UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
HEMOCENTRO

MESTRADO JUNTO AO PROGRAMA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR – DIFERENCIAÇÃO CELULAR NORMAL E NEOPLASICA

"ESTUDO DOS FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E SOBREVIDA NO CÂNCER DE CÓLON".

ALUNA: Carolina Estevam Martinez
ORIENTADORA: Prof.ª. Dra. Fernanda Maris Peria

Ribeirão Preto
2019

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Martinez, Carolina Estevam

"Estudo dos fatores de crescimento semelhante à insulina e sua associação com características clínico-patológicas e sobrevida no câncer de cólon". Ribeirão Preto, 2019.

60 p.: il.; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP- Área de concentração: Oncologia clínica, células tronco e terapia celular, opção diferenciação celular normal e neoplásica.

Orientador: Peria, Fernanda Maris

1. Câncer de cólon. 2. IGF 1. 3. IGFBP 3. 4. IRS 1. 5. Prognóstico

Título: “Estudo dos fatores de crescimento semelhantes à insulina e sua associação com características clínico-patológicas e sobrevida no câncer de cólon”.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre pelo programa de Oncologia clínica, células-tronco e terapia celular
Área de concentração: Diferenciação celular normal e neoplásica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento Code 001.

Aprovado em: ____/____/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr._____Instituição:_____
Julgamento:_____Assinatura:_____
Prof. Dr. _____Instituição:_____
Julgamento:_____Assinatura:_____
Prof. Dr. _____Instituição:_____
Julgamento:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, ***Elaine Benedetti Martinez*** *e* ***Alberto Estevam Martinez*** *e ao meu noivo* ***Bruno Bertolucci*** *que sempre me estimularam ao crescimento profissional e pessoal, torceram e me apoiaram em todos os momentos e me ensinaram os verdadeiros valores da vida.*

A ***Deus, Jesus e Nossa senhora das Graças,*** *sempre foram minha fortaleza e sempre estiveram me guiando e iluminando meu caminho.*

AGRADECIMENTOS

*A **Profª. Drª. Maria Cristina Foss de Freitas** pela iniciativa e contribuição para me apresentar a Dra. Fernanda e tornar possível este trabalho.*

*Ao **Serviço de Patologia Clínica do HCFMRP-USP,** pelo apoio na realização deste projeto e disponibilidade do material e espaço físico.*

*Ao **Laboratório do Departamento de Patologia e Oncologia clínica da FMRP-USP,** em especial à **Técnica Laura,** pela parceria na realização dos resultados do trabalho, eficiência e disposição para ajudar sempre e à **Rosângela Orlandim Lopes** pela força e empenho em me auxiliar no mundo das técnicas de TMA e imuno-histoquímica.*

*À **Leida Mara de Lima Almeida e Andressa** (Secretária do Serviço de Oncologia Clínica do HCFMRP-USP) pelo companheirismo, profissionalismo e disposição para ajudar em qualquer situação.*

A Secretária de Pós-Graduação do Departamento de Oncologia clínica, células tronco e terapia celular do hemocentro, da FMRP-USP) pela ajuda, contribuição e orientações durante este período da Pós-graduação.

*À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** por oferecer-me toda a estrutura e condições para a realização deste estudo.*

*E a **todos** que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À **Profª. Drª. Fernanda Maris Peria**, uma orientadora extraordinária que se tornou uma amiga, sempre atenciosa e carinhosa, palavras não descrevem a minha gratidão por aceitar me orientar, pela confiança depositada em mim, incentivo, presença, que foram primordiais para continuação e finalização deste trabalho e tantas outras atividades realizadas juntas. Obrigada, por me ensinar tanto. Só tenho uma enorme admiração e carinho por você e os meninos Rafa e Rique.*

*Ao **Profª. Drª. Mariângela Ottoboni Brunaldi** pela parceria neste projeto, dedicação, competência e orientação, por proporcionar a realização das análises laboratoriais sempre de forma atenciosa e amigável, sempre disponível com sua vasta sabedoria auxiliando de todas as maneiras possíveis, muito obrigada, a senhora se tornou muito especial em meu coração.*

*Ao **Prof. Dr. Alfredo Ribeiro Silva**, pela contribuição e parceria neste projeto, que só foi possível torná-lo real graças a disponibilização do laboratório, auxílio da técnica, e apresentação a pessoas que foram fundamentais para desenvolvimento e finalização deste.*

RESUMO

MARTINEZ, CE**. Estudo dos fatores de crescimento semelhante à insulina e sua associação com características clínico-patológicas e sobrevida no câncer de cólon.** 2019. 60f. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: O adenocarcinoma de cólon está entre os tumores mundialmente mais incidentes. Dentre as vias relacionadas com a carcinogênese, alterações na via do fator de crescimento semelhante a insulina já foram detalhadas nos tumores de mama, hepático, pulmão e próstata. Alguns estudos também relacionam essa via, em especifico a proteína IGF1, sua proteína de ligação IGFBP3 e o substrato do receptor de insulina IRS1, com proliferação, sobrevivência, crescimento e apoptose celular. Considerando que o diabetes mellitus é um fator de risco associado ao adenocarcinoma de cólon, consideramos a possibilidade da ativação desta via estar desregulada no adenocarcinoma de cólon, podendo apresentar associação com o prognostico dos pacientes. **Objetivo:** Estudar a relação da expressão proteica de IGF1, IGFBP3 e IRS1 e a suas associações com características clínico-patológicas e de sobrevida no adenocarcinoma de cólon. **Pacientes e Métodos:** Estudo analítico transversal envolvendo uma amostra de conveniência de 91 pacientes com adenocarcinoma de cólon estádios IIb, III e IV. As metodologias utilizadas foram revisão de prontuário médico do paciente quanto aos dados clínicos, sociodemográficos, resultado anatomopatológico e a realização e análise de reações imuno-histoquímicas através do "*tissue micro-array*" (TMA). **Resultados:** Dentre os 91 pacientes estudados, a idade média foi de 61,6 anos (intervalo 28-88); sendo a maioria do sexo feminino (54,5%); pré-diabéticos (57,1%); predominando aqueles com adenocarcinoma localizado no cólon descendente e sigmoide (53,3%) e com estádio clinico-patológico inicial II e III (53,9 %; pT3 em 69,2% e pN1 em 45,1%). No anátomo patológico em 53,9% dos pacientes foi identificada invasão angio-linfatica e, em 63,7% não houve presença de invasão perineural. Dos 91 pacientes, 32 pacientes evoluíram para óbito em um intervalo mínimo de seguimento de 24 meses. Entre os pacientes com diagnóstico de DM2, a maioria não fazia uso de metformina (73,2%). A expressão de IGFBP 3 teve associação significativa com o estadiamento (p=0,01), presença de metástase (p=0,02) e óbito (p=0,01). Ao analisar a sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG) os pacientes com estádio IV apresentavam pior desfecho comparado aos estádios iniciais, conforme previsto pela literatura (p<0,01). A

superexpressão de IGF1 foi associada a uma menor sobrevida livre de progressão nos pacientes estudados ($p<0.01$.) Em análise de sobrevida global, pacientes com expressão negativa de IGFBP-3 apresentaram uma menor sobrevida global ($p<0.01$). Pacientes com tumores pouco diferenciados e indiferenciados tiveram pior prognostico que aqueles com tumores bem diferenciado. A proteína IRS1 não apresentou associações com os critérios clínico-patológicos e de desfecho. **Conclusão:** A expressão positiva do IGF1 foi associada a uma menor sobrevida livre de progressão e a expressão negativa do IGFBP3 esteve associada a uma menor sobrevida global em pacientes com adenocarcinoma.

Palavras-Chave: Câncer de colón, IGF 1, IGFBP 3, IRS 1, Prognóstico.

ABSTRACT

MARTINEZ, EC. **Study of insulin-like growth factors and their association with clinical and pathological features and survival in colon cancer.** 2019. 60 f. master's Dissertation - Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introduction: Colon adenocarcinoma is among the most common tumors worldwide. Among the carcinogenesis-related pathways, changes in the insulin- like growth factor pathway have already been detailed in breast, liver, lung and prostate tumors. Some studies also relate this pathway, specifically IGF1 protein, its IGFBP3 binding protein and insulin receptor substrate IRS1, to cell proliferation, survival, growth and apoptosis. Considering that diabetes mellitus is a risk factor associated with colon adenocarcinoma, we consider that the activation of this pathway may be unregulated in colon adenocarcinoma and may be associated with the prognosis of patients. **Objective:** To study the relationship of protein expression of IGF1, IGFBP3 and IRS1 and their association with clinical and pathological features and survival in colon adenocarcinoma. **Patients and Methods:** Cross-sectional analytical study involving a convenience sample of 91 patients with stage IIb, III and IV colon adenocarcinomas. The methodologies used were the review of the patient's medical records regarding clinical, sociodemographic, anatomopathological findings and the performance and analysis of immunohistochemical reactions using the tissue microarray (TMA). **Results:** Among the 91 patients studied, the mean age was 61.6 years (range 28-88); the majority being female (54.5%); pre-diabetics (57.1%); predominantly those with descending and sigmoid colon adenocarcinoma (53.3%) and with initial clinical and pathological stage II and III (53.9%; pT3 in 69.2% and pN1 in 45.1%). In the pathological anatomy in 53.9% of the patients angio-lymphatic invasion was identified and in 63.7% there was no presence of perineural invasion. Of the 91 patients, 32 patients died within a minimum follow-up of 24 months. Among patients diagnosed with T2DM, most did not use metformin (73.2%). IGFBP 3 expression was significantly associated with staging ($p = 0.01$), presence of metastasis ($p = 0.02$) and death ($p = 0.01$). When analyzing progression free survival (SLP) and overall survival (SG), stage IV patients had worse outcome compared to the initial stages, as predicted by the literature ($p <0.01$). IGF1 overexpression was associated with poor progression-free survival in the studied patients ($p <0.01$.) In overall survival analysis, patients with negative IGFBP-3 expression had a lower overall survival ($p <0.01$). Patients with poorly differentiated and undifferentiated tumors had a worse prognosis than those with well-

differentiated tumors. IRS1 protein was not associated with clinical-pathological and outcome criteria. **Conclusion:** Positive IGF1 expression was associated with shorter progression-free survival and negative IGFBP3 expression was associated with lower overall survival in patients with adenocarcinoma.

Keywords: Colon cancer, IGF 1, IGFBP 3, IRS 1, Prognosis.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICOS 1 e 2. Sobrevida livre de progressão associada as variáveis, classificação TNM e IGF1 através do gráfico de Kaplan – Meier 40

GRÁFICOS 3, 4 e 5. Sobrevida global associada as variáveis, IGFBP3, tipo histológico e classificação TNM, através do gráfico de Kaplan – Meier 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores de exames laboratoriais para diagnóstico do DM2 do HC-FMRP. 27

Tabela 2 – Características dos anticorpos primários. 28

Tabela 3 - Análise imuno-histoquímica por escore. 31

Tabela 4 - Características clínico - patológicas dos pacientes estudados. 34

Tabela 5 - Associação entre a expressão de IGF1, IGFBP3 e IRS1 e a idade ao diagnóstico. 35

Tabela 6 - Associação entre a expressão de IGF1, IGFBP3 e IRS1 e os fatores clínico-patológicos em pacientes com adenocarcinoma de cólon avançado. 36

Tabela 7 - Relação da sobrevida livre de progressão e fatores clínico- patológicos em pacientes com adenocarcinoma de cólon avançado. 38

Tabela 8 – Sobrevida livre de progressão - Modelo de regressão de Cox. 39

Tabela 9 - Relação da sobrevida global e fatores clínico- patológicos em pacientes com adenocarcinoma de colón avançado. 41

Tabela 10 – Sobrevida global - Modelo de regressão de Cox. 42

Tabela 11- Descritiva segundo metástase e associação de variáveis – Teste qui-quadrado. 43

Tabela 12- Metástase – Modelo de regressão logística. 44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Consequências da disfunção metabólica relacionada à resistência à insulina. Adaptado de SHALOMAI. et.al, 2016 [11]. 19

Figura 2 - Via de sinalização AMPK. Adaptado de YANG, J. et.al, 2017 [13]. (19) 21

Figura 3. Consequências do DM2 no cancer. Adaptado de YANG, J. et.al, 2017 [13]. 22

Figura 4 - Sinalização da via do fator de crescimento semelhante à insulina e seu microenvolvimento celular. Adaptado de JUNG. et. al, 2015 [18]. 25

Figura 5 - Diagrama da seleção dos pacientes. 27

Figura 6 - Blocos de parafina correspondente aos fragmentos mais representativos de cada lesão. 30

Figura 7 e 8 - Blocos de TMA para realização da imuno-histoquímica. 30

Figura 9 - Expressão de IGF1, IGFBP3 e IRS1 no adenocarcinoma de cólon avançado. 32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

WHO	*World Health Organization*
CCR	Cancer colorretal
Kras	*v-Kiras2 Kiersten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*
p-53	Proteína citoplasmática 53
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
CCR	Câncer de Cólon e Reto
FCSI	Fatores de crescimento semelhante à insulina
IGF 1	*Insulin-like growth factor 1* - Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IGF 1R	*Insulin – like growth fator receptor 1* – Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 1
IGF 2R	*Insulin – like growth fator receptor 2* – Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 2
IGFBP 3	*Insulin-like growth factor binding protein 3* – Proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina 3
IRS 1	*Insulin receptor substrate 1* – Substrato receptor de insulina 1
IRS 2	*Insulin receptor substrate 2* – Substrato receptor de insulina 2
HDL	*High Density Lipoproteins* – Lipoproteína de alta densidade
IDF	*International Diabetes Federation* – Federação internacional de Diabetes
TNM	*Classification of Malignant Tumours* – Classificação de tumores malignos
AMPK	*Adenosine monophosphate-activated protein kinase* - Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
AMP	*Adenosine monophosphate* – Monofosfato de adenosina
ADP	*Adenosine diphosphate* – Difosfato de adenosina
ATP	*Adenosine triphosphate* – Trifosfato de adenosina
mTORC1	*Mammalian target of rapamycin complex 1-*
mTORC2	*Mammalian target of rapamycin complex 2-*

PI3K	*Phosphatidylinositide 3-kinases* – Fosfoinositídeo 3 – quinase
AKT	*Serine-threonine protein kinase* - *P*roteína quinase específica de serina / treonina
GH	*Growth hormone* – Hormônio de crescimento
GHR	*Growth hormone receptor* – Receptor do hormônio de crescimento
TGF- β	*Transforming growth factor beta* – Fator de transformação do crescimento beta
pSTAT1	*Signal transducer and activator of transcription 1*- Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
RXR- α	*Retinoid X receptor alpha* – Retinóide x receptor alfa
PDK1	*Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme* 1- Piruvato desidrogenase lipoamida quinase isoenzima 1
GSK-3β	*Glycogen synthase kinase 3* β - Glicogênio sintase quinase 3 β
TSC1/2	*Tuberous sclerosis 1/2* - Esclerose tuberosa 1/2
S6K1	*Ribosomal protein S6 kinase beta*-1 - Proteína ribossômica S6 quinase beta-1
eIF4E	*Eukaryotic translation initiation factor 4E* - Fator de iniciação de tradução eucariótica 4E
MAPK	*Mitogen-activated protein kinases*- Proteínas quinases ativadas por mitógeno
IMC	Índice de massa corporal
HE	Hematoxilina e eosina
TMA	*Tissue Microarray* – Microarranjos teciduais
HRP	*Horseradish peroxidase*
TBS	*Tris-buffered saline*
DAB	Diaminobenzidina
HR	*Hazard Ratio*
OR	*Odds Ratio*
USP	Universidade de São Paulo
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Sumário

1—INTRODUÇÃO 17
1.1 – Epidemiologia e fatores de risco do câncer colorretal. 17
1.2- Diabetes Mellitus tipo 2 no câncer colorretal. 18
1.3- Fator de crescimento semelhante à insulina e seu sistema de sinalização 23
2- JUSTIFICATIVA 25
3- OBJETIVOS 26
3.1- Objetivo Geral 26
3.2- Objetivos específicos 26
4- PACIENTES MATERIAIS E MÉTODOS. 26
4.1. Pacientes 26
4.2. Critérios de inclusão e exclusão 27
4.2.1. Critérios de inclusão 27
4.2.2. Critérios de exclusão 28
4.3. Materiais 28
4.4. Métodos 29
4.4.1. Método de confecção do Tissue Micro-Array (TMA) – Microarranjos teciduais 29
4.4.2. Reações Imuno-histoquímicas 31
4.4.3. Análises Imuno-histoquímicas 31
4.4.4. Análise estatística 33
5- RESULTADOS 34
5.1. Características clínico-patológicas dos pacientes. 34
5.2.Associação clínico- patológica da expressão de IGF1, IRS1 e IGFBP3. 35
5.3. Associação da expressão proteica com o prognóstico da doença em estudo 38
5.3.1. Sobrevida livre de progressão 38
5.3.2. Sobrevida Global 40
5.3.3. Metástase 43
6. DISCUSSÃO 44
7. CONCLUSÃO 50
8- REFERÊNCIAS 51

1—INTRODUÇÃO

1.1 – Epidemiologia e fatores de risco do câncer colorretal.

O câncer é um grande desafio entre os problemas de saúde pública mundial nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo uma das principais causas de mortalidade. Segundo *World Health Organization* (WHO), a incidência global em 2032 será de 22 milhões de casos novos, onde o cálculo global corrigido para o sub registro é de 640 mil casos novos. No Brasil, as estimativas no o biênio para 2018-2019, foram de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer para cada ano, com exceção do câncer de pele não melanoma que há cerca de 170 mil novos casos [1,2].

Entre os tumores malignos, o câncer colorretal (CCR) é classificado em terceiro lugar como o mais incidente no mundo e em quarto lugar na mortalidade, com mais de 1,4 milhões de casos novos anualmente, perdendo apenas para o câncer de pulmão (1,8 milhões de casos novos) e o câncer de mama feminino (1,7 milhão de casos novos). No Brasil, no biênio de 2018 – 2019, estimou-se para o CCR, 17.380 casos novos em homens, sendo o terceiro mais incidente, e 18.980 em mulheres, como o segundo mais incidente [1-5].

Apesar dos avanços obtidos no rastreamento, diagnóstico e tratamento, a taxa de sobrevida global do CCR em 5 anos é de 65%, essa taxa pode variar consideravelmente através da classificação do estágio da doença no momento do diagnóstico. O estadiamento do câncer é fundamentado no tamanho da lesão primária, no seu grau de disseminação para gânglios linfáticos regionais e na presença ou ausência de metástases à distância [5,6].Contudo, os resultados clínicos ainda não são satisfatórios, pacientes com estágio não avançado, como na classificação do estágio II a , aproximadamente 20% dos casos irá ter recorrência após a ressecção cirúrgica do câncer primário, e além disso aproximadamente 50% dos pacientes diagnosticados com CCR já estão com a doença avançada, como no estágio IV, que é caracterizado pela presença de metástase à distância, diminuindo significativamente a sobrevida global do paciente [5].

Nos carcinomas colorretais, o adenocarcinoma de cólon corresponde a mais de 90% dos casos, sendo mundialmente classificado como o mais incidente e a terceira causa de mortalidade. O adenocarcinoma de cólon é especificado como um tumor humano de origem epitelial em que as células têm como função secretar substâncias para ductos ou cavidade que revestem, é uma doença multifatorial influenciada por fatores genéticos,

ambientais e relacionados ao estilo de vida. Entre os fatores etiológicos conhecidos, estão os defeitos genéticos já comprovados, como mutação nos genes Kras, DCC/DPC4 e p-53; os fatores hereditários com relação ao histórico familiar de câncer colorretal e doenças inflamatórias intestinais; os fatores relacionados a dieta e hábitos ocidentais, como um estilo de vida sedentário, consumo de bebidas alcóolicas, baixa ingestão de frutas e verduras, alto consumo de carnes vermelhas e alimentos processados; a obesidade que também está relacionada ao Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2); e o tabagismo [2,6-9].

Com o objetivo na redução da incidência e mortalidade do adenocarcinoma de cólon, diversos pesquisadores buscam esclarecer sua etiologia, os mecanismos de sua patogênese e seus biomarcadores para contribuir com o diagnóstico precoce, a presença e/ou evolução para metástases, e a melhor escolha na forma do tratamento [3,10].

1.2- Diabetes Mellitus tipo 2 no câncer colorretal.

O pâncreas é o órgão responsável por produzir dois hormônios que regulam os níveis de glicose no organismo, sendo estes a insulina e o glucagon. A insulina é considerada um hormônio anabólico, que facilita a absorção de glicose pelas células – os tecidos envolvidos nesse mecanismo são: músculo, fígado, tecido adiposo, cérebro, rim e trato gastrointestinal, sendo o tecido muscular esquelético o principal na captação de glicose periférica – assim, nas células, a glicose será utilizada para produção de energia e uma parte será armazenada no fígado na forma de glicogênio. Esta etapa ocorre logo após as refeições, quando o nível de glicose circulante encontra- se elevado [11].

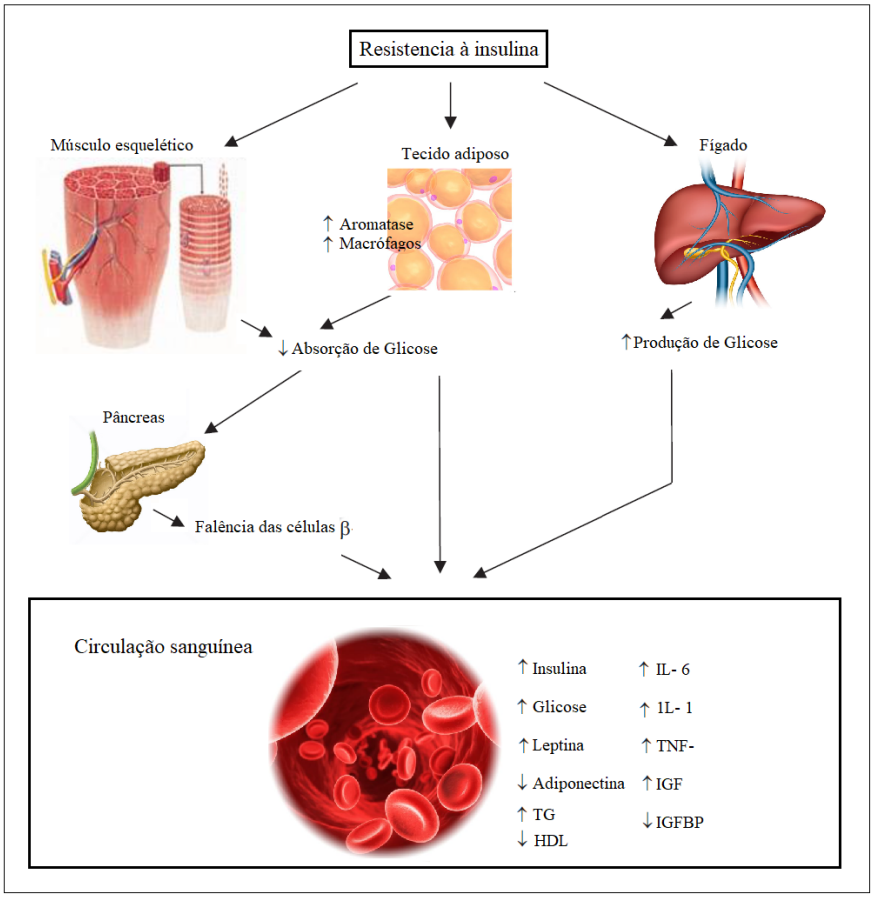
O glucagon é considerado um hormônio catabólico que funciona de maneira oposta à insulina, quando o organismo está em estado de jejum, ou seja, horas sem se alimentar, em que o nível de glicose circulante diminui (podendo ocorrer à hipoglicemia) o pâncreas irá produzir o glucagon que age no fígado, estimulando a quebra de glicogênio em moléculas de glicose que posteriormente é liberada na corrente sanguínea para normalizar o nível de glicose circulante [11].

O DM2 é caracterizado por ser uma condição crônica decorrente da hiperglicemia causada por defeitos na secreção e/ou ação da insulina no organismo. Como consequência da progressão deste mecanismo à longo prazo, pode ocorrer resistência à insulina nas células, levando ao aumento da produção de insulina pelas células beta pancreáticas devido à alta concentração de glicose circulante e, posteriormente a hiperinsulinemia circulante. Com isso, as funções das células beta pancreáticas estarão comprometidas,

devido ao aumento exacerbado na produção de insulina, seguido pela produção insuficiente de insulina pelas células em decorrência de sua sobrecarga, e assim, a hiperglicemia. A hiperglicemia também pode ser resultado do aumento da produção de glicose hepática secundária à resistência à insulina no fígado e a redução da absorção para o músculo esquelético e tecido adiposo [8,11].

Com as consequências dessa disfunção metabólica, a insulina endógena que atua no fígado aumenta a síntese do fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF1) e leva a diminuição da concentração de sua proteína de ligação (IGFBP) levando ao aumento da concentração local biodisponível de IGF1. Há também como consequência a inflamação do tecido adiposo, através da produção de citocinas inflamatórias com a alteração nos níveis circulantes de adipocinas, aumento da leptina e diminuição da adiponectina, inclusive a resistência à insulina está relacionada com níveis anormais lipídicos, como elevado triglicérides e baixo colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade), como demonstrado na figura 1 [8].

Figura 1. Consequências da disfunção metabólica relacionada à resistência à insulina. Adaptado de SHALOMAI. et.al, 2016 [11].



Entre as pessoas que possuem diagnóstico confirmado para diabetes mellitus, 90% dos casos apresentam o tipo 2 e apenas 10% o tipo 1, sendo que o desenvolvimento do DM tipo 2 (DM2) capaz de prevenção na maioria dos casos, segundo *The International Diabetes Federation* (*IDF*) estima-se para o ano 2040, 642 milhões de pessoas com o diagnóstico de DM2 no mundo. O DM2 é considerado uma doença progressiva e metabólica, sua incidência pode aumentar com o avançar da idade, em decorrência das disfunções metabólicas causadas pelo DM2 e sua alta incidência, esta doença pode estar associada a diversas outras patologias, como a obesidade, doenças cardíacas, hipertensão, síndrome metabólica, e ainda estudos relatam sua associação no aumento da incidência e mortalidade em diversos tipos de câncer, como o câncer de mama, endométrio, pâncreas e colorretal [11-13]. No CCR, além do DM2 estar relacionado com sua incidência (aumentando seu risco em até três vezes) e mortalidade, estudos epidemiológicos demostraram sua relação com um pior prognóstico da doença [8, 12-15].

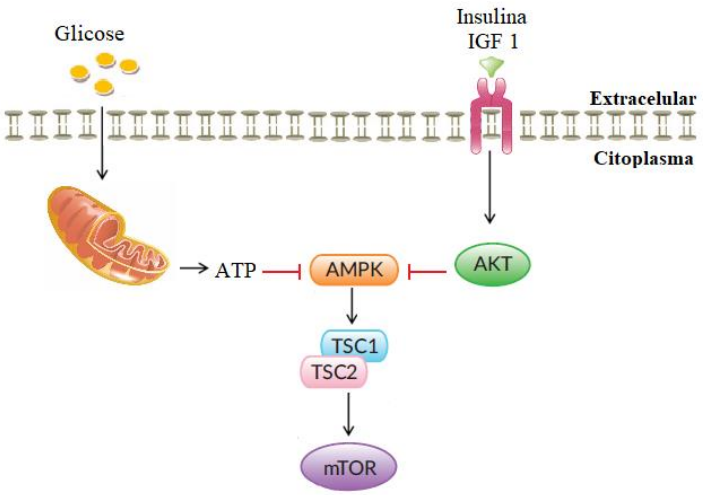
Em um estudo de meta-análise sobre os fatores de risco para o CCR foi mostrado que indivíduos com DM2 têm um risco aumentado de 12% na mortalidade em comparação com os não diabéticos. Em outro estudo, a expressão sérica do micro RNA miR-16, foram significativamente menores nos pacientes hiperglicêmicos, aumentando a proliferação e migração celular de CCR in vitro. Além disso, em um terceiro estudo, retrospectivo, foi evidenciado que pacientes com DM2 possuem maior presença de invasão tumoral, linfo vascular e classificação com o estadiamento mais avançado segundo TNM (classificação de tumores malignos), quando comparados com indivíduos não diabéticos [12-13,16-17].

Os mecanismos moleculares relacionados à incidência ou que levam ao pior prognostico do CCR ainda não estão esclarecidos, mas já é demonstrada sua relação com algumas vias de sinalização que também estão desreguladas no DM2. Essas vias estão envolvidas com o crescimento, sobrevivência e proliferação celular, como por exemplo a via AMPK (proteína quinase ativada por AMP- monofosfato de adenosina). Nos mamíferos, a via AMPK é ativada pelo estado de deficiência nutricional, como no jejum, exercício e privação de glicose, que tem como consequência o aumento de AMP, inativando a síntese de proteínas, ácidos graxos e colesterol, e ativando a glicólise e a autofagia para que a célula sobreviva em energia insuficiente. Já a alta nutrição (como na obesidade ou diabetes), pode inativar esta via [13,18].

No DM2, os níveis elevados de glicose plasmática, insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) irão inibir a via AMPK, que podem promover anabolismo para poder atender à crescente demanda de crescimento celular, principalmente de células cancerígenas. Outro sensor de energia celular muito importante é o mTOR (proteína alvo de rapamicina em mamíferos) que pode funcionar de forma dependente e independente da via AMPK, mTOR tem dois complexos multimoleculares distintos que diferem em composição, especificidade do substrato e regulação do mecanismo de crescimento. O mTOR1 é um sensor de nutrientes e energia que responde a mudanças dos níveis do fator de crescimento, aminoácidos e nutrientes. Os fatores de crescimento, como a insulina e o IGF1, são ativadores do mTOR1, que atua através da sinalização de AKT (proteína quinase específica de serina / treonina). Por consequência a AKT fosforila o TSC2 e o dissocia do TSC1 (complexo de esclerose tuberosa), que então irá ativar o mTOR1. A alta nutrição leva a ativação do m TORC1, devido a perda da inibição de AMPK. Com a restrição da glicose, aminoácido ou oxigênio há a rápida supressão da atividade do mTOR1, através do mecanismo dependente de AMPK. Os aminoácidos, principalmente a leucina e arginina, também podem ativar o mTOR1 através de um mecanismo ainda desconhecido [13].

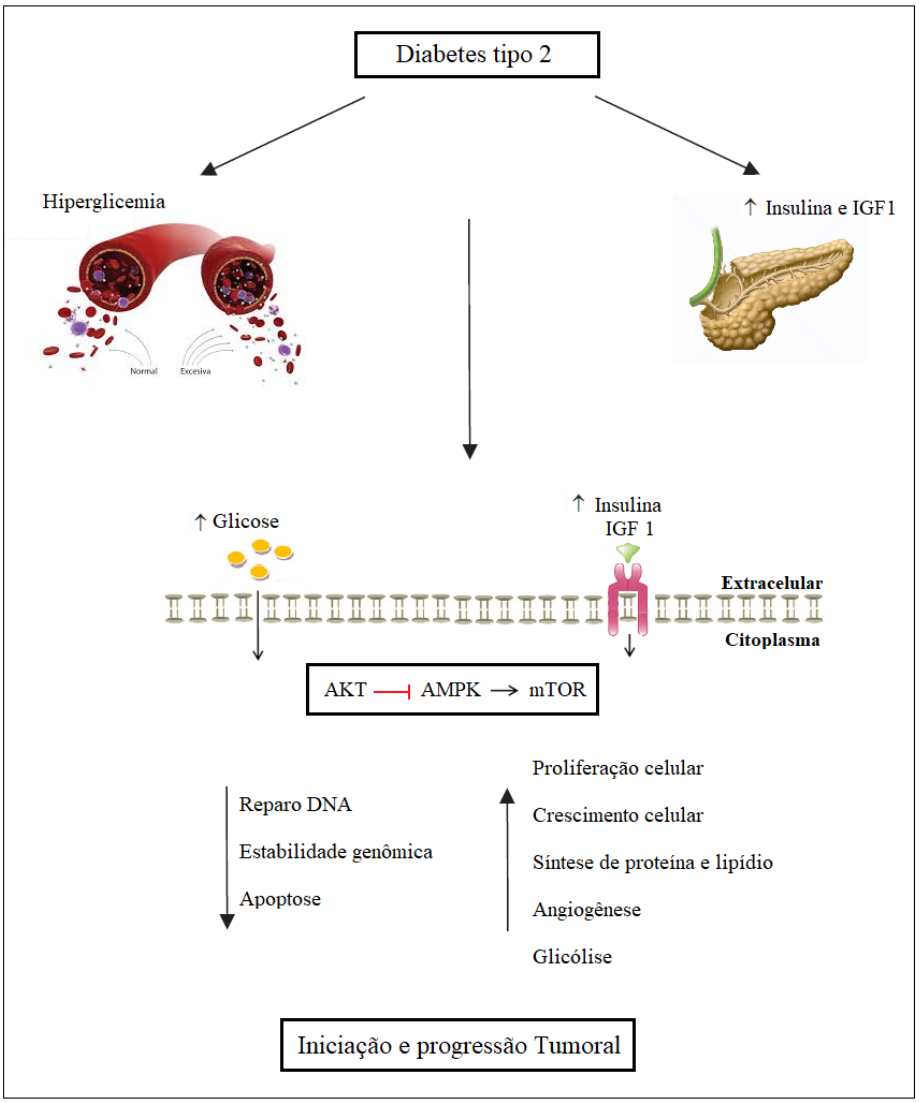
As consequências da ativação da sinalização de mTOR1 através da inibição de AMPK como já mencionado, tem como consequências a síntese de proteínas, a proliferação celular, a inibição da via autofágica nos tecidos epiteliais e aumento do nível de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral– α e a leptina, além de regular positivamente a glicólise estimulando a angiogênese, o que é favorável ao crescimento e metástase de células cancerígenas. É demonstrado que a ativação de AMPK, leva a promoção de um fenótipo metabólico e proliferativo que mostra ser desfavorável ao crescimento de células cancerosas, acreditando que se tem um impacto negativo iniciação do câncer (Figura 2) [13, 18].

Figura 2. Via de sinalização AMPK. Adaptado de YANG, J. et.al, 2017 [13].



As ativações desreguladas de vias de sinalização podem aumentar o risco à carcinogênese, pela diminuição da estabilidade genética, reparo incompatível de DNA (ácido desoxirribonucleico) e remodelação do metabolismo celular, o que torna um ambiente favorável para a sobrevivência das células cancerígenas. As vias de detecção de energia são desreguladas no diabetes mellitus tipo 2, devido ao alto nível de glicose, insulina e IGF-1, podendo aumentar o risco à carcinogênese e diminuir a estabilidade genética e o reparo de incompatibilidade de DNA para promover a síntese proteica, de nucleotídeos e lipídios. Tanto os fatores genéticos quanto ambientais podem contribuir para um pior prognóstico no CCR em pacientes diabéticos tipo 2 em comparação aos pacientes que não apresentam esta patologia (Figura 3) [13,18].

Figura 3. Consequências do DM2 no cancer. Adaptado de YANG, J. et.al, 2017 [13].



1.3- Fator de crescimento semelhante à insulina e seu sistema de sinalização.

O hormônio de crescimento (GH) é produzido pelos somatotrofos da glândula hipófise anterior, que é o principal regulador dos processos de crescimento no organismo. Este hormônio pode atuar através de ações diretas, mediante ao seu receptor específico (GHR), e ações indiretas, principalmente mediadas pela síntese dos fatores de crescimento semelhante à insulina presente no fígado e tecidos periféricos, mas não são armazenados pois são secretados conforme sua produção. A produção principal Dos fatores de crescimento semelhante à insulina acontece no fígado (ação endócrina), em que IGF1 hepático age como hormônio estimulando o crescimento de diversos tecidos, já o IGF1 extra-hepático tem ação autócrina e parácrina, além disso o GH também pode influenciar a expressão do IGF1 extra-hepático [20-22].

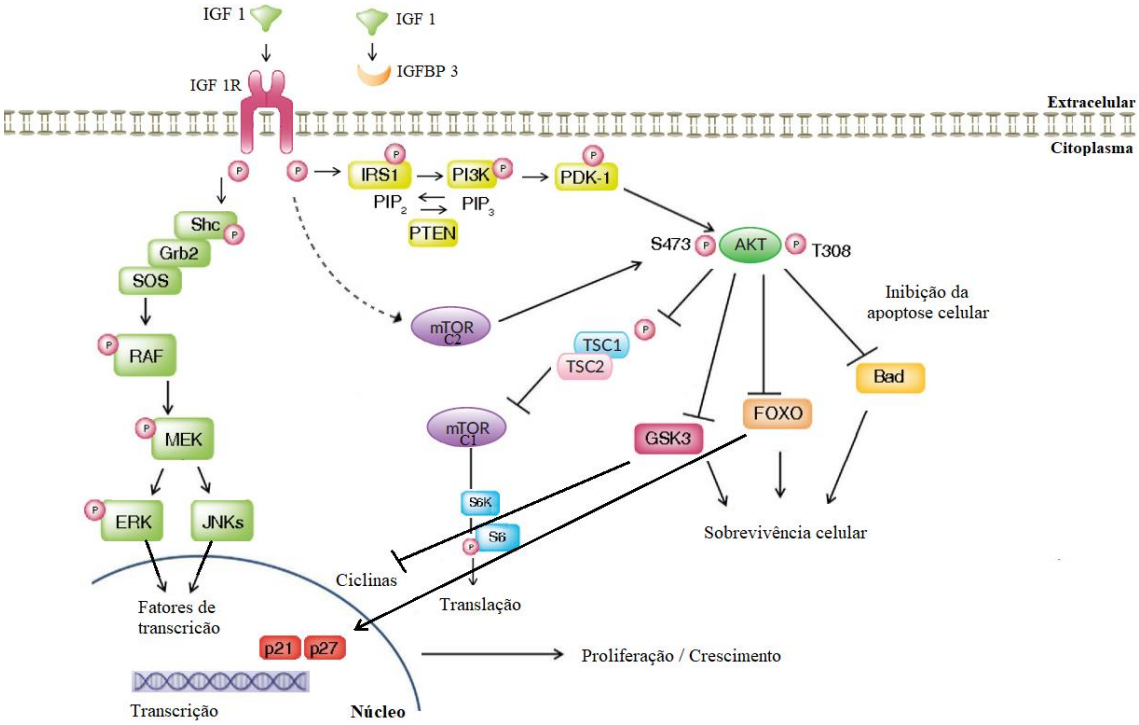
A insulina e a via de sinalização dos fatores de crescimento semelhante à insulina desempenham papéis importantes e complementares no crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose celular, este sistema é composto por dois fatores, IGF1 e IGF2, podendo interagir com seis proteínas secretoras, IGFBP 1 – 6 que regulam a ligação dos fatores de crescimento através de dois receptores, IGF1R e IGF2R [18]. A maioria do IGF1 circulante está ligado à proteína de ligação IGFBP3, controlando a biodisponibilidade do ligando, na ação dependente à IGF, a ligação de IGFBP3 com IGF1 forma um complexo binário, impedindo a ativação de IGF1 com seu receptor (IGF-1R), inibindo a sobrevivência e proliferação celular que induz a célula a apoptose [25-27].

Quando IGF1 não se liga a IGFBP3, a ação do IGF1 ocorre através da ligação ao seu receptor IGF1R, conduzindo sua ativação através de auto fosforilação, assim ocorre o recrutamento e fosforilação de proteínas adaptadoras, as proteínas do substrato receptor de insulina (IRS) e a proteína adaptadora de sinalização (Shc), levando a ativação de duas vias de sinalização. A fosforilação das proteínas IRS1 e IRS2 levam a fosforilação do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), ativando o fosfoinositídeo 3- quinase (PI3K), este ativado converte o PIP2 no segundo mensageiro lipídico, o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) e ativação subsequente do piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1). Assim, a família quinase Akt pode ser ativada por PDK1 e pelo complexo m TORC2, através da fosforilação em Serina 473 (Ser 473) e Treonina 308 (Thr 308), ocorrendo a fosforilação e inativação do complexo de esclerose tuberculosa (TSC1 e 2), com consequente inativação da proteína alvo de rapamicina em mamíferos 1 (mTORC1). Por sua vez, mTORC1 inativo irá ativar sua proteína ribossômica S6 quinase beta-1 (S6K1), levando a tradução de 5´TOP mRNA e ao crescimento celular. Além disso, com a ativação de Akt, ocorre a inibição dos fatores de transcrição FOXO (subgrupo de proteínas da família *forkhead* de fatores de transcrição), GSK- 3β (glicogênio sintase cinase 3 beta) e Bad, que estão envolvidas em vários processos celulares, incluindo síntese de proteínas, metabolismo da glicose e sobrevivência celular [18,28].

Paralelamente há a ativação de Ras/MAPK, através da fosforilação de Shc, resultando na transcrição de genes que impulsionam a proliferação celular, como as ciclinas tipo D. A ativação do complexo de ciclina D/ ciclina-dependente da quinase 4 (CDK4), conduz a transcrição aumentada de E_2F- dependente, através do sequestro pela proteína do retinoblastoma e consequente liberação do fator de transcrição E_2F,

conduzindo a passagem pela transição da fase G_1/S durante a progressão do ciclo celular. (Figura 4) [18,29].

Figura 4. Sinalização da via do fator de crescimento semelhante à insulina e seu microenvolvimento celular. Adaptado de JUNG. et. al, 2015 [18].



A ativação desregulada da via de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina está relacionada a várias doenças, como as doenças cardiovasculares, metabólicas, musculares, neurodegenerativas, envelhecimento e vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama, hepático, colorretal, pulmão e próstata. Contudo, a relação desta via de sinalização com o câncer ainda está sendo elucidada, as primeiras associações dos fatores de crescimento semelhante à insulina com o câncer foram observadas em experimentos in vitro, e a partir de então muitos estudos à nível sérico foram realizados em relação a via de sinalização semelhante à insulina e o câncer de cólon, no entanto, estudos que relacionam esta via com o câncer de cólon através de análises do tecido tumoral são escassos e em sua maioria inconclusivos [18,23-26,30-55].

2- JUSTIFICATIVA

O adenocarcinoma de cólon é o mais frequente entre os tumores colorretais, um de seus fatores de risco está associado ao DM2 que está diretamente relacionada a alteração da via de sinalização dos fatores de crescimento semelhante à insulina. Alguns estudos

também relacionam a proteína IGF1, sua proteína de ligação IGFBP3 e o substrato do receptor de insulina IRS1, com proliferação, sobrevivência, crescimento e apoptose celular, interferindo diretamente no prognostico da doença, e como possíveis biomarcadores para o CCR.

Estudos que relacionam o adenocarcinoma de cólon avançado com a alteração da biodisponibilidade a nível tecidual de IGF1, IGFBP3 e IRS1 e suas associações com o diagnóstico DM2 são escassos. Além disso, estudos que confirmem estas proteínas como possíveis biomarcadores do CCR são insuficientes, sendo necessários novos estudos para o esclarecimento.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Estudar a relação da expressão proteica de IGF1, IGFBP3 e IRS1 e a evolução de pacientes com adenocarcinoma de cólon avançado, através de dois grupos, sendo estes, pacientes com alteração glicêmica e sem alteração glicêmica.

3.2- Objetivos específicos

3.2.1. Examinar a expressão proteica, em nível de tecido, através da análise imuno-histoquímica do IGF1, IGFBP3 e IRS1 em dois grupos, com alteração glicêmica e sem alteração glicêmica, de pacientes com adenocarcinoma de colón.

3.2.3. Relacionar a associação da expressão proteica de IGF1, IGFBP3 e IRS1 com os desfechos clínicos do adenocarcinoma de cólon, resposta ao tratamento adjuvante, sobrevida livre de doença e global.

4- PACIENTES MATERIAIS E MÉTODOS.

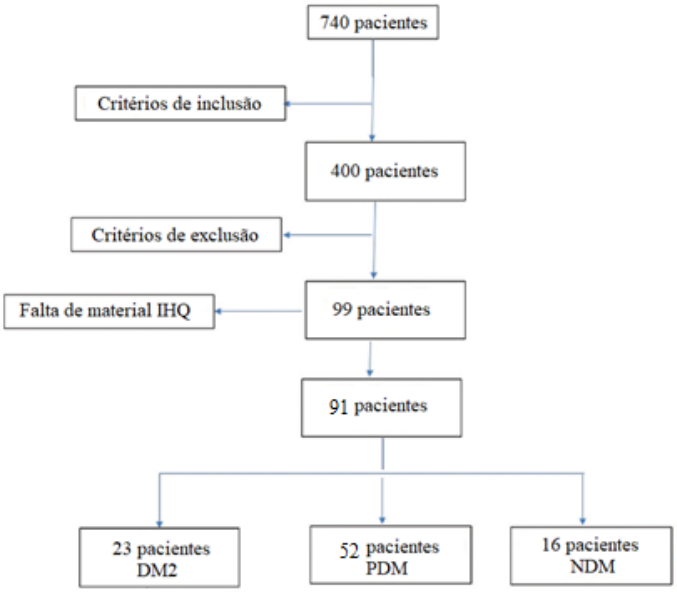
4.1. Pacientes

Trata-se de um estudo analítico, transversal. A amostra do estudo é de conveniência, incluindo a partir dos setecentos e quarenta pacientes, levantados pelo CID 10 - C18 com adenocarcinoma colón-retal que ressecaram o tumor no ano de 2008 a 2015, e que estão cadastrados no **Banco de Tumores Proctológicos do HCFMRP-USP (CEP-HCRP: 12374/2008).**

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do HC-FMRP-USP, pelo número de aprovação CAAE: 75211417.0.0000.5440.

A amostra total de pacientes com adenocarcinoma de cólon avançado com noventa e um pacientes, divididos em dois grupos, sendo estes: setenta e três pacientes com alterações glicêmicas e dezesseis pacientes sem alterações glicêmicas, conforme a figura 5.

Figura 5. Diagrama da seleção dos pacientes



Para a classificação dos pacientes diabéticos, pré-diabéticos e não-diabéticos foram utilizados três exames laboratoriais sendo a glicemia em jejum, a hemoglobina glicada e o teste de tolerância a glicose (GTT), com os seguintes valores de referência utilizados no HCFMRP – USP (Tabela 1):

Tabela 1 – Valores de exames laboratoriais para diagnóstico do DM2 do HC-FMRP.

Teste	Normal	Pré - diabetes	Diabetes
Glicemia de jejum	< 100	100 a 126	≥126
Hemoglobina glicada	< 5,7	5,7 a 6,4	≥ 6,5
GTT	< 140	140 a 199	≥ 200

4.2. Critérios de inclusão e exclusão

4.2.1. Critérios de inclusão

a) Pacientes cadastrados e atendidos pelo sistema único de saúde (SUS);

b) Ambos os sexos;

c) Idade maior que 18 anos;

d) Diagnóstico histológico de adenocarcinoma localizado no cólon;
e) Estádio clínico-cirúrgico avançado [estadio TNM II (alto risco), III e IV];
f) Tratamento oncológico de acordo com as diretrizes científicas atuais;
g) Tempo de seguimento junto ao Ambulatório de Oncologia Clínica do hospital das clínicas da faculdade de medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) de pelo menos 24 meses;
h) Possuem amostras de tecido neoplásicas conservadas em parafinas;
i) Possuem amostra de sangue armazenada;
j) Assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para o uso em pesquisa do tecido e sangue.

4.2.2. Critérios de exclusão

a) Neoplasia localizada no reto;
b) Diagnóstico de outras neoplasias malignas previa, exceto tumores de pele não melanoma;
c) Tumor de cólon e reto sincrônicos ao diagnostico;
d) Tratamento neoadjuvante;
e) Síndrome de Lynch;
f) Diagnostico confirmado de diabetes mellitus tipo I;
g) Pacientes com desnutrição;
h) Fatores que inviabilização a utilização de blocos contendo o tecido tumoral parafinado.

4.3. Materiais

Foi utilizado o seguinte anticorpo secundário para as reações imuno-histoquímicas: EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB detection IHC kit - 15ml – Kits, Abcam ® (ab80436ml15) e foram utilizados três anticorpos primários com as características (Tabela 2):

Tabela 2. Característica anticorpos primários.

Anticorpos Primários (AP)	Marca	Tipo	Marcador	Diluição	DAB	Controles
Anti-IGF1 antibody [7973] Ref: ab176523	Abcam ®	Monoclonal camundongo	Membrana celular	1:50	1’30’’	Rim
Anti-IGFBP3 antibody Ref: ab76001ul400	Abcam ®	Policlonal coelho	Membrana celular	1:10	1’26’’	Mama

Anti IRS 1 antibody [EP263Y] Ref: ab40777	Abcam ®	Monoclonal coelho	Membrana celular	1:50	2’40’’	Rim

4.4. Métodos

Foram coletados, retrospectivamente, informações clínicas e sócio- demográficas através da revisão do prontuário eletrônico de todos pacientes participantes da pesquisa, incluindo-se as seguintes informações: registro, número da biópsia, sexo, data de nascimento, idade ao diagnóstico, data da cirurgia, data da biópsia, diagnóstico de diabetes mellitus, medicamentos de uso rotineiro, diagnóstico nutricional, e dados clínicos da doença [TNM, localização no cólon (direito, transverso, esquerdo e sigmoide), acometimento linfonodal, presença de invasão neoplásica angiolinfática e/ ou perineural, histologia segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), estadiamento patológico, recidiva local e/ ou à distância, local e tempo da recidiva e óbito].

4.4.1. Método de confecção do Tissue Micro-Array (TMA) – Microarranjos teciduais.

A seleção dos fragmentos tumorais foi realizada através da análise de lâminas arquivadas, previamente coradas por Hematoxilina e Eosina (HE). Foram selecionados os blocos de parafina correspondente aos fragmentos mais representativos de cada lesão para a confecção dos TMA.

Para a confecção dos blocos de TMA, foi utilizada a caneta metálica da marca *Zytovision* para retirar, em formato cilíndrico de 2mm de profundidade e de diâmetro, sendo um fragmento da margem e dois fragmentos da área sólida de tumor mais representativa do bloco, devido a heterogeneidade intrínseca tumoral.

Cada bloco do TMA apresentou 4 linhas e 6 colunas, sendo a posição 1:1 (controle) representativa do ponto de referência para leitura das demais posições (linha, coluna). Cada fragmento retirado foi colocado em um bloco receptor de parafina utilizando o equipamento Manual *Tissue Arrayer I* (*Beecher Instruments*, Silver Spring, USA) contendo 24 posições. O bloco receptor foi levado para estufa a 60°C por 20 minutos e após, foi resfriado em temperatura ambiente por 20 minutos e depois levado ao freezer a -8°C por 1 minuto.

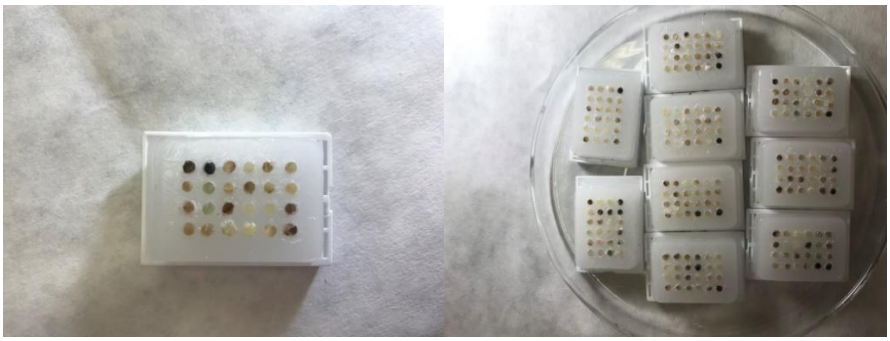
A partir de cada bloco de TMA pronto, foram feitos cortes histológicos de 4 µm de espessura em micrótomo rotativo convencional (*Microm HM315, Walldorf,* Alemanha), utilizando o *paraffin tape-transfer system* (*Instrumedics*, Saint Louis, USA). Um corte foi

reservado para ser corado com HE durante 19’ para confirmar a presença de tumor no cilindro do TMA utilizando microscópio de luz convencional, analisando a representatividade e verificando possíveis cilindros perdidos. Após esta confirmação, os cortes histológicos foram colocados em lâminas de vidro embebidas pela poli-lisina a 8% para a realização do método imuno-histoquímica [28].

Para os cilindros considerados perdidos (menos de 50% do cilindro inteiro), foi repetido um novo corte de TMA para refazer a reação imuno-histoquímica, analisados novamente, os que não foram representativos os casos foram excluídos. Para a análise quantitativa da imuno-marcação, foi considerada como representatividade de 100% a área inteira de cada cilindro representado no bloco de TMA, conforme as figuras 6,7 e 8.

Figura 6 – Blocos de parafina correspondente aos fragmentos mais representativos de cada lesão.

Figura 7 e 8 – Blocos de TMA para realização da imuno-histoquímica.



4.4.2. Reações Imuno-histoquímicas

Foi utilizado um corte para cada bloco de TMA. Todas as amostras teciduais foram de acordo com a rotina do laboratório e com protocolos pré-estabelecidos. Para esta técnica as reações foram realizadas utilizando-se o Kit Abcam® ab80436 *Expose Mouse and Rabbit specifique* HRP/DAB. Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em uma série de álcoois (95%, 80% e 70%), água corrente e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada utilizando uma panela a vapor com tampão citrato à 10mM por 40 minutos, sendo resfriadas por 40 minutos.

Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena através de soluções provenientes do Kit Abcam®. Após esse procedimento, incubou-se o anticorpo primário por 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados neste estudo foram IGF1 na diluição 1:50, anti-humano anticorpo policlonal de coelho (Abcam®, Cambridge, MA, EUA, anticorpo anti-IGF1 7973), IGFBP3 na diluição 1:10, anti-humano anticorpo monoclonal de coelho (Abcam®, Cambridge, MA, EUA, Anticorpo antiIFBP3 ab 7001ul400) e IRS1 na diluição 1:50 anti-humano, anticorpo monoclonal de coelho (Abcam®, Cambridge, MA, EUA, anticorpo anti-IRS1 EP263Y ab40777).

Após as incubações com os anticorpos primários, os cortes foram incubados com complemento por 10 minutos e então incubados com *Goat anti-rabbit HPR conjugate*, sistema de amplificação por 15minutos, ambos do Kit Abcam®.

A reação foi corada por diaminobenzidina (DAB) e contra coradas com hematoxilina. Os cortes foram novamente hidratados em água destilada e desidratados em uma série de álcoois e xilol. Em seguida, as lâminas foram cobertas por lamínula, com auxílio de *Entellan (Merck, Alemanha*).

4.4.3. Análises Imuno-histoquímicas

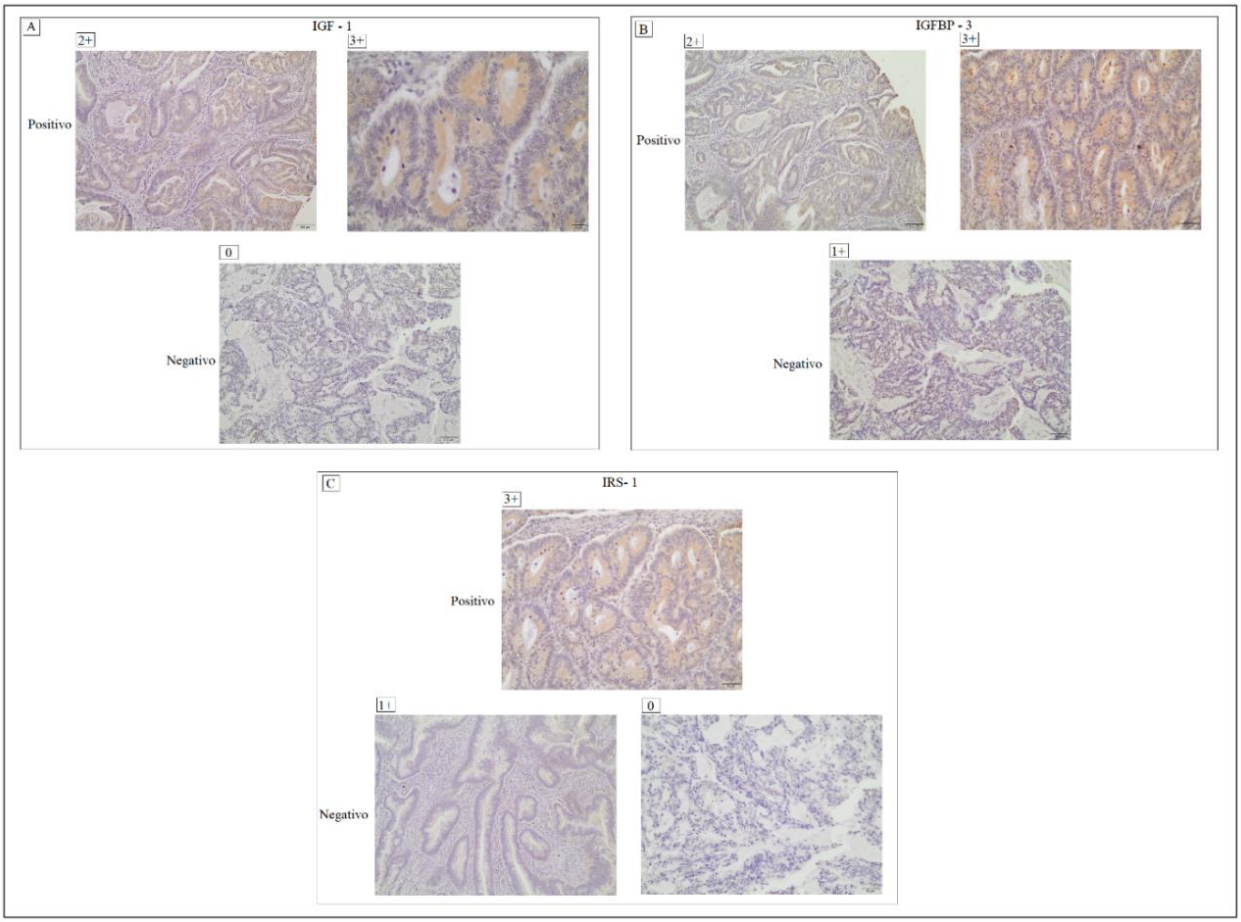
Juntamente, as análises foram examinadas pela pesquisadora e uma patologista com experiência na área, sendo mascarado aos dados clínicos. Para determinar a imunorreatividade de IGF1 e IGFBP3 foi avaliada a intensidade do padrão de coloração da membrana celular. A análise foi semi- quantitativa, através de escore, as pontuações de 0-3 foram utilizadas para a intensidade de coloração e a percentagem de células positivas, onde 0 e 1+ foram considerados negativos e 2+ e 3+ positivos para a expressão das proteínas analisadas, como se segue [47,56]:

Tabela 3- Análise imuno-histoquímica por escore.

Escore 0	Escore 1	Escore 2+	Escore 3+
Não se observa coloração ou é observada em menos de 10% das células tumorais	Coloração fraca em 10% ou mais das células tumorais	Coloração moderada em 10% ou mais das células tumorais	Forte coloração em 10% ou mais das células tumorais

Para determinar a imunorreatividade de IRS1, foi utilizado método específico descrito na literatura, onde a porcentagem de células positivas foi dividida em cinco escores percentuais: ≤10% (0), 11-25% (1), 26-50% (2), 51-75% (3) e > 75% (4). A intensidade da coloração foi dividida em quatro escores de intensidade: sem coloração (0), marrom claro (1), pardo (2) e marrom escuro (3). A coloração da positividade foi determinada pela fórmula: escores gerais = (escore percentual) x (escore de intensidade). A pontuação total variou de 0 a 12, com coloração negativa (0-1) e expressão positiva (2-12) [57], conforme a figura 9.

Figura 9 – Expressão de IGF1, IGFBP3 e IRS1 no adenocarcinoma de cólon avançado. **A,** coloração representativa de IGF1 quantificada em escores de 0 (ampliação original x 100), 2+ (ampliação original x 100) e 3+ (ampliação original x 400), de acordo com a intensidade de coloração. **B,** coloração representativa IGFBP3 quantificada em escores de 1+ (ampliação original x 100), 2+ (ampliação original x 100) e 3+ (ampliação original x 200), de acordo com a intensidade de coloração. **C,** coloração representativa IRS1 quantificada em escores de 0 (ampliação original x 200), 1+ (ampliação original x 100) e 3+ (ampliação original x 200), de acordo com a intensidade de coloração.



4.4.4. Análise estatística

Todas as associações envolvendo duas variáveis qualitativas foram realizadas através do teste qui-quadrado. A fim de relacionar o tempo de sobrevida (ou progressão) com variáveis qualitativas, foram construídas curvas de Kaplan-Meier para as variáveis em estudo e para verificar se existem evidências de diferenças entre as curvas foi utilizado o teste de Log Rank. Para relacionar o tempo de sobrevida com variáveis de interesse, foi proposto o modelo de riscos proporcionais de Cox (Lee, 2003). Este modelo calcula o Hazard Ratio (HR) que fornece o quanto uma categoria tem de risco de vir a óbito (ou apresentar progressão) em relação à outra. Para verificar se as variáveis de interesse são preditoras de metástase, foram calculados Odds Ratio (OR) através da regressão logística bruta e ajustada. Todos os gráficos apresentados foram feitos com o auxílio do software R, versão 3.4.1 e as análises, através do SAS 9.2. Para todas as comparações adotou-se um nível de significância de 5%.

5- RESULTADOS

5.1. Características clínico-patológicas dos pacientes.

Foram estudados o total de 91 pacientes que realizaram ressecção de tumor de cólon (adenocarcinoma) já em estadio avançado da doença, no HCFMRP – USP. O diagnóstico patológico e as classificações foram feitas de acordo com a classificação UICC para tumores malignos [57]. As características dos pacientes se encontram na tabela 4, a média da idade dos pacientes estudados foi de 61 anos e 6 meses (intervalo 28-88), sendo a maioria do sexo feminino (54,5%), pré diabéticos (57,1%), localização cólon descendente e sigmoide (53,3%), classificação TNM II avançado e III (53,9 %), com presença de invasão angiolinfática (53,9%) e negativo para invasão perineural (63,7%), grau de diferenciação bem e moderadamente diferenciado (87,9%), classificação patológica pT3 (69,2%) e pN1(45,1%), sendo a maioria dos pacientes com evolução para metástase (60,4%). A sobrevida global, foi analisado através do período em dias do diagnóstico da doença primária de adenocarcinoma de cólon até a data da morte, e a sobrevida livre de progressão foi definida entre o período do diagnóstico até o momento da progressão/ ou recidiva da doença ou morte, sendo que a maioria dos pacientes não tiveram progressão e/ ou recidiva de doença (50,6%) e não evoluíram a óbito (64,8%). Entre os pacientes com diagnóstico de DM2, a maioria não fazia uso de metformina (73,2%).

Tabela 4 – Características clínico - patológicas dos pacientes estudados.

Idade diagnóstico					
n	**Média**	**Desvio Padrão**	**Mínimo**	**Mediana**	**Máximo**
91	61,58	11,51	28	61	88

Variáveis	Frequência	Percentual
Sexo		
Feminino	50	54,5
Masculino	41	45,6
DM		
DM2	23	25,6
NDM	16	17,8
PDM	52	57,1
Localização		
1 (ascendente e transverso)	37	40,7
2 (descendente e sigmoide)	54	53,3
TNM		
1 (II e III)	49	53,9
2 (IV)	42	46,2
Invasão Angiolinfática		

Não	42	46,2
Sim	49	53,9
Invasão Perineural		
Não	58	63,7
Sim	33	33,3
Histologia		
1 (bem e moderadamente difere.)	80	87,9
2 (pouco dif. e indiferenciado)	11	12,1
pT		
2	8	8,8
3	63	69,2
4	20	22,0
pN		
0	11	12,1
1	41	45,1
2	37	40,7
3	1	1,1
X	1	1,1
Metástase		
Não	36	39,6
Sim	55	60,4
Progressão e/ou recidiva		
Não	46	50,6
Sim	45	49,5
Óbito		
Não	59	64,8
Sim	32	35,2
Metformina pacientes com DM n=23)		
Não	17	73,91
Sim	6	26,08

5.2.Associação clínico- patológica da expressão de IGF1, IRS1 e IGFBP3.

Foram examinadas as expressões dos seguintes anticorpos primários IGF1, IRS1 e IGFBP3, em tecido de adenocarcinoma de cólon avançado, sendo que nas amostras de tumor, a maioria dos pacientes apresentaram expressão positiva para as três proteínas IGF1 (n= 63), IRS1 (n= 85) e IGFBP3 (n = 83), os indivíduos que apresentaram a expressão positiva de IRS1 e IGFBP3 tenderam a pacientes mais velhos respectivamente (61,81±11,58) (61,93±11,48), conforme mostrado na tabela 5.

Tabela 5 – Associação entre a expressão de IGF1, IGFBP3 e IRS1 e a idade ao diagnóstico.

Descritiva segundo anticorpos primários e associação - Teste qui-quadrado							
			Idade diagnóstico				
IGF1 (tumor)	**N Obs.**	**n**	**Média**	**Desvio Padrão**	**Mínimo**	**Mediana**	**Máximo**
Negativo	**28**	28	61,93	12,13	43	59,5	84
Positivo	**63**	63	61,43	11,32	28	61	88

IGFBP3 (tumor)	N Obs.	n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Negativo	**8**	8	58	12	45	54,5	79
Positivo	**83**	83	61,93	11,48	28	61	88
IRS (tumor)	**N Obs.**	**n**	**Média**	**Desvio Padrão**	**Mínimo**	**Mediana**	**Máximo**
Negativo	**6**	6	58,33	10,93	49	54,5	76
Positivo	**85**	85	61,81	11,58	28	61	88

A tabela 6 mostra a associação das características clínico patológicas com a expressão dos anticorpos estudados. A expressão de IGFBP3 teve associação significativa com a classificação de tumores malignos TNM (p = 0.01), presença de metástase (p = 0.02) e óbito (p = 0.01). Já a expressão de IGF1 e IRS1 não tiveram relações significativas com nenhuma variável.

Nos três grupos estudados, é possível verificar que os pacientes que possuem DM2 (25,8%; 27,7%; 27,1%), e os pré-diabéticos (58,7%;54,2%;56,5%) apresentaram mais pacientes com superexpressão das proteínas IGF1, IGFBP3 e IRS1 respectivamente comparado aos não diabéticos (15,9%;18,1%;16,5%). Quanto ao uso de metformina nos pacientes com o diagnóstico de DM2, observa-se que os pacientes que não utilizam o medicamento tendem a uma maior prevalência de superexpressão de IGF1, e os pacientes que fazem uso do medicamento, ocorre o inverso, há uma maior prevalência de pacientes com a expressão negativa para IGF1.

Tabela 6 - Associação entre a expressão de IGF1, IGFBP3 e IRS1 e os fatores clínico-patológicos em pacientes com adenocarcinoma de cólon avançado.

Variáveis	IGF1 (tumor)					IGFBP3 (tumor)					IRS (tumor)				
	Negativo		Positivo			Negativo		Positivo			Negativo		Positivo		
	n	%	n	%	Valor p	n	%	n	%	Valor p	n	%	n	%	Valor p
Sexo					0,46					0,30					0,15
Feminino	17	60,7	32	52,4		3	37,5	47	56,6		5	83,3	45,0	52,9	
Masculino	11	39,3	30	48,4		5	62,5	36	43,4		1	16,7	40,0	47,1	
DM					0,81					0,15					0,27
DM2	7	25,0	16	25,8		-	-	23	27,7		-	-	23	27,1	
NDM	6	21,4	10	15,9		1	12,5	15	18,1		2	33,3	14	16,5	
PDM	15	53,6	36	58,7		7	87,5	45	54,2		4	66,7	48	56,5	
Localização					0,52					0,57					0,22
1	10	35,7	27	42,9		4	50,0	33	39,8		1	16,7	36	42,4	
2	18	64,3	36	57,1		4	50,0	50	60,2		5	83,3	49	57,7	
TNM					0,62					0,01*					0,30
1	14	50,0	35	55,6		1	12,5	48	57,8		2	33,3	47	55,3	
2	14	50,0	28	44,4		7	87,5	35	42,2		4	66,7	38	44,7	
Invasão Angiolinfática					0,07					0,21					0,85
Não	9	32,1	33	52,4		2	25,0	40	48,2		3	50,0	39	45,9	
Sim	19	67,9	30	47,6		6	75,0	43	51,8		3	50,0	46	54,1	
Invasão Perineural					0,18					0,40					0,47
Não	15	53,6	43	68,3		4	50,0	54	65,1		3	50,0	55	64,7	
Sim	13	46,4	20	31,8		4	50,0	29	34,9		3	50,0	30	35,3	
Histologia					0,79					0,97					0,35
1	25	89,3	55	87,3		7	87,5	73	88,0		6	100,0	74	87,1	
2	3	10,7	8	12,7		1	12,5	10	12,1		-	0,0	11	12,9	
pT					0,29					0,11					0,62
2	2	7,1	6	9,5		-	-	8	9,6		-	-	8	9,4	
3	17	60,7	46	73,0		4	50,0	59	71,1		4	66,7	59	69,4	
4	9	32,1	11	17,5		4	50,0	16	19,3		2	33,3	18	21,2	
pN					0,88					0,62					0,96
0	4	14,3	7	11,1		-	-	11	13,6		1	16,7	10	11,8	
1	13	46,4	28	44,4		5	62,5	36	43,3		3	50,0	38	44,7	
2 ou 3	11	39,3	27	42,9		3	37,5	35	42,2		2	33,3	36	42,4	
x	-	-	1	-		-		1	1,2		-	-	1	1,2	
Metástase					0,97					0,02*					0,24
Não	11	39,3	25	39,7		-	-	36	43,4		1	16,7	35	41,2	
Sim	17	60,7	38	60,3		8	100,0	47	56,6		5	83,3	50	58,8	
Progressão					0,20					0,97					0,38
Não	17	60,7	29	46,0		4	50,0	42	50,6		2	33,3	44	51,8	
Sim	11	39,3	34	54,0		4	50,0	41	49,4		4	66,7	42	48,2	
Óbito					0,31					0,01*					0,09
Não	16	57,1	43	68,3		2	25,0	57	68,7		2	33,3	57	67,1	
Sim	12	42,9	20	31,8		6	75,0	26	31,3		4	66,7	28	32,9	
Metformina					0,89					0,43					0,50
Não	26	92,9	59	93,7		8	100,0	77	92,8		6	100,0	79	92,9	
Sim	2	7,1	4	6,4		-	-	6	7,2		-	-	6	7,1	

5.3. Associação da expressão proteica com o prognóstico da doença em estudo.

5.3.1. Sobrevida livre de progressão

Ao analisar a sobrevida livre de progressão por Kaplan- Meier e modelo de regressão COX, foi observado uma relação significativa da sobrevida livre de progressão com a classificação para tumores malignos TNM, os pacientes que possuem a classificação TNM IV tem 43%, 26% e 16% de sobrevida livre de progressão em 1, 2 e 5 anos respectivamente, já os que possuem a classificação TNM II avançado e III, apresentam 94%, 83%, 69 % de sobrevida livre de progressão em 1, 2 e 5 anos respectivamente (HR = 6,24 e p<0.01); com a proteína IGF1, pacientes que apresentam superexpressão de IGF1 têm menor sobrevida livre de progressão quando comparado com os pacientes que não apresentam expressão de IGF1 (HR = 1,58 e p<0.01), é possível observar que os pacientes que apresentam a superexpressão para IGF1 tendem a ter uma menor sobrevida livre de progressão em 1,2 e 5 anos (65%;51%;41%) comparado aos negativos para proteína respectivamente (85%;73%;59%), como visto nas tabelas 7 e 8 e gráficos 1 e 2.

O inverso apresentou referente a proteína IGFBP3, em que os pacientes que apresentaram sua expressão negativa tenderam a uma menor sobrevida livre de progressão (56%;38%;38%) relacionado aos que apresentaram sua superexpressão em 1,2 e 5 anos respectivamente (72%;59%;47%). Quando analisado a associação da sobrevida livre de progressão com os grupos dos pacientes diabéticos, pré-diabéticos e não diabéticos, observa-se que a sobrevida livre de progressão em 5 anos, nos pacientes não diabéticos (66%) tende a ser maior quando comparado com o grupo de pacientes diabéticos tipo 2 (46%) e pré-diabéticos (41%).

Tabela 7. Relação da sobrevida livre de progressão e fatores clínico- patológicos em pacientes com adenocarcinoma de cólon avançado.

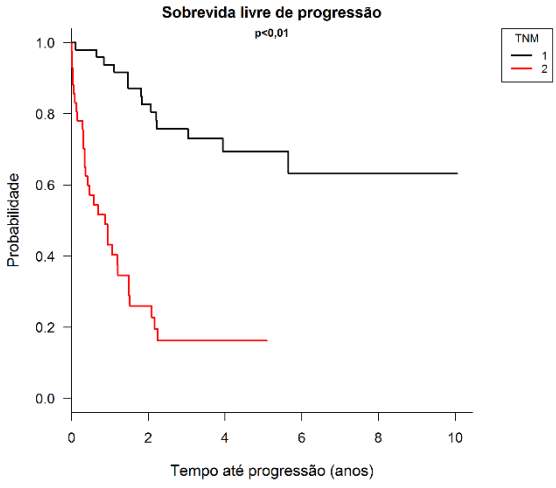
Descritivas - Sobrevida livre de progressão - Kaplan-Meier							
Variáveis	**Sobrevida**				**Total**	**Total de progressão**	**Teste de Log-rank**
	Prob. em 1 ano	**Prob. em 2 anos**	**Prob. em 5 anos**	**Média (IC 95%)**			
IGF1-TUMOR							
Negativo	0,85 (0,8; 1,07)	0,73 (1,33; 1,68)	0,59 (2,05; 2,45)	3,87 (2,96; 4,78)	28	11	0,16
Positivo	0,65 (0,82; 1,06)	0,51 (1,7; 1,96)	0,41 (3,81; 4,07)	2,22 (1,8; 2,65)	63	34	
IGFBP3-TUMOR							
Negativo	0,56 (0,55; 1,33)	0,38 (1,08; 1,88)	0,38 (1,08; 1,88)	1,09 (0,69; 1,49)	8	4	0,62
Positivo	0,72 (0,84; 1,04)	0,59 (1,72; 1,94)	0,47 (3,83; 4,06)	3,25 (2,71; 3,79)	83	41	

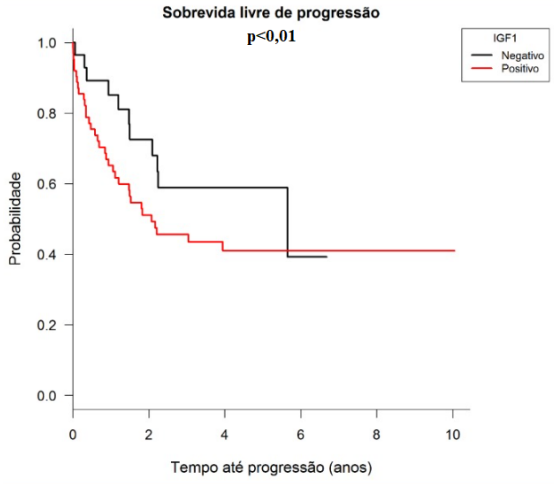
IRS-TUMOR							
Negativo	0,67 (-0,01; 0,74)	0,33 (1,1; 1,86)	0,33 (1,1; 1,86)	1,05 (0,58; 1,53)	6	4	0,42
Positivo	0,72 (0,84; 1,04)	0,6 (1,72; 1,94)	0,47 (3,83; 4,06)	3,27 (2,73; 3,81)	85	41	
DM							
DM2	0,82 (0,32; 0,63)	0,73 (1,31; 1,69)	0,46 (3,72; 4,17)	3,54 (2,57; 4,5)	23	12	
NDM	0,8 (0,46; 0,85)	0,73 (1,6; 2,06)	0,66 (1,98; 2,47)	1,82 (1,4; 2,25)	16	5	0,21
PDM	0,63 (0,81; 1,08)	0,46 (1,67; 1,95)	0,41 (1,95; 2,24)	1,35 (1,13; 1,58)	52	28	
Histologia							
1	0,71 (0,84; 1,04)	0,56 (1,72; 1,94)	0,47 (3,83; 4,06)	3,22 (2,67; 3,76)	80	41	0,91
2	0,78 (0,07; 0,62)	0,78 (0,07; 0,62)	-	1,74 (1,12; 2,36)	11	4	
Invasão Angiolinfática							
Não	0,76 (0,81; 1,07)	0,62 (1,68; 1,98)	0,53 (3,78; 4,1)	3,57 (2,81; 4,32)	42	19	0,25
Sim	0,67 (0,8; 1,08)	0,53 (1,66; 1,96)	0,41 (2,1; 2,4)	1,51 (1,25; 1,76)	49	26	
Invasão Perineural							
Não	0,73 (0,82; 1,06)	0,59 (1,7; 1,96)	0,54 (2,9; 3,17)	2,05 (1,73; 2,38)	58	24	0,14
Sim	0,69 (0,68; 1)	0,56 (1,64; 1,98)	0,33 (3,76; 4,13)	2,79 (1,99; 3,6)	33	21	
pN							
0	0,64 (0,66; 1,23)	0,45 (1,54; 2,12)	0,27 (1,91; 2,43)	1,45 (0,95; 1,95)	11	8	
1	0,67 (0,79; 1,09)	0,55 (1,65; 1,97)	0,49 (2,87; 3,2)	3,21 (2,4; 4,02)	41	20	0,33
2 ou 3	0,8 (0,71; 0,97)	0,66 (1,36; 1,68)	0,51 (3,76; 4,12)	2,69 (2,18; 3,2)	38	16	
Localização							
1	0,67 (0,78; 1,1)	0,6 (1,66; 2)	0,56 (1,92; 2,27)	3,52 (2,64; 4,4)	37	15	0,48
2	0,74 (0,73; 0,96)	0,56 (1,68; 1,95)	0,4 (3,8; 4,09)	2,34 (1,92; 2,77)	54	30	
TNM							
1	0,94 (0,78; 0,91)	0,83 (1,72; 1,94)	0,69 (3,8; 4,09)	4,5 (3,94; 5,06)	49	14	<0,01*
2	0,43 (0,78; 1,1)	0,26 (1,38; 1,66)	0,16 (2,12; 2,37)	1,01 (0,74; 1,28)	42	31	

Tabela 8. Sobrevida livre de progressão - Modelo de regressão de Cox.

Modelo de regressão de Cox considerado o Tempo até progressão (anos)								
Variáveis	**Modelo Bruto**				**Modelo Ajustado**			
	HR	**IC 95%**		**Valor p**	**HR**	**IC 95%**		**Valor p**
IGF1 (Positivo vs negativo)	1,58	0,80	3,12	0,19	3,97	1,57	10,00	<0,01*
IGFBP3 (Negativo vs positivo)	1,34	0,48	3,78	0,58	0,68	0,20	2,29	0,54
IRS (Negativo vs positivo)	1,56	0,56	4,37	0,40	3,15	0,81	12,20	0,10
DM (DM2 vs PDM)	0,67	0,33	1,35	0,26	1,19	0,52	2,70	0,68
DM (PDM vs NDM)	2,23	0,86	5,79	0,10	1,69	0,60	4,77	0,32
DM (DM2 vs NDM)	1,49	0,52	4,30	0,46	2,01	0,62	6,56	0,25
Idade ao diagnóstico	0,98	0,95	1,00	0,06	1,00	0,97	1,03	0,99
Histologia (2 vs 1)	1,10	0,39	3,07	0,86	1,09	0,33	3,62	0,89
Invasão Angiolinfática (Sim vs Não)	1,37	0,75	2,50	0,30	1,88	0,84	4,21	0,12
Invasão Perineural (Sim vs Não)	1,48	0,82	2,69	0,19	1,33	0,58	3,02	0,50
pN (1 vs 0)	0,72	0,32	1,64	0,44	1,66	0,55	5,05	0,37
pN ("2 ou 3" vs 0)	0,54	0,23	1,25	0,15	0,69	0,23	2,05	0,50
pN ("2 ou 3" vs 1)	0,74	0,38	1,43	0,37	0,41	0,19	0,88	0,02*
Localização (2 vs 1)	1,21	0,65	2,26	0,55	1,26	0,62	2,55	0,53
TNM (2 vs 1)	6,24	3,20	12,17	<0,01*	10,31	4,54	23,40	<0,01*

Gráficos 1 e 2. Sobrevida livre de progressão associada as variáveis, classificação TNM e IGF1 através do gráfico de Kaplan – Meier.





5.3.2. Sobrevida Global

Ao analisar a sobrevida global através das análises de sobrevivência de Keplan – Meier e do modelo de regressão de COX, observou-se que houve relação estatisticamente significativa, com a expressão no tecido tumoral de IGFBP-3 (p <0,01), pacientes que possuem a expressão negativa da proteína IGFBP3 tem uma menor sobrevida global comparados aos que possuem expressão positiva (HR= 3,49), quando há expressão positiva de IGFBP-3 a probabilidade de vida em 5 anos é de 65,0% e quando há expressão negativa essa probabilidade vida em 5 anos diminui para 25,0%; com o tipo histológico do tumor, sendo 1 (bem e moderadamente diferenciado) e 2 (pouco diferenciado e indiferenciado), pacientes que apresentam o tipo histológico de adenocarcinomas pouco diferenciado e indiferenciado possuem significativamente uma pior sobrevida global, probabilidade de sobrevida em 1 ano é de 55%, do que os que apresentam adenocarcinomas bem e moderadamente diferenciado, probabilidade de sobrevida global em 1 ano é de 94% (p <0.01) (HR = 2,61); e com a classificação de tumores malignos TNM, sendo 1 (TNM II e III) e 2 (TNM IV) pacientes que apresentam metástase (TNM IV), probabilidade de sobrevida em 5 anos é de 31,0% possuem significativamente uma menor sobrevida global do que os que não apresentam (TNM II e III), probabilidade de sobrevida em 5 anos é de 87,0% (p <0,01) (HR = 6,52), como visto nas tabelas 9 e 10 e nos gráficos 3, 4 e 5.

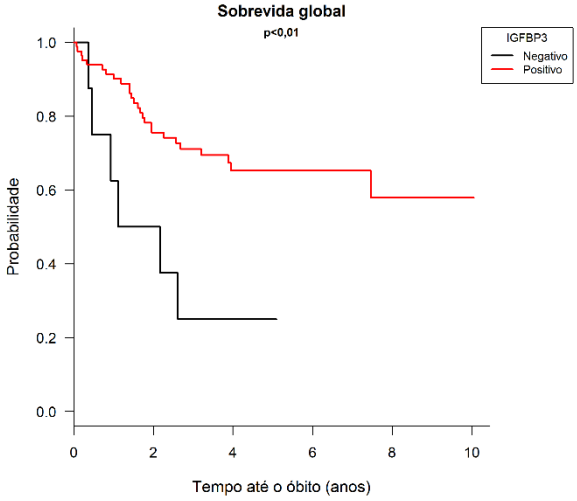
Tabela 9. Relação da sobrevida global e fatores clínico- patológicos em pacientes com adenocarcinoma de colón avançado.

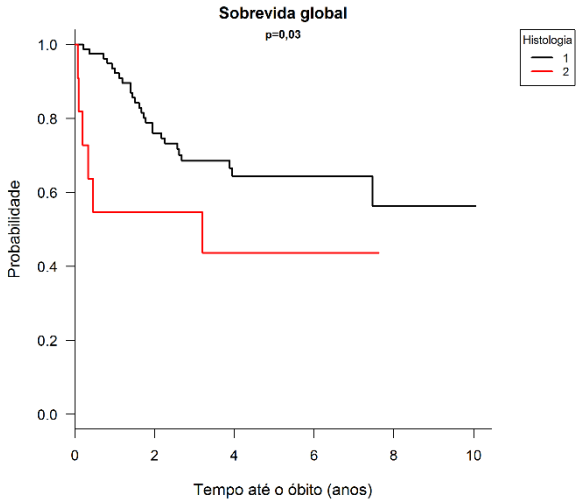
Descritivas - Sobrevida global - Kaplan-Meier							
Variáveis	**Sobrevida**				**Total**	**Total de progressão**	**Teste de Log-rank**
	Prob. em 1 ano	**Prob. em 2 anos**	**Prob. em 5 anos**	**Média (IC 95%)**			
IGF1-TUMOR							
Negativo	0,86 (0,8; 1,06)	0,71 (1,5; 1,84)	0,54 (3,69; 4,09)	2,87 (2,35; 3,39)	28	12	0,42
Positivo	0,9 (0,74; 0,89)	0,74 (1,84; 2,07)	0,65 (3,82; 4,08)	5,43 (4,66; 6,21)	63	20	
IGFBP3-TUMOR							
Negativo	0,63 (0,6; 1,27)	0,5 (0,77; 1,46)	0,25 (2,32; 2,92)	1,61 (0,9; 2,32)	8	6	<0,01*
Positivo	0,91 (0,76; 0,88)	0,76 (1,86; 2,05)	0,65 (3,84; 4,07)	5,48 (4,82; 6,14)	83	26	
IRS-TUMOR							
Negativo	0,83 (0,07; 0,66)	0,83 (0,07; 0,66)	0,33 (2,3; 3,06)	2,2 (1,42; 2,98)	6	4	0,23
Positivo	0,89 (0,87; 1)	0,72 (1,86; 2,05)	0,64 (3,84; 4,07)	5,35 (4,69; 6,02)	85	28	
DM							
DM2	0,87 (0,68; 0,96)	0,78 (1,61; 1,95)	0,71 (3,68; 4,09)	5,75 (4,48; 7,03)	23	7	
NDM	0,88 (0,04; 0,36)	0,81 (1,48; 1,86)	0,72 (2,44; 2,92)	2,3 (1,82; 2,78)	16	4	0,46
PDM	0,9 (0,85; 1,02)	0,68 (1,82; 2,09)	0,54 (3,81; 4,1)	2,92 (2,54; 3,29)	52	21	
Histologia							
1	0,94 (0,88; 0,99)	0,76 (1,86; 2,05)	0,64 (3,84; 4,07)	5,46 (4,8; 6,12)	80	26	0,03*
2	0,55 (0,16; 0,75)	0,55 (0,16; 0,75)	0,44 (2,9; 3,51)	1,85 (0,89; 2,81)	11	6	
Invasão Angiolinfática							
Não	0,93 (0,65; 0,8)	0,77 (1,82; 2,08)	0,71 (2,54; 2,83)	2,35 (2,13; 2,57)	42	11	0,11
Sim	0,85 (0,83; 1,04)	0,7 (1,82; 2,09)	0,52 (3,79; 4,12)	4,74 (3,82; 5,67)	49	21	
Invasão Perineural							
Não	0,89 (0,64; 0,8)	0,66 (1,83; 2,08)	0,6 (2,55; 2,82)	2,16 (1,94; 2,38)	58	21	0,53
Sim	0,88 (0,82; 1,05)	0,85 (1,32; 1,57)	0,63 (3,76; 4,15)	5,52 (4,48; 6,57)	33	11	
pN							
0	1 (0; 0)	0,91 (1,45; 1,79)	0,76 (3,65; 4,26)	3,74 (3,18; 4,3)	11	2	
1	0,87 (0,83; 1,04)	0,76 (1,64; 1,92)	0,66 (3,04; 3,36)	2,6 (2,27; 2,94)	41	12	0,30
2 ou 3	0,89 (0,36; 0,56)	0,67 (1,8; 2,11)	0,55 (3,72; 4,05)	4,85 (3,84; 5,85)	38	17	
Localização							
1	0,83 (0,81; 1,06)	0,67 (1,57; 1,89)	0,59 (3,03; 3,38)	2,42 (2,02; 2,82)	37	13	0,57
2	0,93 (0,75; 0,89)	0,77 (1,84; 2,07)	0,63 (3,81; 4,1)	5,41 (4,61; 6,2)	54	19	
TNM							
1	0,98 (0,3; 0,38)	0,92 (1,87; 2,03)	0,87 (2,52; 2,72)	6,71 (6,09; 7,33)	49	7	<0,01*
2	0,78 (0,81; 1,06)	0,5 (1,79; 2,11)	0,31 (3,8; 4,11)	2,34 (1,88; 2,8)	42	25	

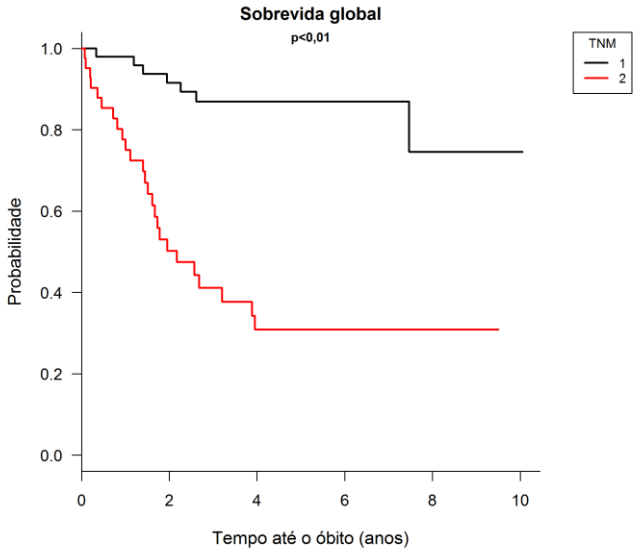
Tabela 10. Sobrevida global - Modelo de regressão de Cox

Modelo de regressão de Cox considerado o Tempo até óbito (anos)								
Variáveis	**Modelo Bruto**				**Modelo Ajustado**			
	HR	**IC 95%**		**Valor p**	**HR**	**IC 95%**		**Valor p**
IGF1 (Positivo vs negativo)	0,71	0,35	1,47	0,36	1,04	0,37	2,95	0,94
IGFBP3 (Negativo vs positivo)	3,49	1,42	8,58	<0,01*	1,99	0,65	6,14	0,23
IRS (Negativo vs positivo)	1,94	0,68	5,56	0,22	1,36	0,33	5,67	0,67
DM (DM2 vs PDM)	0,57	0,23	1,41	0,22	2,01	0,64	6,35	0,23
DM (PDM vs NDM)	1,69	0,58	4,95	0,34	1,18	0,34	4,07	0,80
DM (DM2 vs NDM)	0,96	0,27	3,43	0,95	2,37	0,53	10,67	0,26
Idade ao diagnóstico	0,98	0,95	1,01	0,18	0,98	0,95	1,02	0,39
Histologia (2 vs 1)	2,61	1,07	6,38	0,04*	5,41	1,65	17,74	<0,01*
Invasão Angiolinfática (Sim vs Não)	1,72	0,82	3,59	0,15	1,05	0,38	2,90	0,93
Invasão Perineural (Sim vs Não)	0,72	0,34	1,54	0,40	0,41	0,16	1,07	0,07
pN (1 vs 0)	2,05	0,46	9,16	0,35	1,77	0,32	9,77	0,51
pN ("2 ou 3" vs 0)	2,84	0,65	12,31	0,16	2,66	0,49	14,46	0,26
pN ("2 ou 3" vs 1)	1,39	0,66	2,91	0,39	1,51	0,67	3,37	0,32
Localização (2 vs 1)	0,77	0,38	1,58	0,48	0,86	0,36	2,06	0,74
TNM (2 vs 1)	6,52	2,79	15,20	<0,01	10,00	3,62	27,60	<0,01*

Gráficos 3, 4 e 5. Sobrevida global associada as variáveis, IGFBP3, tipo histológico e classificação TNM, através do gráfico de Kaplan – Meier.







5.3.3. Metástase

Através da análise do teste qui - quadrado, foi possível observar que houve associação entre a presença de metástase com as variáveis IGFBP3 (p= 0,02); a invasão perineural (p= 0,02), em que pacientes com presença de invasão perineural possuem maior probabilidade de apresentar evolução para metástase (HR = 2,80; p=0.03); e estatisticamente significativa com a classificação patológica pT (p < 0,01), como apresentado na tabela 11 e 12.

Tabela 11. Descritiva segundo metástase e associação de variáveis – Teste qui-quadrado.

Variáveis	Metástase				Valor p
	Não		Sim		
	n	%	n	%	
DM					
DM2	11	47,8	12	52,2	
NDM	7	43,8	9	56,3	0,52
PDM	18	34,6	34	65,4	
IGF1 (tumor)					
Negativo	11	39,3	17	60,7	0,97
Positivo	25	39,7	38	60,3	
IGFBP3 (tumor)					
Negativo	-	-	8	100,0	0,02*
Positivo	36	43,4	47	56,6	
IRS (tumor)					
Negativo	1	16,7	5	83,3	0,24
Positivo	35	41,2	50	58,8	
Histologia					
1	32	40,0	48	60,0	0,82
2	4	36,4	7	63,6	
Invasão Angiolinfática					
Não	20	47,6	22	52,4	0,15
Sim	16	32,7	33	67,4	
Invasão Perineural					
Não	28	48,3	30	51,7	0,02*
Sim	8	24,2	25	75,8	
pT					
2	4	50,0	4	50,0	
3	30	47,6	33	52,4	<0,01*
4	2	10,0	18	90,0	
pN					
0	2	18,2	9	81,8	
1	18	43,9	23	56,1	0,28
2 ou 3	16	42,1	22	57,9	
Localização					
1	16	43,2	21	56,8	0,55
2	20	37,0	34	63,0	

Tabela 12. Metástase – Modelo de regressão logística

Modelo de regressão logística com probabilidade modelada em Metástase="Sim"								
Variáveis	**Modelo Bruto**				**Modelo Ajustado**			
	OR	**IC 95%**		**Valor p**	**OR**	**IC 95%**		**Valor p**
DM (PDM vs NDM)	0,78	0,21	2,84	0,70	1,07	0,22	5,17	0,94
DM (DM2 vs NDM)	1,47	0,47	4,60	0,51	1,48	0,37	5,95	0,58
IGF1 (Positivo vs negativo)	0,96	0,39	2,39	0,93	2,87	0,80	10,23	0,10
IGFBP3 (Negativo vs positivo)	<0,001	<0,001	>999,999	0,96	<0,001	<0,001	>999,999	0,97
IRS (Negativo vs positivo)	3,57	0,40	31,92	0,25	4,03	0,18	88,97	0,38
Histologia (2 vs 1)	1,19	0,32	4,41	0,79	1,34	0,27	6,80	0,72
Invasão Angiolinfática (Sim vs Não)	1,82	0,78	4,27	0,17	1,97	0,64	6,09	0,24
Invasão Perineural (Sim vs Não)	2,80	1,08	7,25	0,03*	1,87	0,58	6,02	0,29
pT (3 vs 2)	1,10	0,25	4,79	0,90	0,66	0,12	3,62	0,64
pT (4 vs 2)	8,50	1,13	63,87	0,04*	3,66	0,38	34,89	0,26
pN (1 vs 0)	0,28	0,05	1,48	0,14	0,27	0,04	1,82	0,18
pN ("2 ou 3" vs 0)	0,31	0,06	1,61	0,16	0,28	0,04	2,09	0,22
Localização (2 vs 1)	1,26	0,53	2,96	0,60	1,23	0,45	3,34	0,69

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, grandes esforços foram e estão sendo realizados na tentativa de criar sistemas de estadiamento fundamentados na biologia molecular, pois se mostram mais personalizados e exatos na previsão do prognóstico dos pacientes oncológicos, mas para isto, é necessário conhecer quais dos mecanismos e marcadores moleculares que são influenciados pelo comportamento dos tumores.

Assim, o presente estudo analisou a expressão imuno-histoquímica de IGF1, IGFBP3 e IRS1 com variáveis clínico-patológicas e a correlação da sobrevida livre de progressão e global no adenocarcinoma de cólon avançado em pacientes não – diabéticos, pré-diabéticos e com diabetes mellitus tipo 2, o número de casos em estudados foram de 91 pacientes. Como observado, a maioria dos pacientes foram classificados como idosos, já é de grande conhecimento que o câncer é uma doença aumentada nesta faixa etária, de acordo com o envelhecimento celular, um estudo realizado mostrou que 55% de todos os tumores malignos são acometidos nesta faixa etária, e que 67% de todas as mortes por câncer ocorreram nesta população em 1988. Isso se caracteriza pois níveis alterados de funcionamento podem ocorrer nesta faixa etária, como pulmonar, sistema cardiovascular, renal, nervoso e endócrinos, podendo sofrer alterações que resultam na diminuição do funcionamento e também mudanças ocorrem na estrutura do corpo, como massa óssea e diminuição no tamanho e força dos músculos, além do que múltiplos problemas clínicos causados por outras doenças crônicas estão associados, já que nesta idade também já estão instaladas, como diabetes, pressão alta e dislipidemias [56] . Deve-se observar também que

em países em desenvolvimento, como o Brasil, a população está envelhecendo e crescendo ao lado de uma crescente inserção de comportamentos causadores de câncer, como o tabagismo, má alimentação, sedentarismo. Isso poderia ser melhorado com programas de prevenção, como campanhas de saúde pública que promovem atividade física e alimentação saudável, e esses fatos também enfatizam a necessidade de concentrar na detecção precoce, diagnóstico e tratamento, principalmente nos idosos [58].

Além disso, a maioria dos pacientes foram do sexo feminino, estudos de estimativas apontam que há um discreto predomínio do sexo masculino, tanto em incidência (53%), quanto em mortalidade (57%) [2]. Porém é necessário observar que no câncer colorretal, a incidência mundial em homens apresenta-se em terceiro lugar, já nas mulheres ele se encontra em segundo lugar mais incidente, perdendo apenas para o câncer de mama [59].

Contudo, o maior número de pacientes estudados apresentavam pré- diabetes, a diabetes mellitus tipo 2 como já mencionado, é uma doença de grande agravo na saúde pública, esse aumento no diabetes tipo 2 está claramente ligado as mudanças em direção a um estilo de vida ocidental (alto consumo de alimentos ricos em carboidratos, baixo nível de atividade física), nos países em desenvolvimento houve um aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade, que são consequências do mesmo estilo de vida. Os pacientes pré- diabéticos, se continuarem com os mesmo estilos, daqui a um período de tempo se tornarão diabéticos tipo 2, pacientes que apresentam pré diabetes geralmente não sabem, ou se são diagnosticados já iniciam algum medicamento para reversão do quadro, mas o que é importante destacar é que mesmo com o uso de medicamentos, ocorre o risco de apresentar novamente este quadro caso não seja mudado seu estilo de vida [11].

Como visto, a maioria dos pacientes apresentaram a localização no lado esquerdo, definido como neoplasia localizada no cólon descendente e sigmoide. A localização do tumor é de extrema relevância, já que se conhece a existência de diferenças nas características genéticas e anatomopatológicas dos tumores originados de diferentes localizações do cólon, tendo consequente influencia na evolução e resposta ao prognóstico e tratamento. A prevalência da localização encontrada no trabalho já é demonstrada em outros artigos, concordando assim com a literatura atual [60-63]. O atual trabalho também mostrou que a maioria dos pacientes apresentaram presença de metástase, podendo ser justificado pelo trabalho ser realizado já com pacientes que

tiveram a doença avançada no momento do diagnóstico, e também é demonstrado que de 20 a 25% dos pacientes já possuem metástase no momento do diagnóstico e quando diagnosticados nos estádios iniciais da doença esse percentual pode atingir de 60 até 95% [60-62, 64-65].

Em análise dos pacientes com o diagnóstico de DM2, a maioria não fazia uso de metformina, pois utilizavam outros medicamentos, como a própria a insulina, e outros não utilizavam nenhum medicamento, apenas tentavam controlar através da alimentação. Porém a instabilidade dos sintomas apresentados por estes pacientes que não realizam o uso de nenhum controle medicamentoso, leva a possibilidade de sérios comprometimentos, com impacto e interferências no habito de vida para aderirem a esta forma de tratamento, muito são os pacientes que chegam em prontos atendimentos com hiperglicemia ou algum outro sintoma importante relacionado a doença, sendo um problema para os pacientes e também para os sistemas e serviços da saúde, constituindo necessário cada vez mais o reforço das orientações e acompanhamento do cotidiano dos pacientes que realizam o auto cuidado com agentes de saúde [66]. Foi possível observar no estudo que os pacientes que faziam o uso do fármaco tenderam a ter uma proteção para superexpressão da proteína IGF1, este já ficou demonstrada ser um fator para o pior prognóstico no adenocarcinoma de colon avançado [13,19].

A maioria dos pacientes apresentaram expressão positiva para as 3 proteínas estudadas, IGF1, IGFBP3 e IRS1, sendo que os pacientes diabéticos e pré diabéticos tenderam a ter uma maior superexpressão destas proteínas comparado aos pacientes não diabéticos, sendo possivelmente relacionado a desregulação que ocorre na via de sinalização quando há presença de neoplasia, e tende a ser mais acentuada quando há presença da disfunção glicêmica, o mecanismo biológico subjacente a via de sinalização FCSI já foi revisada por outros autores, esta via está relacionada com a ativação de uma cascata de reações biológicas, levando a proliferação e a inibição da apoptose, que pode contribuir com o desenvolvimento de células tumorais [12-13,16-17,23].

As variaveis apresentas em relação com o adenocarcinoma de cólon avançado mostraram que há uma menor sobrevida global nos pacientes com o tipo histológico pouco diferenciado e indiferenciado,o que se confirma com a literatura, pois quanto maior é o grau (menor diferenciação celular), maior é a velocidade de crescimento do tumor [2]; a presença de invasão perineural, quando há invasão perineural é demosntrado na

literatura que estes pacientes possuem crescimento infiltrativo, maior probabilidade de disseminação linfonodal, e estão associados a estádios mais avançados da doença [67] ; e com a classificação de tumores malignos TNM IV, dado semelhante a literatura, já que pacientes que possuem metástase a distância apresentam um menor tempo de vida. Em relação a associação do risco para evolução de metástase, foi demonstrado uma maior incidência nos pacientes com presença de invasão perineural, e classificação patológica pT4 em comparação a pT2, pois o acometimento da serosa e dos órgãos adjacentes levam ao desenvolvimento de metástase. Em relação a sobrevida global livre de progressão, houve uma associação entre a classificação patológica pN 1,2,3, o que esta de acordo com a literatura, pois pacientes com a presença de metástase linfonodal apresentam pior prognóstico comparado com os que não apresentam [68,69]; e também com a classificação de tumores malignos TNM, como também relacionado na sobrevida global.

Em análise da proteína IGF1 relacionada ao adenocarcinoma de cólon avançado, mostrou que os pacientes que possuem a superexpressão desta proteína tem uma menor sobrevida livre de progressão quando comparado aos pacientes com expressão negativa. O que esta de acordo com a maioria dos estudos realizados, observa-se que os pacientes com sua superexpressão levam a um menor tempo de sobrevida livre de progressão, quando comparado nos pacientes que não apresentam expressão da mesma. [8,13,23,70-73].

Também houve uma associação significativa entre IGFBP3 e a sobrevida global, em que os pacientes que não apresentaram expressão da proteína IGFBP3 apresentaram menor sobrevida global comparado com os que apresentam essa superexpressão, o que já foi confirmando em alguns outros estudos, já que a proteína IGFBP3 é uma proteína de ligação de IGF1, onde a sua presença torna IGF1 menos biodisponível, pois se liga a ele e bloqueia sua capacidade de de ligar aos seus receptores, reduzindo a ativação de reações jusantes da via FCSI, como visto em estudos, os pacientes que possuem a superexpressão de IGF1 e expressão negativa para IGFBP3 apresentam um pior prognóstico/evolução da doença . Este resultado foi de grande importancia, já que estudos de associação de IGFBP3 com o risco de cancer de cólon relatou resultados inconsistentes [74-77] e sua maioria foram realizados em nível sérico e não em tecido, dois estudos realizados com adenocarcinoma avançado observara uma associação significativa inversa entre os altos níveis de soro de IGFBP3 e seu risco o que se assemelha ao resultado do presente estudo [71-73,78-82].

A proteína IRS1 não demonstrou dados estatisticamente significativos no grupo estudado. As proteínas IRS são uma família de proteínas adaptadoras citoplasmáticas que transmitem sinais dos receptores de insulina e IGF1 para induzir uma resposta celular, mas vale ressaltar que ainda nenhum estudo ate o momento foi realizado com o adenocarcinoma de cólon avançado, e os estudos relacionados com IRS1 são inconclusivos. As proteínas IRS não contêm atividade enzimática intrínseca e medeiam a sinalização IGF/IGF1R através de sua função como estruturas protéicas para organizar complexos de sinalização, são recrutados para receptores ativados atravez dos domínios PH e PTB localizados em seus N -terminais, e são subsequentemente fosforilados pelas quinases receptoras em resíduos de tirosina em seus C- terminais, gerando locais de ligação para recrutar efeitos jusantes [83]. Mas ao análisar a expressão de IRS1 no total dos pacientes, 85 pacientes apresentaram expressão postiva para IRS1 e apenas 6 expressão negativa, onde possivelmente mostra que sua expressão pode estar relacionada com o risco de adenocarcinoma de cólon avançado, ja que a maioria dos pacientes apresentaram sua super expressão, como mostrado na literatura.

Em dois trabalhos realizados em ratos mostrou que por imuno-histoquímica, a expressão de IRS1 foi observada em toda a cripta do cólon com diferenciação do epitélio intestinal, que pode ser consistente com um papel da ligação de IGF1/IGF1R [84,85].Outros estudos veem demonstrando que células metástaticas de CRC no fígado apresentam alta expressão de IGF1R e IRS1[86-89]. Houve semelhante resultado do presente estudo na relação IRS1/Histologia, mostrando que pacientes com super expressão de IRS 1 tiveram relação com o fenótipo moderadamente e bem diferenciado, este tipo histologico do adednocarcinoma de cólon é mais associado com um prognóstico de maior agressividade e com potencial metastático [90-91]. No entanto os resultados são confusos e inconclusiveis, sendo necessários mais estudos com IRS-1 que mostram sua associação no CCR e com o adenocarcinoma de cólon avançado que ainda não há estudos na literatura sobre este tipo específico de tumor [53-54,90].

Ao analisar o grupos dos pacientes, diabéticos, pré-diabéticos e não-diabéticos, viu-se que os pacientes que apresentam o diabetes mellitus tipo 2 e o pré-diabetes tendem a ter uma menor sobrevida livre de progressão em comparação ao grupo dos não diabéticos, estudos já confirmaram que pacientes com DM2 mostraram um pior prognóstico em relação ao câncer, neste estudo é apresentado que esta relação ocorre e que também esta relacionada a via de sinalização do fator de crescimento semelhante à

insulina, onde esta encontra-se desrregulada nas patologias estudadas. Foi observado também que pacientes que apresentam adenocarcinoma de cólon avançado e DM2 tem uma relação significativa com a classificação de tumores malígnos (TNM) a sobrevida global e sobrevida livre de progressão, inclusive que os pacientes diabéticos que apresentam metástase possuem um menor tempo de sobrevida global em comparação aos pré diabéticos e não-diabéticos. Mostrando também que os pacientes como DM2 tendem a um maior risco para evolução à metástase do que os não diabéticos, comprovando ainda mais a associação do câncer com o DM2 e pior progressão da doença [8,11-16]. Em análise da metformina que atualmente esta sendo muito estudada como possivel "protetor" as células tumorais, observou-se que pacientes diabéticos com adenocarcinoma de cólon avançado que a ultizavam tenderam a uma maior sobrevida livre de progressão em relação aos que não a utilizavam, se assemelhando aos resultados ja observados nos artigos da literatura mas nenhum destes dados tiveram significancia estatística [4,19].

O presente estudo possui várias vantagens, porém também limitações. Primeiramente é o primeiro estudo que aborda a relação da via do FCSI, o adenocarcinoma de cólon avançado e o DM2. Em segundo lugar, este estudo passou por um critério de seleção bastante criterioso, diminuindo muitas viéses que poderiam vir a ocorrer nos resultados, mas isto também levou a limitação de menor número de pacientes, uma limitação foi que no inicio do estudo iria realizar a expressão plasmática além da tecidual, então foram excluidos pacientes que não apresentavam armazenamento de sangue para estudo, após este objetivo teve que ser retirado por motivos de limitações de armazenamento. Este estudo foi realizado apenas com pacientes com adenocarcinoma de cólon avançado, filtrando assim os resultados para este grupo de pacientes, que por outro lado também pode ser uma limitação, sendo necessário realizar um estudo para pacientes com diagnóstico inicial deste tumor, pois os resultados não podem ser generalizados para o mesmo. Outra limitação é que não houve um grupo controle sem o adenocarcinoma de cólon, já que realizamos também a IHQ nas margem os que seriam observados como tumores, mas isto não foi possível já que algumas margem tiveram marcassão positiva das proteínas estudadas, podendo ser justificado pois já há um microambiente tumoral que interfere e também a mutação ja esta inserida, não é porque a área esta livre do tumor que esta livre da mutação [92].

7. CONCLUSÃO

Muitos estudos clínicos e epidemiológicos apontam que o CCR se tornou nos últimos anos um problema médico e social a nível mundial, aumentando sua incidência cada vez mais. Atualmente sabe-se que seu processo de carcinogênese é complexo e envolve várias alterações nas vias de controle de proliferação celular, apoptose, capacidade de invasão. Embora os métodos de imagem, genética e bioquímica contribuírem para o diagnóstico precoce deste cancer, é a investigação na biologia molecular que vem revolucionando as expectativas de esclarecer sua etiologia e consequentemente seu tratamento.

Estudos recentes têm comprovado que os FCSI estão associados com o prognóstico, evolução a metástase e resposta terapêutica. Onde este trabalho confirma estas comprovações, quando analisados as proteínas IGF1 e IGFBP3 mostrando que altos níveis de IGF1 e diminuídos de IGFBP3 levam a uma pior sobrevida global e livre de progressão, mostrando representar marcadores úteis de prognósticos para estes pacientes estudados. Em contrapartida a proteína IRS1 e seu resultado veio corroborar o que outras investigações têm vindo a comprovar. No entanto, são necessários novos estudos em foco nesta proteína para esclarecimentos.

Também foi possível demonstrar que pacientes que possuem o diagnóstico de DM2 tendem a um pior prognostico, não somente os que já possuem o diabetes, mas também os pré-diabéticos e que o uso de metformina tende a “evitar ou atrasar” a uma pior evolução da doença, podendo ser um medicamento de proteção.

Este e outros estudos mostram a importância de investigar cada vez mais esses possíveis marcadores moleculares para uma detecção precoce e no momento dessa detecção já ser possível prever como será a possível evolução da doença e assim traçar tratamentos correlacionados a inversão destes marcadores. Além disso, devem ser realizadas cada vez mais, campanhas de saúde pública que promovem a atividade física e a alimentação saudável, como mostrado pacientes Diabéticos tipo 2 que é uma doença diretamente relacionada ao estilo de vida leva a um pior desenvolvimento do cancer, neste estudo comprovado sua relação com o adenocarcinoma de colón. Principalmente aos pacientes pré-diabéticos que pode ainda reverter esse diagnóstico, e os já diabéticos podem controlar através da mudança do estilo de vida.

8- REFERÊNCIAS

1. SMITH, BD; SMITH, GL; HURRIA, A; HORTOBAGYI, GN; BUCHHOLZ, TA. Future of Cancer Incidence in the United States: Burdens Upon Aging, Changing Nation. *Journal of Clinical Oncology*, 17, 2758-2765, 2009.

2. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

3. DENG, H; WANG, JM; LI, M; TANG, R; TANG, K; SU, Y. et.al. Long non-coding RNAs: New biomarkers for prognosis and diagnosis of colon cancer. *Tumor Biology*. 1-11, 2017 June.

4. HASONO, K; ENDO, H; TAKAHASHI, H; SUGIYAMA, M; SAKAI, E; UCHIYAMA, T. et al. Metformin Suppresses Colorectal Aberrant Crypt Foci in a Short-term Clinical Trial. *Cancer Prev Rev*, vol. 3 (9), 2010.

5. WANG, P; ZHOU, Y; MEI, Q; ZHAO, J; HUANG, L; FU, Q. PPA1 regulates tumor malignant potential and clinical outcomes of colon adenocarcinoma through JNK pathways. *Oncotarget*, vol. 8 (35): 58611-58624, 2017.

6. SAITO, RF; LANA, MVG; MEDRANO, RFV; CHAMMAS, R. Fundamentos de Oncologia Molecular. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

7. FERREIRA, CG; ROCHA, JCC. Oncologia Molecular. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

8. SHLOMAI, G; NEEL, B; LEROITH, D; GALLAGHER, EJ. Type 2 Diabetes Mellitus and Cancer: The Role of Pharmacoterapy. *Journal of Clinical Oncology,* 34:4261-4269, 2016.

9. JOSHI, P; JOSHI, RK; KIM, WJ; LEE, SA. Insulin- like growth factor- 1, IGF- binding protein- 3, C- peptide and colotectal cancer: a case-control study. *Journal of Cancer Prevention,* vol. 16 (9): 3735-3740, 2015.

10. LIU, J; LIU, F; LI, X; SONG, X; ZHOU, L; JIE, J. Screening Key genes and miRNAs in early-stage colon adenocarcinoma by RNA-sequencing. *Tumor Biology,*1-12, 2017.

11. OZOUGWU, JC; OBIMBA, KC; BELONWU, CD; UNAKALAMBA, CB. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology,* vol. 4(4): 46-57, 2013.

12. SHARMA, A; HANYANN, N; KUMAR, A; TELI, K; RANDHAWA, J; RECOR, J. et.al. Colorectal Cancer: Histopathologic differences in tumor characteristics between patients with and without diabetes. *Clinical Colorectal Cancer*, vol.13 (1): 54-61, 2014.

13. YANG, J; NISHIHARA, R; ZHANG, X; OGINO, S; QIAN, ZR. Energy sensing pathways: Bridging type 2 diabetes and colorectal cancer? *J. Diabetes Complications.* 31(7):1228-1236, 2017 Jul.

14. GIOVANNUCCI, E; HARLAN, DM; ARCHER, MC; BERGENSTAL, RM; GAPSTUR, SM; HABEL, LA. et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes care,* 33: 1674-1685, 2010.

15. DE KORT, S; MASCLEE, AAM; SANDULEANU, S; WEIJENBERG, MP; VAN HERK-SUKEL, MPP; OLDENHOF, NJJ. et al. Higher risk of colorectal cancer in patients with newly diagnosed diabetes mellitus before the age of colorectal cancer screening initiation. *Sci Rep*, 7:46527, 2017 Apr 24.

16. YANG, J; SUN, L; YU, S. Diabetes mellitus is an independent risk factor for colorectal cancer. *Dig. Dis. Sci.*, 57: 1586-97, 2012.

17. YANG, IP; TSAI, HL; HUANG, CW; LU, CY; MIAO, ZF; CHANG, SF. et.al. High blood sugar levels significantly impact the prognosis of colorectal cancer patients through down-regulation of microRNA-16 by targeting Myb and VEGFR2. *Oncotarget*, vol.7 (14), 2016.

18. JUNG, HJ; SUH, Y. Regulation of IGF-1 signaling by microRNAs. *Frontiers in genetics,* vol.5: 472, 2015.

19. KIM, T; KIM, T; CHOI, S; KO, H; PARK, D; LEE, Y. Combination of BEZ235 and Metformin has synergistic effect on cell viability in colorectal cancer cells. Dev. Reprod. Vol. 22, No. 2, 133-142, June, 2018.

20. SJOGREN, KS; LIU, JJ; BLAD, K; SKRTIC, S; VIDAL, O; WALLENIUS, V. et.al. Liver- derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood

but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci*, vol 96: 7088-7092, 1999.

21. HART, LS; DOLLOFF, NG; DICKER, DT; KOUMENIS, C; CHRISTENSEN, JG; GRIMBERG, A. et al. Human colon cancer stem cells are enriched by insulin-like growth factor -1 and are sensitive to figitumumab. *Cell Cycle*, vol.10:14, 2331-2338, 2011.

22. YAKAR, S; ROSEN, CJ; BEAMER, WG; ACKERT-BICKNELL, CL; WU, Y. et.al. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density.

23. GAO, Y; KATKI, H; GRAUBARD, B; POLLAK, M; MARTIN, M; TAO,Y. et al. Serum IGF1, IGF2, and IGFBP 3 and risk of advanced colorectal adenoma. *Int J cancer*, 131(2): E105-E113, 2012.

24. GIOVANNUCCI, E. Insulin, Insulin –Like growth factors and colon cancer: A review of evidence. *The journal of nutrition,* 131:3109S- 3120S, 2001.

25. BHATTACHARYYA, N; PECHHOLDS, K; SHAHJEE, H; ZAPPALA, G; ELBI, C; RAAKA, B. et.al. Nonscreted insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) can induce apoptosis in human prostate cancer cells by IGF-independent mechanisms without being concentrated in the nucleus. *The journal of biological chemistry*, vol. 281(34):24588-24601, 2006.

26. VANAMALA, J; REDDIVARI, L; RADHAKRISHNAN, S; TARVER, C. Resveratrol suppresses IGF1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. *Cancer* 2010, 10:238.

27. SHAHJEE, HM; BHATTACHARYYA, N. Activation of Various Downstream Signaling Molecules by IGFBP-3. *Journal of Cancer Therapy*, vol. 5: 830-835, 2014.

28. GINGRAS, AC; KENNEDY, SG; O'LEARY, MA; SONENBERG, N; HAY, N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt (PKB) signaling pathway. *Genes & Development*, vol.12:502-513, 1998.

29. MCCUBREY, JA; STEELMAN, LS; CHAPPEL, WH; ABRAMS, SL; WONG, EWT; CHANG, F. et.al. Roles of the RAF/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, (8):1263-1284, 2007.

30. DELLELLIS, K; RINALDI, S; KAAS, RJ; KOLONEL, LN; HENDERSON, B; MARCHAND, LL. Dietary and Lifestyle Correlates of Plasma Insulin-like Growth Factor –I (IGF-I) and IGF Binding Protein -3 (IGFBP-3): The Multiethnic Cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention,* vol. 13 (9): 1444-51, 2004.

31. HOLMES, MD; POLLAK, MN; WILLET, WC; HANKINSON, SE. Dietary Correlates of Plasma Insulin- like Growth Factor-I and Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 Concentrations. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention,* vol.11:852-861, 2002.

32. HARRELA, M; KOISTINEN, H; KAPRIO, J; LEHTOVIRTA, M; TUOMILEHTO, J; ERIKSSON, J. et. al. Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I. IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *J. Clin. Investig,* vol.98: 2612–2615, 1996.

33. MACAULAY, VM. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer,* vol. 65:311–20, 1992.

34. CHAN, JM; STAMPFER, MJ; GIOVANNUCCI, E; GRANN, PH; MA, J; WILKINSON, P. et.al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science,* 279: 563–566, 1998.

35. WOLK, A; MANTZOROS, CS; ANDERSSON, SO; BERGSTRO¨M, R; SIGNORELLO, LB; LAGIOU, P. et.al. Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. *J. Natl. Cancer Inst*., 90: 911–915, 1998.

36. HARMAN, S; METTER, E; BLACKMAN, M; LANDIS, P; CARTER, H. Serum levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-3, and prostate-specific antigen as predictors of clinical prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 85: 4258–4265, 2000.

37. MA, J; POLLAK, MN; GIOVANNUCCI, E; CHAN, JM; TAO, T; HENNEKENS, CH. et.al. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding protein-3. *J. Natl. Cancer Inst*., 91: 620–625, 1999.

38. GIOVANNUCCI, E; POLLAK, MN; PLATZ, EA; WILLETT, WC; STAMPFER, MJ; MAJEED, N. et.al. A prospective study of plasma insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 and risk of colorectal neoplasia in women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev,* vol. 9: 345–349, 2000.

39. THISSEN, J; KETELSLEGERS, J; UNDERWOOD, L. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. Endocr. Rev., *15:* 80–101, 1994.

40. DOUYON, L; SCHTEINGART, DE. Effect of obesity and starvation on thyroid hormone, growth hormone, and cortisol secretion. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 31: 173–189, 2002.

41. RENEHAN, AG; PAINTER, JE; O'HALLORAN, D; ATKIN, WS; POTTEN, CS; O'DWYER, ST. et.al. Circulating insulin-like growth factor II and colorectal adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, vol. 85: 3402–3408, 2000.

42. MANOUSOS, O; SOUGLAKOS, J; BOSETTI, C; TZONOU, A; CHATZIDAKIS, V; TRICHOPOULOS, D. et.al. IGF-I and IGF-II in relation to colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 83: 15–17, 1999.

43. YU, H; SPITZ, MR; MISTRY, J; GU, J; HONG, WK; WU, X. Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis. J. Natl. Cancer Inst., 91: 151–156, 1999.

44. HANKINSON, SE; WILLETT, WC; COLDITZ, GA; HUNTER, D J; MICHAUD, DS; DEROO, B. et.al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. Lancet, *351:* 1393–1396, 1998.

45. BRUNING, PF; VAN DOORN, J; BONFRER, JMG. Insulin-like growthfactor-binding protein 3 is decreased in early-stage operable premenopausal breast cancer. Int. J. Cancer, *62:* 266–270, 1995.

46. BAXTER, RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278: 967 – 76, 2000.

47. HIRAKAWA, T; YASHIRO, M; MURATA, A; HIRATA, K; KIMURA, K; AMANO, R. IGF-1 receptor and IGF binding protein-3 might predict prognosis of patients with resectable pancreatic cancer. *BMC Cancer*, vol. 13:392, 2013.

48. WEBER, MM; FOTTNER, C; LIU, SB; JUNG, MC; ENGELHARDT, D; BARETTON, GB. et al. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas. *Cancer*, 95: 2086–2095, 2002.

49. SEKHARAM, M; ZHAO, H; SUN, M; FANG, Q; ZHANG, Q; YUAN, Z. et al. Insulin-like growth factor 1 receptor enhances invasion and induces resistance to apoptosis of colon cancer cells through the Akt/Bcl-x(L) pathway. *Cancer Res*, 63: 7708–7716, 2002.

50. DALLAS, NA; XIA, L; FAN, F; GRAY, MJ; GAUR, P; VAN BUREN, G. et al. Chemoresistant Colorectal Cancer Cells, the Cancer Stem Cell Phenotype and Increased Sensitivity to Insulin-like Growth Factor-I Receptor Inhibition. *Cancer Research*, 69:1951-7, 2009.

51. WU, Y; YAKAR, S; ZHAO, L; HENNIGHAUSEN, L; LEROITH, D. Circulating Insulin like Growth Factor-I Levels Regulate Colon Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Research*, 62:1030-5, 2002.

52. VOLKOVA, E; ROBINSON, BA; WILLIS, J; CURRIE, MJ; DACHS, G. Marginal effects of glucose, insulin and insulin-like growth factor on chemotherapy response in endothelial and colorectal cancer. *Oncology letters*, 7:311-320, 2014.

53. ESPOSITO, DL; ARU, F; LATTANZIO, R; MORGANO, A; ABBONDANZA, M; MALEKZADEH, R. et. al. The insulin receptor substrate 1 (IRS1) in intestinal epithelial differentiation and in colorectal cancer. PLoS One. 2012;7: e36190.

54. KORNMANN, M; MARUYAMA, H; BERGMANN, U; TANGVORANUNTAKUL, P; BEGER, HG; WHITE, MF. et. al. Enhanced expression of the insulin receptor substrate-2 docking protein in human pancreatic cancer. Cancer Res. 1998; 58:4250–4254.

55. HELLAWELL, GO; TURNER, GDH; DAVIES, DR; POULSOM, R; BREWSTER, SF; MACAULAY, VM. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. Cancer Res. 2002; 62:2942–2950.

56. YANCIK, R; RIES, LG. Cancer in the aged: an epidemiologic perspective on treatment issues. Cancer, December 1, supplement, 1991.

57. LUO, J; WEN, Q; LI, J; XU, L; CHU, S. et. al. Increased expression of IRS-1 is associated with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. Int J Clin Exp Pathol 2014;7 (9):6117-6124.

58. JEMAL, A; BRAY, F; CENTER, MM; FERLAY, J; WARD, E; FORMAN, D. Global cancer statistics. CA CANCER J. Clin. 2001; 61:69-90.

59. FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC, 2013. (IARC Cancer Base, 11).

60. ALVES, A; MUNOZ, J. Estudo do valor prognostico do Ki-67 em adenocarcinomas colorretais e sua correlação com parâmetros clínicos- patológicos. Memorias Forenses. Nr1, dezembro, 2018.

61. DEBUCQUOY, A; GOETHALS, L; LIBBRECHT, L; PERNEEL, C; GEBOES, K; ECTORS, N. et.al. Molecular and clínico-pathological markers in rectal cancer: A tissue micro- array study. International Journal of Colorectal Disease, 24(2), 129–138, 2009.

62. MOGOANTĂ, SS; VASILE, I; TOTOLICI, B; NEAMŢU, C; STREBA, L; BUSUIOC, C. J. et. al. Colorectal cancer - clinical and morphological aspects. Romanian Journal of Morphology and Embryology, 55(1), 103–110, 2014.

63. BROWN, DC; GATTER, KC. Ki67 protein: The immaculate deception? Histopathology, 40(1), 2–11, 2002.

64. REIMERS, MS; ZEESTRATEN, ECM; KUPPEN, PJK; LIEFERS, GJ; VAN DE VELDE, CJH. Biomarkers in precision therapy in colorectal cancer. Gastroenterology Report, 1(3), 166–83, 2013.

65. ROSSONI, MD. Fatores prognósticos e recidiva neoplásica em pacientes com adenocarcinoma colorretal estádio I e II (TNM), submetidos a tratamento cirúrgico com intenção curativa: o papel do fenômeno brotamento tumoral avaliado por dois métodos histológicos diferentes. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012.

66. SARTI, TD; FEUERWERKER, LCM. Saúde da Família em análise: estudo de caso sobre a produção da atenção à saúde de pessoas com diabetes mellitus tipo 2. Saúde em Redes. 2018; 4(1):55-73.

67. CRUZ, JV; CUTAIT, R; MARTINEZ, CAR; BEVILACQUA, RG; LEITE, KRM; MARGARIDO, NF. Importância prognóstica da invasão neural no câncer colorretal: estudo imunohistoquímico com a proteína -100. Coloproct, 2006;26 (3): 280-292.

68. CORDEIRO, F; YAMAGUCHI, NH; HABR-GAMA, A; CUTAIT, R; REINAN, RJ; ABRAMOFF, R. et.al. Projeto diretrizes: diagnóstico, estadiamento e tratamento cirúrgico e multidisciplinar do câncer colorretal. AMB.ORG, 14 agosto 2001.

69. NETO, JDC; BARRETO, JBP; FREITAS, NS; QUEIROZ, MA. Câncer Colorretal: Características Clínicas e Anatomopatológicas em Pacientes com Idade Inferior a 40 Anos. Rev bras Coloproct. Outubro/dezembro, 2006.

70. NETO, JDRT; TEIXEITA, FR; PRUDENTE, ACL; SILVINO, CJ; ARCIERE, JS; FILHO, MCV. Estudo Demográfico do Câncer de Cólon e Reto no Estado de Sergipe. Rev bras Coloproct. Abril/junho, 2008.

71. GIOVANNUCCI, E; POLLAK, MN; PLATZ, EA; WILLETT, WC; STAMPFER, MJ; MAJEED, N. et. al. A prospective study of plasma insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 and risk of colorectal neoplasia in women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000; 9:345–9.

72. RENEHAN, AG; PAINTER, JE; ATKIN, WS; POTTEN, CS; SHALET, SM; O'DWYER, ST. High-risk colorectal adenomas and serum insulin-like growth factors. Br J Surg. 2001; 88:107–13.

73. TERAMUKAI, S; ROHAN, T; LEE, KY; EGUCHI, H; ODA, T; KONO, S. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding protein-3 and colorectal adenomas in Japanese men. Jpn J Cancer Res. 2002; 93:1187–94.

74. RINALDI, S; CLEVELAND, R; NORAT, T; BIESSY, C; ROHRMANN, S; LINSEISEN, J. et. al. Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: results from the EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies. Int J Cancer. 126:1702–15.

75. MA, J; POLLAK, MN; GIOVANNUCCI, E; CHAN, JM; TAO, Y; HENNEKENS, CH. et. al. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. J Natl Cancer Inst. 1999; 91:620–5.

76. KAAKS, R; TONIOLO, P; AKHMEDKHANOV, A; LUKANOVA, A; BIESSY, C; DECHAUD, H. et. al. Serum C-peptide, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding proteins, and colorectal cancer risk in women. J Natl Cancer Inst. 2000; 92:1592–600.

77. NOMURA, AM; STEMMERMANN, GN; LEE, J; POLLAK, MN. Serum insulin-like growth factor I and subsequent risk of colorectal cancer among Japanese American men. Am J Epidemiol. 2003; 158:424–31.

78. TSILIDIS, KK; BRANCATI, FL; POLLAK, MN; RIFAI, N; CLIPP, SL; HOFFMAN-BOLTON, J. et. al. Metabolic syndrome components and colorectal adenoma in the CLUE II cohort. Cancer Causes Control. 21:1–10.

79. KEKU, TO; LUND, PK; GALANKO, J; SIMMONS, JG; WOOSLEY, JT; SANDLER, RS. Insulin resistance, apoptosis, and colorectal adenoma risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005; 14:2076–81.

80. LE MARCHAND, L; WANG, H; RINALDI, S; KAAKS, R; VOGT, TM; YOKOCHI, L. et.al. Associations of plasma C-peptide and IGFBP-1 levels with risk of colorectal adenoma in a multiethnic population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 19:1471–7.

81. RENEHAN, AG; PAINTER, JE; O'HALLORAN, D; ATKIN, WS; POTTEN, CS; O'DWYER, ST. et.al. Circulating insulin-like growth factor II and colorectal adenomas. J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85:3402–8.

82. SCHOEN, RE; WEISSFELD, JL; KULLER, LH; THAETE, FL; EVANS, RW; HAYES, RB. et.al. Insulin-like growth factor-I and insulin are associated with the presence and advancement of adenomatous polyps. Gastroenterology. 2005; 129 :4 64–75.

83. SHAW, LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: At the intersection of metabolismo and cancer. University of Massachusetts Medical School; Worcester, MS, USA. Pg 1750-1756, 1 jun 2011.

84. EWTON, DZ; KANSRA, S; LIM, S; FRIEDMAN, E. Insulin-like growth factor-I has a biphasic effect on colon carcinoma cells through transient inactivation of forkhead1, initially mitogenic, then mediating growth arrest and differentiation. Int J Cancer 98: 665–73, 2002.

85. HOWARTH, GS. Insulin-like growth factor-I and the gastrointestinal system: therapeutic indications and safety implications. J Nutr. 133: 2109–12, 2003.

86. REINMUTH, N; FAN, F; LIU, W; PARIKH, AA; STOELTZING, O. et.al. Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. Lab Invest 82: 1377–89, 2002.

87. FUKUDA, R; HIROTA, K; FAN, F; JUNG, YD; ELLIS, LM. et.al. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. J Biol Chem 277: 38205–11, 2002.

88. SHAW, LM. Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signaling intermediates in the alpha6beta4 integrin-dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion. Mol Cell Biol 21: 5082–93, 2001.

89. YANG, GY; XU, KS; PAN, ZQ; ZHANG, ZY; MI, YT. et. al. Integrin alpha v beta 6 mediates the potential for colon cancer cells to colonize in and metastasize to the liver. Cancer Sci 99: 879–87, 2008.

90. YOKOYAMA, S; TAKIFUJI, K; HOTTA, T; MATSUDA, K; TOMINAGA, T. et. al. Moderately differentiated colorectal adenocarcinoma as a lymph node metastatic phenotype: comparison with well differentiated counterparts. BMC Surgery 10: 8, 2010.

91. BOMMER, GT; FENG, Y; IURA, A; GIORDANO, TJ; KUICK, R. et.al. IRS1 regulation by Wnt/beta-catenin signaling and varied contribution of IRS1 to the neoplastic phenotype. J Biol Chem 285: 1928–38, 2010.

92. ONUCHIC, AC; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. Rev Med (São Paulo). 2010 jan.-mar.;89(1):21-31.