação inibitória. Outros fatores também interferem na secreção de GH, como a tiroxina, o glucagon, os esteróides sexuais, a dopamina e a hipoglicemia, que estimulam a secreção atuando no hipotálamo ou na hipófise. Por outro lado, o sistema de retroalimentação negativo exercido pelo GH e pelos IGFs, regulando as concentrações de GHRH e de somatostatina ou atuando diretamente sobre as células hipofisárias, é determinante na regulação da síntese e na secreção do GH<sup>67</sup>.

Em pacientes eutróficos, o estado de jejum leva ao aumento na secreção de GH, sem alteração na concentração sérica de IGF-1, devido à resistência hepática ao GH, causada pela redução na concentração de insulina durante o jejum, já que ela estimula a síntese do receptor de GH (GHR). Por outro lado, no estado de obesidade ocorre excesso de gordura visceral, sobretudo no fígado, cursando com estado de hipofunção do eixo GH-IGF-1 e marcada diminuição na secreção de GH, devido ao *feedback* negativo, regulado pelo aumento de IGF-1 livre sobre a glândula pituitária, inibindo a produção de GH<sup>68</sup>. Isso ocorre porque a hiperinsulinemia presente na obesidade exerce efeito inibitório na liberação de GH pelos somatotrófos através do bloqueio na síntese de IGFbps pelo fígado, ocorrendo aumento da fração livre de IGF-1. Além dessa ação, ela aumenta a densidade e sensibilidade de receptores GH, causando mudanças significativas na produção de IGF-1 e IGFBP-3. O aumento na concentração de IGFBP-3 é, no entanto, menos marcante que o do IGF-1, levando ao aumento da relação molar IGF/IGFBP-3, que associado à diminuição da concentração de IGFBP-1, pode refletir maior bioatividade dos IGFs, favorecendo a formação de tumores<sup>69</sup>. Os ácidos graxos livres também inibem a liberação de GH pela hipófise.

As fisiologias dos eixos IGF e GH, bem como os efeitos da insulina podem ser resumidas na figura 1.

Quando relacionados, o IMC e o IGF-1 total não apresentam relação linear, visto que em indivíduos super obesos, sua concentração diminui significativamente comparada a indivíduos com peso normal. A concentração de IGFBP's 1 e 2 também diminui com aumento do IMC, ocorrendo o inverso com a fração livre de IGF-1, que apresenta uma relação proporcional ao IMC<sup>22</sup>.

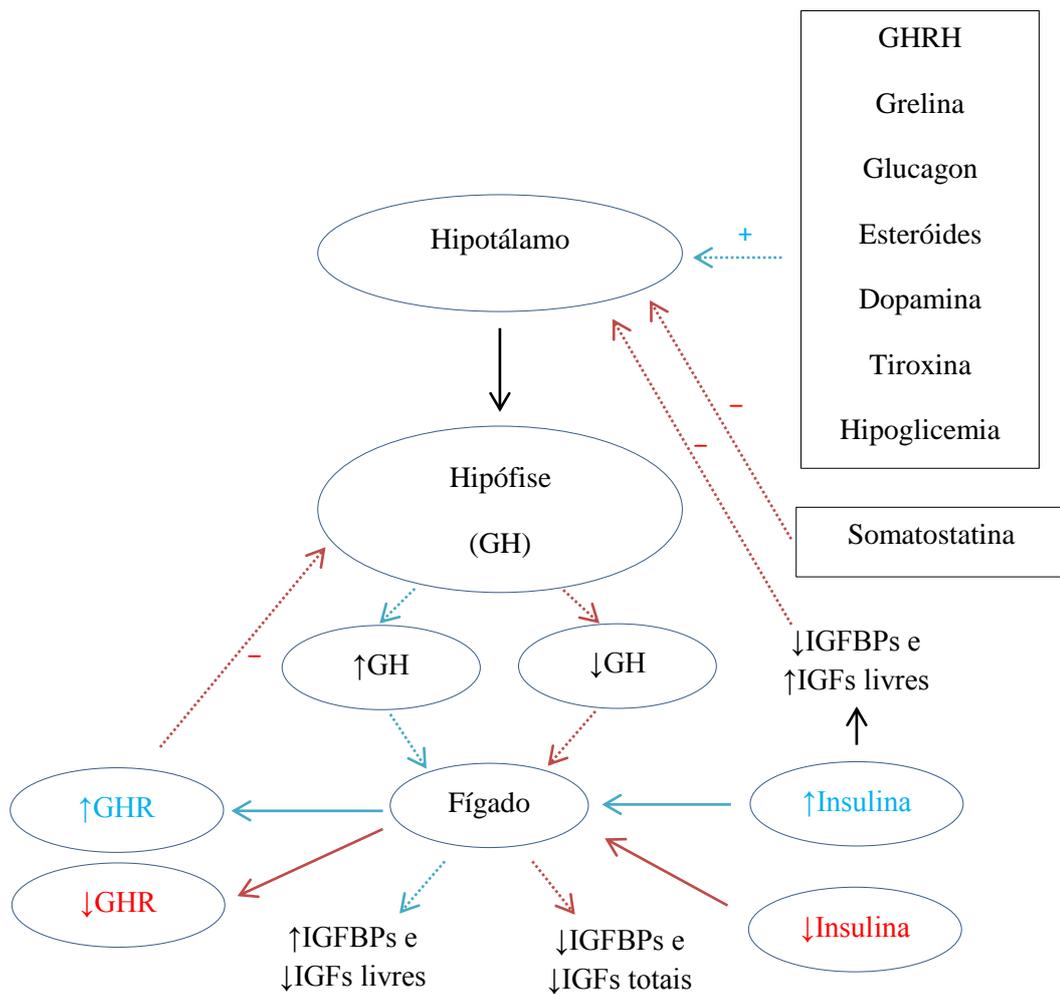


Figura 1. Fisiologia do eixo GH-IGF e repercussões do efeito da insulina sobre o mesmo. GH=Hormônio do Crescimento; GHR=Receptor do Hormônio do Crescimento; IGF=Insulin-Like growth factor; IGFbps= Insulin-Like growth factor binding proteins.

#### 2.3.4 Mecanismos envolvidos na carcinogênese

O conceito da relação entre metabolismo irregular e carcinogênese foi anunciado por Otto Warburg<sup>70</sup>. Em 2002, num painel de especialistas da Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC), avaliou-se a relação entre obesidade e câncer e se concluiu que algumas neoplasias poderiam ser prevenidas evitando o ganho de peso<sup>71</sup>. A partir daí, estudos observacionais e epidemiológicos investigaram tal associação, sugerindo mecanismos que relacionam essas duas doenças.

A hipótese mais estudada envolve a ação da hiperinsulinemia prolongada. Nesse formato simples, a obesidade, especificamente visceral, resulta em aumento na liberação de ácidos graxos livres, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e da resistina, bem como em diminuição na liberação de adiponectina na circulação e consequente desenvolvimento de resistência insulínica pelo acúmulo de metabólitos de ácidos graxos dentro de tecidos responsivos à insulina. Assim, há uma diminuição na eficiência de sinalização insulínica para regulação da glicose plasmática nos tecidos sensíveis a sua ação, como o músculo esquelético, fígado, tecido adiposo e endotélio, e aumento compensatório na produção de insulina pelo pâncreas a fim de manter os níveis glicêmicos dentro da faixa de normalidade<sup>67</sup>.

A hiperinsulinemia reduz a produção de IGFBP-1 e IGFBP-2, que normalmente se ligam ao IGF-1 inibindo sua ação, resultando em aumento nos níveis de IGF-1 livre, bioativo. Esta somatomedina, junto à insulina, se liga aos seus receptores, resultando em fosforilação de proteínas IRS, que ativam a cascata de sinalização intracelular, representada pelas vias fosfoinositol-3-quinase (PI3K-Akt) e proteína quinase ativada pelo mitógeno (MAP quinase ou MAPK), ambas envolvidas no processo da carcinogênese<sup>22</sup>. Essas vias ativam oncogenes Ras-MAPK, induzindo proliferação celular e consequentes mudanças no ambiente celular favorável à formação de tumores<sup>7,21</sup>. Outras ações da insulina seriam a estimulação da  $\beta$ -catenina, uma via de sinalização precoce em neoplasias, que promove a inibição da glicogênio sintase 3  $\beta$  e a ativação de oncogenes Ras-MAPK, além de induzir a proteólise de IGFBP-3, o que poderia reduzir a afinidade de IGF-1 aos fragmentos de IGFBP-3, aumentando a liberação de IGF-1 livre<sup>22</sup>.

O IGF-1 apresenta ações mitogênica e anti-apoptótica, induz hipóxia e linfangiogênese relacionada a tumores, produz o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) mediado pelo

fator-1, e aumenta a migração celular, mediada por integrinas e  $\epsilon$ -caderina<sup>22</sup>. Além disso, é importante na regulação da diferenciação e organização celular, como também na estimulação da via de sinalização chave para iniciação tumoral ( $\beta$ -catenina) e potencialização dos efeitos de outros estimuladores do crescimento celular, incluindo estrógenos<sup>28</sup>. Estudos indicam que esta somatomedina encontra-se hiperexpressa em muitas neoplasias, incluindo mama, cólon e próstata<sup>22</sup> (Figura 2).

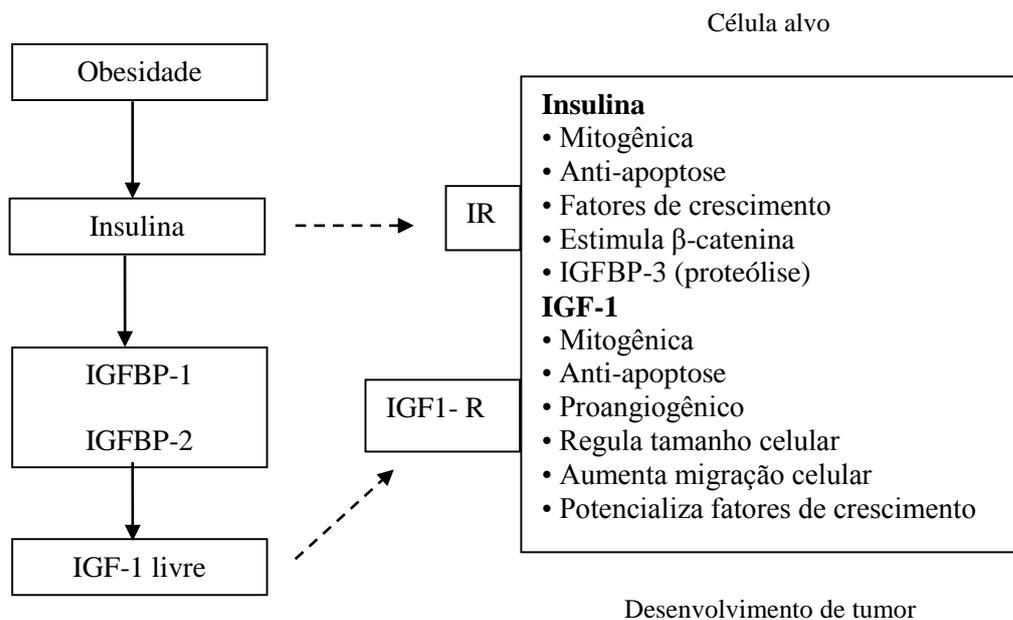


Figura 2. Hipótese insulina-IGF como mecanismo responsável pela associação entre câncer e obesidade, "formato simples": Obesidade está associada ao estado prolongado de hiperinsulinemia, que reduz a produção de IGFBP-1 e IGFBP-2. A diminuição nessas proteínas resulta em aumento dos níveis de IGF-1 livre, acreditando-se ser a forma "bioativa" de IGF-1. Ações do IGF-1 (listado no quadro da célula alvo) pode favorecer o desenvolvimento de tumores. Abreviações: IR, receptor da insulina; IGF-1R, receptor do fator de crescimento insulina-like.

A resistência insulínica e consequente hiperinsulinemia são fatores prognósticos adversos à mortalidade associada às neoplasias de mama<sup>28</sup>, cólon<sup>72</sup> e próstata<sup>73</sup>, podendo promover uma baixa resposta ao tratamento contra o câncer ou um fenótipo mais agressivo em pacientes com diabetes<sup>74</sup>. A hiperinsulinemia constitui um fator de risco para câncer de endométrio<sup>75</sup> e apresenta efeitos proliferativos no hepatocarcinoma pela *upregulation* da enzima AKR1B10, a qual favorece o desenvolvimento e progressão tumoral através de lipogênese<sup>76</sup>.

Além disso, o peptídeo C, cuja concentração plasmática habitualmente está elevada quando há hiperinsulinemia, está relacionado a um maior risco de câncer de mama, endométrio e cólon, não sendo visto a mesma relação com neoplasias de próstata, ovários e mama antes da

menopausa<sup>22</sup>. Este peptídeo é oriundo da clivagem da pró-insulina em insulina e peptídeo-C, sendo sua dosagem útil para acompanhar a produção endógena de insulina.

As intervenções terapêuticas indicadas para pacientes com DM tipo 2 são o uso regular de insulina, de drogas que aumentam a secreção de insulina, como sulfoniluréias, ou de drogas de sensibilização da insulina, como metformina ou tiazolidinedionas (TZDs). Dados sugerem que pacientes obesos que usam insulina ou fármacos que aumentam a secreção de insulina tem um risco mais alto de neoplasias com pior prognóstico em relação aos pacientes que usam drogas de sensibilização insulínica<sup>77</sup>, possivelmente devido à redução nos níveis circulantes de insulina, mostrando a forte associação entre níveis altos de insulina e risco de câncer.

Existem outras vias moleculares ligadas ao excesso de peso, que podem ser relevantes na carcinogênese. Estes sistemas não são, necessariamente, exclusivos do eixo Insulina-IGF, mas suas regulações estão interligadas, constituindo o modelo complexo da hipótese insulina-câncer, abaixo destacados:

### Síndrome Metabólica

A Síndrome Metabólica é caracterizada por resistência insulínica, tolerância à glicose comprometida, obesidade central, hipertensão e dislipidemia<sup>28</sup>, e pode estar associada a desordens de coagulação e de marcadores inflamatórios como o aumento da Proteína C Reativa e alterações no sistema das adipocinas. Recentes estudos indicam uma relação independente desta síndrome com a formação de adenoma colorretal<sup>78</sup> e câncer de mama após a menopausa<sup>79</sup>.

### Esteroides sexuais

A obesidade também influencia a síntese e biodisponibilidade de estrógenos, andrógenos e progestágenos. O tecido adiposo promove a expressão de enzimas que metabolizam os hormônios sexuais, como a enzima aromatase, a qual estimula a formação de estrógenos a partir de precursores androgênicos, secretados pelas gônadas e glândulas adrenais. Nos homens e nas mulheres após a menopausa, o tecido adiposo é o principal local de síntese dos estrógenos. Na obesidade há aumento dos níveis circulantes de insulina e da atividade de IGF-1, resultando em redução na síntese hepática e concentração sanguínea de globulina ligadora de hormônios sexuais, (SHBG), aumentando, dessa forma, a quantidade de hormônios sexuais livres, bioativos<sup>7,22-25,28</sup>.

Ensaio experimentais evidenciam que estrógenos e progestágenos estão envolvidos na regulação da proliferação e diferenciação celular, bem como da apoptose, contribuindo para a carcinogênese nos tecidos sensíveis a estes hormônios. Assim, o risco de câncer de mama após a menopausa aumenta em torno de 50% diante de concentrações diminuídas de SHBG e concentrações elevadas de esteroides sexuais circulantes, incluindo dehidroepiandrosterona (DHEA), DHEA sulfato,  $\Delta$ -4-androstenediona, testosterona, estrona e estradiol total<sup>12,28</sup>. Já o câncer de endométrio, quarto mais comum entre as mulheres, apresenta um risco de desenvolvimento duas a três vezes maior na obesidade. Aproximadamente, 40% da incidência desse câncer é atribuído ao excesso de peso, sendo 70-90% do tipo 1 em obesas (estrógeno-dependente)<sup>7</sup>. Nas mulheres obesas, antes da menopausa, o mecanismo de desenvolvimento deste tipo de neoplasia provavelmente é a diminuição de progesterona, devido à produção ovariana de andrógenos ou anovulação contínua, presente na Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), também conhecida como Síndrome de Stein-Leventhal, representada por amenorreia, infertilidade, hirsutismo e obesidade. A SOP afeta 20 a 30% das mulheres em idade fértil, sendo a causa mais frequente de anovulação crônica, levando a ciclos menstruais irregulares com oligomenorreia e infertilidade. Atualmente, muitos estudos tem mostrado de forma conclusiva a associação direta entre SOP e doenças cardiovasculares (hipertensão e doenças isquêmicas cardíacas), DM tipo 2 e doenças malignas, como o câncer de endométrio, devido à exposição ininterrupta do tecido endometrial ao estrogênio de forma não contrabalanceada pela progesterona<sup>7</sup>. (Figura 3)

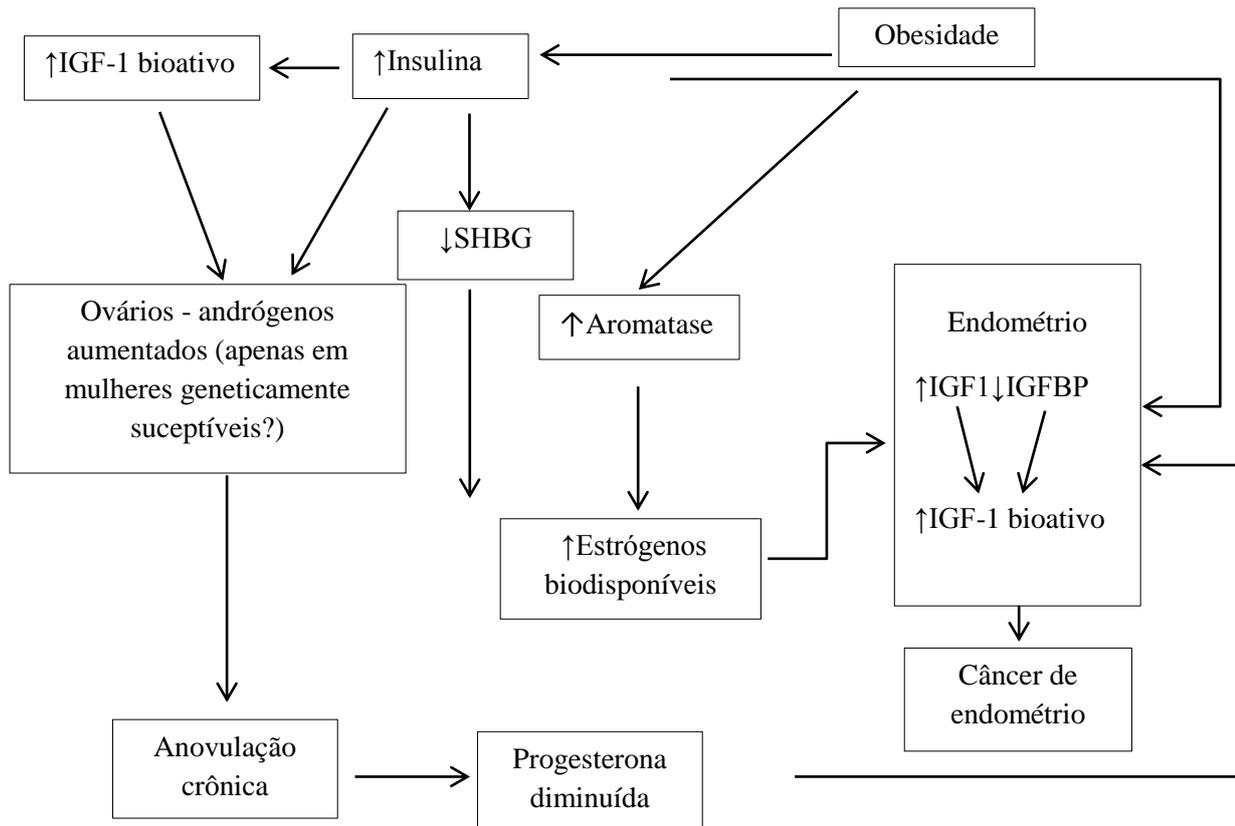


Figura 3. Aspectos bioquímicos e hormonais (hormônios sexuais) relacionados à obesidade e câncer endometrial. (Adaptado de Calle *et al*<sup>7</sup>)

### Adipoquinas

O tecido adiposo é, reconhecidamente, um órgão endócrino ativo, que não apenas armazena energia, mas promove a produção de adipoquinas ou adipocitoquinas, destacando-se a leptina e adiponectina. Elas são relevantes para a carcinogênese e manutenção da homeostase, imunidade e inflamação<sup>24</sup>. De maneira geral, os estudos sugerem que a leptina e adiponectina apresentam papéis opostos no desenvolvimento e progressão do câncer.

A adiponectina é um hormônio protéico que modula a regulação da glicemia e o catabolismo de ácidos graxos. É secretada pelo tecido adiposo branco na corrente sanguínea, onde representa, aproximadamente, 0,01% de todas as proteínas plasmáticas, e seus níveis estão inversamente relacionados ao percentual de gordura corporal em adultos<sup>29</sup>. Este hormônio tem um papel na supressão de eventos metabólicos que podem causar DM tipo 2, obesidade, aterosclerose, doença hepática gordurosa não alcoólica e SM. Assim, a adiponectina regula os níveis de glicose intracelular, a  $\beta$ -oxidação, o clearance de triglicerídeos,

além de promover proteção contra disfunção endotelial, perda de peso e controle do metabolismo energético. É um importante agente de sensibilização da insulina e um regulador negativo da angiogênese<sup>29</sup>. Como sua concentração plasmática está diminuída na obesidade, poderá favorecer ao desenvolvimento de neoplasias pela ausência de sua regulação negativa sobre a angiogênese. A adiponectina foi inversamente correlacionada ao câncer de cólon, endométrio, esôfago, próstata e mama<sup>24,80</sup>.

A leptina é um hormônio peptídico que apresenta uma estrutura terciária semelhante a alguns membros da família das citocinas. É produzida principalmente pelos adipócitos e sua concentração varia proporcionalmente à quantidade de tecido adiposo. Além do seu conhecido efeito sobre o controle do apetite, evidências atuais demonstram que a leptina está envolvida no controle da massa corporal, reprodução, angiogênese, imunidade, cicatrização e função cardiovascular. Esta adipoquina é o principal mediador de regulação do apetite e da homeostase de energia. As mudanças na concentração plasmática de leptina sinalizam ao cérebro o *status* do metabolismo energético, que responde ativando os receptores de leptina e inibindo a formação de neuropeptídeos relacionados ao apetite. Do lado oposto, baixos níveis de leptina induzem hiperfagia. A Insulina exerce *feedback* positivo sobre a expressão genética de leptina para inibir o apetite<sup>24</sup>.

A maioria dos obesos é leptina-resistente, pois a expressão prolongada de leptina observada na obesidade induz à resistência leptínica e aumento na concentração plasmática deste hormônio, similar à insulina. Esta associação entre adiposidade e níveis de leptina pode sugerir um papel deste hormônio neuroendócrino na incidência aumentada de câncer na obesidade, já que a leptina apresenta efeitos mitogênicos e anti-apoptóticos em diversas neoplasias<sup>81-86</sup>.

#### Estado inflamatório associado à obesidade

Outro mecanismo que pode favorecer o desenvolvimento de neoplasias na obesidade é a presença crônica de um estado inflamatório de baixo grau chamado metaflamação<sup>87</sup>. Embora ainda incerto como esse estado inflamatório é iniciado, propõe-se um mecanismo induzido por hipóxia. Durante o ganho de peso e conseqüente expansão do tecido adiposo, algumas células permanecerão distantes da vascularização dos órgãos, levando à hipóxia localizada. Esta condição ativa o fator indutor de hipóxia, HIF-1 $\alpha$ , que promove a infiltração de macrófagos e monócitos no tecido adiposo e a secreção de TNF- $\alpha$ <sup>24</sup>. Outras citocinas pró-inflamatórias como

as interleucinas (IL) 1 e 6, receptores de TNF $\alpha$ , Proteína C Reativa (PCR), quimoquinas (proteína quimiotática do monócito, MCP-1) e adipoquinas (haptoglobina, inibidor do ativador de plasminogênio-1, leptina, visfatina, resistina e fator de crescimento do endotélio vascular - VEGF), também são secretadas, de forma irregular, repercutindo na redução da secreção de adipoquinas anti-inflamatórias (adiponectina e antagonista de IL-1)<sup>24</sup>. Em relação ao TNF- $\alpha$ , recentes estudos sugerem que seu envolvimento com a carcinogênese pode ser explicado pela ativação do fator de transcrição nuclear, o NF- $\kappa$ b, ao bloquear o inibidor de NF- $\kappa$ B<sup>88</sup>. Além de mediar a necrose tumoral induzida por endotoxinas, o TNF- $\alpha$  tem sido implicado na angiogênese e metástases, bem como sobrevida, crescimento e diferenciação celular por ativação deste fator de transcrição (via NF- $\kappa$ B), prevenindo a apoptose o que permite a sobrevida celular com formação de neoplasia associada à inflamação<sup>88</sup>.

A IL-6 está positivamente correlacionada ao IMC. A sua secreção, através do tecido adiposo, é induzida pelo TNF- $\alpha$  e através de condições de hipóxia neste tecido. A IL-6 estimula a proliferação de células, diferenciação e metástases<sup>24</sup>. O inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) afeta a diferenciação dos adipócitos e a sinalização insulínica<sup>25</sup>. Ele inibe os ativadores do plasminogênio, como a uroquinase e o tecido ativador de plasminogênio<sup>24</sup>, sendo um indicador de pobre prognóstico, promotor do crescimento tumoral ao inibir a apoptose, regulador da angiogênese e aumentar a migração e adesão celular<sup>25</sup>.

### Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo pode ser causado pela produção irregular de citocinas, adiponectina, leptina, resistina, PAI-1, IL-6 e proteína quimiotática de monócitos-1 nos adipócitos<sup>30</sup>. A obesidade também pode diminuir, de forma independente, as atividades antioxidantes de proteção do corpo e aumentar o estresse oxidativo sistêmico, um fenômeno que pode ser particularmente relevante para desenvolvimento de câncer renal relacionado à obesidade<sup>24</sup>. Em camundongos geneticamente obesos, a exposição crônica à radiação UV aumenta os níveis de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e a produção de óxido nítrico (NO) com maiores danos fotooxidativos de lipídios e proteínas e consequente depleção de enzimas antioxidantes de defesa, incluindo glutathione, glutathione peroxidase e catalase. Além disso, as espécies reativas induzidas pela radiação UV podem mediar a ativação de MAPK e NF- $\kappa$ B, favorecendo o crescimento tumoral.<sup>89</sup>

### Susceptibilidade genética

É concebível que os fatores genéticos que predisõem à obesidade também possam estar envolvidos no desenvolvimento de tumores. A obesidade genética vem progredindo desde a descoberta de quinze novos *loci* associados ao IMC<sup>31</sup>. É possível sobrepor este mapa genético da "obesidade" ao mapa genético do câncer para explorar prováveis genes candidatos à carcinogênese em regiões associadas, como nas neoplasias de mama (11p e 16q) e colorretal (sobreposição no cromossomo 18q)<sup>22</sup>.

### Sensibilização lipídica

O armazenamento de excesso de adipócitos, coordenando o aumento de lipídeos, é característica da obesidade, onde estão envolvidos os seguintes componentes:

#### Ácido Graxo Sintase (FASN)

Esta enzima forma ácidos graxos endógenos, que são necessários à divisão celular. Encontra-se elevada em neoplasias de mama, ovários, próstata e lesões precursoras de estômago, cólon, esôfago e cavidade oral<sup>24</sup>. Inibidores específicos de FASN, como a droga Orlistat, levam à apoptose de linhagens celulares derivadas de neoplasias de próstata, mama e cólon<sup>90</sup>.

#### Monoacilglicerol lipase (MAGL)

A atividade aumentada de FASN em células neoplásicas é acompanhada pelo aumento de enzimas lipolíticas, como a monoacilglicerol lipase, MAGL, que promove a mobilização de estoques de lipídeos para o remodelamento celular e geração de lipídeos de sinalização tumorigênica. Sua via é regulada em tumores agressivos, cujas células liberam ácidos graxos, que se tornam combustíveis para geração de moléculas de sinalização lipídica, tais como o ácido lisofosfatídico e prostaglandinas<sup>91</sup>.

#### Transferência de lipídeos ao tumor a partir de adipócitos

As células neoplásicas podem utilizar lipídeos a partir de reserva de adipócitos próximos como fontes de energia, promovendo o crescimento tumoral<sup>92</sup>. Estes dados são de particular importância, considerando as implicações da obesidade sobre a prevalência e agressividade do câncer e a interação sinérgica entre adipócitos e células neoplásicas<sup>24</sup>.

### Células estromais adiposas (ASC)

Para progredir, um tumor precisa superar fatores que limitam seu crescimento, estabelecendo uma neovasculatura, que o abastece com fatores de crescimento e oxigênio. As células estromais mesenquimais (MSC's) derivadas do tecido adiposo e denominadas células estromais adiposas ou *adipose stromal cells* (ASC), podem ser uma fonte potencial de células progenitoras. Assim, um estudo usando modelo animal evidenciou que a obesidade facilitou o crescimento tumoral, independente de dieta, sugerindo um papel direto do tecido adiposo na progressão do câncer. Quando transplantadas em ratos, elas puderam promover o crescimento tumoral, servindo como progenitores de adipócitos perivasculares<sup>93</sup>.

A patogênese neoplásica pode ser direcionada pela obesidade, através da conversão de ácidos graxos da dieta, ou sintetizados *De novo*, em lipídeos de sinalização tumorigênica, que podem sinalizar para células neoplásicas através de interações autócrinas e parácrinas<sup>24</sup>. As enzimas que sintetizam ou quebram estes lipídeos de sinalização estão desreguladas no câncer, podendo desencadear respostas oncogênicas, incluindo proliferação, motilidade, invasão, crescimento tumoral, respostas imunológicas e metástases<sup>94</sup>. Tais lipídeos incluem: Ácido lisofosfatídico, Prostaglandinas (prostaglandina E<sub>2</sub>), Esfingosine-1-fosfatase (S1P), Fator Ativador de Plaquetas (PAF) e Fosfoinosítides (Fosfatidilinositóis)<sup>24</sup>.

Os mecanismos envolvidos na associação entre obesidade e câncer estão resumidos na Figura 4.

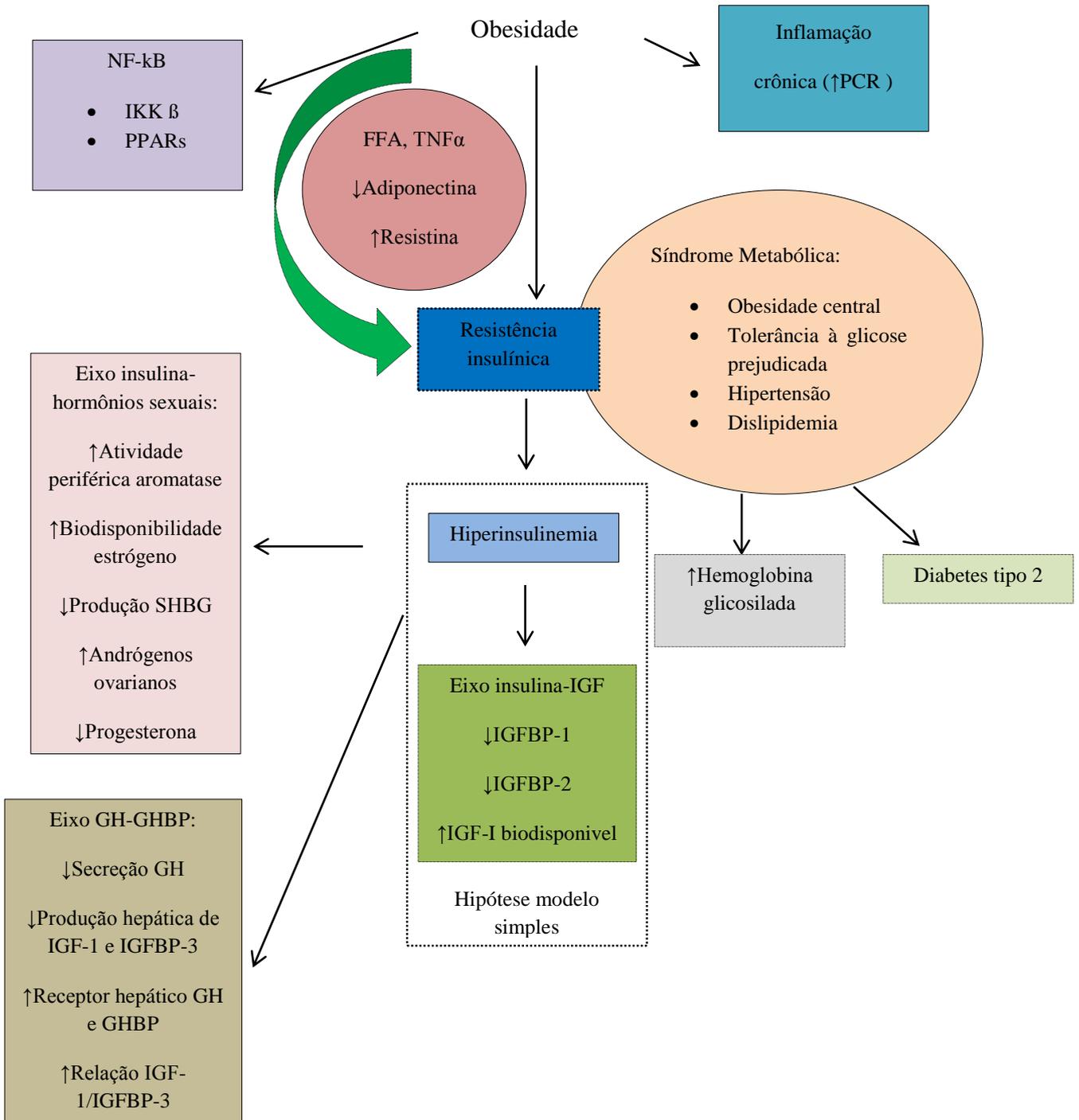


Figura 4. “Formato complexo” da hipótese insulina-câncer e inter-relações entre obesidade, resistência insulínica e carcinogênese.

Abreviações: NF-kB, fator nuclear kB; IKK  $\beta$ , inibidor de kappa beta quinase; PPARs, receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, FFA, ácidos graxos livres; TNF $\alpha$ , fator de necrose tumoral, GH, hormônio do crescimento, IGF, fator de crescimento semelhante à insulina; IGFBP, proteína de ligação do fator de crescimento insulina-like; GHBP, proteína de ligação do hormônio do crescimento.

## 2.4 Obesidade e neoplasias do aparelho digestivo

### 2.4.1 Obesidade e câncer do Aparelho Digestivo

Entre as neoplasias do aparelho digestivo frequentemente associadas à obesidade, destacam-se o câncer de cólon, pâncreas e esôfago. O câncer de cólon constitui-se na terceira causa mais comum de câncer no mundo. Associa-se à ingestão excessiva de ácidos graxos de origem animal e ingestão deficiente de frutas e verduras ricas em  $\beta$ -caroteno e antioxidantes. Demonstrou-se associação entre o câncer colorretal e a obesidade, sobretudo no sexo masculino<sup>8</sup>. Uma possível associação com obesidade está na circunferência abdominal e relação cintura-quadril, sobretudo quanto à formação de adenomas em homens<sup>78</sup>. Esta diferença entre os gêneros são especulativas. Uma hipótese é que a gordura abdominal é mais comum em homens do que em mulheres, sendo um fator de risco mais forte que a gordura periférica<sup>95</sup>. Outra possibilidade é o papel protetor dos estrógenos sobre o risco de câncer colorretal<sup>25</sup>.

Outro mecanismo de associação para câncer de cólon é através da proteína guanilato ciclase C (GUCY2C), receptor transmembrana de extrema importância para a homeostase intestinal, abrangendo o equilíbrio de fluidos e eletrólitos, a dinâmica epitelial e as funções antitumorigênica e de barreira intestinal. Recentes descobertas expandiram seu papel homeostático ao revelar um novo eixo endócrino, intestino-cérebro, de regulação do apetite pela GUCY2C hipotalâmica, que responde à uroguanilina derivada do intestino. Além disso, o balanço de energia e supressão do tumor por um sistema receptor único sugere que o eixo hormonal da GUCY2C pode contribuir para a relação entre a obesidade e o câncer colorretal<sup>96</sup>. GUCY2C apresenta expressão elevada em células epiteliais intestinais e é ativada pela guanilina. A obesidade pode induzir a perda da guanilina com silenciamento da GUCY2C, produzindo disfunção epitelial, e aumento da susceptibilidade à carcinogênese<sup>96</sup>.

A obesidade está associada a um risco três vezes maior para adenocarcinoma de esôfago, pela associação com refluxo gastroesofágico crônico<sup>7,62</sup>. Apresenta relação homem/mulher de 3/1<sup>12</sup>. Um precursor reconhecido do adenocarcinoma é a metaplasia intestinal ou esôfago de Barrett. Os doentes com alterações de Barrett tem um aumento de risco de 30-40 vezes maior de desenvolver o adenocarcinoma do esôfago<sup>9</sup>. O consenso existente é que o ácido de longa data e refluxo biliar leva à inflamação crônica, desencadeando uma sequência metaplasia-displasia. Pacientes com esôfago de Barrett estão mais propensos a apresentar características da síndrome

metabólica e adiposidade central. Isso levanta a possibilidade de que a gordura visceral desempenha um papel adicional na patogênese da Barrett além de refluxo simples<sup>9</sup>. Estudo recente concluiu que o polimorfismo comum do gene IGF-IR G1013A modula o risco de obesidade para o adenocarcinoma de esôfago. Estes achados implicam o eixo Fator de Crescimento Insulina-Like na patogênese molecular do adenocarcinoma<sup>97</sup>. A associação entre obesidade e câncer do aparelho digestivo pode ser resumida na Figura 5.

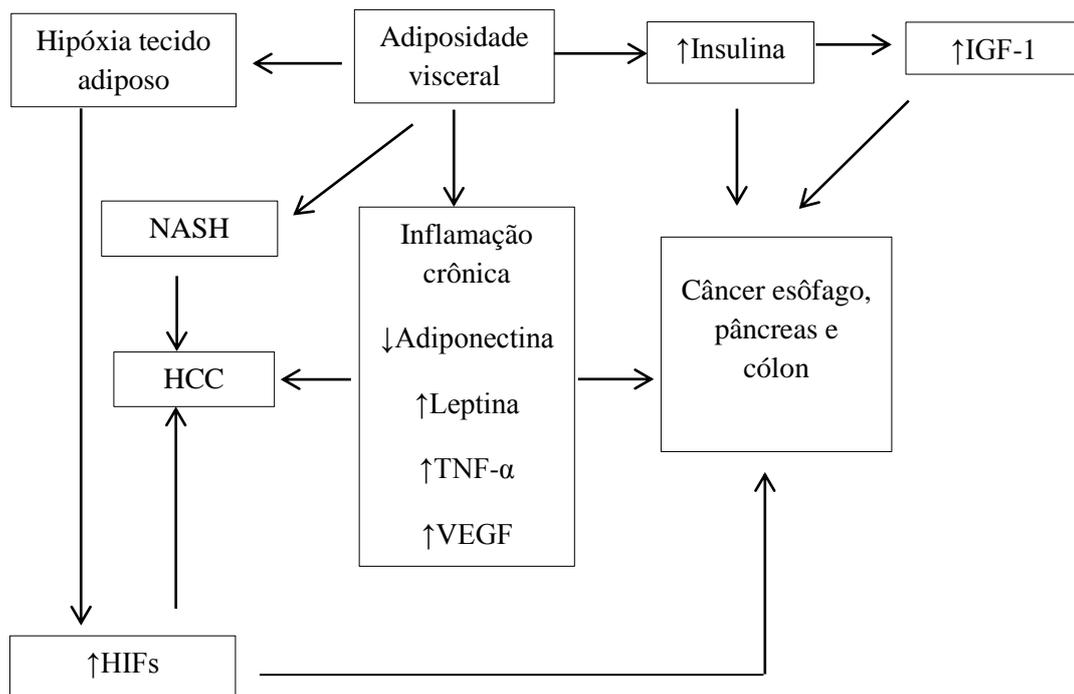


Figura 5 Mecanismos do efeito da obesidade visceral sobre a carcinogênese no aparelho digestivo. HIFs=Fatores indutores de hipóxia; HCC=Carcinoma hepatocelular; VEGF=Fator de crescimento do endotélio vascular; IL6=Interleucina 6; TNF-α=Fator de Necrose Tumoral alfa

Diante das evidências expostas, sabe-se que o tecido adiposo em expansão pode ter uma contribuição clinicamente relevante no desenvolvimento do câncer. Porém, são necessárias mais investigações a fim de entender melhor os mecanismos moleculares que ligam a função irregular do tecido adiposo no desenvolvimento desta doença, de forma a fornecer novas estratégias terapêuticas para prevenir e/ou tratá-la. Não obstante, combater e tratar a obesidade é uma prioridade a fim de reduzir a incidência de mortalidade por neoplasias a ela relacionadas. Desse modo, a identificação de fatores que afetam algum dos componentes do balanço energético para prevenir ou reduzir o peso é uma avenida promissora de pesquisa. Ao mesmo tempo, os mecanismos que modulam a relação obesidade/câncer não estão completamente esclarecidos,

devido à natureza complexa e multifatorial da doença, à susceptibilidade genética individual e, parcialmente, devido à ausência de ferramentas de pesquisas apropriadas para identificá-los.

Por outro lado, o desenvolvimento do Projeto Genoma permitiu a aproximação da clínica médica com a Biologia Molecular e, após a sua conclusão em 2003, observou-se um aumento das ciências capazes de estudar a expressão gênica e seus produtos, as proteínas, chamadas de ciências “ômicas”. Assim, com a evidência e evolução dessas linhas científicas tornou-se possível explorar as mudanças do genoma na expressão do perfil genético relacionado a diferentes patologias, tais como a obesidade e o câncer. Ciências, como a nutrigenômica, epigenômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica permitirão uma melhor compreensão de como alguns fatores podem afetar no metabolismo energético e na carcinogênese relacionada à obesidade, inferindo-a na prática clínica a partir de novas alternativas de prevenção e tratamento a nível molecular.

## **2.5. As Ciências Ômicas e sua importância na compreensão da carcinogênese e obesidade**

### **2.5.1 Biologia molecular do câncer**

Achados na literatura direcionam para o envolvimento de duas rotas mutacionais que acarretam no descontrole da proliferação celular e conseqüentemente no desenvolvimento do câncer. A primeira rota refere-se à hiperatividade de um gene estimulador e a segunda envolve a inatividade de um gene inibidor. Durante o processo de divisão celular, os genes envolvidos na codificação de proteínas que estimulam a proliferação celular são chamados de proto-oncogenes e aqueles que codificam proteínas inibidoras da proliferação celular são denominados genes supressores de tumor ou anti-oncogenes<sup>98</sup>. Por sua vez, os micro-RNAs, ao contrário de outros genes envolvidos na carcinogênese, não codificam proteínas e sim bloqueiam a tradução da proteína ou provocam a degradação do RNA mensageiro. Os produtos destes genes podem atuar como oncogenes ou como agentes de supressão tumoral<sup>99,100</sup>.

As alterações envolvendo os oncogenes, genes supressores de tumor e microRNAs no desenvolvimento do câncer são eventos somáticos, embora as mutações germinativas possam predispor ao câncer hereditário ou familiar. Uma única alteração genética raramente é suficiente para o desenvolvimento de um tumor maligno, pois a maioria das evidências aponta para um

processo de etapas de alterações sequenciais destas proteínas reguladoras em células cancerosas, que inclui a iniciação, a promoção, a progressão até a manifestação do tumor<sup>98</sup>.

Uma vez formados, os tumores possuem clones citogeneticamente diferentes, que surgem a partir da célula transformada decorrentes de alterações genéticas secundárias ou terciárias. Esta heterogeneidade contribui para diferenças no comportamento clínico e das respostas ao tratamento de tumores do mesmo tipo diagnóstico<sup>100</sup>. Por esta razão, os passos iniciais no desenvolvimento do câncer são de considerável importância clínica e uma prioridade no desenvolvimento do tratamento racional.

Os avanços na biologia molecular permitiram a identificação de oncogenes no sangue periférico, gerando alvos para drogas anticâncer<sup>101</sup>. A descoberta da participação de micro-RNAs na iniciação e progressão do câncer humano também tem proporcionado um alvo adicional aos tratamentos antineoplásicos<sup>100</sup>, já que podem ser quantificados tanto no sangue periférico (através dos leucócitos) quanto em tecidos, de forma que a vantagem da terapia-alvo é a sua ação direta sobre os produtos dos oncogenes, tornando a célula cancerosa mais sensível ao tratamento.

### 2.5.2 Ciências Ômicas

Diante das evidências científicas a cerca da biologia molecular envolvida na relação entre câncer, mutações celulares somáticas e expressão gênica anormal, resultaram em melhor compreensão do comportamento celular, seja normal ou maligno<sup>102</sup>. Este fato levou a uma maior exploração da análise da expressão genética na pesquisa médica, sobretudo na área da carcinogênese, aumentando as possibilidades de estudos dos sistemas biológicos de forma completa, nos quais todos ou a maioria dos elementos de um sistema poderiam ser avaliados quantitativamente ou em termos de interações<sup>41</sup>. Neste contexto estão inseridas as ciências ômicas que envolvem a genômica, a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica, e cujas definições estão resumidas na Figura 6.

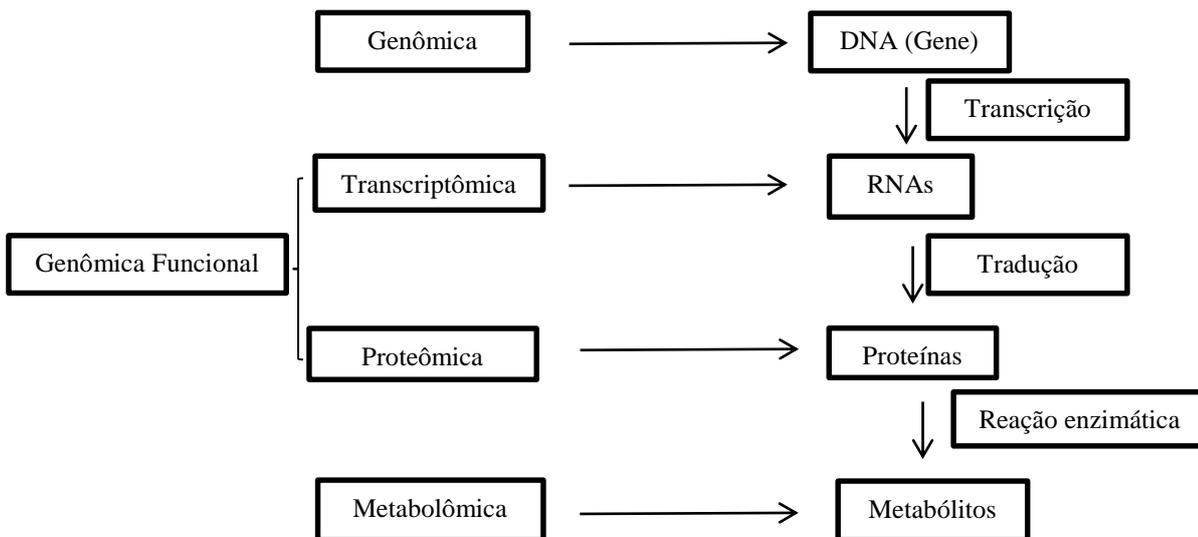


Figura 6 Componentes das ciências ômicas e suas respectivas áreas de atuação.

A genômica caracteriza-se pelo estudo dos genes e suas funções, ou seja, a análise do genoma, o qual fornece acesso às sequências regulatórias, favorecendo a descoberta de polimorfismos responsáveis por diferenças na fisiologia e predisposição às doenças<sup>41</sup>. Enquanto que o transcriptoma é o produto inicial da expressão gênica de um organismo e se caracteriza por uma coleção de moléculas de RNA mensageiro (mRNA), cuja informação biológica é requerida pela célula em determinado momento. Nesse tipo de abordagem, são analisadas as moléculas de mRNA produzidas em uma célula ou tecido a partir do seu genoma, podendo-se obter informações precisas sobre a regulação da transcrição<sup>41</sup>.

As moléculas de mRNA são sintetizadas a partir de genes que codificam proteínas e direcionam a síntese do produto final da expressão gênica, o proteoma, que especifica a natureza das reações bioquímicas que a célula está apta a realizar. Assim, a proteômica pode ser definida como a ciência e a tecnologia associada ao mapeamento, visualizando e/ou quantificando a expressão de todas ou da maioria das proteínas em sistemas vivos<sup>103</sup> e fornece informações importantes para complementar os estudos de transcriptômica e metabolômica.

Atualmente, a proteômica tem sido aplicada em diversas áreas médicas com quatro objetivos principais: entender melhor a biologia e a fisiologia normais de células, tecidos e órgãos; explorar os mecanismos patogênicos e melhor compreender a fisiopatologia das doenças; identificar novos biomarcadores para a detecção precoce da doença, previsão e prognóstico e, finalmente, definir novos alvos terapêuticos, medicamentos e vacinas<sup>104</sup>. Esta ciência depende da extração, separação, visualização, identificação e quantificação das proteínas presentes em um

organismo ou tecido num determinado momento. Todos esses estágios têm limitações, sendo complexo descrever o proteoma completo de um organismo.

Na clínica médica, os estudos proteômicos foram realizados na caracterização do câncer, doenças infecciosas, cardíacas<sup>41</sup> e neurológicas, como Alzheimer<sup>105</sup>. Outros estudos mostram a caracterização de agentes infecciosos, como *Mycobacterium tuberculosis*<sup>106</sup>, comparando o proteoma de cepas patogênicas e não patogênicas de microorganismos, podendo auxiliar no desenvolvimento de métodos diagnósticos e agentes terapêuticos. Entretanto, é no campo das neoplasias que esta tecnologia vem se mostrando útil, ao identificar possíveis biomarcadores diagnósticos e prognósticos, e promissora no campo da obesidade a partir de estudos sobre as proteínas envolvidas no metabolismo do tecido adiposo<sup>45</sup>. Assim, o estudo da análise proteômica vem a complementar os dados da transcriptômica e dos sequenciamentos de genoma, auxiliando na compreensão das redes de funcionamento celular e, desta forma, representando a ponte de ligação entre o genótipo e o fenótipo de um organismo.

#### *Aplicações clínicas da proteômica na obesidade*

A obesidade mórbida envolve um problema que é complexo sob os pontos de vista médico, psicológico e sócioeconômico, exigindo a busca de conhecimento sobre suas causas. A cirurgia bariátrica tem se mostrado sensível e bem sucedida na redução de peso, melhorando as comorbidades. A padronização de procedimentos cirúrgicos para esta doença tornou-se um dos principais temas científicos em todo o mundo, com o dilema de escolher a técnica adequada a cada paciente individualmente. Estes esforços são baseados na crescente evidência sobre a fisiopatologia da fome e saciedade, bem como os regulamentos endócrinos influenciados por fatores ambientais, alimentares e estilo de vida sedentário. Usando meios sofisticados, os pesquisadores tentam decifrar todos os aspectos moleculares da obesidade mórbida, utilizando técnicas inovadoras, tais como a proteômica<sup>44</sup>.

Resultados promissores iniciais na descoberta de biomarcadores de câncer e transplante obtidos com tecnologias proteômicas já foram publicados<sup>107,108</sup>. Além disso, esses dados levam ao aumento do entusiasmo científico e da possibilidade de obter novos *insights* sobre os mecanismos de regulação da fisiopatologia da obesidade. Recentemente, a proteômica foi aplicada para elucidar uma variedade de vias de detecção e discriminação de enzimas lipolíticas em pacientes obesos<sup>44</sup> e perfil intra-abdominal e subcutâneo de adipoquinas<sup>45</sup>. No entanto, dados sobre investigação proteômica em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica ainda são limitados<sup>46-50</sup>. Por isso, a grande demanda por técnicas sofisticadas justificaria a aplicação da

proteômica para melhor definir as consequências metabólicas e, talvez relacionadas à carcinogênese, antes e após a cirurgia bariátrica.

#### *Aplicações clínicas da proteômica no câncer*

A função anormal das proteínas compromete o funcionamento celular acarretando no desenvolvimento de doenças. Portanto, estudos ao nível de expressão proteica, em paralelo ao DNA e mRNA, são os maiores contribuidores na biologia do câncer. Recentemente, o termo oncoproteômica tem sido usado para descrever abordagens na pesquisa do câncer que permite a investigação da expressão de proteínas que poderiam ser marcadores sensíveis de doenças malignas<sup>42</sup>.

Dessa forma, definem-se, então, os biomarcadores como moléculas que são objetivamente mensuradas e avaliadas como indicadores de processos biológicos normais, patológicos ou respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas<sup>43</sup>. Na prática clínica, um biomarcador pode ser capaz de avaliar o progresso da doença ou os efeitos de intervenções terapêuticas. Os dois principais objetivos das pesquisas a cerca de biomarcadores são identificar assinaturas moleculares únicas, que poderiam distinguir células tumorais e desenvolver testes sensíveis a fim de permitir o rastreamento, diagnóstico acurado de doenças, a predição do seu curso, monitorizar sua progressão e acessar a eficácia do tratamento<sup>43</sup>. A detecção dessas moléculas deve ser minimamente invasiva e prontamente acessível através da coleta de sangue, urina ou saliva<sup>41</sup>, sensível, específica, simples e de baixo custo. Na condução do câncer, os biomarcadores são divididos em biomarcadores de triagem (usados para avaliar o risco de desenvolvimento de câncer em indivíduos saudáveis ou identificar indivíduos com doença subclínica), diagnósticos, prognósticos (predição do progresso da doença), preditivos (predição da resposta ao tratamento) e farmacodinâmicos/farmacocinéticos (avalia a terapia mais eficaz e/ou dosagem de drogas)<sup>43</sup>. Proteínas biomarcadoras são confiáveis para um estado da doença e resultado clínico, pois elas refletem o fenótipo patogênico<sup>43</sup>.

Diferentes biomarcadores proteicos tem sido relacionados ao câncer conforme ilustrado na tabela 1, onde são descritas as proteínas identificadas em neoplasias ginecológicas e do aparelho digestivo.

Tabela 1. Biomarcadores proteicos relacionados às neoplasias de pâncreas, cólon, mama e endométrio, identificados por suas características isoelétricas: peso molecular (MW), em Da, e ponto isoelétrico teórico (pI theo)<sup>110-127</sup>.

NEOPLASIA	BIOMARCADOR	MW (Da)	pI (theo)	REFERÊNCIA
<b>PÂNCREAS</b>	Apolipoproteína C-II	11248	4,72	Felix K et al, 2011 <sup>110</sup>
	Apolipoproteína C-III	10852.0	5,23	Felix K et al, 2011 <sup>110</sup>
	Zinc- $\alpha$ 2-glicoproteína (ZAG)	34259	5,71	Felix K et al, 2011 <sup>110</sup>
	GLP-1 ( <i>glucagon-like peptide-1</i> )	29628	9.34	Felix K et al, 2011 <sup>110</sup>
	Apolipoproteína E	36153.8	5.42	Yu KH et al, 2005 <sup>111</sup>
	Apolipoproteína A-IV precursor	45353.4	5.33	Yu KH et al, 2005 <sup>111</sup>
<b>CÓLON</b>	S100A8	10834.4	7.07	Jimenez CR et al, 2010 <sup>112</sup>
	S100A9	13242.0	6.08	Jimenez CR et al, 2010 <sup>112</sup>
	<i>Heat Shock Protein 60</i> (HSP60)	61,055	5.7	Hamelin C et al, 2011 <sup>113</sup>
	Apolipoproteína A-1 (ApoA-1)	30777.6	5.5	Helgason HH et al, 2010 <sup>114</sup>
	Catepsina B	37,822	5.88	Hung KE et al, 2009 <sup>115</sup>
	Catepsina D	44,552	6.1	Hung KE et al, 2009 <sup>115</sup>
	Transferrina	77,064	6.81	Ward DG et al, 2006 <sup>116</sup>
	<i>Fatty Acid Synthase</i> (FASN)	273,427	6.01	Menendez JA et al, 2007 <sup>117</sup>
<b>MAMA</b>	Trombospondina -1	129,383	4.71	Zeng Z et al, 2011 <sup>118</sup>
	Trombospondina-5	82,860	4.36	Zeng Z et al, 2011 <sup>118</sup>
	$\alpha$ -1B-glicoproteína	54,254	5.56	Zeng Z et al, 2011 <sup>118</sup>
	Amilóide sérica A	14086,71	9,27	Zhang G et al, 2012 <sup>119</sup>
	Apolipoproteína C1	9,332	8.01	Gonçalves A et al, 2006 <sup>120</sup>
	Catepsina D	45037	6,10	Valle A et al, 2011 <sup>121</sup>
	Transferrina	77,064	6.81	Huang LJ et al, 2006 <sup>122</sup>
<b>ENDOMÉTRIO</b>	HE4	12,993	4.69	Bignotti E et al, 2011 <sup>123</sup>
	Amilóide A sérica	14086,71	9,27	Cocco E et al, 2010 <sup>124</sup>
	Caliceína 10	30,17	8.95	Santini AD et al, 2006 <sup>125</sup>
	Apolipoproteína A-1	30777.6	5.5	Farias-Eisner G et al, 2010 <sup>126</sup>
	Transferrina	77,064	6.81	Farias-Eisner G et al, 2010 <sup>126</sup>
	Transtirretina	15,887	5.52	Farias-Eisner G et al, 2010 <sup>126</sup>
	Apolipoproteína A-1	30777.6	5.5	Takano M et al, 2010 <sup>127</sup>
	Apolipoproteína C1	9,332	8.01	Takano M et al, 2010 <sup>127</sup>

A análise de biomarcadores proteicos mais comumente usados nos diagnósticos clínicos é baseada na detecção de níveis séricos superexpressos de proteínas ou presença/ausência delas em tecidos pela técnica de imunoenensaio, porém ela é dependente de anticorpos específicos e a detecção de proteínas de baixa abundância em fluidos biológicos afeta a sensibilidade dos testes<sup>128</sup>. Os avanços das técnicas proteômicas combinados à nanotecnologia tem sido útil na identificação e caracterização do efeito de genes mutados na estabilidade e função das proteínas. Estas técnicas são capazes de detectar múltiplas proteínas, aumentando a sensibilidade e especificidade<sup>109</sup>.

O plasma e soro estão entre os materiais biológicos mais acessíveis para detecção de biomarcadores podendo ter grande relevância clínica, pois os tumores crescem rapidamente e excretam proteínas na corrente sanguínea<sup>129</sup>. O proteoma do soro/plasma é complexo e sofre mudanças dinâmicas na concentração, estrutura e função como resultado de fatores fisiológicos, patológicos e farmacológicos. Proteínas são também encontradas em múltiplas formas, devido às mutações somáticas tumor-específicas<sup>129</sup>. Condições patológicas como o câncer aumentam o número de produtos proteicos, mas é esperado que as proteínas liberadas pelo tumor sejam encontradas no sangue em baixas concentrações.<sup>130</sup> Dessa forma, se apenas uma pequena quantidade de proteínas específicas circula no plasma, ela não pode ser prontamente detectada e, neste caso, amostras teciduais poderiam ser mais adequadas em termos de concentração de proteínas. Entretanto, acessar tecidos para objetivos de rastreamento não é prático e existe também a ausência de homogeneidade celular através de amostras teciduais. Assim, novos avanços em espectrometria de massa tem reduzido o limiar para detecção de proteínas a níveis de femtogramas<sup>109</sup> e, recentemente, o uso combinado de LCM (cromatografia líquida) com tecnologia proteômica durante a preparação da amostra tem aumentado a oportunidade de traçar o perfil de expressão das proteínas no plasma, podendo resolver este problema<sup>41</sup>.

Outro grande desafio na detecção de biomarcadores neoplásicos é a heterogeneidade do tumor relacionada à variabilidade individual e biológica entre as amostras, refletindo mudanças no estado metabólico, diferenças entre casos em termos de sexo, idade, gênero, etnicidade, dieta, exercício e condições fisiológicas (inflamação, estresse, jejum, perda ou ganho de peso e status hormonal), que contribuem para baixa especificidade e pobre sensibilidade dos marcadores usados atualmente. Isto poderia ser resolvido por estudos sistemáticos e comparações de proteomas sanguíneos entre indivíduos saudáveis e com câncer e pelo estabelecimento de

tecnologias proteômicas de alto teor detectando, simultaneamente, diferentes variantes de proteínas aberrantes<sup>43</sup>.

Além do uso da proteômica na identificação de biomarcadores de neoplasias, esta tecnologia poderia ser benéfica em identificar a probabilidade da resistência de um tumor antes de iniciar algum tratamento, visando, assim, outros agentes ou um regime mais agressivo. Dados preliminares mostram que a genômica pode discriminar respostas a drogas e documentar células tumorais resistentes tanto em modelo animal como humano<sup>131</sup>.

## **2.6 Perspectivas da análise proteômica na pesquisa de biomarcadores neoplásicos em pacientes obesos**

Embora os procedimentos bariátricos padronizados sejam realizados por décadas, não se sabe qual técnica deve ser considerada de escolha para cada paciente, já que os tratamentos cirúrgicos disponíveis fornecem diferentes resultados metabólicos, dificultando a comparação. A perda do excesso de peso é, geralmente, aceita como o principal parâmetro para determinar as taxas de sucesso após a cirurgia bariátrica. No entanto, o efeito da cirurgia sobre a curva ponderal não é sempre acompanhado por diminuição comparável no risco de morbidades como o câncer<sup>37,38</sup>. Por esta razão, há uma necessidade de que novas ferramentas proporcionem uma maior compreensão dos mecanismos subjacentes biofuncionais e fortaleçam os resultados biométricos dos atuais estudos de cirurgia bariátrica. O estudo, em larga escala, da expressão, estrutura e função conhecida de proteínas, tem o potencial notável de melhorar a compreensão e a prática da regulação do peso através da cirurgia bariátrica, além da influência dessa perda ponderal sobre as morbidades relacionadas à obesidade. Uma das áreas onde a proteômica pode ter o seu maior potencial está na descoberta de novos marcadores diagnósticos e prognósticos de doenças, como o câncer, e compreender a resposta a uma intervenção cirúrgica. Por este motivo, o momento é propício para este instrumento inaugurar uma nova era na cirurgia bariátrica e metabólica.

## 2.7 Cirurgia da obesidade e câncer: resultados

A obesidade é uma condição médica prevenível e dados estatísticos mostram que a perda de peso previne o desenvolvimento de câncer e outras doenças associadas<sup>132</sup>.

Terapêuticas foram propostas para a obesidade grave, porém se revelaram ineficazes com o manuseio clínico para emagrecimento e a manutenção da perda de peso<sup>32</sup>. A cirurgia é considerada, atualmente, a medida mais efetiva no controle desta doença e suas morbidades, proporcionando importante diminuição de mortalidade, a longo prazo, conforme demonstrado por uma metanálise sobre cirurgias bariátricas, que encontrou uma mortalidade de 0,35%<sup>33</sup>. Assim, a resolução do Conselho Federal de Medicina, de número 1.942/2010, e Ministério da Saúde segue os parâmetros estabelecidos internacionalmente desde 1991 pelo *National Institutes of Health*<sup>133</sup> e indica a cirurgia bariátrica para obesos quando o IMC for acima de 35 Kg/m<sup>2</sup> com comorbidades ou acima de 40 Kg/m<sup>2</sup>, independente de comorbidades<sup>34</sup>, embora Pories *et al.* em 2010 sugeriram a reavaliação das diretrizes atuais para cirurgia bariátrica<sup>35</sup>, pois a restrição a esse nível de IMC como principal requisito para indicação parece não refletir o grau ou distribuição de obesidade, discriminando injustamente a composição da gordura corporal e metabólica.

Estudos já relataram efeitos positivos da cirurgia de obesidade no risco de doenças como o câncer, além de reduzir distúrbios metabólicos e DM tipo 2,<sup>32,36</sup> apesar de já ter sido evidenciado que o efeito da cirurgia sobre a curva ponderal não é sempre acompanhado por diminuição comparável no risco de neoplasias<sup>37,38</sup>. O estudo SOS demonstra que o tratamento cirúrgico está associado à perda de peso sustentada e diminui a mortalidade por melhora das comorbidades, inclusive o câncer, especialmente nas mulheres operadas<sup>32</sup>. Christou e col. demonstraram que o tratamento cirúrgico da obesidade reduziu em 76% o risco de desenvolvimento de câncer. Analisando dois grupos de pacientes, este estudo demonstrou que no grupo controle de 5746 pacientes portadores de obesidade mórbida acompanhados clinicamente por um período de cinco anos, a incidência de neoplasias foi de 8,49%. No grupo de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico (n=1035), a incidência foi de 2,03%<sup>134</sup>. Outros estudos evidenciaram a importância do tratamento cirúrgico na redução da incidência de câncer<sup>135-138</sup>.

Atualmente, a cirurgia bariátrica mais utilizada no Brasil e no mundo é a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR). Porém, a gastrectomia vertical, ou *sleeve gastrectomy*, vem

apresentando resultados satisfatórios quanto à curva ponderal e melhora de comorbidades, inclusive efeitos comprovados sobre a SM<sup>39,40</sup>.

Independente do impacto individual das vias metabólicas envolvidas na fisiopatologia e progressão do câncer, é evidente que esta doença caminha lado a lado com a obesidade e um profundo entendimento dos mecanismos envolvidos nesta associação é fundamental. Considerando que o tecido adiposo promove progressão do câncer, podemos melhorar o resultado desta doença não apenas pelo tratamento a ela direcionado, mas da obesidade em si ao identificar e compreender o comportamento dos marcadores biomoleculares no processo da carcinogênese a ela associada.

# *Metodologia*

### 3.1 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC, UFPE). A equipe do Programa de Cirurgia Bariátrica realiza cirurgias da obesidade desde 1997, composta por equipe multidisciplinar, que inclui cirurgiões, endocrinologistas, enfermeiras, psicólogos, nutricionistas e assistentes sociais, além de outros especialistas como cardiologistas, pneumologistas, endoscopistas e radiologistas, todos responsáveis pelo acompanhamento pré e pós-operatório dos pacientes.

A análise proteômica foi realizada em colaboração com o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), da UFPE.

### 3.2 População do estudo

A população do estudo foi composta por dois grupos. O controle, formado por voluntários eutróficos que trabalhavam no Hospital das Clínicas da UFPE, e o grupo de pacientes portadores de obesidade com indicação de cirurgia bariátrica (Derivação gástrica em Y de Roux, DGYR, e gastrectomia vertical). Assim, a amostra foi representada por quarenta indivíduos de ambos sexos, faixa etária entre 18 e 65 anos, atendidos no ambulatório de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas no período de janeiro de 2011 a junho de 2013.

Os critérios utilizados para a indicação de cirurgia bariátrica foram baseados nas determinações do “*National Institutes of Health Consensus Development Panel on Gastrointestinal Surgery for Severe Obesity*”, que incluem IMC maior que 40 Kg/m<sup>2</sup> ou maior que 35 Kg/m<sup>2</sup> com comorbidades. Foram excluídos pacientes gestantes, portadores de obesidade decorrente de distúrbios psiquiátricos e endocrinológicos, dependentes químicos, portadores de comorbidades relacionadas a um elevado risco cirúrgico, antecedentes de etilismo, tabagismo, doença auto-imune, tratamento oncológico e história pessoal ou familiar de neoplasias.

### 3.3 Desenho do estudo

O desenho do estudo enquadrou-se na tipologia de estudos de coorte, em que foi conduzido um desenho de comparação de parâmetros antes e depois de uma intervenção (estudo de antes e depois). Foram selecionados quarenta pacientes e distribuídos em dois grupos:

Grupo controle: composto por dez pacientes eutróficos ( $IMC \leq 25 \text{ Kg/m}^2$ ), ambos sexos e faixa etária de 18 a 65 anos, não submetidos ao tratamento cirúrgico;

Grupo de obesos: composto por trinta pacientes portadores de obesidade com indicação de cirurgia bariátrica, ambos sexos, faixa etária de 18 a 65 anos, que foi subdividido em dois grupos, de acordo com a técnica cirúrgica, a fim de avaliar se haveria diferença significativa quanto à perda de peso entre as técnicas, o que poderia interferir nos resultados da análise proteômica:

- i) Grupo GV, o qual foi composto por dezenove pacientes submetidos à gastrectomia vertical, avaliados antes do procedimento e ao longo de seis meses após a cirurgia, através de parâmetros clínicos e laboratoriais registrados em prontuário médico e banco de dados;
- ii) Grupo DGYR, que foi constituído por onze pacientes submetidos à derivação gástrica em Y de Roux (DGYR), avaliados antes do procedimento e ao longo de seis meses após a cirurgia, através de parâmetros clínicos e laboratoriais registrados em prontuário médico e banco de dados.

Ainda, para avaliar a influência do grau de obesidade e da insulina sobre a expressão das proteínas, foi necessário estratificar o grupo de obesos em subgrupos, de acordo com valor de IMC e da concentração sérica de insulina, como se segue:

- **PBIB**= pacientes com  $IMC \leq 40 \text{ Kg/m}^2$  e insulina sérica  $\leq 21 \text{ mU/L}$ , pré e pós-operatório;
- **PAIA**= pacientes com  $IMC > 40 \text{ kg/m}^2$  e insulina sérica  $> 21 \text{ mU/L}$ , pré e pós-operatório;
- **PBIA**= pacientes com  $IMC \leq 40 \text{ Kg/m}^2$  e insulina sérica  $> 21 \text{ mU/L}$ , pré e pós-operatório;
- **PAIB**= pacientes com  $IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$  e insulina sérica  $\leq 21 \text{ mU/L}$ , pré e pós-operatório

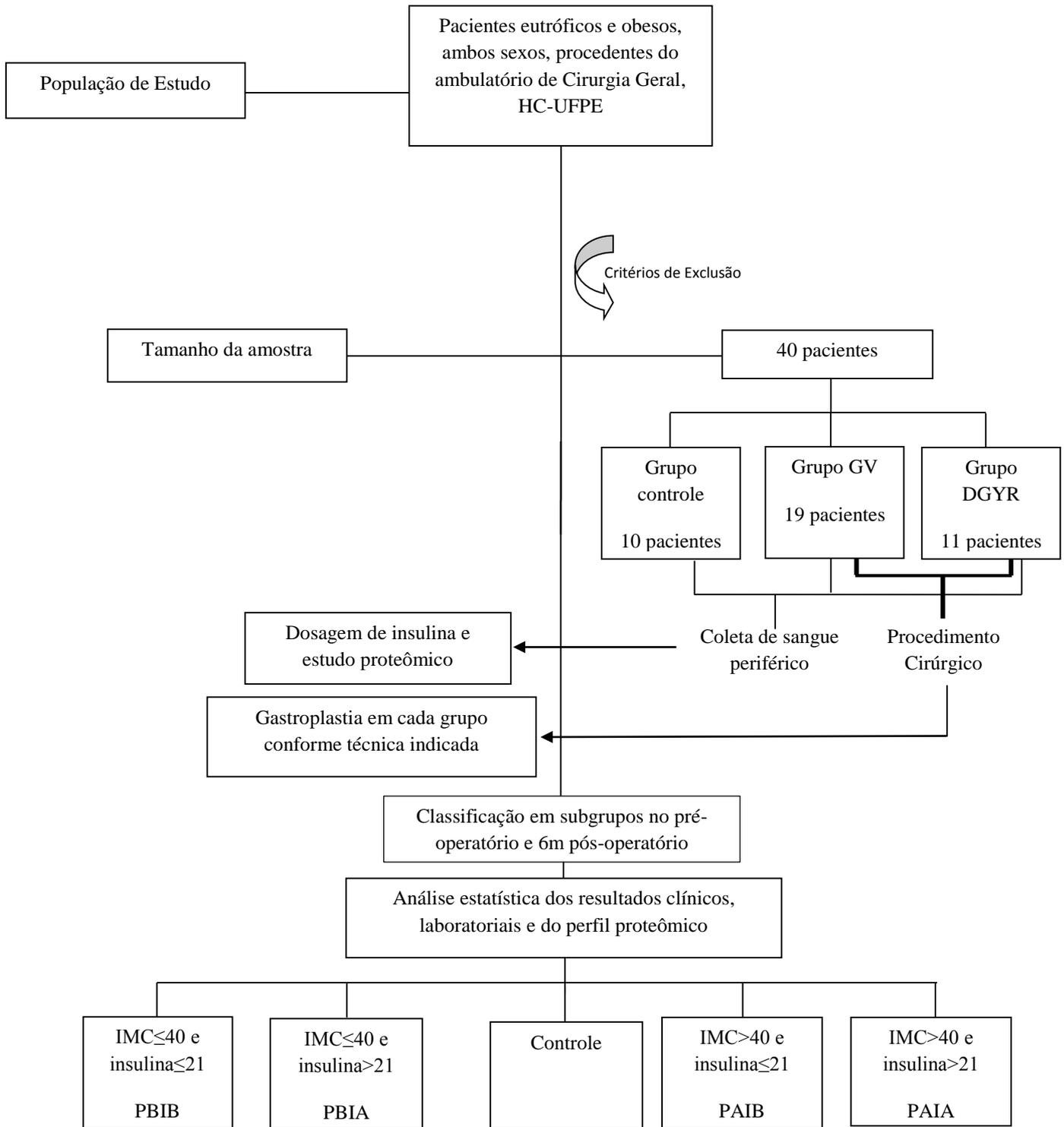


Figura 7. Fluxograma do estudo

### 3.4 Elenco de variáveis

Serão analisadas as seguintes variáveis:

Nome da variável	Definição/Categorização																												
<b>Técnica Cirúrgica</b>	Cirurgia bariátrica, caracterizada, de acordo com a técnica, como Derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) ou gastrectomia vertical																												
<b>Antropométricas</b>																													
<b>Peso</b>	O peso é quantificado em kilogramas (Kg)																												
<b>Altura</b>	A altura é medida em metros (m)																												
<b>IMC</b>	O índice de massa corporal é utilizado para classificação da obesidade, sendo calculado pela razão entre o peso medido em quilogramas sobre a altura, medida em metros, ao quadrado ( $Kg/m^2$ )																												
<b>Percentual de perda de peso</b>	A perda de peso foi estimada utilizando-se o percentual de perda de peso, calculado pela fórmula: Perda de peso percentual= $[(PI-PA)/PI] \times 100$ , onde: PI= Peso Inicial em Kg PA= Peso Atual em Kg																												
<b>Laboratoriais</b>																													
<b>Insulina</b>	Concentração sérica quantificada em mU/L																												
<b>Perfil de proteínas</b>	Potenciais biomarcadores a serem identificados, caracterizados como hiperexpressos ou ausentes:  <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">Apolipoproteína C-II</td> <td style="width: 50%;">Catepsina D</td> </tr> <tr> <td>Apolipoproteína C-III</td> <td>Transferrina</td> </tr> <tr> <td>Zinc-<math>\alpha</math>2-glicoproteína (ZAG)</td> <td><i>Fatty Acid Synthase</i> (FASN)</td> </tr> <tr> <td>GLP-1 (glucagon-like peptide-1)</td> <td>Trombospondina -1</td> </tr> <tr> <td>Apolipoproteína E</td> <td>Trombospondina-5</td> </tr> <tr> <td>Apolipoproteína A-IV precursor</td> <td><math>\alpha</math>-1B-glicoproteína</td> </tr> <tr> <td>S100A8</td> <td>Amilóide sérica A (SAA)</td> </tr> <tr> <td>S100A9</td> <td>Apolipoproteína C1</td> </tr> <tr> <td><i>Heat Shock Protein</i> 60 (HSP60)</td> <td>HE4 (WFDC2)</td> </tr> <tr> <td>Apolipoproteína A-1 (ApoA-1)</td> <td>Amilóide A sérica (SAA)</td> </tr> <tr> <td>Catepsina B</td> <td>Calicreína 10 (KLK10)</td> </tr> <tr> <td>Transtirretina (TTR)</td> <td>Calicreína 11 (KLL11)</td> </tr> <tr> <td>Podoplanina</td> <td>Proteína de ligação do ácido graxo hepática</td> </tr> <tr> <td>Apolipoproteína B</td> <td>PGRF<math>\beta</math></td> </tr> </table>	Apolipoproteína C-II	Catepsina D	Apolipoproteína C-III	Transferrina	Zinc- $\alpha$ 2-glicoproteína (ZAG)	<i>Fatty Acid Synthase</i> (FASN)	GLP-1 (glucagon-like peptide-1)	Trombospondina -1	Apolipoproteína E	Trombospondina-5	Apolipoproteína A-IV precursor	$\alpha$ -1B-glicoproteína	S100A8	Amilóide sérica A (SAA)	S100A9	Apolipoproteína C1	<i>Heat Shock Protein</i> 60 (HSP60)	HE4 (WFDC2)	Apolipoproteína A-1 (ApoA-1)	Amilóide A sérica (SAA)	Catepsina B	Calicreína 10 (KLK10)	Transtirretina (TTR)	Calicreína 11 (KLL11)	Podoplanina	Proteína de ligação do ácido graxo hepática	Apolipoproteína B	PGRF $\beta$
Apolipoproteína C-II	Catepsina D																												
Apolipoproteína C-III	Transferrina																												
Zinc- $\alpha$ 2-glicoproteína (ZAG)	<i>Fatty Acid Synthase</i> (FASN)																												
GLP-1 (glucagon-like peptide-1)	Trombospondina -1																												
Apolipoproteína E	Trombospondina-5																												
Apolipoproteína A-IV precursor	$\alpha$ -1B-glicoproteína																												
S100A8	Amilóide sérica A (SAA)																												
S100A9	Apolipoproteína C1																												
<i>Heat Shock Protein</i> 60 (HSP60)	HE4 (WFDC2)																												
Apolipoproteína A-1 (ApoA-1)	Amilóide A sérica (SAA)																												
Catepsina B	Calicreína 10 (KLK10)																												
Transtirretina (TTR)	Calicreína 11 (KLL11)																												
Podoplanina	Proteína de ligação do ácido graxo hepática																												
Apolipoproteína B	PGRF $\beta$																												
Nome da variável	Definição/Categorização																												
<b>Sexo</b>	Expresso em gênero, feminino ou masculino																												
<b>Idade</b>	Expresso em anos completos																												

### 3.5 Procedimentos

#### 3.5.1 Coleta de dados

Inicialmente, foi elaborada uma ficha para preenchimento dos dados pesquisados (vide APÊNDICE). Os pacientes com indicação de tratamento cirúrgico foram avaliados no ambulatório e procederam a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido após preencher os critérios para a realização da pesquisa. Seus exames pré-operatórios também foram analisados e incluiu, além de exames hematológicos e bioquímicos, a realização de ultrassonografia de abdome total, endoscopia digestiva alta e avaliação de equipe multidisciplinar (endocrinologia, cardiologia, pneumologia, ortopedia, psicologia, nutrição, enfermagem).

No grupo controle, a coleta de dados de avaliação clínica, antropométrica e dos exames bioquímicos, bem como a coleta de sangue para o estudo em questão foi realizada pelo pesquisador em ambiente hospitalar e caráter ambulatorial, na presença de acompanhante escolhido pelo paciente. No grupo de pacientes obesos no pré-operatório, a coleta de dados de avaliação clínica, antropométrica e dos exames bioquímicos, bem como a coleta de sangue para o estudo em questão foi realizada pelo pesquisador no dia da cirurgia, em ambiente hospitalar, na presença de acompanhante escolhido pelo paciente. No pós-operatório, foram utilizados, especificamente, os dados da reavaliação clínica, (antropométrica e bioquímica) coletados no sexto mês de retorno ao primeiro dia de avaliação médica por considerar esse período como o de maior perda de excesso de peso, de estabilização da ingestão alimentar com dieta sólida, além de constituir tempo hábil de acompanhamento para realização deste estudo.

#### 3.5.2 Procedimentos antropométricos

O peso foi aferido em balança plataforma, com capacidade máxima para 300 Kg e subdivisão em 100 g. Para esta mensuração, o paciente foi posicionado de pé, devendo estar descalço e com o mínimo de roupa possível, permanecendo ereto e de costas para a escala de medidas da balança, com os pés juntos no centro da plataforma, braços ao longo do corpo para evitar possíveis alterações de leitura das medidas. Este procedimento foi realizado imediatamente antes e seis meses após a cirurgia.

A estatura foi determinada utilizando antropômetro vertical milimetrado com escala de 0,5 cm, acoplado à balança. O paciente foi colocado na posição ortostática, cabeça orientada no plano de Frankfurt, descalço, mantendo os calcanhares, cinturas pélvica e escapular e região occipital em contato com o aparelho. A medida foi realizada com o cursor com ângulo de noventa graus em relação à escala, estando o indivíduo em inspiração profunda.

O cálculo de IMC, ou índice de Quetelet, foi realizado por meio da fórmula que relaciona o peso, em Kg, com a altura ao quadrado ( $m^2$ ), sendo adotados como ponte de corte para avaliar o estado nutricional aqueles preconizados pela OMS (Quadro 1).

A avaliação da perda de peso foi estimada utilizando o percentual de perda de peso, calculado pela fórmula  $[(PI-PA)/PI] \times 100$ , onde PI= peso inicial (antes da cirurgia), PA=peso atual, no sexto mês de pós operatório.

### 3.5.3 Procedimentos laboratoriais

No grupo de pacientes obesos, tanto no pré como no pós- operatório, foi realizada a coleta de sangue periférico (08 mL), através de punção venosa, no dia da cirurgia, com o paciente em jejum de oito horas, para avaliação e quantificação plasmática da insulina e para o estudo proteômico. O volume de 04 mL foi acondicionado em tubo seco e encaminhado imediatamente ao laboratório de análises clínicas do Hospital das Clínicas (HC-UFPE), para dosagem da insulina.

Para o estudo proteômico, 04 mL de sangue foi coletado em tubo contendo EDTA (0.5%) como anticoagulante. O plasma foi separado por centrifugação (8000g, 30 min), adicionado 10  $\mu$ L/mL de inibidor de protease (GE Healthcare Corp., USA) e armazenado a -80 °C para posterior análise proteômica.

### 3.5.4 Procedimentos cirúrgicos

Os pacientes foram submetidos à Derivação Gástrica em Y de Roux (DGYR) por laparotomia e gastrectomia vertical por vídeolaparoscopia, conforme descrito por Madura et al<sup>139</sup> e Roa et al<sup>140</sup>, respectivamente. Para o estudo em questão, as cirurgias foram realizadas pela mesma equipe médica.

### 3.5.5 Estudo Proteômico

Para fins analíticos as amostras foram agrupadas em grupos constituídos de: pacientes controle, pacientes obesos pré-operatório e estes mesmos pacientes após seis meses da intervenção cirúrgica (obesos pós-operatório). Em seguida foram formados *Pools* contendo 30 $\mu$ L de plasma de cada paciente. Para avaliar a influência do IMC, da concentração sérica de insulina e do percentual de perda de peso, novos *Pools* foram estabelecidos. Abaixo segue detalhamento de cada grupo:

- De acordo com a intervenção cirúrgica:
  - **Controle:** grupo dos pacientes controles dessa pesquisa, não operados, já descrito no desenho do estudo;
  - **Obesos pré-operatório:** grupo de obesos, composto pelos trinta pacientes da pesquisa;
  - **Obesos pós-operatório:** mesmo grupo de obesos seis meses após a cirurgia.
- De acordo com o IMC e dosagem de insulina:
  - **PBIB=** pacientes com  $IMC \leq 40 \text{ Kg/m}^2$  e insulina sérica  $\leq 21 \text{ mU/L}$ , pré e pós-operatório;
  - **PAIA=** pacientes com  $IMC > 40 \text{ kg/m}^2$  e insulina sérica  $> 21 \text{ mU/L}$ , pré e pós-operatório;
  - **PBIA=** pacientes com  $IMC \leq 40 \text{ Kg/m}^2$  e insulina sérica  $> 21 \text{ mU/L}$ , pré e pós-operatório;
  - **PAIB=** pacientes com  $IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$  e insulina sérica  $\leq 21 \text{ mU/L}$ , pré e pós-operatório
- De acordo com a perda de peso:
  - **PPA=** perda de peso até 21,58%;
  - **PPB=** perda de peso de 21,58% a 24,42%;
  - **PPC=** perda de peso de 24,42 a 30,32%;
  - **PPD=** perda de peso  $>30,32\%$ .

Após a formação dos *Pools*, a Albumina e Imunoglobulina plasmáticas foram depletadas, utilizando o kit comercial ProteoPrep Immuno (Sigma Aldrich®) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida as proteínas totais foram precipitadas utilizando o kit comercial 2-D Clean-Up (GE Healthcare Corp., USA) e quantificadas pelo 2D-quant KIT (GE Healthcare

Corp., USA) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, uma quantidade correspondente a 300 µg de proteína em 250 µl de solução de hidratação (7M uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS, 100 mM de ditioneitol (DTT), 0,002% de azul de bromofenol e 2% de Pharmalite pH 3-10) foi usada para a rehidratação das fitas Immobiline DryStrips, durante 16 h na temperatura ambiente. A focalização isoelétrica das amostras embebidas nas fitas foi realizada em aparelho IPGPhor 3 IEF System da Amersham (GE Healthcare Corp., USA). Após a 1ª dimensão, as fitas foram equilibradas com tampão contendo 6M de uréia, 50 mM tampão TRIS-HCl pH 6.8, 30% de glicerol, 2% de SDS e DTT (10 mg/ml) durante 15 min e a seguir, usando o mesmo tampão e tempo de incubação, com a iodoacetamida (25 mg/ml) em substituição ao DTT. A corrida da 2ª dimensão ocorreu em gel de 12,5% de SDS-PAGE. Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Brilliant Blue em metanol-ácido acético, descorados e suas imagens digitalizadas com auxílio do Image Scanner III (GE Healthcare Corp., USA). A diferença de expressão das proteínas entre as amostras, foi detectada pelo Software ImageMaster 2D Platinum Versão 7.0 (GE Healthcare Corp., USA), o qual utilizou teste ANOVA ( $p < 0,05$ ) para respaldo estatístico. Após a identificação das proteínas que caracterizavam cada grupo, fizemos uma descrição detalhada delas a fim de selecionar os spots diferenciais. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Por fim, os spots selecionados foram analisados usando o servidor de proteômica *TagIdent tool* (<http://expasy.org/tools/tagident.html>) *Expert Protein Analysis System (ExPASy)*, o qual foi desenvolvido pelo *Swiss Institute of Bioinformatics*. Para tal, os critérios de busca adotados foram pI e Peso molecular do spot; espécie *Homo sapiens*; e banco de dados *UniProtKB/Swiss-Prot*.

### **3.6 Plano de descrição e análise**

Foi construído um banco de dados utilizando-se o programa SPSS versão 18 (*Statistical Package for the Social Sciences*) para o processamento e análise dos dados. Os dados foram abordados em três momentos. No primeiro momento, na fase descritiva, o IMC, a insulina e a perda de peso foram resumidos adequadamente em proporções e médias aritméticas, desvios-padrão, valores mínimo e máximo. A perda de peso após a cirurgia também foi descrita em quartis.

No segundo momento, na fase analítica, foram comparadas as médias das variáveis IMC, em Kg/m<sup>2</sup>, e insulina sérica, em mU/L, referentes aos grupos controle e de obesos pré-

operatório. O mesmo procedimento foi realizado com os valores obtidos depois da intervenção cirúrgica. As médias de cada variável foram comparadas entre si, pelo teste t, para amostras independentes. Foram comparadas as médias das variáveis IMC, em  $\text{Kg/m}^2$ , e insulina sérica, em mU/L, referentes aos grupos DRGY e GV, antes e depois da cirurgia pelo teste t, para amostras pareadas. A perda de peso foi comparada entre os grupos submetidos à técnica DGYR e à técnica GV. Para avaliar a associação, foi utilizado o teste t para amostras independentes. Em todas as situações, a probabilidade máxima de erro para rejeição da hipótese nula foi de 5%.

No terceiro momento, procedeu-se à análise proteômica. Para analisar as variáveis que poderiam interferir no resultado da análise proteômica, o grupo de obesos foi estratificado de acordo como descrito nos procedimentos laboratoriais. Para analisar a diferença de expressão das proteínas entre as amostras de plasma dos anteriormente detalhados, o Software Image Master 2D Platinum Versão 7.0 utilizou teste ANOVA.

### **3.7 Aspectos Éticos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), registrada e analisada de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, em 11 de junho de 2010 sob o CAAE nº 0086.0.172.000-10 (Anexo 1).

Os pacientes foram convidados a participar espontaneamente do estudo e os portadores de obesidade concordantes, estando aptos ao procedimento cirúrgico e após esclarecimentos de dúvidas e riscos, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido a fim de serem submetidos à coleta de sangue periférico para dosagem sérica da insulina e análise proteômica. Os voluntários eutróficos concordantes também assinaram o termo de consentimento para realização dos procedimentos laboratoriais.

Os dados dos pacientes constam no prontuário e os dados referentes ao estudo estão no protocolo de pesquisa em arquivo pessoal do pesquisador pelo prazo mínimo de cinco anos. Os dados referentes à pesquisa serão mantidos em sigilo, não permitindo a divulgação com a identificação dos pacientes, garantindo a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos. O acompanhamento clínico dos indivíduos participantes da pesquisa foi realizado de forma habitual no serviço onde sua cirurgia foi realizada.

# *Resultados*

Inicialmente, apresentaram-se as estatísticas descritivas correspondentes às variáveis antropométricas e laboratoriais do grupo de obesos antes e seis meses após o procedimento cirúrgico e do grupo controle. Posteriormente, analisou-se a associação entre as variáveis, comparando-se os grupos. Finalmente, apresentaram-se os resultados da análise proteômica com a identificação de proteínas potencialmente carcinogênicas e seu comportamento nos diferentes grupos e subgrupos os quais foram divididos de acordo com os valores das variáveis antropométricas e laboratoriais. (IMC e concentração sérica de insulina, respectivamente).

Dessa forma, Os resultados descritos nas tabelas 2 e 3 correspondem aos valores descritivos (valor mínimo, valor máximo, média aritmética e desvio-padrão), referentes ao grupo de obesos no pré-operatório e seis meses após a cirurgia bariátrica e referente ao grupo controle, respectivamente.

Observou-se que a média de idade no grupo de obesos foi de  $35,07 \pm 7,09$  anos, com IMC médio de  $42,84 \pm 6,70$ . A distribuição da população do estudo por sexo está descrita na tabela 4, não se observando significância estatística pelo teste exato de Fischer entre os grupos de obesos e controle. A concentração plasmática média da insulina no pré-operatório foi de  $25,07 \pm 11,94$  mU/L. A tabela 5 descreve o percentual de perda de peso distribuído no grupo de obesos seis meses após o procedimento cirúrgico, onde a média foi de  $25,82\% \pm 5,12$ , com um percentual de perda de excesso de peso, em média, de  $57,97 \pm 11,12$ .

Tabela 2. Valores das estatísticas descritivas relativas às variáveis antropométricas e laboratoriais referentes ao grupo de obesos (n=30)

Variáveis	Valor mínimo	Valor máximo	Média aritmética	Desvio-padrão
Idade (anos)	24,00	57,00	35,07	7,69
Peso pré-operatório (Kg)	84,00	215,00	120,00	30,58
Altura (m)	1,54	215,00	1,66	0,09
IMC pré-operatório (Kg/m <sup>2</sup> )	35,00	60,26	42,84	6,70
Insulina pré-operatório (mU/L)	7,40	60,00	25,07	11,94
Peso pós-operatório (Kg)	64,00	146,50	88,00	20,23
IMC pós-operatório (Kg/m <sup>2</sup> )	25,50	42,82	31,63	4,49
Insulina pós-operatório (mU/L)	4,00	15,00	9,71	3,37

Tabela 3. Valores das estatísticas descritivas relativas às variáveis antropométricas e laboratoriais referentes ao grupo controle (n=10)

Variáveis	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média Aritmética	Desvio-padrão
Idade (anos)	23,00	31,00	27,70	2,58
Peso (Kg)	50,20	77,00	65,52	10,10
Altura (m)	1,56	1,81	1,69	0,07
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	19,80	26,00	22,73	2,35
Insulina (mU/L)	5,00	10,00	6,89	1,58

Tabela 4. Distribuição da população de estudo por sexo

Sexo	Grupo de obesos	Grupo controle	Total
Masculino	8 (26,7%)	5 (50%)	13 (32,5%)
Feminino	22 (73,3%)	5 (50%)	27 (67,5%)
Total	30 (100%)	10 (100%)	40 (100%)

Teste de Fischer  $p > 0,05$

Tabela 5. Distribuição do percentual de perda de peso (%PP) no grupo de obesos, seis meses após o procedimento cirúrgico n=30

Estatísticas descritivas	%
Valor Mínimo	17,34
Valor Máximo	35,20
Média Aritmética	25,82
Desvio-padrão	5,12
Primeiro quartil	21,58
Segundo quartil	24,42
Terceiro quartil	30,32

Foram comparadas as médias aritméticas das variáveis antropométricas e laboratoriais entre os grupos controle e de obesos no pré-operatório e seis meses após o procedimento cirúrgico.

Analisando os valores de IMC, observou-se que a média do grupo de obesos no pós-operatório foi menor que no pré-operatório, com significância estatística ( $p < 0,0001$ ). O mesmo foi observado quando se compararam as médias de peso absoluto e concentração sérica de insulina antes e seis meses após a cirurgia bariátrica, alcançando significância estatística ( $p < 0,0001$ ).

Comparando-se os valores das médias de IMC, peso e concentração sérica de insulina entre os grupos de obesos no pré-operatório e controle, observou-se diferença com significância estatística entre elas. Comparando-se os valores de médias de IMC, peso e concentração sérica de insulina entre os grupos de obesos no pós-operatório e controle, também verificou-se diferença estatisticamente significantes..

A análise revelou que, independente da técnica cirúrgica empregada, a perda de peso, a queda dos níveis de IMC e a diminuição da concentração sérica de insulina ocorreram nos dois grupos (DGYR e GV) com valor de  $p < 0,0001$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre o percentual de perda de peso no sexto mês pós-operatório quando se compararam as duas técnicas ( $p > 0,05$ ). Tais resultados estão descritos nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6. Comparação de médias e desvios-padrão de IMC em  $\text{Kg}/\text{m}^2$ , insulina em  $\text{mU}/\text{L}$  e peso em  $\text{Kg}$ , pré e pós-operatórios, no grupo de obesos segundo a técnica DGYR

Variáveis	Grupo DGYR pré n=11 (a)	Grupo DGYR pós n=11 (b)	Teste t * (a e b)	p
IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	49,36±6,64	35,64±4,70	13,97	<0,0001
Insulina (mU/L)	33,25±12,39	11,43±3,00	6,08	<0,0001
Peso (Kg)	146,36±33,64	105,36±22,56	10,37	<0,0001

Tabela 7. Comparação de médias e desvios-padrão de IMC em Kg/m<sup>2</sup>, insulina em mU/L e peso em Kg, pré e pós-operatórios, no grupo de obesos, segundo a técnica gastrectomia vertical

Variáveis	Grupo GV pré n=19 (a')	Grupo GV pós n=19 (b')	Teste t * (a' e b')	p
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	39,06±2,58	29,31±2,16	19,37	<0,0001
Insulina	20,33±8,92	8,72±3,24	7,17	<0,0001
Peso	104,73±14,40	77,93±9,23	14,03	<0,0001

Tabela 8. Diferença de perda de peso, em percentual, entre as duas técnicas cirúrgicas no grupo de obesos após seis meses

Variável	DGYR	GV	Teste t*	p
Média e desvio-padrão da perda de peso (%)	27,73±4,39	24,71±5,29	1,68	>0,05

\*Amostras independentes

#### 4.1 Resultados da análise proteômica

Neste estudo, a ferramenta da proteômica adotada, eletroforese 2-DE, identificou cerca de 190 spots em cada gel. Destes, 10 spots foram selecionados pela sua intensidade diferenciada em grupos específicos ou pela sua presença em alguns grupos e ausência em outros. Suas características de peso molecular e ponto isoelétrico (pI), utilizados para identificação das proteínas, foram analisadas pelo servidor de proteômica *TagIdent tool Expert Protein Analysis System (ExPASy)*, através dos critérios de busca: pI e Peso molecular do spot; espécie *Homo sapiens*; e banco de dados *UniProtKB/Swiss-Prot*. O perfil das proteínas detectadas na eletroforese bidimensional estão expostos na tabela 9. É importante mencionar que, após identificação, estes dez spots referiram-se as proteínas relacionadas ao câncer e/ou obesidade.

Tabela 9 Proteínas identificadas pelo *TagIdent tool Expert Protein Analysis System (ExPASy)*, através do ponto isoelétrico (pI) e Peso molecular do *spot*; espécie *Homo sapiens*; banco de dados *UniProtKB/Swiss-Prot*.

NºSpot	Identificação da Proteína	Nome da Proteína	pI	pI	Peso Teórico	Peso encontrado
			Teórico	encontrado	(KDa)	(KDa)
1	<b>TSN13_HUMAN (O95857)</b>	Tetraspanina-13	8.2	8.5	22,15	22,40
2	<b>FABPL_HUMAN (P07148)</b>	Proteína de ligação de ácido graxo do fígado	6.6	6.8	14,21	15,27
3	<b>PGFRB_HUMAN (P09619)</b>	Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas	4.8	4,9	121,06	122,40
4	<b>TSP2_HUMAN (P35442)</b>	Trombospondina- 2	4.6	4.6	120,98	121,21
5	<b>APOBR_HUMAN (Q0VD83-4)</b>	Isoforma 4 do receptor de apolipoproteína B	4.3	4.5	118,74	121,50
6	<b>LDLR-HUMAN (P01130)</b>	Receptor da lipoproteína de baixa densidade	4.7	4.8	93,10	95,00
7	<b>A6XGL1_HUMAN (A6XGL1)</b>	Transtirretina	5.1	5.0	20,11	20,00
8	<b>PDPN_HUMAN (Q86YL7-4)</b>	Isoforma 4 da Podoplanina	5.2	5.4	24,52	24,00
9	<b>APOA1_HUMAN (P02647)</b>	Apolipoproteína A-1	5.3	5.5	28,79	26,026
10	<b>KLK11_HUMAN (Q9UBX7-3)</b>	Isoforma 3 da Calicreína 11	9.1	9.3	33,76	35,69

Através da ferramenta adotada, foram identificados seis *spots*, ou pontos, no grupo obeso pré-operatório (Figura 8), que não foram detectados nos grupos controle (Figura 9) e nos pacientes após a cirurgia (Figura 10). Estes *spots* referem-se às proteínas: receptor  $\beta$  do fator de crescimento derivado de plaquetas (PGFR $\beta$ ) (*Spot 3*), trombospondina- 2 (TSP2) (*Spot 4*), receptor da apolipoproteína B (ApoB) (*Spot 5*), receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLR), (*Spot 6*), transtirretina (TTR) (*Spot 7*) e isoforma 4 da Podoplanina (PDPN), (*Spot 8*).

O estudo proteômico para avaliar a influência do IMC, concentração de insulina e percentual de perda de peso na presença de moléculas envolvidas com o câncer, identificou quatro *Spots*. Estes foram identificados como tetraspanina-13 (TSN13), (*Spot 1*), proteína de

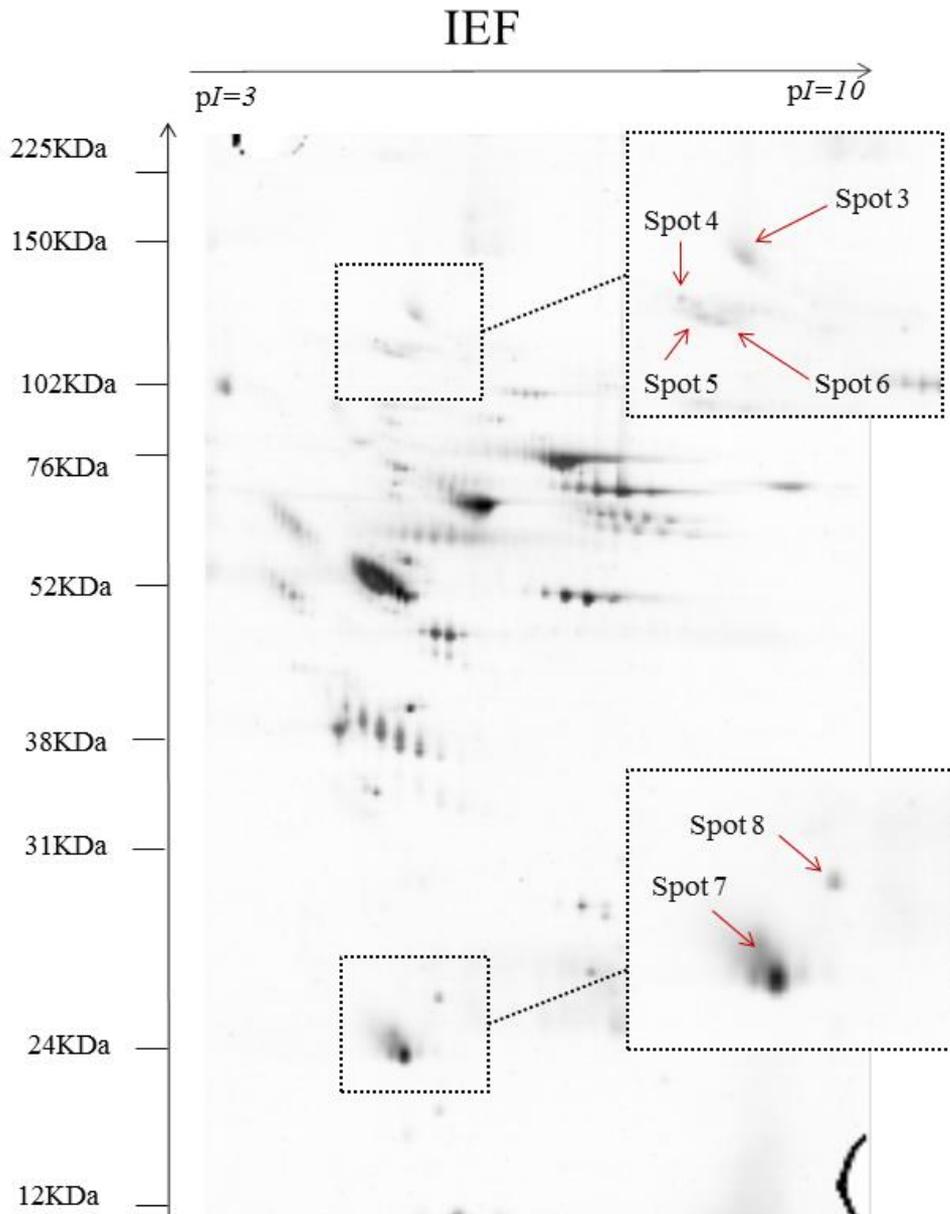
ligação do ácido graxo hepático (FABPL) (*Spot 2*), apolipoproteína A-1 (ApoA1) (*Spot 5*), e Calicreína-11 (KLK11) (*Spot 10*). Tais *spots* são evidenciados na figura 11.

O *spot 1*, (Figura 12) refere-se proteína a tetraspanina-13 (TSN-13), que foi identificada no pré-operatório em todos os grupos (PBIB, PAIA, PBIA e PAIB), sobretudo neste último, não sendo mais detectada após a cirurgia, inclusive nos grupos PPA, PPB, PPC e PPD.

A proteína de ligação do ácido graxo hepático (FABPL), *spot 2* apresentou o mesmo comportamento da TSN-13, ou seja, foi detectada em todos os grupos no pré-operatório, mais expressa no grupo PAIB, e não foi visualizada após a perda de peso induzida pela cirurgia, independente do valor sérico da insulina e do IMC (Figura 12).

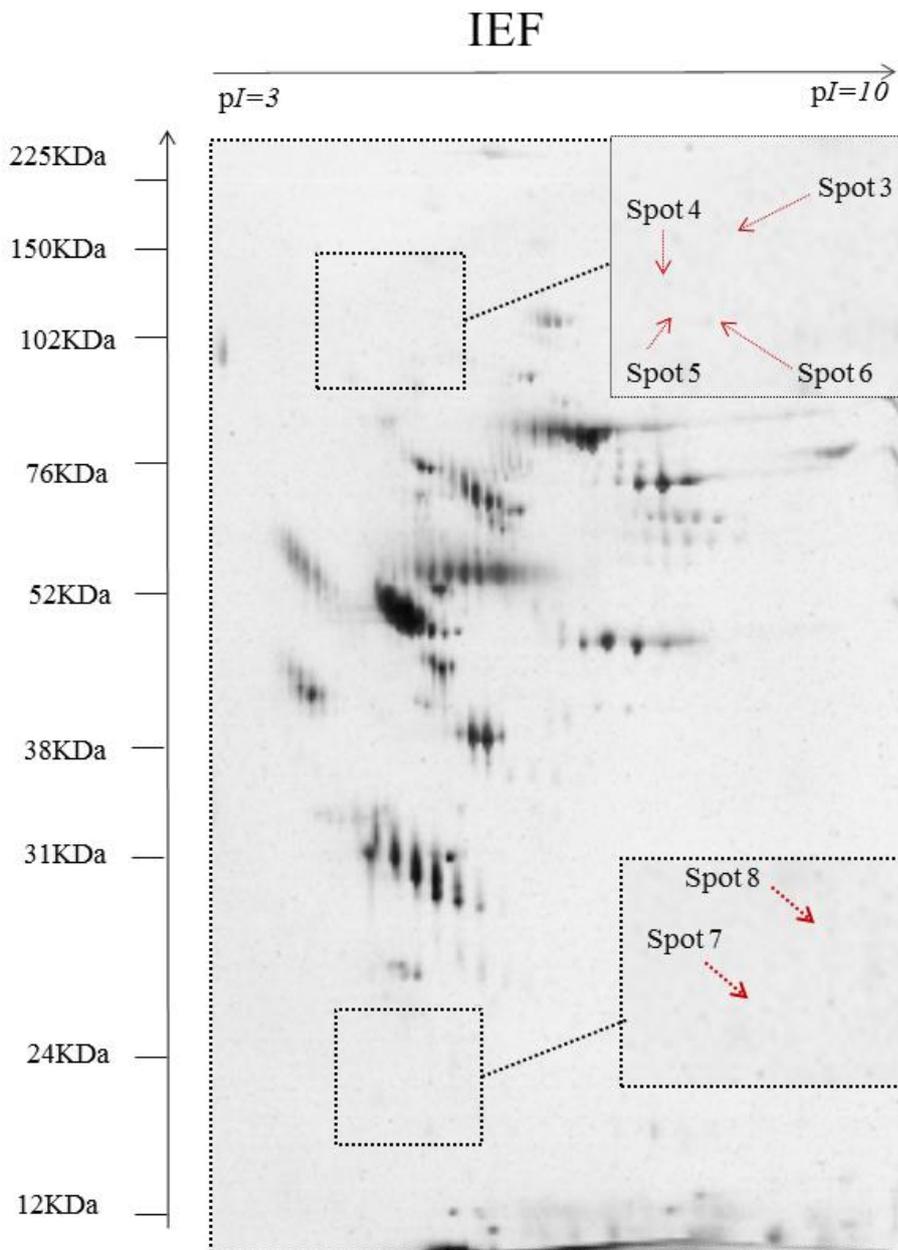
Para o *spot 9*, foi identificada a apolipoproteína A-1 (Apo A-1) que esteve presente no pré-operatório em todos os grupos. Porém, após a cirurgia, não foi detectada nos grupos com hiperinsulinemia (PAIA e PBIA), apenas no grupo PBIB. Além disso, independente do percentual de perda de peso, ela permaneceu no pós-operatório. (Figura 13).

A Calicreína-11 (KLK11) foi identificada no *spot 10* (Figura 14). Esta proteína foi visualizada nos géis dos grupos pré e pós-operatório, exceto no grupo PPA e no grupo PAIA, onde ela não foi expressa.



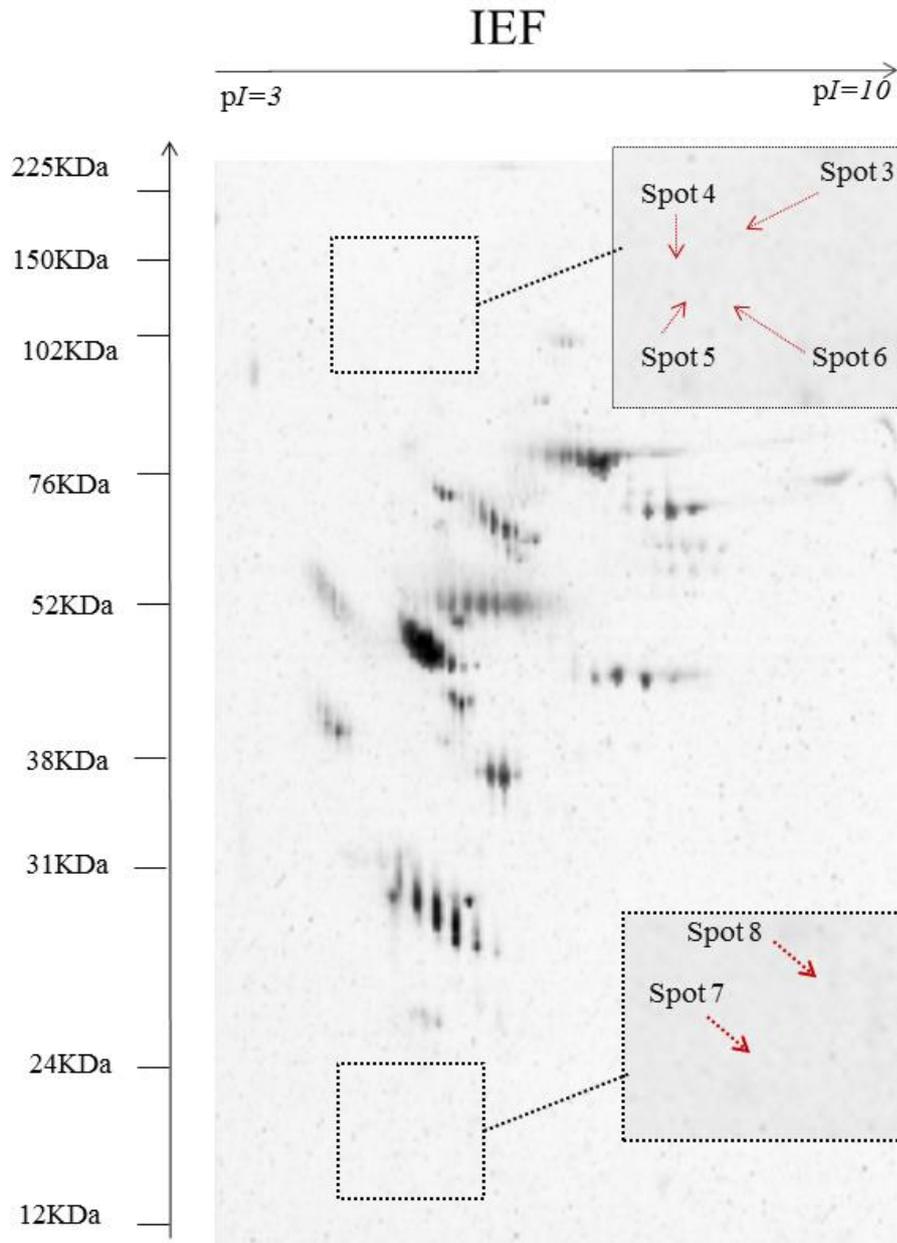
***Pool* obesos pré-operatório**

Figura 8. Gel analítico de eletroforese bidimensional de proteínas plasmáticas do *Pool* de pacientes obesos, pré-operatório, corado pelo Coomassie-Blue. Os spots foram numerados conforme a tabela 10.



***Pool* pacientes eutróficos**

Figura 9. Gel analítico de eletroforese bidimensional de proteínas plasmáticas do *Pool* de pacientes eutróficos (grupo controle) corado pelo Coomassie-Blue. Os *spots* foram numerados conforme a tabela 10.



***Pool* obesos pós-operatório**

Figura 10 Gel analítico de eletroforese bidimensional de proteínas plasmáticas do *Pool* de pacientes obesos, pós-operatório, corado pelo Coomassie-Blue. Os spots foram numerados conforme a tabela 10.

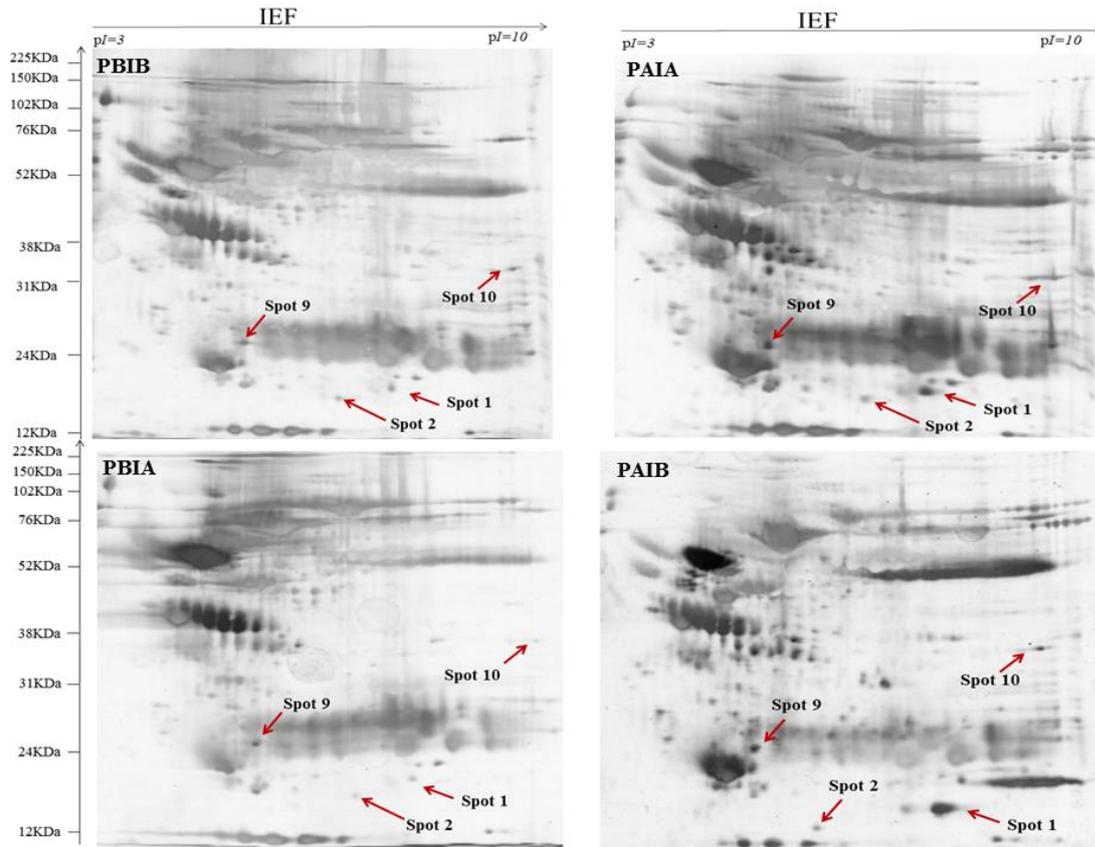


Figura 11. Gel analítico de eletroforese bidimensional de proteínas plasmáticas do *Pool* de pacientes obesos, pré-operatório, evidenciando a expressão dos spots 1, 2, 3 e 4 em todos os subgrupos, corado pelo Coomassie-Blue. Os spots foram numerados conforme a tabela 10.

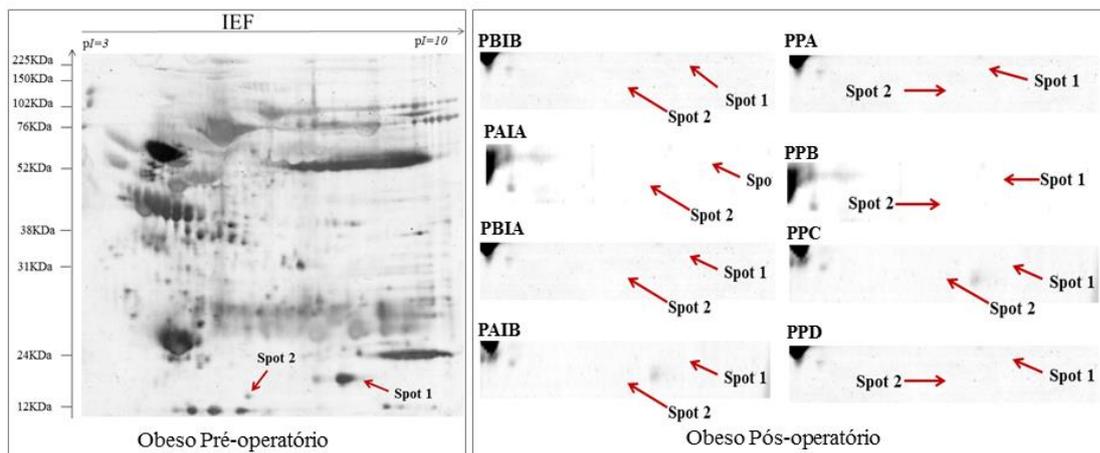


Figura 12. Gel analítico de eletroforese bidimensional de proteínas plasmáticas do *Pool* de pacientes obesos, pré e pós-operatório, evidenciando a ausência de expressão dos *spots* 1 e 2 em todos os subgrupos, após o procedimento, corado pelo Coomassie-Blue. Os spots foram numerados conforme a tabela 10.

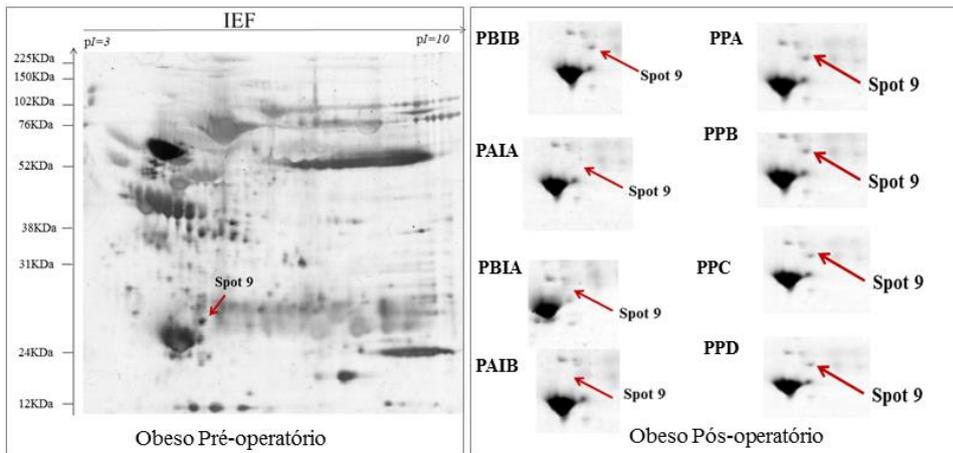


Figura 13 Gel analítico de eletroforese bidimensional da Apo A-1, identificada no *spot 9* do *Pool* de pacientes obesos, pós-operatório, evidenciando a ausência de expressão nos grupos PBIA e PAIA. Corado pelo Coomassie-Blue. Os spots foram numerados conforme a tabela 10.

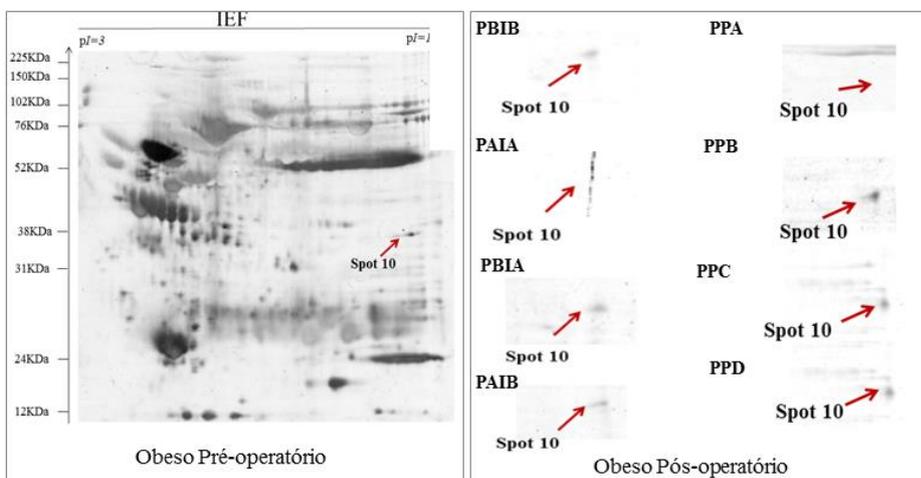


Figura 14 Gel analítico de eletroforese bidimensional da Calicreína 11, identificada no *spot 10* do *Pool* de pacientes obesos, pós-operatório, evidenciando a ausência de expressão apenas nos grupos PPA e PAIA. Corado pelo Coomassie-Blue. Os spots foram numerados conforme a tabela 10.

## *Discussão*

A obesidade tem sido associada ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, de forma que essa associação epidemiológica tem estado sob crescente investigação. Dados combinados de 57 estudos de coorte sugerem que a cada 5 kg/m<sup>2</sup> de aumento no IMC aumenta o risco de mortalidade por neoplasias em até 10% <sup>63</sup>. Além disso, estudos longitudinais recentes sobre cirurgia bariátrica/metabólica tem revelado que a perda de peso satisfatória também resulta em diminuição na incidência de câncer <sup>32,134-136</sup>.

Os resultados apresentados neste trabalho tem a finalidade de responder a pergunta condutora ao permitir a utilização da plataforma proteômica para identificar as proteínas presentes na obesidade para que, no futuro, elas possam ser usadas em estudos dirigidos e relacioná-las às características clínicas do câncer e ao desenvolvimento de novos métodos terapêuticos e de prevenção.

Inicialmente, os resultados descritivos da população do estudo caracterizam o perfil do paciente portador de obesidade e as repercussões das técnicas cirúrgicas adotadas sobre as variáveis antropométricas e laboratoriais. Em seguida, os resultados da análise proteômica serão discutidos a partir das proteínas identificadas nos diversos subgrupos de pacientes obesos, descrevendo seus principais mecanismos relacionados à carcinogênese e seu comportamento diante da perda de peso e diminuição na concentração sérica de insulina induzidos pela cirurgia.

Quanto aos resultados epidemiológicos do estudo, ao observar a distribuição da obesidade por sexo, houve um predomínio nas mulheres jovens (73,3% com idade média de 37,05 anos), compatível com os dados disponíveis na literatura. Segundo a OMS, existem, atualmente, pouco mais de meio milhão de pacientes portadores de obesidade, predominando no sexo feminino em torno de 14%<sup>1</sup>. No Brasil, houve um aumento em até três vezes na incidência de obesidade nos últimos dez anos, sobretudo na população com baixos recursos financeiros, sendo também mais frequente no sexo feminino e na faixa etária acima de 40 anos <sup>54,55</sup>.

Entre as técnicas cirúrgicas adotadas no presente estudo, a DGYR é considerada o padrão utilizado até os dias atuais para o tratamento da obesidade, porém a gastrectomia vertical vem ganhando espaço. Nos últimos dez anos, houve uma diminuição na realização da técnica DGYR, caindo a frequência de 65,1% para 46,6%, seguido por um aumento marcante na realização da gastrectomia vertical para 27,89%<sup>137</sup>. Além disso, estudos recentes de metanálise evidenciam eficácia semelhante das duas técnicas quanto à perda de peso e melhora de comorbidades, embora ligeiramente maior na DGYR, mas com efeitos comprovados da gastrectomia vertical sobre o DM tipo 2, a síndrome metabólica, a resistência insulínica e hiperinsulinemia<sup>39,40,141-144</sup>.

No Brasil, em 2011, do total de 65.000 cirurgias realizadas, 20% foi representado pela gastrectomia vertical<sup>137</sup>. O Serviço de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas da UFPE vem seguindo as tendências mundial e nacional, indicando a realização desta técnica desde 2010 para pacientes com obesidade graus II e III, inclusive portadores de DM tipo 2. Nesse período de quatro anos, do total de 400 cirurgias bariátricas realizadas, sessenta (15%) foram pela técnica da gastrectomia vertical. Assim, com o objetivo de avaliar a influência das técnicas cirúrgicas sobre o percentual de perda de peso e conseqüentemente sobre perfil de proteínas carcinogênicas na obesidade, foram incluídos na amostra pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico tanto pela técnica DGYR quanto pela gastrectomia vertical, analisando os parâmetros de curva ponderal e níveis séricos de insulina, principais fatores envolvidos no desenvolvimento de neoplasias associadas à obesidade.

Quanto à evolução ponderal após a cirurgia, Faria et al. consideraram em seu estudo o sucesso do tratamento cirúrgico quando há perda de excesso de peso (%PEP) de 50% no sexto mês<sup>145</sup>. Na importante revisão de Buchwald et al., a perda de peso após cirurgias bariátricas foi estimada em 58 a 64% do excesso de peso, demonstrando perda absoluta de 38 a 40 kg e proporcional de 32%. Essa situação tem como base uma população de obesos com IMC médio de 47 kg/m<sup>2</sup><sup>138</sup>, o que acarreta um excedente lipídico em relação à amostra estudada, que apresentou um IMC médio de 42,84 Kg/m<sup>2</sup>. Entretanto, o que se observou no período de realização do estudo (seis meses) foi um %PEP de 57,97%, semelhante à revisão de Buchwald et al. e superior à Faria et al., evidenciando-se uma excelente resposta da curva ponderal à cirurgia nos primeiros seis meses. Apesar da diminuição no IMC em 73,83%, alcançando significância estatística em todos os parâmetros antropométricos (peso absoluto, %PP e %PEP), os pacientes ainda permaneceram com obesidade grau I e, portanto, com diferença significativa dos parâmetros antropométricos em relação ao grupo controle. Isso pode ser justificado pelo curto período do estudo, que embora seja considerado o intervalo de tempo pós-operatório em que há maior velocidade de perda ponderal<sup>146</sup>, há continuação dessa perda, porém de forma mais lenta e contínua até sua estabilização em dois anos após a cirurgia, indicando que na amostra poderá haver comportamento semelhante, alcançando valores antropométricos sem diferença estatística em relação ao grupo controle.

Além do %PEP, os resultados da cirurgia bariátrica podem ser avaliados pelo percentual de perda de peso (%PP). Ferraz et al. citaram o %PP como outra forma de análise da qualidade da perda ponderal, onde a avaliação considerada excelente corresponde a perda >35%, boa quando

o %PP fica entre 25 e 34%, pobre com %PP de 15 a 24% e falha terapêutica quando <15% após um período de 01 ano<sup>147</sup>. No presente estudo, houve, em seis meses, uma boa avaliação da eficácia cirúrgica quanto ao peso (%PP=25,82%). Além disso, quando comparadas, as duas técnicas cirúrgicas não apresentaram diferença estatística quanto ao %PP, confirmando os achados das últimas metanálises, que demonstram eficácia semelhante na evolução ponderal tanto na DGYR (27,73 ±4,39) quanto na gastrectomia vertical (24,71 ±5,29).

No presente trabalho, selecionamos duas técnicas cirúrgicas para avaliação de possíveis diferenças entre elas quanto à perda de peso após seis meses do procedimento. Assim, de acordo com os estudos acima citados<sup>141-144</sup>, em que se evidencia perda de peso satisfatória entre as duas técnicas, não observamos diferença com significância estatística na amostra estudada. Podemos concluir que as duas técnicas cirúrgicas, DGYR e gastrectomia vertical, são eficazes na perda de peso e, portanto, este parâmetro não influenciou para a análise proteômica.

Autores evidenciam que seis meses após a cirurgia bariátrica, já pode ser observado melhora na resistência insulínica e normalização dos níveis séricos de insulina, além de diminuição dos mediadores inflamatórios relacionados à obesidade, bem como do estresse oxidativo e hipóxia tecidual, fatores sabidamente envolvidos no mecanismo da carcinogênese<sup>10-13,148</sup>. Na amostra estudada, embora o grupo de obesos tenha permanecido com obesidade grau I, provavelmente pelo curto período de seguimento, não consideramos esta situação um obstáculo à realização do estudo proteômico, visto que as variáveis de interesse (peso, %PEP, %PP e níveis séricos de insulina) diminuíram de forma significativa após o procedimento cirúrgico, como evidenciado na literatura, podendo, dessa forma, influenciar no comportamento das proteínas identificadas pela plataforma proteômica.

Quanto as alterações metabólicas associadas à obesidade, observou-se que o grupo de obesos, com IMC médio de 42,84 Kg/m<sup>2</sup>, apresentou uma concentração sérica de insulina de 25,07 mU/L, caracterizando hiperinsulinemia. Sabe-se que o tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo e um dos seus componentes, o tecido adiposo branco, é reconhecido como um órgão endócrino e metabolicamente ativo, sobretudo na forma visceral, possuindo alta atividade lipolítica com consequente liberação de ácidos graxos livres na circulação portal, favorecendo o desenvolvimento da resistência insulínica pelo acúmulo de metabólitos de ácidos graxos dentro de tecidos responsivos à insulina. Assim, há diminuição da eficiência de sinalização insulínica para regulação da glicose plasmática nos tecidos sensíveis a

sua ação e aumento compensatório na produção de insulina pelo pâncreas a fim de manter os níveis glicêmicos dentro da faixa de normalidade<sup>72</sup>. Essa ineficácia metabólica leva o fígado a produzir mais glicose, o músculo a utilizar, de maneira insuficiente, a glicose circulante e o tecido adiposo a aumentar a lipólise. Essas alterações relacionadas à resistência insulínica e hiperinsulinemia compensatória são as mais estudadas no mecanismo da carcinogênese associada à obesidade<sup>22,72</sup>, justificando a dosagem sérica deste hormônio na amostra estudada para evidenciar possíveis proteínas envolvidas nas vias de sinalização carcinogênica ativadas pela insulina, através de seus efeitos mitogênicos e angiogênicos.

Atualmente, a cirurgia bariátrica mais utilizada no Brasil e no mundo é a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) pelos seus resultados sobre a redução de comorbidades, inclusive na obesidade grau I<sup>149</sup>. Porém, a gastrectomia vertical, vem apresentando resultados satisfatórios quanto à curva ponderal e efeitos comprovados sobre a SM<sup>39,40</sup>.

Recentes estudos publicados por Lanelli et al., Yip et al. e Benaiges et al., ao avaliarem a evolução da resistência insulínica e valores antropométricos, comparando DGYR e gastrectomia vertical, concluíram que os pacientes submetidos à DGYR apresentaram melhora semelhante à gastrectomia vertical na resistência insulínica após um ano de cirurgia<sup>40,143,144</sup>. No presente trabalho, observou-se, após seis meses, uma queda significativa nas concentrações séricas de insulina, sendo esta diferença maior na DGYR (65,62%) em relação à gastrectomia vertical (57,10%), porém sem significância estatística, corroborando com os achados da literatura.

Nos últimos anos, vem aumentando o número de trabalhos a cerca da carcinogênese relacionada à obesidade com o intuito de descobrir novos mecanismos dessa associação. Nesse contexto, pesquisas dedicadas ao esclarecimento da biologia molecular envolvida tanto na carcinogênese quanto na obesidade são de grande valia para a compreensão desse mecanismo complexo e multifatorial.

Dessa maneira, estudos proteômicos vem sendo realizados após cirurgias bariátricas, porém sem relatos relacionados à carcinogênese<sup>46-50</sup>. Oberbach A et al. identificaram biomarcadores relacionados ao metabolismo lipídico, e também, cardiovasculares cuja expressão foi diminuída com a redução do IMC<sup>46,47</sup>. Outros autores detectaram a diminuição de proteínas de fase aguda e citocinas inflamatórias após a cirurgia, justificando que a cirurgia reverte o mecanismo inflamatório crônico presente na obesidade<sup>48</sup>. Culnan et al. detectaram a presença da apolipoproteína A-IV, um marcador anti-aterogênico, após a DGYR<sup>49</sup>. Finalmente,

Trak-Smayra et al. analisaram o perfil proteômico no soro de pacientes submetidos à DGYR para identificar marcadores séricos de esteatose e NASH (doença hepática não alcoólica) antes e após a cirurgia, correlacionando com biópsia hepática realizada no procedimento cirúrgico, identificando potenciais biomarcadores de severidade da lesão hepática<sup>50</sup>.

Diante disto, a elucidação dos mecanismos metabólicos precisos de prevenção do câncer pela cirurgia bariátrica pode aumentar nossa compreensão de como a obesidade, o DM tipo 2 e a síndrome metabólica estão associados à carcinogênese e crescimento tumoral.

O LIKA, da UFPE, já vem utilizando as ciências ômicas no arsenal de pesquisas científicas voltadas à carcinogênese, com vários trabalhos publicados nessa área, a exemplo da genômica do HPV e sua associação com o câncer gástrico<sup>150</sup>.

Nesse estudo, com a colaboração do LIKA, foi avaliado o perfil proteômico de pacientes obesos, na tentativa de identificar proteínas envolvidas em processos carcinogênicos. Para tal propósito, foi utilizado o plasma de pacientes obesos, submetidos à cirurgia bariátrica, tomando-se como referência o perfil proteômico plasmático de indivíduos eutróficos e sem fatores potencialmente de risco para o desenvolvimento de neoplasias, excluindo-se as variáveis de confusão.

O estudo proteômico identificou dez *spots* diferentemente expressos entre os grupos e, posteriormente, identificados como proteínas potencialmente carcinogênicas (tabela 10). Entre esses, seis *spots* foram identificados no grupo de obesos no pré-operatório, que se tornaram ausentes após o procedimento cirúrgico. Esses *spots* também não foram identificados no grupo controle. Tais *spots* foram identificados como receptor  $\beta$  do fator de crescimento derivado de plaquetas (PGFR $\beta$ ), Trombospondina-2 (TSP-2), receptor da apolipoproteína B, receptor de lipoproteína de baixa densidade, transtirretina e isoforma 4 da Podoplanina.

O receptor  $\beta$  do fator de crescimento derivado de plaquetas (PGFR $\beta$ ) é um receptor tirosina-quinase presente na superfície celular, que pela sua ligação aos membros da família do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), promove ação mitogênica, sobretudo em células de origem mesenquimal. A fosforilação do PGFR $\beta$ , através da expressão do PDGF, ativa as vias de sinalização ERK1/2 e Akt, que são essenciais à proliferação celular<sup>151</sup>. O estroma tumoral contém diferentes tipos celulares, incluindo fibroblastos ativados (miofibroblastos), células endoteliais, perícitos e células inflamatórias. Os primeiros são moduladores chaves da

progressão tumoral<sup>151</sup>. O PGFR $\beta$  parece estar envolvido nos mecanismos que regulam a ativação desses fibroblastos<sup>152</sup>.

O PGFR $\beta$  desempenha um papel importante na promoção do crescimento tumoral progressivo em vários tipos de câncer, assim como na leucemia e neoplasias do estômago<sup>151</sup>, próstata<sup>153</sup>, pâncreas<sup>154</sup>, mama<sup>155</sup>, cólon<sup>156</sup> e fígado<sup>157</sup>. Citoquinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , iniciam e mantem a resposta de crescimento em células do músculo liso do intestino via PGFR $\beta$ <sup>156</sup>. Isto sugere que o início da expressão de PGFR $\beta$  é um fator chave no crescimento das células musculares intestinais, em que a inflamação pode danificar mecanismos inibitórios intrínsecos e, assim, levar à hiperplasia e ao câncer<sup>156</sup>. Um dos mecanismos de associação entre obesidade e câncer é a liberação de TNF $\alpha$  e seus efeitos proliferativos. Assim, pode haver uma inter-relação entre o TNF $\alpha$  e a expressão de PGFR $\beta$ , contribuindo para o desenvolvimento de neoplasias na obesidade.

Evidências recentes indicam que as células-tronco mesenquimais contribuem para a angiogênese do tumor, de forma que células estaminais derivadas do tecido adiposo tem a capacidade de se diferenciar em estruturas capilares através de PGFR $\beta$ <sup>158</sup>. Cheng S et al. citam em seu estudo, a presença do PGFR $\beta$  no câncer de mama, neoplasia frequente na obesidade<sup>159</sup>. O PGFR $\beta$  controla o recrutamento e proliferação de perícitos nos leitos vasculares, participando de eventos como vasoconstrição, angiogênese e maturação celular endotelial<sup>160</sup>. Outra via potencialmente modulada pelo PGFR $\beta$  é a manutenção da função de barreira vascular, de forma que quando diminuído, o PGFR $\beta$  pode levar à perda da retenção de perícitos em vasos sanguíneos tumorais, favorecendo sangramento e potencial aumento de metástases<sup>161</sup>.

Devido a sua função de manutenção da barreira vascular e apesar de poucos estudos terem examinado os efeitos do PGFR $\beta$  e perícitos sobre ação da insulina na vascularização extra-hepática, acredita-se que a perda de sua atividade pode aumentar a permeabilidade vascular em cultura de adipócitos<sup>162</sup> e músculo esquelético em modelo animal<sup>163</sup>, induzindo a translocação do transportador de glicose e, mais recentemente, pode aumentar a permeabilidade vascular hepática e o transporte transendotelial hepático de insulina, melhorando a sensibilidade insulínica<sup>164</sup>. Neste contexto, poderíamos sugerir que a expressão do PGFR $\beta$  na obesidade, além de suas ações carcinogênicas, favorece, indiretamente, a ação mitogênica da insulina ao promover a resistência insulínica, contribuindo, assim, para o desenvolvimento de neoplasias.

Assim, o PGFR $\beta$  pode funcionar como um biomarcador potencialmente carcinogênico na

obesidade, sobretudo de mama. Sua ausência após a cirurgia, acompanhada da perda de peso, revela um importante papel protetor do tratamento cirúrgico da obesidade no desenvolvimento de neoplasias.

A trombospondina-2 (TSP-2) também foi uma proteína detectada no *Pool* dos pacientes obesos no pré-operatório e não visualizada após a cirurgia. As trombospondinas (TSPs) fazem parte de uma família de cinco proteínas multifuncionais amplamente distribuídas na matriz extracelular de inúmeros tecidos. Cada domínio das TSPs especifica uma função biológica distinta através da interação com um receptor específico. Entre as TSPs, a TSP2 apresenta forte atividade anti-angiogênica e sua expressão é modulada por uma situação de hipóxia e por oncogenes<sup>165</sup>. Em vários tumores (tireóide, cólon, carcinoma da bexiga), a expressão de TSP2 é inversamente correlacionada ao grau de diferenciação do tumor e taxa de sobrevida<sup>165</sup>. Pode ser encontrada hiperexpressa na neoplasia intraepitelial da próstata<sup>166</sup> e no líquido pleural de mesoteliomas<sup>167</sup>. Devido a sua ação anti-angiogênica, estudos recentes sugerem que as TSPs ou peptídeos derivados de TSPs, através de sua atividade biológica, podem estar envolvidos em novas estratégias terapêuticas promissoras para o tratamento anti-angiogênico de neoplasias<sup>168</sup>.

Quando há aumento das necessidades de oxigênio e nutrientes, fato comum na hipóxia tecidual, presente na obesidade visceral, ocorre proliferação vascular e entre as inúmeras moléculas indutoras da angiogênese, destaca-se o fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF), o qual está aumentado na obesidade<sup>22</sup>. Porém, tão importante quanto a proliferação vascular, é a involução deste processo que ocorre após a resolução dessa demanda adicional, com a regressão dos vasos neoformados e isso ocorre através dos inibidores da angiogênese, como a trombospondina-2. Desta forma, evita-se que haja um aporte excessivo de oxigênio que, além de desnecessário, poderia levar à formação de radicais livres de oxigênio, prejudiciais aos tecidos<sup>169</sup>. Nesse contexto inconstante, o mecanismo angiogênico parece atuar como uma balança, em que, de um lado estão os ativadores (pró-angiogênicos), como o VEGF, e do outro, os inibidores (angiostáticos), como as trombospondinas. É do resultado deste balanço que leva a um maior ou menor estímulo para a proliferação vascular e conseqüente formação de neoplasias. Nas neoplasias, há desequilíbrio desse balanço, o que justifica a identificação de uma resposta em cascata visando ao restabelecimento da homeostase<sup>170</sup>.

Nesta vertente, demonstrou-se que o desenvolvimento de vasos sanguíneos ao redor e dentro do tumor é indispensável ao crescimento tumoral, invasão local e metastização aos órgãos

vizinhos, mas ensaios clínicos demonstraram que certos tumores poderiam produzir inibidores angiogênicos<sup>170</sup>, como a TSP-2, na tentativa do organismo manter a homeostase nesse mecanismo angiogênico. Assim, tumores que são TSP-2 negativos, possuem maior densidade microvascular, maior risco de metastização e pior prognóstico, relativamente aos TSP-2 positivos<sup>171</sup>.

Além desse “estímulo” angiogênico na presença de neoplasias, a expressão de TSP-2 é estimulada pela presença de interleucina 10 (IL-10)<sup>172</sup>. Sabe-se que na obesidade, considerando o estado inflamatório crônico de baixo grau, há aumento nos níveis de interleucina 10<sup>48</sup>. Assim, dois fatores poderiam contribuir para a identificação da TSP-2 neste estudo, o fator de crescimento derivado do endotélio (VEFG) e a IL-10. Estes relatos sugerem que a presença da TSP-2 nos pacientes obesos pode indicar um desequilíbrio no metabolismo voltado à inflamação e carcinogênese. A sua ausência, após a perda de peso induzida pelo tratamento cirúrgico, indicaria um equilíbrio na homeostase entre fatores promotores de tumor e inibidores angiogênicos, fortalecendo o papel favorecedor da cirurgia bariátrica contra a inflamação e formação do câncer.

Outra proteína identificada nos pacientes obesos no pré-operatório foi o receptor da apolipoproteína B (apoB). A apoB é uma glicoproteína constituída por 4536 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 540 kDa, apresentando cinco domínios estruturais, sendo o quarto domínio responsável pela interação da apoB com seus receptores e pela manutenção da integridade desta partícula. A apo B pode ser encontrada em duas formas: apo B-48 e apo B-100<sup>173</sup>. Esta proteína desempenha um papel central no metabolismo lipídico como principal componente proteico das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), estando sua função relacionada à remoção de LDL do plasma e regulação da biossíntese do colesterol<sup>174</sup>.

A síntese lipídica é um resultado integrado de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, porém ela pode promover o crescimento e sobrevivência de células neoplásicas. Vários estudos epidemiológicos tem mostrado uma ligação entre obesidade e câncer de mama, estando o metabolismo lipídico envolvido nesse mecanismo<sup>174</sup>. Nessa vertente, estudos prévios demonstraram que a apoB pode estar relacionada ao desenvolvimento tumoral e metástases e, em níveis elevados, pode ser encontrada em tumores cerebrais na infância<sup>174</sup>. A concentração sérica de apoB tem atuado como um potencial marcador para o diagnóstico e prognóstico de

neoplasias de ovário, vesícula biliar e mama, também relacionadas à obesidade, e a ativação da lipogênese *de novo*, modulada por apoB, correlaciona-se com pior prognóstico<sup>175</sup>.

Desse modo, a elevação da concentração sérica da apoB e estimulação da lipogênese endógena acarreta na elevação da concentração de receptores da apolipoproteína B, podendo favorecer o desenvolvimento de neoplasias associadas à obesidade. Esse receptor foi detectado neste estudo e a perda de peso, induzida pelo tratamento cirúrgico, levou a ausência de expressão dessa proteína, acreditando-se que a melhora do metabolismo lipídico, promovida pela cirurgia, diminuiu a expressão do receptor de apoB com consequente diminuição no potencial desenvolvimento de neoplasias, principalmente as relacionadas ao metabolismo lipídico, como mama.

No *spot 6* foi identificado um outro receptor envolvido no metabolismo lipídico, o da LDL. A LDL é uma lipoproteína transportadora de colesterol no plasma, o qual é englobado pelas células dos tecidos-alvo através da endocitose intermediada por seu receptor. Os tumores malignos apresentam um aumento da expressão dos receptores de lipoproteínas, devido à aceleração da proliferação celular com consequente aumento da necessidade de lipídeos para a síntese das membranas celulares. Esse aumento da expressão dos receptores de LDL no câncer pode ser utilizado para concentrar fármacos de ação antineoplásica em tecido tumoral, utilizando lipoproteínas ou emulsões semelhantes a lipoproteínas como veículo.

Os níveis dessa proteína (LDLR) foram encontrados hiperexpressos em células tumorais deficientes em adiponectina. Em células de câncer de mama humano, a hiperexpressão de LDLR eleva a atividade da  $\beta$ -catenina nuclear, facilitando a proliferação das células tumorais<sup>176</sup>, podendo justificar o mecanismo de desenvolvimento do câncer de mama na obesidade. Além disso, estudos relatam que a hipóxia tecidual aumenta a expressão de receptores de LDL, através do aumento de HIF1 $\alpha$ <sup>177</sup>. Em outro estudo, Shen et al. correlacionaram a atividade de HIF1 $\alpha$  ao aumento de LDL e VLDL em células de hepatoma (HepG2), através da expressão de receptores LDL, observando, também, a correlação desse receptor com espécimes de carcinoma hepatocelular<sup>178</sup>. Esses estudos relatam o envolvimento do TNF- $\alpha$  com o aumento de LDL. Donohoe et al. descrevem a liberação de TNF- $\alpha$  como um dos promotores de câncer do aparelho digestivo na obesidade<sup>27</sup>.

Igualmente, pode-se sugerir, nesse estudo, que a presença do receptor de LDL

evidenciada no grupo de obesos no pré-operatório e sua ausência após a cirurgia pode estar relacionada à hipóxia tecidual presente na obesidade, através da liberação de HIF-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  e diminuição de adiponectina, tornando-o um potencial biomarcador para o desenvolvimento de neoplasia de mama e carcinoma hepatocelular. No entanto, é necessário maior investigação, correlacionando esses fatores, HIF-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , LDL e receptor de LDL, em modelos de neoplasia hepática.

A transtirretina é uma proteína de fase aguda e tem sido citada pela sua diminuição em situações quando o metabolismo apresenta-se aumentado, como em estágios avançados de neoplasias<sup>179</sup>. A transtirretina também foi identificada como biomarcador carcinogênico na fase inicial das neoplasias de ovário, endométrio e na Síndrome dos Ovários Policísticos, as duas últimas relacionadas à obesidade<sup>8,126,180,181</sup>. Na análise proteômica, identificamos a transtirretina no grupo de pacientes obesos no pré-operatório. Entretanto, não avaliamos a presença da Síndrome de Ovários Policísticos nesse grupo. Mas encontrá-la hiperexpressa sugere mecanismos envolvendo esta proteína de fase aguda em processos carcinogênicos precoces, onde o metabolismo presente na obesidade é necessário ao desenvolvimento tumoral. A ausência de expressão desta proteína no pós-operatório reforça o papel da cirurgia bariátrica na proteção do câncer ginecológico.

A Podoplanina (PDPN) é uma glicoproteína do tipo mucina transmembranar de 38 kDa envolvida com a progressão tumoral e foi identificada no *spot* 8. Em vários tipos de células tumorais, a PDPN é regulada positivamente, desempenhando importante papel na transição epitelial, invasão e metástase, sobretudo em neoplasias de cólon e pâncreas<sup>182</sup>. Nesse estudo, a presença dessa proteína e sua ausência após a perda de peso pode sugerir a realização de estudos posteriores na área da obesidade e cirurgia metabólica, correlacionando com câncer de pâncreas e DM tipo 2, pois esta última condição é comum às duas patologias.

Ainda neste estudo, foi avaliada a influência do IMC, queda da insulina e percentual de perda de peso após a cirurgia na presença de potenciais biomarcadores neoplásicos. Nesta etapa, quatro *spots* foram identificados e suas respectivas proteínas relacionadas à obesidade e câncer. (Figuras 11, 12, 13 e 14, tabela 10).

No *spot* 1, identificamos a Tetraspanina-13 (TSN13), uma proteína de superfície celular, responsável pela modulação de vias de transdução de sinal envolvidas na regulação do desenvolvimento, ativação, crescimento e motilidade celular<sup>183</sup>. Além disso, a TSN13 está

associada aos receptores de adesão, da família das integrinas, regulando a migração celular dependente de integrina. Estudos propõem que a TSN13 influencia a migração celular através dos seguintes mecanismos: modulação da integrina, isolamento das integrinas na superfície celular ou transporte intracelular e reciclagem das integrinas. Pesquisas citam a superexpressão da TSN13 em amostras de câncer de próstata<sup>183</sup> e seu gene caracterizado como o mais expresso no adenocarcinoma de próstata<sup>184</sup>. A obesidade está relacionada à neoplasia de próstata, principalmente indiferenciada, e é proporcional ao IMC, mas não está claro quais mecanismos levam a essa associação. Acredita-se que no homem portador de obesidade há níveis elevados de estradiol e níveis mais baixos de testosterona, (importante para manter a diferenciação celular da glândula prostática), além dos altos níveis de insulina, IGFs e leptina, mas há inconsistência nos estudos<sup>12</sup>. Possivelmente, a presença da TSN13 hiperexpressa na obesidade e seus efeitos carcinogênicos possa explicar o desenvolvimento de neoplasia prostática associada à obesidade. Além disso, a TSN13 apresenta-se elevada no adenocarcinoma mucinoso de endométrio e ovário<sup>185</sup>, câncer de mama<sup>186</sup> e tumores de células germinativas testiculares<sup>187</sup>. Apesar de seu envolvimento na carcinogênese, nenhum relato científico relaciona a TSN13 com a obesidade. Porém, neste estudo, a TSN13 esteve presente em todos os pacientes obesos no pré-operatório, principalmente no grupo PAIB (Figura 11) e ausente após a intervenção cirúrgica. Dessa a cirurgia bariátrica, outra vez, foi eficaz no papel de reduzir o risco de desenvolvimento de neoplasias.

As proteínas de ligação de ácidos graxos (FABPs) são parte de uma família composta por oito proteínas envolvidas no transporte de ácidos graxos da membrana celular até sítios de oxidação e síntese. A designação de cada uma destas proteínas foi derivada a partir do tecido originalmente isolado e os membros-chave deste grupo de proteínas incluem as proteínas de ligação de ácidos graxos no fígado, intestino e epiderme.

L-FABP (proteína de ligação de ácidos graxos hepática) participa de várias funções fisiológicas importantes, incluindo a sinalização intracelular, controle da divisão e diferenciação celular<sup>188</sup>. Essas funções estão irregulares nos tumores em desenvolvimento e na progressão neoplásica. Além disso, a L-FABP pode atuar como um receptor de ácido graxo, sendo uma proteína alvo para substâncias cancerígenas genotóxicas. A ligação destes carcinógenos à L-FABP promove a mitogênese. Esta proteína, por conseguinte, tem sido implicada no desenvolvimento de tumores em estágio precoce, como cólon e próstata<sup>189,190</sup>. Em nosso estudo,

essa proteína foi encontrada no *Pool* dos pacientes obesos (PAIA, PAIB, PBIA e PBIB), com expressão ausente após a perda de peso, sugerindo ser um marcador neoplásico na obesidade.

Este resultado corrobora com os achados descritos, os quais sugerem que a cirurgia bariátrica favorece a proteção contra o desenvolvimento do câncer, uma vez que influencia na produção de proteínas carcinogênicas.

A apolipoproteína A-1 (apo A-1), principal lipoproteína carreadora do colesterol HDL, foi identificada no *spot* 9. A apo A-1 participa da remoção do excesso de colesterol tecidual, através do transporte reverso do colesterol. No entanto, vem sendo citada pela sua superexpressão em neoplasias de cólon, mama e endométrio<sup>126,176,191</sup>. Estudos *in vitro* mostraram que a insulina estimula a produção de apolipoproteína A1 (apo 1) e na síndrome metabólica, são fatores presentes a dislipidemia e resistência insulínica, levando à hiperinsulinemia. Nas neoplasias de mama e cólon, a apo A-1 apresenta correlação positiva com dislipidemia e síndrome metabólica<sup>192,193</sup>, fato que pode justificar sua presença no grupo de obesos no pré-operatório e ausência nos pacientes após a cirurgia nos grupos com hiperinsulinemia (PBIA e PAIA), já que houve diminuição significativa na concentração sérica de insulina após a cirurgia. Assim, a apo A-1 pode ser utilizada como biomarcador de câncer de cólon e mama em pacientes portadores de obesidade e síndrome metabólica.

A Calicreína 11 (*spot* 10, Figura 14) foi detectada em todos os grupos de obesos no pré-operatório e podemos afirmar que ela não sofreu influência do peso nem da insulina, pois permaneceu expressa no pós-operatório tanto nos pacientes com hiperinsulinemia, quanto nos pacientes com insulina  $\leq 21\text{mU/L}$  e nos pacientes que perderam peso, exceto no grupo que apresentou o menor percentual de perda, sugerindo outros mecanismos envolvidos na ausência de sua expressão, especificamente nesse grupo.

Esta proteína é da família das serino-proteases e vem sendo implicada na carcinogênese, sugerindo a sua utilização como biomarcador em neoplasias de próstata, ovário, estômago, mama e testículo<sup>194</sup>. A expressão da calicreína 11 no câncer gástrico parece estar associada a um melhor prognóstico<sup>194</sup>. Sano A et. al citam em seu estudo que a expressão da calicreína 11 em receptores de estrogênio no câncer de mama pode desempenhar um papel fundamental na progressão do câncer, aumentando a biodisponibilidade de IGFs através de degradação de IGFBP-3<sup>195</sup>. Na obesidade, sabe-se que há aumento na liberação de IGFs com diminuição de IGFB-3, podendo ter a participação da calicreína 11 nesses pacientes e explicar o mecanismo de

relação entre obesidade e câncer de mama. Na literatura, não há estudos relacionando a calicreína 11 ao grau de obesidade e à influência da perda de peso. Da mesma forma, não encontramos evidências científicas, relacionando a sua expressão ao metabolismo da insulina. Isto nos sugere que embora esta proteína esteja presente nos pacientes com obesidade grave e hiperinsulinemia, mais estudos serão necessários na tentativa de elucidar os potenciais mecanismos envolvendo a severidade da obesidade, hiperinsulinemia e a expressão da calicreína-11, mas a torna um potencial biomarcador carcinogênico nesses pacientes.

### **Considerações finais**

Os pacientes portadores de obesidade apresentam, em seu perfil proteômico, moléculas potencialmente carcinogênicas e a perda de peso, induzida pelo tratamento cirúrgico, promoveu o desaparecimento dessas proteínas, tornando a cirurgia bariátrica um fator protetor para o desenvolvimento de neoplasias. Além disso, identificamos proteínas envolvidas em processos neoplásicos que estão relacionadas à hiperinsulinemia e cujos mecanismos metabólicos não puderam ser evidenciados no presente estudo, abrindo-se uma promissora oportunidade para novos trabalhos que possam envolver outras áreas das ciências ômicas, como a metabolômica, a fim de identificar os metabólitos envolvidos nessas reações favorecedoras do desenvolvimento tumoral. Por fim, a cirurgia, no seu arsenal de benefícios relacionados à obesidade, mostra-se como uma promissora alternativa para os pacientes portadores de obesidade na prevenção do câncer.

## *Conclusão*

Diante dos resultados, podemos concluir na amostra estudada, que foram identificadas proteínas potencialmente carcinogênicas nos pacientes portadores de obesidade: Receptor da apolipoproteína B, Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas, Trombospondina- 2, receptor da Lipoproteína de baixa densidade, Transtirretina e a Podoplanina;

A perda de peso induzida pelas técnicas cirúrgicas DGYR e gastrectomia vertical promoveu a remissão significativa dessas proteínas, independente do grau de obesidade e da concentração de insulina;

A mudança nos níveis de insulina influenciou na ausência de expressão da Apolipoproteína A-1 após a cirurgia. A ausência desta proteína após a cirurgia não ocorreu devido ao peso;

A caliceína 11 não sofreu influência nem do peso e nem da concentração de insulina, permanecendo hiperexpressa no pós-operatório.

## *Referências*

1. World Health Organization, 2013. Global strategy on diet, physical activity and health. Disponível em: [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight\\_text/en/index.html](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/index.html).
2. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA*. 2007 Nov 7;298(17):2028-37.
3. Brasil – MS – Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>
4. Brasil- Instituto Nacional do Câncer – Estimativa de câncer para 2010, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>
5. World Health Organization, 2013. Health topics, Cancer. Disponível em: [http://www.who.int/gho/ncd/mortality\\_morbidity/cancer\\_text/en/index.html](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/index.html)
6. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003 Apr 24;348(17):1625-38.
7. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2004 Aug;4(8):579-91.
8. Larsson SC, Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*. 2007 Sep;86(3):556-65.
9. International Agency for Research on Cancer. Weight Control and Physical Activity, Volume 6 Lyon: International Agency for Research Cancer 2002:1-315, 30-4.
10. Kaidar-Person O, Bar-Sela G, Person B. The two major epidemics of the twenty-first century: obesity and cancer. *Obes Surg*. 2011 Nov;21(11):1792-7.
11. Basen-Engquist K, Chang M. Obesity and cancer risk: recent review and evidence. *Curr Oncol Rep*. 2011 Feb;13(1):71-6.
12. Pischon T, Nöthlings U, Boeing H. Obesity and cancer. *Proc Nutr Soc*. 2008 May;67(2):128-45.
13. Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and cancer. *Oncologist*. 2010;15(6):556-65.
14. Siegel EM, Ulrich CM, Poole EM, Holmes RS, Jacobsen PB, Shibata D. The effects of obesity and obesity-related conditions on colorectal cancer prognosis. *Cancer Control*. 2010 Jan;17(1):52-7.
15. Reeves GK, Pirie K, Beral V, et al. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ*. 2007 Dec 1;335(7630):1134.

16. Ryan AM, Duong M, Healy L, Ryan SA, Parekh N, Reynolds JV, Power DG. Obesity, metabolic syndrome and esophageal adenocarcinoma: epidemiology, etiology and new targets. *Cancer Epidemiol*. 2011 Aug;35(4):309-19.
17. Gukovsky I, Li N, Todoric J, Gukovskaya A, Karin M. Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(6):1199-209.e4.
18. Bergström A, Hsieh CC, Lindblad P, Lu CM, Cook NR, Wolk A. Obesity and renal cell cancer--a quantitative review. *Br J Cancer*. 2001 Sep 28;85(7):984-90.
19. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol*. 2012 Mar;56(3):704-13.
20. Vongsuvan R, George J, Qiao L, van der Poorten D. Visceral adiposity in gastrointestinal and hepatic carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2013 Mar 1;330(1):1-10.
21. Roberts DL, Dive C, Renehan AG. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. *Annu Rev Med*. 2010;61:301-16.
22. Renehan AG, Frystyk J, Flyvbjerg A. Obesity and cancer risk: the role of the insulin-IGF axis. *Trends Endocrinol Metab*. 2006 Oct;17(8):328-36.
23. Louie SM, Roberts LS, Nomura DK. Mechanisms linking obesity and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1831(10):1499-508.
24. Prieto-Hontoria PL, Pérez-Matute P, Fernández-Galilea M, Bustos M, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Role of obesity-associated dysfunctional adipose tissue in cancer: a molecular nutrition approach. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jun;1807(6):664-78.
25. Cottam D, Fisher B, Ziemba A, Atkinson J, Grace B, Ward DC, et al. Tumor growth factor expression in obesity and changes in expression with weight loss: another cause of increased virulence and incidence of cancer in obesity. *Surg Obes Relat Dis*. 2010 Sep-Oct;6(5):538-41.
26. Moulin CM, Rizzo LV, Halpern A. Effect of surgery-induced weight loss on immune function. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2008 Oct;2(5):617-9.
27. Donohoe CL, Pidgeon GP, Lysaght J, Reynolds JV. Obesity and gastrointestinal cancer. *Br J Surg*. 2010; 97:628-42.
28. Perks CM, Holly JM. Hormonal mechanisms underlying the relationship between obesity and breast cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011 Sep;40(3):485-507, vii.

29. Bråkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhiotovskiy B, et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 24;101(8):2476-81.
30. Kamigaki M, Sakaue S, Tsujino I, Ohira H, Ikeda D, Itoh N, et al. Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jan 13;339(2):624-32.
31. Hofker M, Wijmenga C. A supersized list of obesity genes. *Nat Genet*. 2009 Feb;41(2):139-40.
32. Sjöström L, Gummesson A, Sjöström CD, Narbro K, Peltonen M, Wedel H, et al. Swedish Obese Subjects Study. Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial. *Lancet Oncol*. 2009 Jul;10(7):653-62.
33. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D. Trends in mortality in bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Surgery*. 2007;147:621-35.
34. Conselho Federal de Medicina B. Resolução N° 1.942/2010. Estabelece normas seguras para o tratamento cirúrgico da obesidade mórbida, definindo indicações, procedimentos aceitos e equipe. *Diário Oficial da União, Brasil*, em 12 de fevereiro de 2010; seção I, p. 72. 2010.
35. Pories WJ, Dohm LG, Mansfield CJ. Beyond the BMI: the search for better guidelines for bariatric surgery. *Obesity*. 2010;18(5):865-71.
36. Adams TD, Gress RE, Smith SC, Halverson RC, Simper SC, Rosamond WD, Lamonte MJ, Stroup AM, Hunt SC. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med*. 2007 Aug 23;357(8):753-61.
37. Ostlund MP, Lu Y, Lagergren J. Risk of obesity-related cancer after obesity surgery in a population-based cohort study. *Ann Surg*. 2010 Dec;252(6):972-6.
38. Dixon JB, Schachter LM, O'Brien PE, Jones K, Grima M, Lambert G, et al. Surgical vs conventional therapy for weight loss treatment of obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2012 Sep 19;308(11):1142-9.
39. Li JF, Lai DD, Ni B, Sun KX. Comparison of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass with laparoscopic sleeve gastrectomy for morbid obesity or type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Can J Surg*. 2013 Dec;56(6):E158-64.

40. Benaiges D, Flores Le-Roux JA, Pedro-Botet J, Chillarón JJ, Renard M, Parri A, et al. Sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass are equally effective in correcting insulin resistance. *Int J Surg*. 2013;11(4):309-13.
41. Chuthapisith S, Layfield R, Kerr ID, Eremin O. Principles of proteomics and its applications in cancer. *Surgeon*. 2007 Feb;5(1):14-22.
42. Jain KK. Role of oncoproteomics in the personalized management of cancer. *Expert Rev Proteomics*. 2004 Jun;1(1):49-55.
43. Kočevár N, Hudler P, Komel R. The progress of proteomic approaches in searching for cancer biomarkers. *N Biotechnol*. 2013 Mar 25;30(3):319-26.
44. Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Esteve E, et al. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Jan;18(1):13-20.
45. Pérez-Pérez R, García-Santos E, Ortega-Delgado FJ, López JA, Camafeita E, Ricart W, et al. Attenuated metabolism is a hallmark of obesity as revealed by comparative proteomic analysis of human omental adipose tissue. *J Proteomics*. 2012 Jan 4;75(3):783-95.
46. Oberbach A, von Bergen M, Blüher S, Lehmann S, Till H. Combined serum proteomic and metabolomic profiling after laparoscopic sleeve gastrectomy in children and adolescents. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2012 Mar;22(2):184-8.
47. Oberbach A, Blüher M, Wirth H, Till H, Kovacs P, Kullnick Y, et al. Combined proteomic and metabolomic profiling of serum reveals association of the complement system with obesity and identifies novel markers of body fat mass changes. *J Proteome Res*. 2011 Oct 7;10(10):4769-88.
48. Dalmas E, Rouault C, Abdenmour M, Rovere C, Rizkalla S, Bar-Hen A, et al. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am J Clin Nutr*. 2011 Aug;94(2):450-8.
49. Culnan DM, Cooney RN, Stanley B, Lynch CJ. Apolipoprotein A-IV, a putative satiety/antiatherogenic factor, rises after gastric bypass. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Jan;17(1):46-52.
50. Trak-Smayra V, Dargere D, Noun R, Albuquerque M, Yaghi C, Gannagé-Yared MH, et al. Serum proteomic profiling of obese patients: correlation with liver pathology and evolution after bariatric surgery. *Gut*. 2009 Jun;58(6):825-32.

51. Sirin O, Kolonin MG. Treatment of obesity as a potential complementary approach to cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2013 Jun;18(11-12):567-73.
52. Monteiro CA, Moura EC, Conde WL, Popkin BM. Socioeconomic status and obesity in adult populations of developing countries: a review. *Bull World Health Organ*. 2004 Dec;82(12):940-6.
53. Pesquisa de Orçamento Familiar 2008-2009; Disponível:  
[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_encaa/pof\\_20082009\\_encaa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf)
54. Vigitel Brasil 2006: protective and risk factors for chronic diseases by telephone survey; Disponível:[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio\\_vigitel\\_2006\\_marco\\_2007.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_vigitel_2006_marco_2007.pdf)
55. Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.132 p.: il. – (Série G. Estatística e Informação em Saúde); Disponível:[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Ago/22/vigitel\\_2011\\_final\\_0812.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Ago/22/vigitel_2011_final_0812.pdf)
56. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Apr;50(2):216-29.
57. Yang W, Kelly T, He J. Genetic epidemiology of obesity. *Epidemiol Rev*. 2007;29:49-61.
58. Region WWP. International Association for the Study of Obesity, and International Obesity Taskforce: The Asian-Pacific Perspective: Redefining Obesity and Its Treatment. Geneva, Switzerland, WHO Western Pacific Region. 2000.
59. Bahia L, Coutinho ES, Barufaldi LA, Abreu Gde A, Malhão TA, de Souza CP, et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2012 Jun 18; 12:440.
60. Renehan AG. Bariatric surgery, weight reduction, and cancer prevention. *Lancet Oncol*. 2009 Jul;10(7):640-1.
61. Anderson AS, Caswell S. Obesity management - an opportunity for cancer prevention. *Surgeon*. 2009 Oct;7(5):282-5.
62. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008 Feb 16;371(9612):569-78.

63. Teucher B, Rohrmann S, Kaaks R. Obesity: focus on all-cause mortality and cancer. *Maturitas*. 2010 Feb;65(2):112-6.
64. Wiseman M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc*. 2008 Aug;67(3):253-6.
65. Matthews CE, Sui X, LaMonte MJ, Adams SA, Hébert JR, Blair SN. Metabolic syndrome and risk of death from cancers of the digestive system. *Metabolism*. 2010 Aug;59(8):1231-9.
66. Inoue M, Iwasaki M, Otani T, Sasazuki S, Noda M, Tsugane S. Diabetes mellitus and the risk of cancer: results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Arch Intern Med*. 2006 Sep 25;166(17):1871-7.
67. Martinelli CE Jr, Custódio RJ, Aguiar-Oliveira MH. Physiology of the GH-IGF axis. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Jul;52(5):717-25.
68. Chen JW, Højlund K, Beck-Nielsen H, Sandahl Christiansen J, Orskov H, Frystyk J. Free rather than total circulating insulin-like growth factor-I determines the feedback on growth hormone release in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jan; 90(1):366-71.
69. Sandhu MS, Dunger DB, Giovannucci EL. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Jul 3;94(13):972-80.
70. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb 24;123(3191):309-14.
71. Vainio H, Kaaks R, Bianchini F. Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *Eur J Cancer Prev*. 2002 Aug;11 Suppl 2:S94-100.
72. Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR, Liu K. Colorectal cancer mortality and factors related to the insulin resistance syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Apr;11(4):385-91.
73. Amling CL, Riffenburgh RH, Sun L, Moul JW, Lance RS, Kusuda L, et al. Pathologic variables and recurrence rates as related to obesity and race in men with prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol*. 2004 Feb 1;22(3):439-45.

74. Barone BB, Yeh HC, Snyder CF, Peairs KS, Stein KB, Derr RL, et al. Long-term all-cause mortality in cancer patients with preexisting diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2008 Dec 17; 300 (23):2754-64.
75. Mu N, Zhu Y, Wang Y, Zhang H, Xue F. Insulin resistance: a significant risk factor of endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2012 Jun; 125 (3):751-7.
76. Liu Z, Yan R, Al-Salman A, Shen Y, Bu Y, Ma J, et al. Epidermal growth factor induces tumour marker AKR1B10 expression through activator protein-1 signalling in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem J*. 2012 Mar 1; 442 (2):273-82.
77. Bao B, Wang Z, Li Y, Kong D, Ali S, Banerjee S, et al. The complexities of obesity and diabetes with the development and progression of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr; 1815 (2):135-46.
78. Morita T, Tabata S, Mineshita M, Mizoue T, Moore MA, Kono S. The metabolic syndrome is associated with increased risk of colorectal adenoma development: the Self-Defense Forces health study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005 Oct-Dec;6(4):485-9.
79. Hancke K, Grubeck D, Hauser N, Kreienberg R, Weiss JM. Adipocyte fatty acid-binding protein as a novel prognostic factor in obese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jan;119(2):367-7.
80. An W, Bai Y, Deng SX, Gao J, Ben QW, Cai QC, et al. Adiponectin levels in patients with colorectal cancer and adenoma: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*. 2012 Mar;21(2):126-33.
81. Hoda MR, Popken G. Mitogenic and anti-apoptotic actions of adipocyte-derived hormone leptin in prostate cancer cells. *BJU Int*. 2008 Aug;102(3):383-8.
82. Cheng SP, Yin PH, Chang YC, Lee CH, Huang SY, Chi CW. Differential roles of leptin in regulating cell migration in thyroid cancer cells. *Oncol Rep*. 2010 Jun;23(6):1721-7.
83. Ptak A, Kolaczowska E, Gregoraszczyk EL. Leptin stimulation of cell cycle and inhibition of apoptosis gene and protein expression in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Endocrine*. 2013 Apr;43(2):394-403.
84. Drew JE. Molecular mechanisms linking adipokines to obesity-related colon cancer: focus on leptin. *Proc Nutr Soc*. 2012 Feb;71(1):175-80.
85. Wu MH, Chou YC, Chou WY, Hsu GC, Chu CH, Yu CP, et al. Circulating levels of leptin, adiposity and breast cancer risk. *Br J Cancer*. 2009 Feb 24;100(4):578-82.

86. Sharma D, Saxena NK, Vertino PM, Anania FA. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Jun;13(2):629-40.
87. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-45.
88. Kulbe H, Thompson R, Wilson JL, Robinson S, Hagemann T, Fatah R, et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2007 Jan 15;67(2):585-92.
89. Katiyar SK, Meeran SM. Obesity increases the risk of UV radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- $\kappa$ B signaling. *Free Radic Biol Med*. 2007 Jan 15;42(2):299-310.
90. Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res*. 2004 Mar 15;64(6):2070-5.
91. Nomura DK, Long JZ, Niessen S, Hoover HS, Ng SW, Cravatt BF. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell*. 2010 Jan 8;140(1):49-61.
92. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. 2011 Oct 30;17(11):1498-503.
93. Zhang Y, Daquinag AC, Amaya-Manzanares F, Sirin O, Tseng C, Kolonin MG. Stromal progenitor cells from endogenous adipose tissue contribute to pericytes and adipocytes that populate the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2012 Oct 15;72(20):5198-208.
94. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb; 9(2):162-76.
95. Yamamoto S, Nakagawa T, Matsushita Y, Kusano S, Hayashi T, Irokawa M, et al. Visceral fat area and markers of insulin resistance in relation to colorectal neoplasia. *Diabetes Care*. 2010 Jan;33(1):184-9.
96. Kim GW, Lin JE, Waldman SA. GUCY2C: at the intersection of obesity and cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2013 Apr;24(4):165-73.
97. MacDonald K, Porter GA, Guernsey DL, Zhao R, Casson AG. A polymorphic variant of the insulin-like growth factor type I receptor gene modifies risk of obesity for esophageal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol*. 2009 Jul;33(1):37-40.

98. Videira RS, Deboni MCZ, Araújo CAS, Okamoto AC, Melhado RM. Oncogenes e desenvolvimento de câncer. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar.* 2002;6(1):71-6.
99. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Dec;28(3-4):369-78.
100. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 2008 Jan 31;358(5):502-11.
101. Csontos Z, Nádasi E, Csejtei A, Illényi L, Kassai M, Lukács L, et al. Oncogene and tumor suppressor gene expression changes in the peripheral blood leukocytes of patients with colorectal cancer. *Tumori.* 2008 Jan-Feb;94(1):79-82.
102. Guttmacher AE, Collins FS. Welcome to the genomic era. *N Engl J Med.* 2003 Sep 4;349(10):996-8.
103. Nambiar PR, Gupta RR, Misra V. An "Omics" based survey of human colon cancer *Mutat Res.* 2010 Nov 10;693(1-2):3-18.
104. Brandacher G, Golderer G, Kienzl K, Werner ER, Margreiter R, Weiss HG. Potential applications of global protein expression analysis (proteomics) in morbid obesity and bariatric surgery. *Obes Surg.* 2008 Jul;18(7):905-10.
105. German DC, Gurnani P, Nandi A, Garner HR, Fisher W, Diaz-Arrastia R, et al. Serum biomarkers for Alzheimer's disease: proteomic discovery. *Biomed Pharmacother.* 2007 Aug;61(7):383-9.
106. Ryoo SW, Park YK, Park SN, Shim YS, Liew H, Kang S, et al. Comparative proteomic analysis of virulent Korean Mycobacterium tuberculosis K-strain with other mycobacteria strain following infection of U-937 macrophage. *J Microbiol.* 2007 Jun;45(3):268-71.
107. Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson IW, Weiler T, Sangster K, et al. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Jan;15(1):219-27.
108. Maurya P, Meleady P, Dowling P, Clynes M. Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. *Anticancer Res.* 2007 May-Jun;27(3A):1247-55.
109. Whiteaker JR, Lin C, Kennedy J, Hou L, Trute M, Sokal I, et al. A targeted proteomics-based pipeline for verification of biomarkers in plasma. *Nat Biotechnol.* 2011 Jun 19;29(7):625-34.
110. Felix K, Fakelman F, Hartmann D, Giese NA, Gaida MM, Schnölzer M, et al. Identification of serum proteins involved in pancreatic cancer cachexia. *Life Sci.* 2011 Jan 31;88(5-6):218-25.

111. Yu KH, Rustgi AK, Blair IA. Characterization of proteins in human pancreatic cancer serum using differential gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2005 Sep-Oct;4(5):1742-51.
112. Jimenez CR, Knol JC, Meijer GA, Fijneman RJ. Proteomics of colorectal cancer: overview of discovery studies and identification of commonly identified cancer-associated proteins and candidate CRC serum markers. *J Proteomics.* 2010 Sep 10;73(10):1873-95.
113. Hamelin C, Cornut E, Poirier F, Pons S, Beaulieu C, Charrier JP, et al. Identification and verification of heat shock protein 60 as a potential serum marker for colorectal cancer. *FEBS J.* 2011 Dec;278(24):4845-59.
114. Helgason HH, Engwegen JY, Zapatka M, Vincent A, Cats A, Boot H, et al. Identification of serum proteins as prognostic and predictive markers of colorectal cancer using surface enhanced laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Oncol Rep.* 2010 Jul;24(1):57-64.
115. Hung KE, Faca V, Song K, Sarracino DA, Richard LG, Krastins B, Forrester S, et al. Comprehensive proteome analysis of an Apc mouse model uncovers proteins associated with intestinal tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009 Mar;2(3):224-33.
116. Ward DG, Suggett N, Cheng Y, Wei W, Johnson H, Billingham LJ, et al. Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis. *Br J Cancer.* 2006 Jun 19;94(12):1898-905.
117. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Oct;7(10):763-77.
118. Zeng Z, Hincapie M, Pitteri SJ, Hanash S, Schalkwijk J, Hogan JM, et al. A proteomics platform combining depletion, multi-lectin affinity chromatography (M-LAC), and isoelectric focusing to study the breast cancer proteome. *Anal Chem.* 2011 Jun 15;83(12):4845-54.
119. Zhang G, Sun X, Lv H, Yang X, Kang X. Serum amyloid A: A new potential serum marker correlated with the stage of breast cancer. *Oncol Lett.* 2012 Apr 1;3(4):940-944.
120. Gonçalves A, Esterni B, Bertucci F, Sauvan R, Chabannon C, Cubizolles M, et al. Postoperative serum proteomic profiles may predict metastatic relapse in high-risk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Oncogene.* 2006 Feb 16;25(7):981-9.
121. Valle A, Sastre-Serra J, Pol C, Miró AM, Oliver J, Roca P. Proteomic analysis of MCF-7 breast cancer cell line exposed to leptin. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2011;34(3):147-57.

- 122.Huang LJ, Chen SX, Huang Y, Luo WJ, Jiang HH, Hu QH, et al. Proteomics-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase as a novel serum markers of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006 Oct;54(1):87-94.
- 123.Bignotti E, Ragnoli M, Zanotti L, Calza S, Falchetti M, Lonardi S, et al. Diagnostic and prognostic impact of serum HE4 detection in endometrial carcinoma patients. *Br J Cancer*. 2011 Apr 26;104(9):1418-25.
- 124.Cocco E, Bellone S, El-Sahwi K, Cargnelutti M, Buza N, Tavassoli FA, et al. Serum amyloid A: a novel biomarker for endometrial cancer. *Cancer*. 2010 Feb 15;116(4):843-51.
- 125.Santin AD, Diamandis EP, Bellone S, Marizzoni M, Bandiera E, Palmieri M, et al. Overexpression of kallikrein 10 (hK10) in uterine serous papillary carcinomas. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 May;194(5):1296-302.
126. Farias-Eisner G, Su F, Robbins T, Kotlerman J, Reddy S, Farias-Eisner R. Validation of serum biomarkers for detection of early- and late-stage endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 2010 Jan;202(1):73.e1-5.
- 127.Takano M, Kikuchi Y, Asakawa T, Goto T, Kita T, Kudoh K, et al. Identification of potential serum markers for endometrial cancer using protein expression profiling. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Mar;136(3):475-81.
- 128.Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett*. 2007 Aug 18;253(2):180-204.
- 129.Hanash S. Progress in mining the human proteome for disease applications. *OMICS*. 2011 Mar;15(3):133-9.
- 130.Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D, et al. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics. *Cytometry A*. 2009 Oct;75(10):816-32.
- 131.Li XH, Li C, Xiao ZQ. Proteomics for identifying mechanisms and biomarkers of drug resistance in cancer. *J Proteomics*. 2011 Nov 18;74(12):2642-9.
- 132.McTiernan A. Obesity and cancer: the risks, science, and potential management strategies. *Oncology (Williston Park)*. 2005 Jun;19(7):871-81; discussion 881-2, 885-6.
- 133.NIH conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. Consensus Development Conference Panel. *Ann Intern Med*. 1991 Dec 15;115(12):956-61.
- 134.Christou NV, Lieberman M, Sampalis F, Sampalis JS. Bariatric surgery reduces cancer risk in morbidly obese patients. *Surg Obes Relat Dis*. 2008 Nov-Dec;4(6):691-5.

135. Adams TD, Hunt SC. Cancer and obesity: effect of bariatric surgery. *World J Surg* 2009 Oct;33(10):2028-33.
136. Adams TD, Stroup AM, Gress RE, Adams KF, Calle EE, Smith SC, et al. Cancer incidence and mortality after gastric bypass surgery. *Obesity*. 2009 Apr;17(4):796-802.
137. Buchwald H, Oien DM. Bariatric surgery worldwide 2011. *Obes Surg*. 2013 Apr;23(4):427-36.
138. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2004 Oct 13;292(14):1724-37.
139. Madura JA 2nd, Dibaise JK. Quick fix or long-term cure? Pros and cons of bariatric surgery. *F1000 Med Rep*. 2012;4:19.
140. Roa PE, Kaidar-Person O, Pinto D, Cho M, Szomstein S, Rosenthal RJ. Laparoscopic sleeve gastrectomy as treatment for morbid obesity: technique and short-term outcome. *Obes Surg*. 2006 Oct;16(10):1323-6.
141. Karcz WK, Krawczykowski D, Kuesters S, Marjanovic G, Kulemann B, Grobe H, et al. Influence of Sleeve Gastrectomy on NASH and Type 2 Diabetes Mellitus. *J Obes*. 2011; 2011:765473.
142. Hady HR, Dadan J, Gołaszewski P, Safiejko K. Impact of laparoscopic sleeve gastrectomy on body mass index, ghrelin, insulin and lipid levels in 100 obese patients. *Wideochir Inne Tech Malo Inwazyjne*. 2012 Dec;7(4):251-9.
143. Iannelli A, Anty R, Schneck AS, Tran A, Hébuterne X, Gugenheim J. Evolution of low-grade systemic inflammation, insulin resistance, anthropometrics, resting energy expenditure and metabolic syndrome after bariatric surgery: a comparative study between gastric bypass and sleeve gastrectomy. *J Visc Surg*. 2013 Sep;150(4):269-75.
144. Yip S, Plank LD, Murphy R. Gastric bypass and sleeve gastrectomy for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of outcomes. *Obes Surg*. 2013 Dec;23(12):1994-2003.
145. Faria SL, Kelly EO, Faria OP. Acompanhamento nutricional pós-cirurgia bariátrica. *Nutrição em pauta*. 2008;91:13-16.
146. Novais PFS, Rases Junior I, Liette CVS, Oliveira MRM. Evolução e classificação do peso corporal em relação aos resultados da cirurgia bariátrica-derivação gástrica em Y de Roux. *Arq Bras Endocrinol metab*. 2010;54(3):303-310.

147. Ferraz EM, Arruda PCL, Bacelar TS, Ferraz AAB, Albuquerque AC. Tratamento cirúrgico da obesidade mórbida. *Rev Col Bras Cir* 2003;30(2):98-105.
148. Ashrafian H, Ahmed K, Rowland SP, Patel VM, Gooderham NJ, Holmes E, et al. Metabolic surgery and cancer: protective effects of bariatric procedures. *Cancer*. 2011 May 1;117(9):1788-99.
149. de Sa VC, Ferraz AA, Campos JM, Ramos AC, Araujo JG Jr, Ferraz EM. Gastric bypass in the treatment of type 2 diabetes in patients with a BMI of 30 to 35 kg/m<sup>2</sup>. *Obes Surg*. 2011 Mar;21(3):283-7.
150. Cândido AC, de Lima Filho JL, Martins DB, Mendes CM, Vieira JR, Ferraz AA. Association of human papillomavirus genomic sequences by polymerase chain reaction in gastric carcinomas in Brazil. *Anal Quant Cytol Histol*. 2013 Feb;35(1):1-6.
151. Onoyama M, Kitadai Y, Tanaka Y, Yuge R, Shinagawa K, Tanaka S, et al. Combining molecular targeted drugs to inhibit both cancer cells and activated stromal cells in gastric cancer. *Neoplasia*. 2013 Dec;15(12):1391-9.
152. Kitadai Y. Cancer-stromal cell interaction and tumor angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Microenviron*. 2010;3:109–116.
153. Cheng J, Ye H, Liu Z, Xu C, Zhang Z, Liu Y, et al. Platelet-derived growth factor-BB accelerates prostate cancer growth by promoting the proliferation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2013 Jul;114(7):1510-8.
154. Kitamoto S, Yokoyama S, Higashi M, Yamada N, Takao S, Yonezawa S. MUC1 enhances hypoxia-driven angiogenesis through the regulation of multiple proangiogenic factors. *Oncogene*. 2013 Sep 26;32(39):4614-21.
155. Schito L, Rey S, Tafani M, Zhang H, Wong CC, Russo A, et al. Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 2;109(40):E2707-16.
156. Nair DG, Miller KG, Lourenssen SR, Blennerhassett MG. Inflammatory cytokines promote growth of intestinal smooth muscle cells by induced expression of PDGF-R $\beta$ . *J. Cell Mol Med*. 2014 Jan 13. [Epub ahead of print]
157. Seki N, Toh U, Kawaguchi K, Ninomiya M, Koketsu M, Watanabe K, et al. Tricin inhibits proliferation of human hepatic stellate cells in vitro by blocking tyrosine phosphorylation of PDGF receptor and its signaling pathways. *J Cell Biochem*. 2012 Jul;113(7):2346-55.

158. Keerl S, Gehmert S, Song YH, Alt E. PDGF and bFGF modulate tube formation in adipose tissue-derived stem cells. *Ann Plast Surg.* 2010 Apr;64(4):487-90.
159. Cheng S, Li Y, Yang Y, Feng D, Yang L, Ma Q, et al. Breast cancer-derived K172N, D301V mutations abolish Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1 inhibition of platelet-derived growth factor receptor signaling. *FEBS Lett.* 2013 Oct 11;587(20):3289-95.
160. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 May;29(5):630-8.
161. Xian X, Håkansson J, Ståhlberg A, Lindblom P, Betsholtz C, Gerhardt H, et al. Pericytes limit tumor cell metastasis. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):642-51.
162. Whiteman EL, Chen JJ, Birnbaum MJ. Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates glucose transport in 3T3-L1 adipocytes overexpressing PDGF receptor by a pathway independent of insulin receptor substrates. *Endocrinology.* 2003 Sep;144(9):3811-20.
163. Yuasa T, Kakuhata R, Kishi K, Obata T, Shinohara Y, Bando Y, et al. Platelet-derived growth factor stimulates glucose transport in skeletal muscles of transgenic mice specifically expressing platelet-derived growth factor receptor in the muscle, but it does not affect blood glucose levels. *Diabetes.* 2004 Nov;53(11):2776-86.
164. Raines SM, Richards OC, Schneider LR, Schueler KL, Rabaglia ME, Oler AT, et al. Loss of PDGF-B activity increases hepatic vascular permeability and enhances insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Sep;301(3):E517-26.
165. de Fraipont F, Nicholson AC, Feige JJ, Van Meir EG. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med.* 2001 Sep;7(9):401-7.
166. Vallbo C, Damber JE. Thrombospondins, metallo proteases and thrombospondin receptors messenger RNA and protein expression in different tumour sublines of the Dunning prostate cancer model. *Acta Oncol.* 2005;44(3):293-8.
167. Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, Luider TM, Willemsen R, Severijnen LA, et al. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 Jul;31(1):114-21.
168. Oganessian A, Armstrong LC, Migliorini MM, Strickland DK, Bornstein P. Thrombospondins use the VLDL receptor and a nonapoptotic pathway to inhibit cell division in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell.* 2008 Feb;19(2):563-71.
169. Semenza, G. "Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1". *Biochemical pharmacology.* Oxford. 64(5-6):993-998.

170. Bergers G., Benjamin LE. "Tumorigenesis and the angiogenic switch". *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3(6):401-410.
171. Maeda K, Nishiguchi Y, Kang S, et al: Expression of thrombospondin-1 inversely correlated with tumor vascularity and hematogenous metastasis in colon cancer. *Oncology Reports* 2001;8(4):763-766.
172. Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, Tsuchida T, Tomii Y, Osada H, et al. Interleukin 10 expression is correlated with thrombospondin expression and decreased vascular involvement in colon cancer. *Int J Oncol*. 2001 Mar;18(3):487-91.
173. Reaven GM, Abbasi F, Bernhart S, Coulston A, Darnell B, Dashti N, et al. Insulin resistance, dietary cholesterol, and cholesterol concentration in postmenopausal women. *Metabolism*. 2001 May;50(5):594-7.
174. Liu X, Wang Y, Qu H, Hou M, Cao W, Ma Z, et al. Associations of polymorphisms of rs693 and rs1042031 in apolipoprotein B gene with risk of breast cancer in Chinese. *Jpn J Clin Oncol*. 2013 Apr;43(4):362-8.
175. Llanos AA, Makambi KH, Tucker CA, Wallington SF, Shields PG, Adams-Campbell LL. Cholesterol, lipoproteins, and breast cancer risk in African American women. *Ethn Dis* 2012;22:281-7.
176. Liu J, Xu A, Lam KS, Wong NS, Chen J, Shepherd PR, et al. Cholesterol-induced mammary tumorigenesis is enhanced by adiponectin deficiency: role of LDL receptor upregulation. *Oncotarget*. 2013 Oct;4(10):1804-18.
177. Cal R, Castellano J, Revuelta-López E, Aledo R, Barriga M, Farré J, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesteryl ester uptake and accumulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2012 Jun 1;94(3):469-79.
178. Shen GM, Zhao YZ, Chen MT, Zhang FL, Liu XL, Wang Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes LDL and VLDL uptake through inducing VLDLR under hypoxia. *Biochem J*. 2012 Jan 15;441(2):675-83.
179. Watanabe T, Shibata M, Nishiyama H, Soeda S, Furukawa S, Gonda K, et al. Serum levels of rapid turnover proteins are decreased and related to systemic inflammation in patients with ovarian cancer. *Oncol Lett*. 2014 Feb;7(2):373-377.
180. Nosov V, Su F, Amneus M, Birrer M, Robins T, Kotlerman J, et al. Validation of serum biomarkers for detection of early-stage ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 Jun;200(6):639.e1-5.

- 181.Kozak KR, Su F, Whitelegge JP, Faull K, Reddy S, Farias-Eisner R. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics*. 2005 Nov;5(17):4589-96.
- 182.Shindo K, Aishima S, Ohuchida K, Fujiwara K, Fujino M, Mizuuchi Y, et al. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts enhances tumor progression of invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Mol Cancer*. 2013 Dec 20;12(1):168. [Epub ahead of print]
- 183.Arencibia JM, Martín S, Pérez-Rodríguez FJ, Bonnin A. Gene expression profiling reveals overexpression of TSPAN13 in prostate cancer. *Int J Oncol*. 2009 Feb;34(2):457-63.
- 184.Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 20;101(3):811-6.
- 185.Hendrix ND, Wu R, Kuick R, Schwartz DR, Fearon ER, Cho KR. Fibroblast growth factor 9 has oncogenic activity and is a downstream target of Wnt signaling in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res*. 2006 Feb 1;66(3):1354-62.
- 186.Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell*. 2006 Dec;10(6):529-41.
- 187.Korkola JE, Houldsworth J, Chadalavada RS, Olshen AB, Dobrzynski D, Reuter VE, et al. Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13.31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):820-7.
- 188.Schroeder F, Atshaves BP, Starodub O, Boedeker AL, Smith RR 3rd, Roths JB, et al. Expression of liver fatty acid binding protein alters growth and differentiation of embryonic stem cells. *Mol Cell Biochem*. 2001 Mar;219(1-2):127-38.
- 189.Petrova DT, Asif AR, Armstrong VW, Dimova I, Toshev S, Yaramov N, et al. Expression of chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1) and tumor protein D52 (TPD52) as potential biomarkers for colorectal cancer. *Clin Biochem*. 2008 Oct;41(14-15):1224-36.
- 190.Hammamieh R, Chakraborty N, Das R, Jett M. Molecular impacts of antisense complementary to the liver fatty acid binding protein (FABP) mRNA in DU 145 prostate cancer cells in vitro. *J Exp Ther Oncol*. 2004 Oct;4(3):195-202.

191. Bouwman FG, Claessens M, van Baak MA, Noben JP, Wang P, Saris WH, et al. The physiologic effects of caloric restriction are reflected in the in vivo adipocyte-enriched proteome of overweight/obese subjects. *J Proteome Res.* 2009 Dec;8(12):5532-40.
192. Han C, Zhang HT, Du L, Liu X, Jing J, Zhao X, et al. Serum levels of leptin, insulin, and lipids in relation to breast cancer in china. *Endocrine.* 2005 Feb;26(1):19-24.
193. Sung MK, Bae YJ. Linking obesity to colorectal cancer: application of nutrigenomics. *Biotechnol J.* 2010 Sep;5(9):930-41.
194. Tasdemir A, Oguz A, Eroglu C, Cihan YB, Turak EE, Karaman H, Soyuer S. Is human kallikrein-11 in gastric cancer treated with surgery and adjuvant chemoradiotherapy associated with survival? *Pathol Res Pract.* 2013 Dec;209(12):779-83.
195. Sano A, Sangai T, Maeda H, Nakamura M, Hasebe T, Ochiai A. Kallikrein 11 expressed in human breast cancer cells releases insulin-like growth factor through degradation of IGFBP-3. *Int J Oncol.* 2007 Jun;30(6):1493-8.

## *Apêndices*

## Apêndice 1

### Termo de consentimento livre e esclarecido

Este é um convite para você participar da pesquisa: “Avaliação de biomarcadores no processo da carcinogênese em pacientes portadores de Obesidade Mórbida submetidos à gastroplastia”, que é coordenada pela Dra. Luciana Teixeira de Siqueira. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo para o senhor (a).

Essa pesquisa visa ao estudo da expressão de proteínas potencialmente carcinogênicas em pacientes obesos com indicação de tratamento cirúrgico e terá o objetivo de melhor compreender os mecanismos do desenvolvimento de neoplasias na obesidade e a eficácia do tratamento cirúrgico em reduzir o risco de câncer nesses pacientes. Uma melhor compreensão da biologia molecular ajudará no entendimento da carcinogênese na obesidade, bem como na melhora do diagnóstico e tratamento precoce.

Caso decida aceitar o convite, você será submetido(a) ao(s) seguinte(s) procedimentos: Coleta de pequena quantidade de sangue antes da cirurgia (1 vez) e até 12 meses após a cirurgia para obesidade em quatro momentos: 1º mês, 3º mês, 6º mês e 12º mês de pós-operatório. Tal procedimento será realizado no Hospital das Clínicas da UFPE e a análise do material (sangue) será realizada no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.

Este estudo trará benefícios importantes que poderão ter aplicação direta na prevenção e no diagnóstico do câncer relacionado à obesidade. O conhecimento das alterações na expressão dos oncogenes na obesidade poderá ajudar na prevenção e no diagnóstico precoce, podendo ser mais um arsenal para a indicação da cirurgia em pacientes portadores de obesidade grave.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e sua identidade não será revelada publicamente em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

Não existe risco para os pacientes, uma vez que será coletada somente pequena quantidade de sangue para análise nos pacientes com indicação de cirurgia bariátrica. Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente a Dra. Luciana Teixeira de Siqueira, coordenadora da pesquisa, nos telefones: (81)21263654. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE, no endereço Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-901, Tel. 21268588

### Consentimento Livre e Esclarecido:

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa. Estou ciente do exposto acima e, ainda, de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo a minha saúde.

Recife, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura do participante da pesquisa: \_\_\_\_\_

Testemunha 1: \_\_\_\_\_

Testemunha 2: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE 2

Protocolo de Pesquisa: Associação entre obesidade e câncer; estudo proteômico

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_

Telefones: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: F( ) M( )

### 1. PRÉ-OPERATÓRIO

Peso inicial \_\_\_\_\_ Kg Altura \_\_\_\_\_ m<sup>2</sup> IMC \_\_\_\_\_ Kg/m<sup>2</sup>

Doenças associadas:

Diabetes tipo 2: SIM ( ) NÃO ( )

Glicemia inicial \_\_\_\_\_ mg/dl Hg glicada: \_\_\_\_\_

Medicações: Oral ( ) Quantas drogas \_\_\_\_\_

Insulina ( ) Quantas unidades \_\_\_\_\_

Nenhuma ( ) Por que? \_\_\_\_\_

Tempo da doença \_\_\_\_\_

HAS: SIM ( ) NÃO ( )

Medicações em uso: \_\_\_\_\_

Apnéia do sono: SIM ( ) NÃO ( )

Antecedentes

Neoplasia: SIM ( ) NÃO ( )

Tratamento quimio ou radioterápico: SIM ( ) NÃO ( )

Etilismo: SIM ( ) NÃO ( )

Frequência \_\_\_\_\_

Dependência química: SIM ( ) NÃO ( )

Distúrbio psiquiátrico: SIM ( ) NÃO ( )

Qual? \_\_\_\_\_

Medicamentos \_\_\_\_\_

Cirurgia: SIM ( ) NÃO ( )

Quais? \_\_\_\_\_

Laboratório:

Insulina \_\_\_\_\_ mU/L

Perfil de proteínas potencialmente carcinogênicas

### 2. CIRURGIA

DGYR ( ) Gastrectomia vertical (sleeve) ( )

Data da cirurgia \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Idade na cirurgia \_\_\_\_\_

Acesso: laparotomia ( ) Video ( )

Alça alimentar: \_\_\_\_\_ cm Alça biliopancreática \_\_\_\_\_ cm

Complicações: \_\_\_\_\_

### 3. SEGUIMENTO

Data da informação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Tempo pós-operatório \_\_\_\_\_ meses

Peso atual \_\_\_\_\_ Kg IMC atual \_\_\_\_\_ kg/m<sup>2</sup>

Percentual de perda do excesso de peso \_\_\_\_\_ %

***Anexos***



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 140/2010 - CEP/CCS

Recife, 11 de Junho de 2010

Registro do SISNEP FR – 321879

CAAE – 0086.0.172.000-10

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 089/10

**Título: “Avaliação de biomarcadores no processo de carcinogênese em pacientes portadores de Obesidade Mórbida submetidos à gastroplastia”.**

Pesquisador Responsável: Luciana Teixeira de Siqueira

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 10 de Junho de 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

  
Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto  
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A  
Sra. Luciana Teixeira de Siqueira  
Hospital das Clínicas- HC/UFPE