

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

MÁRCIA CRISTINA FERNANDES MESSIAS

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES OXIDATIVOS E DE
PERFIL LIPIDÔMICO EM PACIENTES COM CÂNCER DE
RETO**

Bragança Paulista
2017

MÁRCIA CRISTINA FERNANDES MESSIAS – RA. 001201502493

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES OXIDATIVOS E DE
PERFIL LIPIDÔMICO EM PACIENTES COM CÂNCER DE
RETO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.(a) Dr.(a) Patrícia de Oliveira Carvalho

Bragança Paulista
2017

WI 529
M548a

Messias, Márcia Cristina Fernandes.
Avaliação de biomarcadores oxidativos e do perfil
lipidômico em pacientes com câncer de reto / Márcia
Cristina Fernandes Messias. -- Bragança Paulista, 2017.
90 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-
Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco.

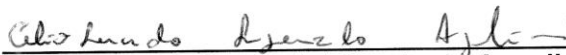
Orientação de: Patrícia de Oliveira Carvalho.

1. Neoplasias colorretais. 2. Plasma. 3. Lipidômica.
4. Biomarcadores, I. Carvalho, Patrícia de Oliveira.
II. Título.

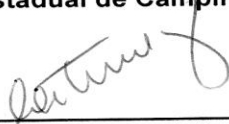
MESSIAS, C.F., Márcia, "Avaliação de Biomarcadores oxidativos e de perfil lipídômico em pacientes com câncer de reto". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 26 de Janeiro de 2017 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Célio Fernando Figueiredo Angolini
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP



Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco

Dedico este trabalho a minha eterna e
amada filha Princesa.

AGRADECIMENTOS

DEUS, tu és Soberano, tu és Forte; Maravilhoso... Obrigada por tudo, mas principalmente pela minha vida, pela minha saúde e por ser sempre o barro em suas mãos, me moldando diariamente e me fazendo e refazendo de acordo com a sua vontade.

Meus pais Antonio e Ione, meu irmão Claudio, minha sobrinha Lara e meus amados animais de estimação, vocês são os verdadeiros alimentos para minha alma.

PRINCESA, minha eterna e amada filha, sei que tem uma patinha felina sua em toda esta transformação que aconteceu na vida da mamãe. Infelizmente você não esteve fisicamente ao meu lado, acompanhando passo a passo de tudo como sempre fez por 17 anos, mas sei que espiritualmente sempre está comigo.

Minha amiga Verônica, a responsável pelo início da transformação. Nunca me esquecerei daquele e-mail que recebi em fevereiro de 2013, falando sobre a possibilidade de uma bolsa TT3 FAPESP. A oportunidade que sempre sonhei tinha acabado de me mostrar a primeira porta.

Profa Dra Patrícia, a poli mulher (filha, esposa, mãe, farmacêutica, docente, pesquisadora e religiosa), uma pessoa extremamente iluminada, de uma alma espiritualizada, sempre disposta a ajudar o próximo; o próprio reflexo de DEUS aqui no plano terreno. Obrigada por abrir a primeira porta com o TT3 e em seguida com o Mestrado, a senhora nem sonha o quanto modificou a minha vida, em todos os aspectos. Obrigada por ter realizado um sonho que tinha desde 2003 quando conheci e me apaixonei a primeira vista pela pesquisa.

Giovana Colozza Mecatti, pela confiança e por permitir a realização do meu primeiro trabalho na pesquisa científica.

Minhas amigas Marta, Vilma, Irmã Cleude, Maria Carolina e dona Alice por todo apoio espiritual (orações) e amizade verdadeira.

Aline, Tiago, Gian e Thaís Guimarães pelo apoio; só vocês me estenderam a mão na hora que mais precisei durante os experimentos. Deixaram seus familiares durante final de semana, chegaram mais cedo no laboratório, trabalharam em dia de folga e acordaram de madrugada só para me ajudarem, sem querer nada em troca e tudo em nome da nossa amizade. Nunca vou esquecer o que fizeram.

Maria Elisa, Yoyo, Élida, Mari, Jussara, Laís, Thaís, Gabriel, Sabrina Janussi, James, Douglas e profa Thalita Rocha pelo companheirismo e risadas no laboratório.

Prof Dr Mário Ângelo Claudino, pelo apoio financeiro no Congresso junto com a profa Patrícia.

Silvana Aparecida Calafatti, José Pedrazzoli Júnior, Katiane Ferreira Soares e Aline Vilha Santos da UNIFAG, pela parceria autorizando a liberação das amostras de voluntários saudáveis e, conseqüentemente, fornecendo todos os dados necessários para este e futuro estudos.

Fernanda, Dani, Paola, Maycon, Marcos, Luana, Paula, Grazi, Ingrid, Malu, José Francisco, Thaís, Juliana e Matilde, colaboradores do Laboratório São José, pela excelente recepção e apoio que tive durante a abordagem dos voluntários saudáveis. Dani você é o anjo da Hematologia, sempre prestativa e a responsável por guardar as amostras de sangue do meu estudo com tanto carinho e cuidado.

Prof Dr Carlos Augusto Real Martinez (USF), Laura Credidio e Prof Dr Claudio Saddy Rodrigues Coy (ambos do Departamento de Coloproctologia da UNICAMP) pela parceria, doando amostras de plasma de pacientes com câncer colorretal que são a chave mestre da minha dissertação de Mestrado.

Dr Célio Fernando Figueiredo Angolini (Instituto de Química – Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas – UNICAMP) pelas análises das classes de lipídios, pela atenção e ajuda dispensada durante toda a avaliação dos resultados e principalmente pela parceria neste estudo.

Ao Fabiano por todo suporte técnico no laboratório.

Vilma e Tatine por toda atenção dispensada e suporte no atendimento prestado na secretaria da Pós-Graduação.

Sem mais, a Universidade São Francisco e a CAPES pela bolsa concedida.

*“Faça as coisas o mais simples que
você puder, porém não as mais
simples.”*

Albert Einstein

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais frequentes na população adulta mundial e apresenta alta taxa de morbidade e letalidade. Evidências recentes tem mostrado que um evento precoce na carcinogênese é a ativação do metabolismo de lipídios, macromoléculas que, além de estarem envolvidas em complexos processos metabólicos da célula, são altamente susceptíveis ao processo de lipoperoxidação desencadeado pelo estresse oxidativo. A estratégia lipidômica é capaz de fornecer informações importantes relacionadas ao mecanismo envolvido na patogênese do câncer além de revelar novos biomarcadores para o seu diagnóstico precoce. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar no plasma de pacientes com câncer de reto os biomarcadores de estresse oxidativo (malondialdeído e F_2 -isoprostano) e os de perfil lipidômico visando identificar os metabólitos diferenciais entre os grupos avaliados e contribuir no conhecimento das alterações no metabolismo de lipídios envolvidas na carcinogênese. Foram utilizadas amostras de sangue de 23 pacientes com câncer de reto, estratificados segundo o estadio e de 18 voluntários saudáveis. O perfil lipidômico foi avaliado por cromatografia à gás (CG-FID) e espectrometria de massas equipado com ionização electrospray (ESI) e a lipoperoxidação foi avaliada através da determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e da dosagem de F_2 -isoprostano. Para a análise dos dados foi utilizado o *website MetaboAnalyst* (versão 2.0) e as moléculas diferenciais indicadas por meio de ferramentas estatísticas multivariadas, usando análise de componente principal (PCA), análise discriminatória parcial dos quadrados mínimos (PLS-DA) e análise discriminatória ortogonal parcial dos quadrados mínimos (OPLS-DA). A importância da variável na projeção (*VIP*) foi utilizada para identificar os íons que tiveram maior efeito discriminatório entre os grupos. Os resultados mostraram que os níveis plasmáticos de malondialdeído nos pacientes com câncer de reto no estadio 3 e 4 foram superiores aos valores observados no grupo saudável e grupo estadio 0 ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças nos níveis de F_2 -isoprostano entre os grupos. No conjunto de dados do ESI foi possível a identificação de 15 lipídios diferenciais entre os grupos. Os íons mais abundantes identificados no grupo de pacientes com câncer foram de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina enquanto que, os de lisofosfatidilcolinas (LFC) metabólitos identificados como LFC 16:1, LFC 18:1 e LFC 18:2, apareceram com abundância relativa reduzida. Evidencia-se que a LFC (P-16:1), um plasmalogênio contendo ácido palmitoleico (16:1), apresentou o maior *VIP score* com uma tendência reduzida em pacientes com câncer de reto, dado que aponta este metabólito como um importante mediador na patogênese da doença e que futuramente, poderá contribuir na identificação de novos biomarcadores da doença.

Palavras chave: plasma, neoplasias colorretais, biomarcadores, lipidômica.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequently occurring neoplasms in the world's adult population with high morbidity and lethality rates. Recent evidence has revealed that the activation of lipid metabolism involving macromolecules that are not only involved in complex cell metabolism mechanisms but are also highly susceptible to lipid peroxidation triggered by oxidative stress is a precocious event in carcinogenesis. Lipidomic strategy can provide important information regarding cancer pathogenesis mechanisms and could reveal new biomarkers to enable early diagnosis. This study set out to evaluate oxidative stress markers (malondialdehyde and F₂-isoprostane) and lipidomic profiles in the plasma of patients with rectal cancer, to identify differential metabolites among the groups and contribute towards greater understanding of lipid metabolism alterations involved in carcinogenesis. Blood samples were taken from 23 rectal cancer patients stratified according to the stage of the disease and from 18 healthy volunteers. Lipidomic profiles were evaluated by gas chromatography (GC-FID) and mass spectrometers fitted with electrospray ionization (ESI). Peroxidation was evaluated by determining Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and F₂-isoprostane dosages. Data analysis used the web application *MetaboAnalyst* (2.0) and the differential molecules were indicated by means of multivariate statistics tools using Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA). Variable Importance Projection (VIP) analysis was used to identify those ions with the greatest discriminant effect among the groups. Results showed that malondialdehyde plasma levels were higher in patients in stages 3 and 4 of rectal cancer than in the healthy group and the stage 0 group ($p < 0.05$). No differences in F₂-isoprostane levels were detected among the groups. In the ESI data set it was possible to identify 15 differential lipids among the groups. The most abundant ions identified in the cancer patients were those of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine while those of lysophosphatidylcholine (LPC) metabolites, identified as LPC 16:1, LPC 18:1 and LPC 18:2, showed a relatively reduced presence. It was found that LPC (P 16:1), a plasmalogen containing palmitoleic acid (16:1), returned the highest VIP score with a tendency to reduction among rectal cancer patients. That identifies this metabolite as an important mediator in the pathogenesis of the disease and one that could contribute towards the identification of new biomarkers in the future.

Key words: plasma, colorectal neoplasms, biomarkers, lipidomic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AF	Ácido fosfatídico
AG	Ácidos graxos
AGI	Ácido graxo insaturado
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGNE	Ácido graxo não esterificado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
ALF	Ácido lisofosfatídico
Cer	Ceramida
CG	Cromatografia a gás
CK α	Colina quinase alfa
CL	Cardiolipina
COOH	Ácido carboxílico
COX	Cicloxygenase
cTNM	Classificação clínica: Tumor, Linfonodo, Metástase
DAG	Diacylglicerol
DHA	Ácido docosahexaenóico
DPA	Ácido docosapentaenóico
EL	Esfingolipídios
EM	Esfingomielina
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ES	Esfingosina
FAME	<i>Fatty acid methyl esters</i>
FAS	Ácido graxo sintase
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
FG	Fosfatidilglicerol
FI	Fosfatidilinositol
FL	Fosfolipídios
FS	Fosfatidilserina

GB	Globosídeo
GFL	Glicerofosfolipídios
GG	Gangliosídeo
GL	Glicerolipídios
GSH	Glutathiona reduzida
LFCAT1	Lisofosfatidilcolina aciltransferase 1
LDN	Lipogênese <i>de novo</i>
LE	Lipídios esteróis
LFC	Lisofosfatidilcolina
LFE	Lisofosfatidiletanolamina
LFG	Lisofosfatidilglicerol
LFI	Lisofosfatidilinositol
LFL	Lisofosfolipídios
LFS	Lisofosfatidilserina
LLL	<i>Liquid-liquid extraction</i>
LO	Lipoxigenase
LP	Lipídios prenólicos
LT	Leucotrieno
MAG	Monoacilglicerol
MDA	Malondialdeído
OPLS-DA	Análise discriminante parcial ortogonal por quadrados mínimos
PCA	Análise do Componente Principal
PG	Prostaglandina
PL	Plasmalogênio
PLA2	Fosfolipase A2
PLS-DA	Análise discriminante parcial por quadrados mínimos
pTNM	Classificação patológica: Tumor, Linfonodo, Metástase
ST	Sulfatídeo
TAG	Triacilglicerol
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TNM	Tumor, linfonodo, metástase
TX	Tromboxano

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estadiamento TNM	20
Tabela 2: Categorias, classes e subclasses dos lipídios	25
Tabela 3: Principais ácidos graxos encontrados na natureza	27
Tabela 4: Nome e características químicas dos ácidos graxos insaturados	30
Tabela 5: Estrutura química e função das subclasses dos glicerolipídios	32
Tabela 6: Estrutura química e função das subclasses dos glicerofosfolipídios	34
Tabela 7: Estrutura química e função das subclasses dos esfingolipídios	37
Tabela 8: Estrutura química e função das subclasses dos lipídios esteróis	38
Tabela 9: Estrutura química e função das subclasses dos lipídios prenólicos	39
Tabela 10: Principais biomarcadores lipídicos em tecido e sangue de pacientes com CCR	47
Tabela 11: Dados demográficos e características clínicas de pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis	53
Tabela 12: Principais classes de lipídios identificadas no plasma de pacientes com câncer de reto	61
Tabela 13: Composição de ácidos graxos (% relativa) dos lipídios totais do plasma de voluntários saudáveis (n=18) e pacientes com câncer de reto (n=19)	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia do intestino grosso	18
Figura 2: Nível de penetração do tumor na parede intestinal	19
Figura 3: Lipídios <i>building blocks</i>	22
Figura 4: Mecanismo da biossíntese lipídica	23
Figura 5: Categorias dos lipídios	24
Figura 6: Imagem exemplificativa da notação utilizada nos ácidos graxos	26
Figura 7: Estrutura química dos ácidos graxos	29
Figura 8: Metabolismo dos ácidos graxos das famílias n-6 e n-3	31
Figura 9: Esquema de um glicerofosfolipídio	33
Figura 10: Estrutura geral do esfingolipídio	36
Figura 11: Peroxidação lipídica	42
Figura 12: Reação do teste de TBA	43
Figura 13: Formação do F ₂ -isoprostano	44
Figura 14: Triagem dos pacientes e voluntários saudáveis do estudo	52
Figura 15: Representação gráfica da PCA e <i>loadings</i> do conjunto de dados dos pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis. As variâncias explicadas pela PC1 (36,7%) versus PC2 (20,8%)	58
Figura 16: Escores de discriminação PLS-DA e <i>loadings</i> de dados ESI-MS de pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis	58
Figura 17: Escores de discriminação OPLS-DA e <i>loadings</i> de dados ESI-MS de pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis	59
Figura 18: Íons identificados como importantes pelo PLS-DA para a separação dos grupos de pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis	59
Figura 19: Espectros ESI(+)-MS mostrando o perfil lipídico da extração do plasma	60
Figura 20: Estrutura da molécula (C ₂₄ H ₄₈ NO ₆ P) de m/z 478 identificada como LFC (P-16:1)	60
Figura 21: <i>HeatMap</i> mostrando a distribuição dos grupos de pacientes com câncer de reto e voluntário	62
Figura 22: Porcentagem relativa das classes dos ácidos graxos do grupo controle e dos pacientes com câncer de reto, segundo o estadio	63
Figura 23: Concentração plasmática de malondialdeído (nmol/mL) do grupo controle e dos pacientes com câncer de reto, segundo o estadio	65
Figura 24: Concentração plasmática de F ₂ -isoprostano do grupo controle e dos pacientes com câncer de reto, segundo o estadio	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Câncer colorretal	17
1.2 Lipídios em plasma	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Lipídios: funções, estruturas, biossíntese e classificação	22
2.2 Classes e subclasses dos lipídios	24
2.2.1 Ácidos graxos	26
2.2.2 Glicerolipídios	31
2.2.3 Glicerofosfolipídios	32
2.2.4 Esfingolipídios	36
2.2.5 Lipídios esteróis	38
2.2.6 Lipídios prenólicos	39
2.3 Metabolismo de lipídios e câncer	39
2.4 Estresse oxidativo e biomarcadores de oxidação	40
2.5 Biomarcadores lipídicos em câncer	44
2.6 Lipidômica e métodos analíticos aplicados a lipidômica	48
3 OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo Geral	51
3.2 Objetivos Específicos	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 Grupos de estudo	52
4.2 Seleção dos voluntários	52
4.2.1 Seleção dos voluntários doentes	52
4.2.2 Seleção dos voluntários saudáveis	53
4.3 Coleta de sangue	54
4.4 Determinação do perfil lipidômico	54
4.4.1 Determinação do perfil de ácidos graxos por cromatografia a gás	54
4.4.2 Identificação das classes de lipídios por ESI-Q-TOF	55
4.5 Quantificação de biomarcadores de oxidação	55
4.5.1 Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	55
4.5.2 Dosagem de F ₂ -isoprostano (8-epi-prostaglandina 2,8-epi-PGF ₂)	56
4.6 Análise estatística	56

5 RESULTADOS	57
5.1 Caracterização lipidômica do plasma	57
5.1.1 Perfil das classes de lipídios	57
5.1.2 Perfil dos ácidos graxos	63
5.2 Biomarcadores de oxidação	65
6 DISCUSSÃO	67
6.1 Biomarcadores de perfil lipidômico	67
6.2 Biomarcadores de oxidação de lipídios	70
7 CONCLUSÕES	72
8 REFERÊNCIAS	73
9 ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR), tumor que acomete o cólon e o reto, é uma das neoplasias mais frequentes na população adulta mundial, apresentando incidência e mortalidade crescentes em várias partes do mundo. Devido ao desenvolvimento geralmente silencioso da lesão, o CCR produz poucos sintomas iniciais, fazendo com que o diagnóstico da malignidade do tumor seja realizado habitualmente nas fases mais avançadas da doença, fato que piora o prognóstico dos pacientes (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2009).

A principal estratégia na prevenção e no controle do câncer e de outras patologias é sua detecção precoce, permitindo que intervenções e terapias efetivas possam contribuir para a redução da morbimortalidade. As células cancerígenas não somente alteram o microambiente ao seu redor, a fim de favorecer o seu crescimento, mas também são capazes de causar alterações sistêmicas, muitas das quais capazes de serem detectadas nos fluidos biológicos.

Entre os diversos mecanismos que podem levar à carcinogênese, a produção excessiva de radicais livres e espécies reativas de oxigênio está associada a danos na fita ou alterações nas bases nitrogenadas ou, ainda, modificações de desoxirribose, podendo gerar danos como apoptose e mutações (MARNETT, 2000). É conhecido que os biomarcadores oxidativos, em especial de lipídios, desempenham importante papel na gênese de diferentes processos relacionados à proliferação celular e ao desenvolvimento de câncer (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2002).

Durante o desenvolvimento das células cancerígenas há a reprogramação de suas vias metabólicas para promover o crescimento celular, proliferação e fontes de energia metabólica. Todos estes processos estão intimamente relacionados ao metabolismo de lipídios, que se tornam assim excelentes fontes de informação sobre o estado metabólico e oxidativo das células em processo de tumorigênese.

Assim, há um grande interesse dos pesquisadores na descoberta de novos biomarcadores circulantes, úteis como indicadores precoces de um processo patológico. A realização de testes de pesquisa de biomarcadores circulantes do câncer é chamada de biópsia líquida (ALVES e DELMONICO, 2015).

A pesquisa de biomarcadores circulantes lança mão de ferramentas que incluem as tecnologias de plataformas “*omics*”, como a genômica (pesquisa de genes), transcriptômica (pesquisa de RNAm), proteômica (pesquisa de proteínas) e lipidômica (pesquisa de lipídeos). Entre estas ferramentas, a lipidômica é a mais recente na procura de novos biomarcadores

circulantes de câncer. A lipidômica constitui uma ciência interdisciplinar utilizada para descrever a análise sistemática de lipídios, envolvendo a caracterização e quantificação destes compostos nos sistemas biológicos, uma vez que apresentam diversas funções biológicas importantes, abrangendo desde moléculas armazenadoras de energia (gorduras e óleos), elementos estruturais de membranas biológicas (fosfolipídios e esteróides), cofatores de enzimas, transportadores de elétrons, hormônios e mensageiros intracelulares (ARMSTRONG, 2009).

A abordagem lipidômica além de desempenhar um papel crucial no estudo da composição e do metabolismo dos lipídios pode contribuir ainda na compreensão das bases moleculares das doenças fornecendo evidências de moléculas relacionadas com o metabolismo modificado destas células, abrir caminho para novas terapias, avaliar a efetividade dos tratamentos e, principalmente apontar novas ferramentas para o diagnóstico precoce do câncer. Além disto, a identificação de biomarcadores lipídicos circulantes através da análise de fluidos dos pacientes é um método relativamente não invasivo de diagnóstico precoce da doença aumentando a possibilidade de sucesso no tratamento. Embora muitos trabalhos tenham associado o câncer às mudanças metabólicas, estudos aprofundados de lipidômica em sangue de pacientes com câncer ainda são escassos.

Assim, o presente trabalho foi realizado no sentido de avaliar biomarcadores de estresse oxidativo e do perfil lipidômico, com o objetivo de contribuir no conhecimento das alterações no metabolismo destas moléculas e na sua possível utilização no diagnóstico precoce de câncer de reto. Tais marcadores se basearam na avaliação de produtos de oxidação de lipídios (malondialdeído e isoprostano) e no perfil lipidômico (ácidos graxos e classes de lipídios) no plasma de pacientes com câncer de reto em comparação ao grupo de voluntários saudáveis.

1.1 Câncer colorretal

Considerada uma doença crônica degenerativa, o câncer pode desencadear de diferentes maneiras algum tipo de impacto tanto na vida dos pacientes como na de seus familiares. A confirmação do diagnóstico, a escolha do tratamento, o seguimento terapêutico e o processo de reabilitação são fatores que influem diretamente no estilo de vida do paciente com câncer e que são de extrema importância na luta contra esta doença (NICOLUSSI e SAWADA, 2009).

A denominação de CCR engloba os tumores que acometem o intestino grosso (cólon) e o reto (FIGURA 1). A estimativa mundial em 2012 apontou o CCR como o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens (746 mil casos novos – 10% do total dos cânceres) e o segundo

nas mulheres (614 mil casos novos – 9,2% do total dos cânceres). Neste mesmo período, para a mortalidade, foram estimados 694 mil casos em ambos os sexos (8,5% do total de óbitos) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; INCA, 2015).

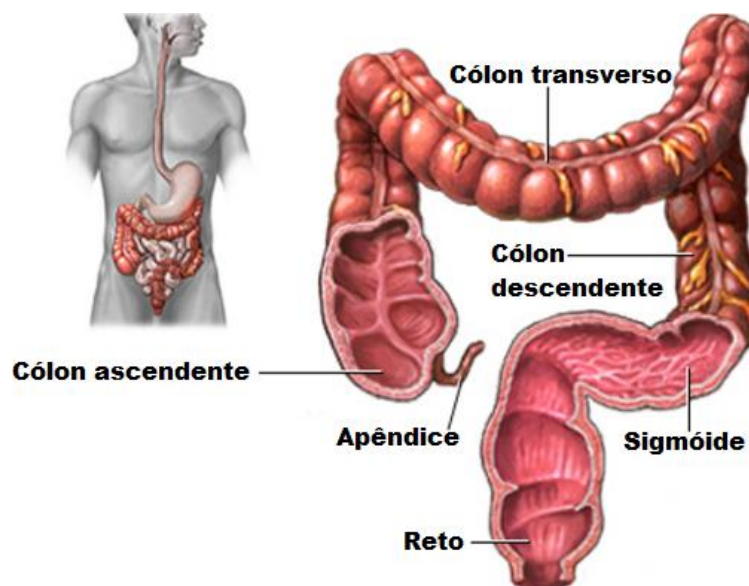


FIGURA 1: Anatomia do intestino grosso. Fonte: figura adaptada <http://www.adamimages.com/>.

No Brasil, o CCR é o terceiro tipo de câncer mais comum, sendo previsto para o final de 2016 em torno de 16.600 casos novos em homens e de 17.620 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 17,10 casos novos a cada 100 mil mulheres e 16,84 para cada 100 mil homens, considerando todas as regiões brasileiras (INCA, 2015).

Na etiopatogenia do CCR fatores importantes como etnia, dieta, idade, depressão, obesidade, sedentarismo, sarcopenia, tabagismo, etilismo, predisposição genética, mutação genética, mudanças epigenéticas, história familiar de CCR e condições como doença intestinal inflamatória e polipose familiar são pontos chaves para o aumento da incidência da doença (PIAZZOLLA, 2015).

Embora o padrão da incidência seja semelhante entre os sexos, a epidemiologia descreve uma discreta predileção por indivíduos do gênero masculino e com idade superior a 60 anos, sendo possível observar, tanto na incidência como na mortalidade, um aumento das taxas com o avanço da idade (RÊGO et al., 2012).

Através de um efetivo esquema de rastreamento é possível realizar a detecção precoce do CCR, garantindo não só o seu tratamento em fase inicial, mas também condições ideais

para a sua prevenção. Vários testes de rastreamento como pesquisa de sangue oculto nas fezes, retossigmoidoscopia, enema de bário com duplo contraste, colonografia por tomografia computadorizada e colonoscopia podem ser necessários para detectar as lesões colorretais. A microscopia óptica também é utilizada para avaliar o grau de diferenciação e o nível de penetração do tumor através da parede intestinal (TIS, T1, T2, T3 e T4) (FIGURA 2). Embora a colonoscopia seja considerado um procedimento médico invasivo para os idosos, em decorrência da sedação e do preparo para o pré-exame, relatos recentes reportam que a mesma permitiu uma redução significativa do CCR tanto proximal como distal em indivíduos mais velhos, passando a ser considerada como um método de padrão ouro no diagnóstico da doença (MACIEL e MACIEL, 2014; HASHIMOTO et al., 2016).

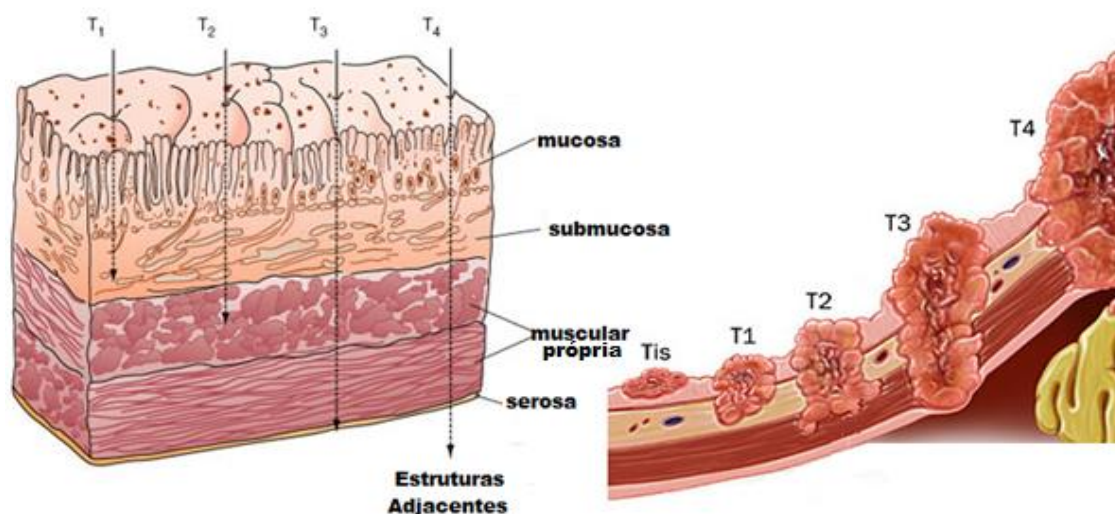


FIGURA 2: Nível de penetração do tumor na parede intestinal. Fonte: figura adaptada <http://derival.com.br/doencas/doencas-do-colon/cancer-colorretal/>.

O CCR apresenta três padrões de susceptibilidade: esporádico (correspondem a 70% dos casos), hereditário (ocorre em menos de 10% dos pacientes) e familiar (engloba cerca de 10 a 30% dos casos). O grau de diferenciação do tumor apresenta variações conforme a identificação das glândulas, morfologia nuclear e mitoses. A classificação tumor-linfonodo-metástase (TNM), preconizada pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), é utilizada para identificar o estadiamento do CCR e pode ser diferenciada por dois prefixos: cTNM (classificação clínica) que é estabelecida a partir dos dados do exame físico e dos exames complementares (imagem) e pTNM (classificação patológica) que baseia-se nos achados cirúrgicos e no exame anatomopatológico da peça operatória. O “T” apresenta um número ou

letra que descreve o tumor primário (profundidade de invasão na parede), o “N” representa o comprometimento linfonodal e o “M” refere-se à metástase à distância. Assim, a classificação do estadiamento (Tabela 1) permite iniciar uma terapêutica mais adequada para cada categoria aumentando as chances de sobrevida dos pacientes (INCA, 2015, PIAZZOLLA, 2015).

Diferentes formas de tratamento podem ser realizadas, tanto de forma combinada ou isolada, mas isto vai depender do tamanho, extensão e localização do tumor e das condições gerais do paciente. A combinação de cirurgia, quimioterapia e radioterapia tem sido empregada com o objetivo de reduzir os índices de recidiva local ou à distância e aumentar a sobrevida do paciente. No caso do tratamento cirúrgico, ele pode ser curativo (remoção completa do tumor primário, de órgãos ou estruturas adjacentes comprometidas e de metástases localizadas) ou paliativo (reduzir ou controlar os sintomas relacionados ao tumor). A quimioterapia pode ser realizada após a cirurgia e objetiva diminuir o risco de recidiva tumoral em até 30%. A radioterapia também pode ser aplicada após o procedimento cirúrgico quando o tumor invade estruturas vizinhas ou quando as margens de ressecção são comprometidas (SOUZA, 2016).

Tabela 1: Estadiamento TNM. Fonte: AJCC (2010, 7 ed.)

Estadiamento		TNM	
0	Tis	N0	M0
I	T1;T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2; T1	N1-N1c; N2a	M0
IIIB	T3-T4a; T2-T3; T1-T2	N1-N1c; N2a; N2b	M0
IIIC	T4a; T3-T4a; T4b	N2a; N2b; N1-N2	M0
IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b

1.2 Lipídios em plasma

O sangue é um biofluido altamente especializado constituído por elementos sólidos em suspensão como os glóbulos vermelhos e brancos e plaquetas, num meio líquido o plasma. O plasma é um componente amarelo claro, de fácil acesso, rico em informações, composto de 92% água, carboidrato, lipídios, proteína e sódio e ainda é responsável por transportar seus componentes e outros produtos químicos (MORAIS, 2009).

Dentre os métodos aplicados na avaliação dos componentes presentes em plasma humano, a lipidômica vem se destacando como uma ferramenta importante na identificação de biomarcadores lipídicos que auxiliam no diagnóstico de diversas doenças, principalmente o câncer (ISHIKAWA et al., 2013).

No plasma humano é possível observar uma notável diversidade de lipídios, sendo estes inclusos em seis categorias: ácidos graxos, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, esteróis e prenólicos (FERRERI e CHATGILIALOGLU et al., 2012).

O sangue é responsável por transportar os lipídios endógenos e exógenos no plasma através da combinação de lipídios com proteínas, permitindo o transporte da gordura num meio aquoso. Dentre as proteínas de transportes, destacam-se a albumina que transporta os ácidos graxos não esterificados (AGNE) ou livres (parte mínima gordura no sangue) e as lipoproteínas que são divididas em quatro classes, sendo elas: lipoproteínas de alta densidade (HDL – *High Density Lipoprotein*), lipoproteína de baixa densidade (LDL – *Low Density Lipoprotein*), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL – *Very Low Density Lipoprotein*) e quilomícrons (MORAIS, 2009).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipídios: funções, estruturas, biossíntese e classificação

O papel dos lipídios na saúde e na doença humana está tomando o centro das atenções. Nas últimas décadas tem havido um esforço intenso para desenvolver metodologias adequadas para descobrir, identificar e monitorar quantitativamente os lipídios do sistema biológico (LI, FAN, WANG, 2015).

Eles apresentam diversas funções biológicas chave, tais como na ativação dos componentes das membranas celulares, servir de fonte para o estoque de energia, participar das vias de sinalização autócrina e parácrina e na autofagia. Esta diversidade da sua função se dá pela enorme variação e complexidade na estrutura da sua molécula já que diferentes transformações bioquímicas são necessárias para que ocorra a sua biossíntese (BRÜGGER, 2014). O sistema de classificação do *Lipid Maps* define a estrutura dos lipídios a partir de dois tipos de subunidades bioquímicas ou *building blocks*: grupos cetoacetil e isopreno (Figura 3)

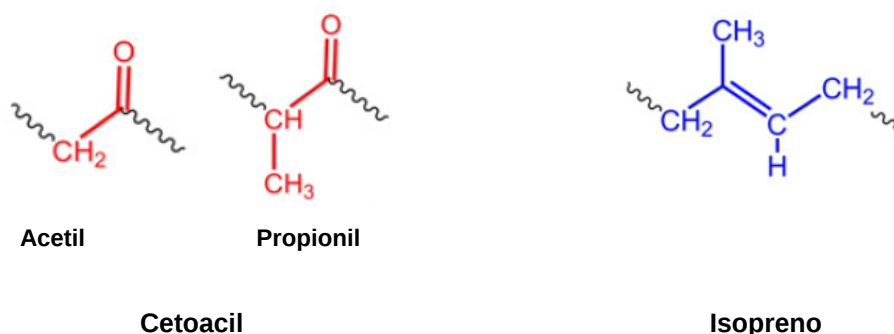


FIGURA 3: Lipídios *building blocks*. Fonte: figura adaptada de FAHY et al. (2011, p. 638).

Suas pequenas moléculas de caráter hidrofóbico ou anfipático são biossintetizadas inteiramente ou em partes pela condensação de bases carbânion das unidades de tioésteres de cetoacil e/ou pela condensação de bases carbocátion das unidades do isopreno, conforme demonstrado na Figura 4 (FAHY et al., 2011).

Conforme esta abordagem, os lipídios podem ser classificados em oito categorias (Figura 5): ácidos graxos, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, sacarolipídios e policetídeos (derivados da condensação de subunidades cetoacilo) e os lipídios esteróis e prenólicos (derivados da condensação de subunidades do isopreno), sendo que cada uma

destas categorias contem classes e subclasses distintas (HINTERWIRTH, STEGEMANN e MAYR, 2014).

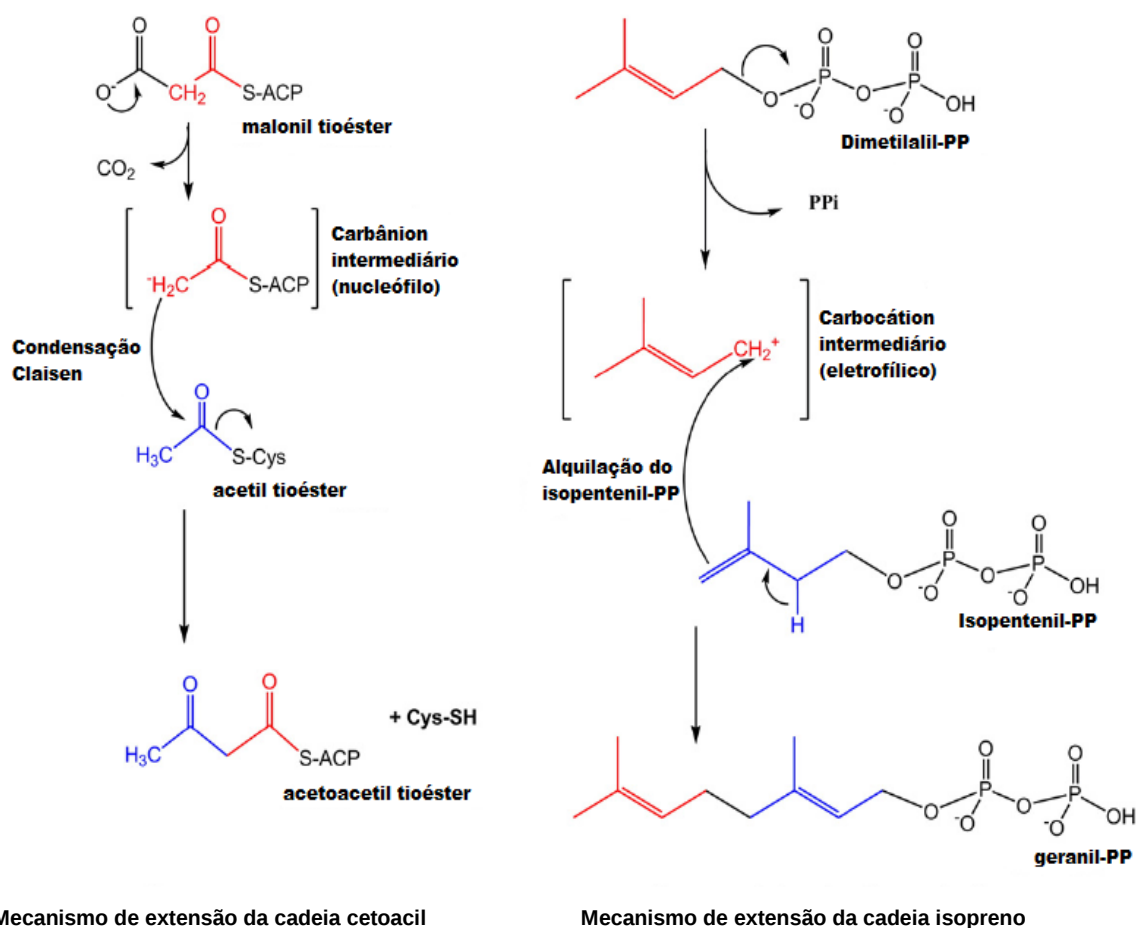


FIGURA 4: Mecanismo da biossíntese lipídica. Fonte: figura adaptada de FAHY et al. (2011, p. 638).

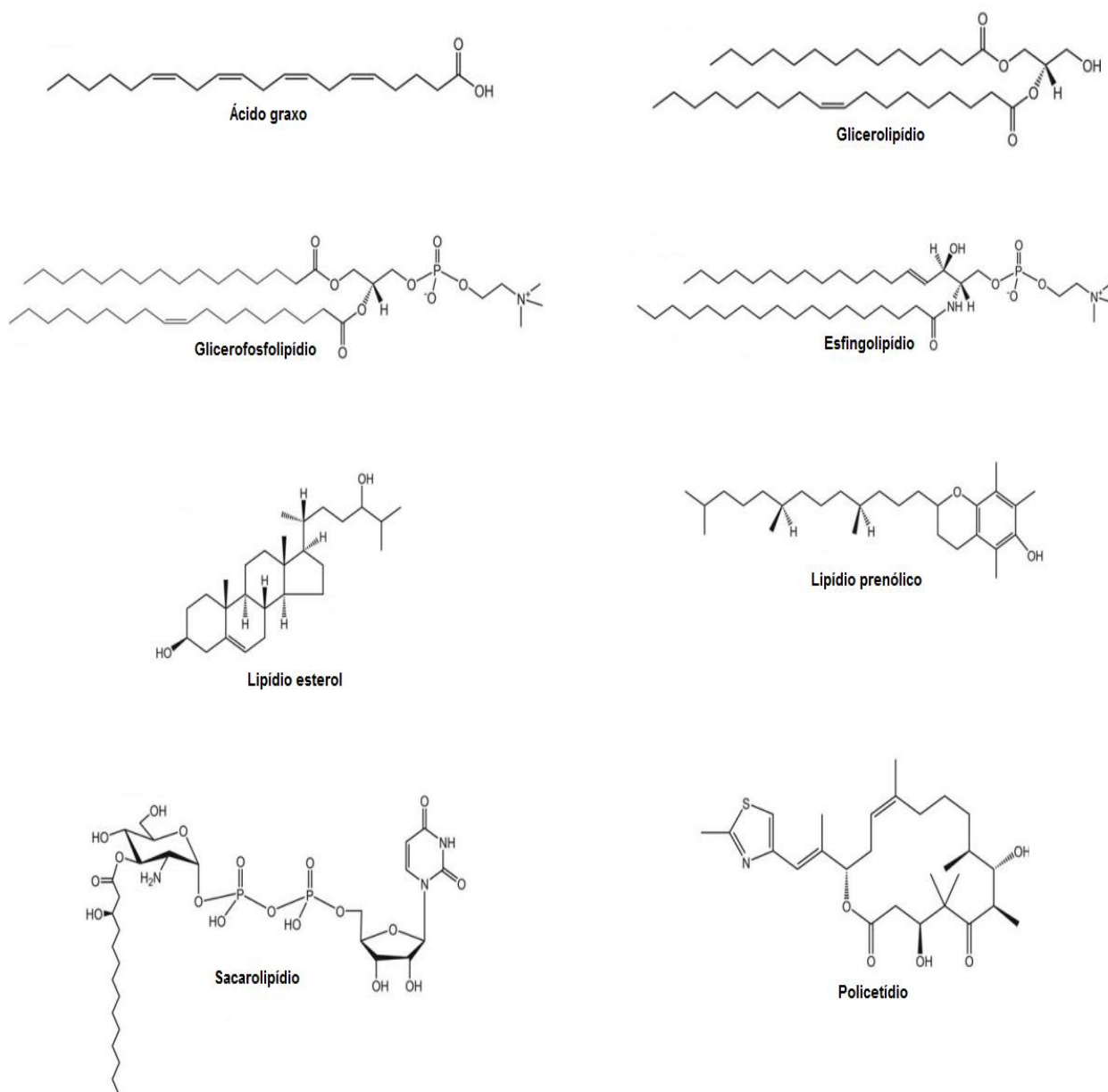


FIGURA 5: Categorias dos lipídios. Representação das estruturas das oito categorias lipídicas. Fonte: figura adaptada de FAHY et al. (2011, p. 639).

2.2 Classes e subclasses dos lipídios

De acordo com o sistema de classificação, os lipídios são divididos em oito categorias e cada uma é subdividida em classes e subclasses (Tabela 2).

Tabela 2: Categorias, classes e subclasses dos lipídios. Fonte: LIPID MAPS; FAHY et al (2005, p. 843-859); LI, FAN e WANG (2015, p. 2).

Categorias	Ácidos graxos	Glicerolipídios	Glicerofosfolipídios	Esfingolipídios	Sacrolipídios	Policetídios	Lipídios esteróis	Lipídios prenóis
Classes	1. Ácidos graxos e conjugados 2. Ésteres graxos 3. Octadecanóides 4. Alcóois, Éter Aldeídos, Nitrilas e Ésteres graxos 5. Amidas graxos 6. Eicosanóides	1. Monoradilgliceróis 2. Diradilgliceróis 3. Triradilgliceróis	1. Glicerofosfoetanolamina 2. Glicerofosfocolina 3. Glicerofosfoglicerol 4. Glicerofosfoserina 5. Glicerofosfoinositol 6. Glicerofosfoglicerol 7. Plasmalogênio	1. Ceramidas 2. Fosfoesfingolipídio 3. Glicosfingolipídios neutros 4. Glicosfingolipídios ácidos 5. Bases esfingóides	Acilamino açúcares	Policetídeo macrolídeo Policetídeo aromático Policetídeo híbrido/peptídeo não-ribossomal Flavonoides	1. Esteróis 2. Secosteróides 3. Esteróides 4. Ácidos biliares e derivados	1. Isoprenóides 2. Poliprenóides 3. Quinonas e hidroquinonas
Subclasses	1. Saturados e insaturados e Ácido graxo livre 2. Acil-CoA graxo e Acilcarnitina graxo 3. Ácido jasmônico 4. ----- 5. Amida primária 6. Prostaglandina, leucotrieno, tromboxano e isoprostano	1. Monoacilglicerol e monoalquilglicerol 2. Diacilglicerol, alquilacilglicerol e dialquilglicerol 3. Triacilglicerol, alquildiacilglicerol, dialquilmonoacilglicerol	1. Ácido fosfatídico e ácido lisofosfatídico 2. Fosfatidiletanolamina (cefalina) e lisofosfatidiletanolamina 3. Fosfatidilcolina (lecitina) e lisofosfatidilcolina 4. Fosfatidilglicerol e lisofosfatidilglicerol 5. Fosfatidilserina (cefalina) e lisofosfatidilserina 6. Fosfatidilinositol, lisofosfatidilinositol 7. Plasmalogênio e demais subclasses 8. Cardiolipina	1. Ceramida, lactosil ceramida, ceramida glicosilada e glucosilceramida 2. Ceramida fosfocolina (esfingomielina), ceramida fosfoetanolamina, ceramida fosfoinositol e ceramida fosforilada 3. Globosídeos e cerebrosídeos 4. Gangliosídeo e sulfatídeo 5. Esfinganina, esfingosina, lisoesfingomielina e lisoglicosfingomielina	Mono, di, tri, tetra, penta e hexacilaminoaçúcares		1. Ésteres de colesterol e fitoesterol 2. Vitaminas D ₂ e D ₃ e derivados 3. Estrogênio, androgênio, progesterônio e gluco/mineralocorticóide 4. Ácidos biliares C ₂₄ , C ₂₆ , C ₂₇ e C ₂₈ , álcoois e derivados	1. Monoterpenos, diterpenos e triterpenos 2. Bactoprenóis, fitoprenóis e dolicol 3. Ubiquinonas, e vitaminas E e K

2.2.1 Ácidos graxos

Os ácidos graxos (AG) são ácidos monocarboxílicos encontrados na forma esterificada nos lipídios naturais e também como substâncias livres. Formados por um grupo de diversas moléculas sintetizadas pela elongação do iniciador acetil-coenzima A com os grupos malonil-coenzima A, podem conter uma funcionalidade cíclica e/ou estarem substituídos com heteroátomos (oxigênio, halogênio, azoto e enxofre). Sua denominação pode ser feita de forma abreviada em que o primeiro número refere-se aos átomos de carbono da cadeia acil, a este seguem-se dois pontos e depois outra cifra indicando o número de insaturações baseado na posição da primeira dupla ligação contada a partir de seu radical metila ($-\text{CH}_3$), denominada extremidade ômega (representada por ω ou Ω) ou a partir de seu grupo funcional, o ácido carboxílico ($-\text{COOH}$), denominada extremidade delta (representada por Δ ou δ), como apresentado na Figura 6 (CERQUEIRA, 2013).

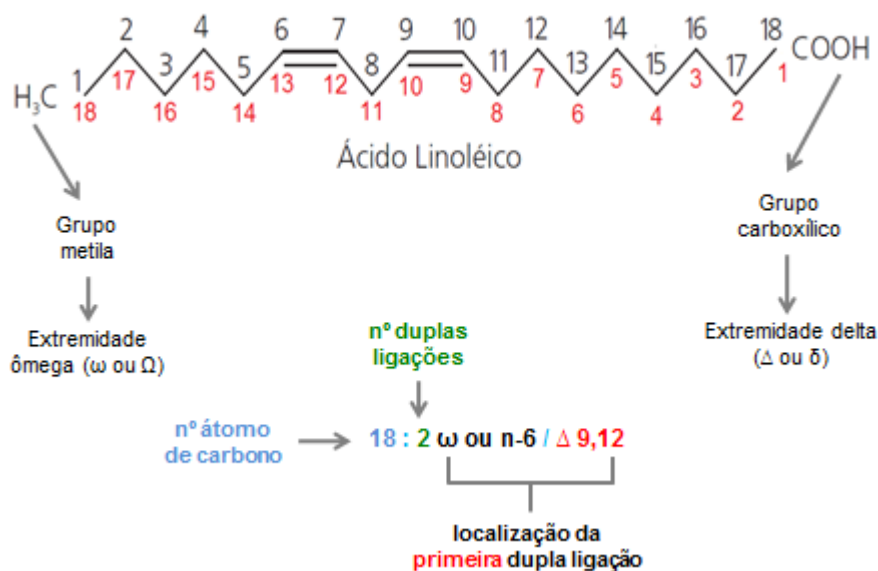


FIGURA 6: Imagem exemplificativa da notação utilizada nos ácidos graxos. Representação do ácido linoléico.

Na natureza, os AG se diferem pelo comprimento da cadeia de carbono, pela presença, quantidade e configuração de duplas ligações na mesma e pela posição do AG na molécula de glicerol. Todas estas possíveis modificações na cadeia carbônica dos AG são responsáveis pelas diferentes propriedades físico-químicas dos lipídios (Tabela 3) (PHILIPPI, 2008).

TABELA 3: Principais ácidos graxos encontrados na natureza. Fontes: SOUZA, MATSUSHITA e VISENTAINER (1998, p. 103); TACO (2011, p. 161) *(continua)*

Ácidos Graxos	Nome sistemático	Nome comum
Ácidos graxos saturados		
2:0	Etanóico	Acético
4:0	Butanóico	Butírico
6:0	Hexanóico	Capróico
7:0	Heptanóico	
8:0	Octanóico	Caprílico
9:0	Nonanóico	Pelargônico
10:0	Decanóico	Cáprico
11:0	Undecanóico	Hendecanóico
12:0	Dodecanóico	Láurico
14:0	Tetradecanóico	Mirístico
15:0	Pentadecanóico	Pentadecílico
16:0	Hexadecanóico	Palmítico
17:0	Heptadecanóico	Margárico
18:0	Octadecanóico	Estearico
20:0	Eicosanóico	Araquídico
22:0	Docosanóico	Behênico
24:0	Tetracosanóico	Lignocérico
26:0	Hexacosanóico	Cerótico
28:0	Octacosanóico	Montânico
30:0	Triacontanóico	Melissico
Ácidos graxos monoinsaturados		
10:1 (Δ 9) ω 1	Decenóico	Caproléico
11:1 (Δ 10) ω 1	Undecenóico	Undecilênico
12:1 (Δ 9) ω 3	Dodecanóico	Lauroléico
14:1 (Δ 5) ω 9	Tetradecenóico	Fisetérico
14:1 (Δ 9) ω 5	Tetradecenóico	Miristoléico
16:1 (Δ 9) ω 7	Hexadecenóico	Palmitoléico
18:1 (Δ 6) ω 12	Octadecenóico	Petroselínico
18:1 (Δ 9) ω 9	Octadecenóico	Oléico

TABELA 3: Principais ácidos graxos encontrados na natureza. Fontes: SOUZA, MATSUSHITA e VISENTAINER (1998, p. 103); TACO (2011, p. 161) (conclusão)

Ácidos Graxos	Nome sistemático	Nome comum
Ácidos graxos monoinsaturados		
18:1 (Δ 11) ω 7	Octadecenóico	Vacênico
20:1 (Δ 5) ω 15	Eicosenóico	
20:1 (Δ 9) ω 11	Eicosenóico	Gadoléico
22:1 (Δ 11) ω 11	Docosenóico	Cetoléico
22:1 (Δ 13) ω 9	Docosenóico	Erúcico
24:1 (Δ 15) ω 9	Tetracosenóico	Nervônico
Ácidos graxos poli-insaturados		
18:2 (Δ 9,12) ω 6	Octadecadienóico	Linoléico
18:3 (Δ 6,9,12) ω 6	Octadecatrienóico	γ -linolênico
18:3 (Δ 9,12,15) ω 3	Octadecatrienóico	α -linolênico
18:4 (Δ 6,9,12,15) ω 3	Octadecatetraenóico	Estearidônico
20:2 (Δ 11,14) ω 6	Eicosadienóico	
20:3 (Δ 8,11,14) ω 6	Eicosatrienóico	di-homo- γ -linolênico
20:3 (Δ 11,14,17) ω 3	Eicosatrienóico	di-homo- α -linolênico
20:4(Δ 5,8,11,14) ω 6	Eicosatetraenóico	Araquidônico (AA)
20:5(Δ 5,8,11,14,17) ω 3	Eicosapentaenóico (EPA)	Timnodônico
22:2 (Δ 13,16) ω 6	Docosadienóico	
22:3 (Δ 13,16,19) ω 3	Docosatrienóico	
22:4 (Δ 7,10,13,16) ω 6	Docosatetraenóico	
22:5(Δ 7,10,13,16,19) ω 3	Docosapentaenóico (DPA)	Clupanodônico
22:6(Δ 4,7,10,13,16,19) ω 3	Docosahexaenóico (DHA)	
Ácidos graxos trans		
18:1 t	<i>trans</i> -octadecenóico	Elaídico
22:1 t	<i>trans</i> -13-docosenóico	Brassídico
18:2 t	<i>trans</i> -octadecadienóico	Linolelaídico

Quanto ao tamanho da cadeia carbônica, estes são denominados como AG de cadeia curta (4 a 10 átomos de carbono), cadeia média (12 a 14 átomos de carbono), cadeia longa (16 a 18 átomos de carbono) e cadeia muito longa (acima de 20 átomos de carbono). AG podem apresentar diversos substituintes na cadeia carbônica tais como grupos metila, hidroxila, epóxido, carbonila, ciclopropano, ciclopropeno, éteres, dentre outros (VISENTAINER e FRANCO, 2012).

Os AG são classificados em saturados (AGS) e insaturados (AGI). Os AGS não apresentam duplas ligações e são constituídos de cadeia hidrocarbonada saturada, retilínea,

flexível e com um número variável de átomos de carbono. Os AGI são constituídos de uma ou mais duplas ligações, apresentam cadeia longa, com pelo menos 16 carbonos e o número de duplas ligações divide-se em dois grupos: os monoinsaturados (AGMI), que contem apenas uma dupla carbono-carbono e os poli-insaturados (AGPI), com duas ou mais dessas ligações (Figura 7). Dos AGPI, são particularmente importantes os da série ômega 3 e 6. O ácido alfa-linolênico (18:3 n-3) é precursor na biossíntese dos ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico, ambos altamente insaturados, com cinco e seis duplas ligações, respectivamente e o ácido linoléico (18:2 n-6) é precursor do ácido araquidônico (COZZOLINO, 2007, CALDER, 2012).

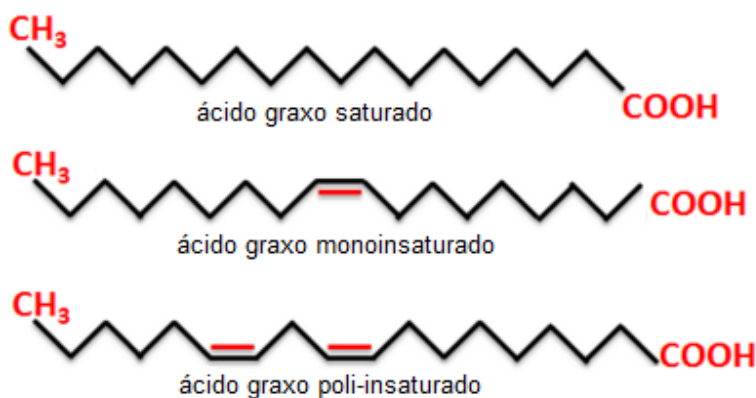


FIGURA 7: Estrutura química dos ácidos graxos. Ácidos graxos saturado e insaturado. Fonte: figura adaptada de VALENZUELA e VALENZUELA (2013, p. 9).

Os AGI podem apresentar o mesmo número de carbonos e de duplas ligações (isômeros posicionais), porém se diferem na localização das ligações da cadeia carbônica (Tabela 4). São exemplos de isômeros posicionais os ácidos oléico (18:1) da série ω -9 e o vacênico (18:1) da série ω -7, onde o primeiro apresenta a dupla ligação no carbono 9 e o segundo no carbono 7, numerados a partir da extremidade ômega (PHILIPPI, 2008).

TABELA 4: Nome e características químicas dos ácidos graxos insaturados. Fonte: PHILIPPI (2008, p. 249).

Nome	Número de Carbonos	Número de duplas ligações	Posição da primeira dupla ligação	Nomenclatura
Ácido eicosapentaenóico	20	5	n- 3 ou ω -3	C 20:5 Δ 5,8,11,14,17
Ácido araquidônico	20	4	n-6 ou ω -6	C 20:4 Δ 5,8,11,14
Ácido vacênico	18	1	n-7 ou ω -7	C 18:1 Δ 11
Ácido oléico	18	1	n-9 ou ω -9	C 18:1 Δ 9

Dentro da sua diversidade funcional, os AG são classificados como não essenciais (sintetizados endogenamente) e essenciais (obtidos através de alimentos fontes ou suplementos). A essencialidade de um AG depende da distância da primeira dupla ligação da terminação metil. Durante sua formação no organismo humano, as enzimas de biossíntese dos AG podem inserir duplas ligações na posição n-9 ou maior; porém, estas enzimas não podem inserir duplas ligações às posições próximas ao grupo metil. Por esta razão, os AG com duplas ligações nas posições n-3 (EPA e DHA) e n-6 são considerados essenciais para o ser humano. Durante o jejum, os AG são mobilizados do tecido adiposo, transportados no plasma sob a forma não esterificada (AGNE) e passam a ser o principal substrato energético para o organismo (CARDOSO, 2006).

A incorporação do EPA e DHA nas membranas celulares, fornecida através da dieta, diminui a produção de eicosanóides derivados do AA (20:4 n-6) (MAYER et al., 2003). As enzimas cicloxigenase e lipoxigenase metabolizam o AA e produzem mediadores pró-inflamatórios como as prostaglandinas e tromboxanos da série 2 (PGE₂, PGF_{2 α} e TXA₂) e leucotrienos da série 4 (LTB₄, LTC₄, LTD₄). Na disponibilidade do EPA (20:5n-3), este serve de substrato para estas enzimas e ocorre produção de mediadores anti-inflamatórios, os prostanóides da série 3 - PGE₃, PGI₃, TXA₃ e leucotrienos da série 5 - LTB₅, LTC₅ e LTD₅ (Figura 8) (FÜRST e KUHN, 2000).

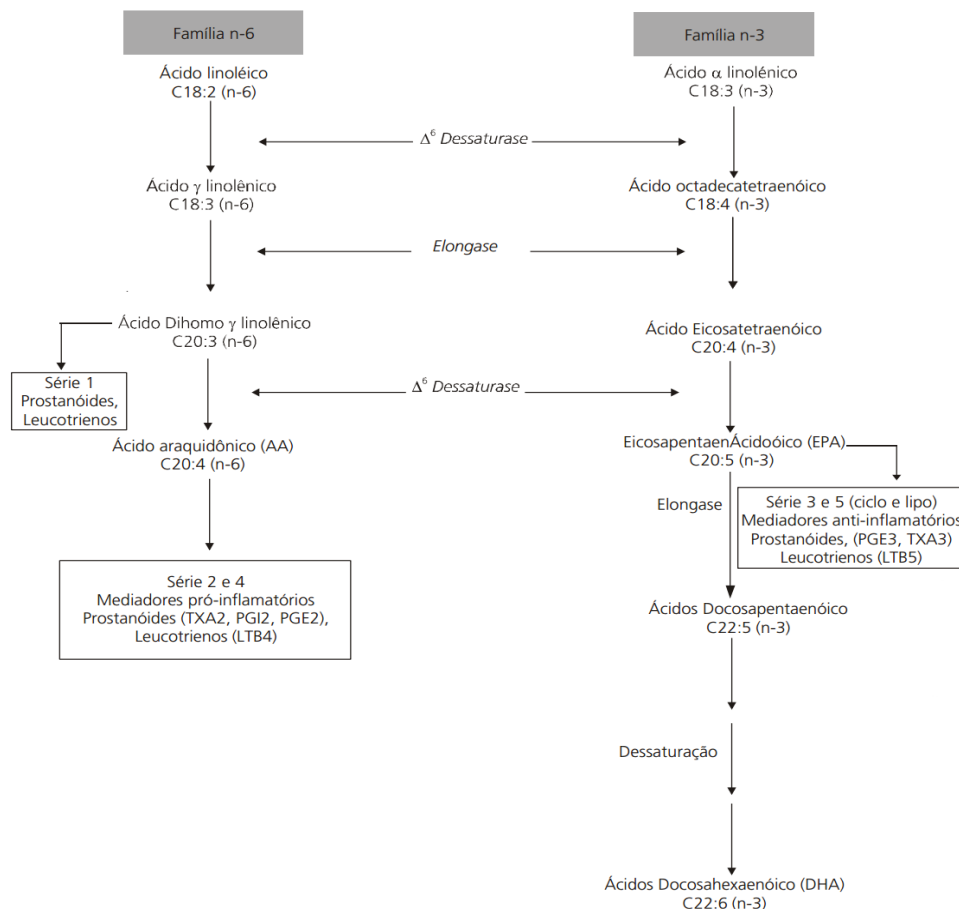
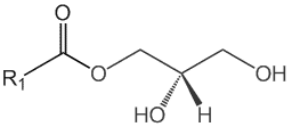
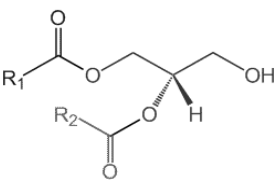
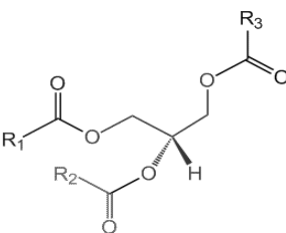


FIGURA 8: Metabolismo dos ácidos graxos das famílias n-6 e n-3. Fonte: figura adaptada de GARÓFOLO e PETRILI (2006, p. 614)

2.2.2 Glicerolipídios

Os glicerolipídios (GL) são um grupo estruturalmente heterogêneo de lipídios anfipáticos e essenciais na regulação das funções celulares, de hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento e de citocinas inflamatórias. Todos eles tem, pelo menos, uma cadeia hidrofóbica ligada a um esqueleto de glicerol (BITTMAN, 2013). Esta classe inclui todos os compostos que contenham AG esterificados com o álcool tri-hídrico glicerol. O glicerol pode ser esterificado para 1, 2 ou 3 acil graxo formando o monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG) e triacilglicerol (TAG) (Tabela 5). Os AG esterificados com glicerol podem coexistir com outras moléculas esterificadas com um grupo hidroxila de glicerol (HERNANDEZ e KAMAL-ELDIN, 2013).

Tabela 5: Estrutura química e função das subclasses dos glicerolipídios

GL	Função GL	Estrutura GL	Referências
MAG	Inibe o aumento pós-prandial de insulina e TAG no sangue e atua na síntese química orgânica.		(Zhong, Cheong e Xu, 2014; Lipid Maps)
DAG	Previne acúmulo de gordura corporal e desordens relacionadas à obesidade e é precursor dos fosfolipídios.		(Feldes et al., 2012; Lipid Maps)
TAG	Armazena energia, absorve lipídios da dieta nos enterócitos, sintetiza e transporta lipoproteína VLDL nos hepatócitos, produz leite nas células epiteliais mamárias e protege as articulações e órgãos internos.		(Coleman e Mashek, 2011; Lipid Maps)

2.2.3 Glicerofosfolipídios

Um dos principais componentes das membranas celulares pertence a uma classe de moléculas conhecidas como glicerofosfolípidos (GFL) ou fosfolipídios. Os GFL são sintetizados a partir de uma molécula de glicerol e um grupo fosfato (PO_4), sendo esterificados no carbono α (posição sn-3) e por dois AG que também são esterificados com dois átomos de carbono remanescentes (posições sn-1 e sn-2). O glicerol e o PO_4 são ligados a uma base (colina, etanolamina, serina ou inositol) ou a um átomo de hidrogênio, formando a cabeça polar (hidrofílica) e os AG esterificados com cauda apolar (hidrofóbica), como apresentado na Figura 9 (HISHIKAWA et al., 2014).

A forma mais simples dos GFL (Tabela 6) é o ácido fosfatídico (AF), mas o grupo fosfato também pode ser esterificado pelo grupo hidroxil de vários álcoois, tais como etanolamina (fosfatidiletanolamina, FE ou cefalina), colina (fosfatidilcolina, FC ou lecitina), inositol (fosfatidilinositol, FI) e glicerol (fosfatidilglicerol, FG) para formar diferentes famílias de fosfolipídios ou pelo aminoácido serina para formar fosfatidilserina (FS). A cardiolipina (CL) e o plasmalogênio (PL), também são importantes representantes dos GFL. Devido sua importante atividade biológica como maior componente biológico da membrana, os GFL tem sido

relacionados a diversas doenças cardiovasculares, cognitivas e problemas de memória, processos inflamatórios, diabetes e câncer (MONTEALEGRE et al., 2014).

Além destas, outras formas polares de GFL também são geradas por meio da catálise da hidrolase ou pela hidrólise química dos fosfolipídios, como é o caso dos lisofosfolipídios (LFL) e seus derivados correspondentes (lisofosfatidilcolina, LFC; lisofosfatidilserina, LFS; lisofosfatidiletanolamina LFE; lisofosfatidilinositol, LFI; lisofosfatidilglicerol, LFG e o ácido lisofosfatídico (ALF). Nos LFL há ausência de uma cadeia acil e somente um grupo hidroxil do esqueleto glicerol é acilado. São moléculas sinalizadoras derivadas da membrana, produzidas pelas fosfolipases e que possuem uma ampla diversidade de atividades biológicas. Tanto os LFL como seus receptores são pesquisados em vários tipos de células e tecidos, indicando sua importância em diversos processos fisiológicos como reprodução, desenvolvimento vascular e sistema nervoso (D'ARRIGO e SERVI, 2010; WAGNER e RICHLING, 2010; BANDU, MOK e KIM, 2016).

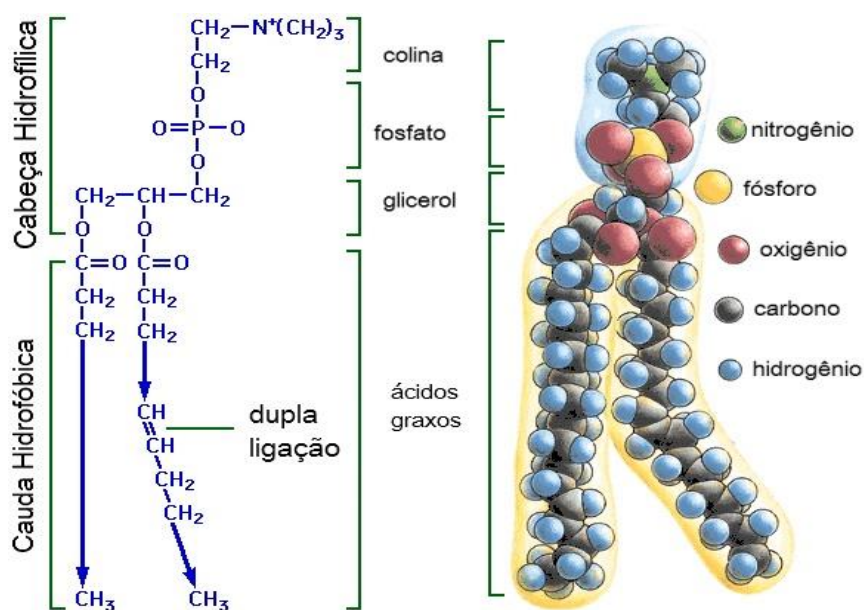
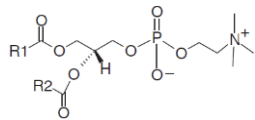
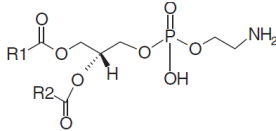
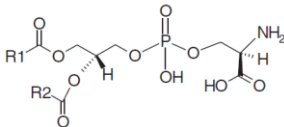
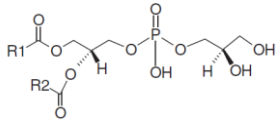
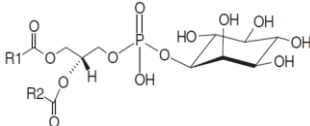
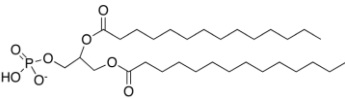
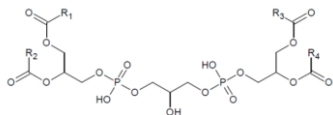
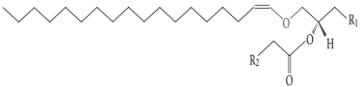


FIGURA 9: Esquema de um glicerofosfolipídio. Fonte: <[http://www.teliga.net/2010/04/ estrutura-da-membrana-plasmatica.html](http://www.teliga.net/2010/04/estrutura-da-membrana-plasmatica.html)>

Tabela 6: Estrutura química e função das subclasses dos glicerofosfolipídios

(continua)

GFL	Função GFL	Estrutura GFL	Referências
FC	Precursor de moléculas sinalizadoras, elemento chave das lipoproteínas, atua na bile e como surfactante pulmonar.		(Bandu, Mok e Kim, 2016; Lipid Maps)
FE	Atua na função cardíaca, regula a fusão das membranas mitóticas de Golgi e na divisão celular.		(Bandu, Mok e Kim, 2016; Lipid Maps)
FS	Regula a função do sistema nervoso central e atua na apoptose.		(Bandu, Mok e Kim, 2016; Lipid Maps)
FG	Molécula sinalizadora das funções celulares, precursor na biossíntese da cardiolipina, participa da replicação do DNA, na modificação das lipoproteínas celulares e na apoptose.		(Nie et al., 2010; Lipid Maps)
FI	Regula o crescimento, a proliferação celular e a apoptose, sinalizador de doenças (diabetes, cardiovascular e câncer) e fixa carboidratos e proteínas fora da membrana celular.		(Clarke et al., 2015; Lipid Maps)
AF	Substrato para enzimas envolvidas na síntese glicerofosfolipídios e TAG, lipídio mensageiro, participa no tráfego vesicular, sinalização, organização do citoesqueleto, quimiotaxia e proliferação celular.		(Gomez-Cambronero, 2013; Lipid Maps)
CL	Marcador bioquímico das funções mitocondriais e atua na formação de energia celular (ATP).		(Mejia, Nauyen e Hatch, 2014; Lipid Maps)
PL	Reserva para o segundo mensageiro e tem potencial oxidante sacrificial (interromper a lipoperoxidação).		(Braverman e Moser, 2012; Lipid Maps)

2.2.4 Esfingolipídios

Os esfingolipídios (EL) são uma família complexa de compostos constituídos por três componentes: um grupo esfingóide, um AG e um grupo polar (Figura 10). São componentes estruturais da membrana celular com várias funções biológicas importantes na inflamação, no crescimento, diferenciação, morte e migração da célula, além de serem sintetizados e degradados nos lisossomos após endocitose na membrana plasmática (YAN et al., 2016).

Ceramida (Cer) é o precursor estrutural de todos os EL complexos e estes são classificados em fosfoesfingolipídio (esfingomielina - EM, esfingosina - ES) e glicoesfingolipídios (cerebrosídeo - CS, sulfatídeo - ST, globosídeo - GB e gangliosídeo - GG) (Tabela 7) (BARROSO, 2012).

Os glicoesfingolipídios apresentam na sua cabeça polar unidades de carboidrato, sendo: cerebrosídeos (monossacarídeos de ceramidas), sulfatídeos (sulfatos de monossacarídeos de ceramidas), globosídeos (oligossacarídeos de ceramida neutros) e gangliosídeos (ácidos e oligossacarídeos de ceramidas contendo ácido siálico).

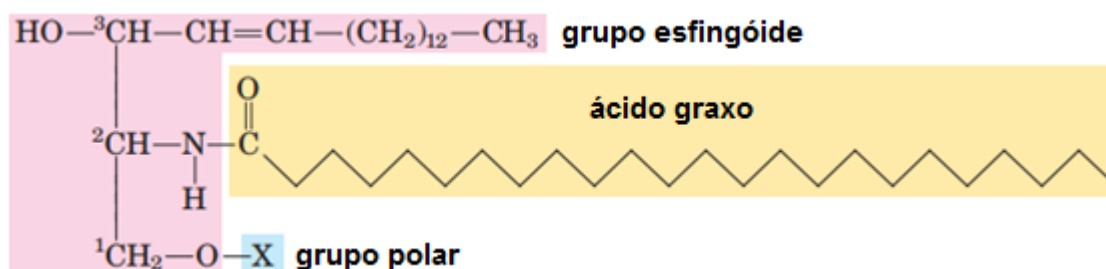
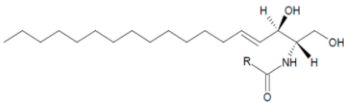
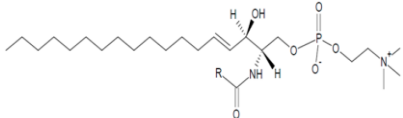
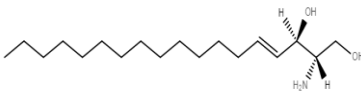
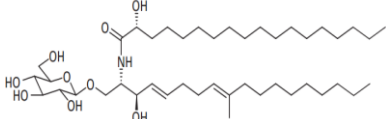
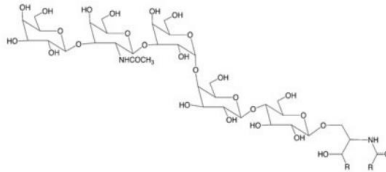
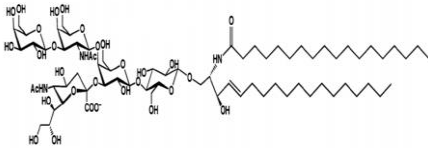
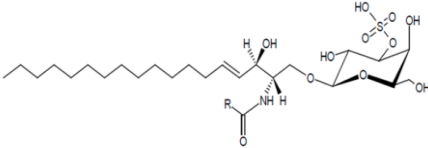


FIGURA 10: Estrutura geral do esfingolipídio. Fonte: <<http://www.docentes.esalq.usp.br/luagallo/lipideos.html>>

Tabela 7: Estrutura química e função das subclasses dos esfingolipídios

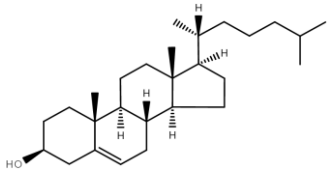
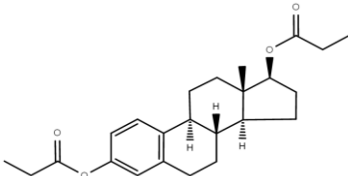
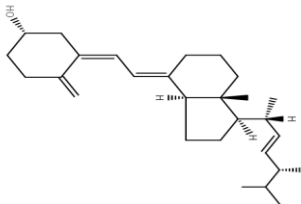
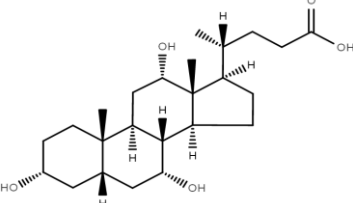
EL	Função EL	Estrutura EL	Referência
Cer	Quimiotaxia dos macrófagos, apoptose, sinalizador de molécula, transdução de sinal, diferenciação e proliferação celular e degeneração celular.		(Bandu, Mok e Kim, 2016; Lipid Maps)
EM	Reservatório para lipídios bioativos e concentra-se na bainha de mielina.		(Laboureur, Ollero e Touboul, 2015; Lipid Maps)
ES	Participa da formação e manutenção dos lipídios de microdomínios e promove o crescimento tumoral, neovascularização e inflamação.		(Rosen et al., 2013; Lipid Maps)
CS	Formar e manter a estrutura da bainha de mielina.		(Li et al., 2012; Lipid Maps)
GB	Formar a face externa da membrana plasmática.		(Joo et al., 2014; Lipid Maps)
GG	Sinalização, apoptose, posicionamento do neurotransmissor, interação entre neurônio e célula da glia, homeostasia do cálcio intracelular e intranuclear e função celular.		(Yagi-Utsumi e Kato, 2015; Lipid Maps)
ST	Atua na estabilidade e função da mielina, secreção de insulina pelas ilhotas de <i>Langerhans</i> , sistema imune, hemostasia/trombose, câncer e infecções bacterianas.		(Takahashi e Suzuki, 2012; Lipid Maps)

2.2.5 Lipídios esteróis

Os lipídios esteróis (LE) representam um importante componente dos lipídios da membrana, já que possibilitam a sua fluidez, regulam e modificam suas características e sinalizam processos biológicos de translocação de proteína e expressão de genes. (BUI, SUGA e UMAKOSHI, 2016).

Este é formado pelo esterol, cujo representante principal - o colesterol - é o precursor do esteróide, secosterol e ácidos biliares e seus conjugados que são os outros elementos que compõem essa mesma classe (Tabela 8). O esteróide compreende o andrógeno (testosterona e androsterona), estrógeno, progesterona, mineralocorticóide (aldosterona) e glicocorticóide (cortisona) e o secosteróide as várias formas de vitamina D (colecalfiferol e ergocalciferol) (CORREIA, 2014).

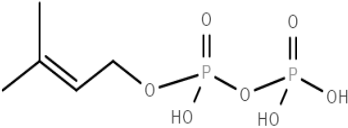
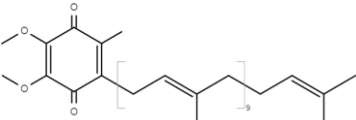
Tabela 8: Estrutura química e função das subclasses dos lipídios esteróis

LE	Função LE	Estrutura LE	Referências
Esteróis	Modula as propriedades físicas, organiza a bicamada lipídica da membrana plasmática e mantém a fluidez da membrana.		(Mannock et al., 2010; Lipid Maps)
Esteróides	Sinalização e produção de hormônios.		(Mahan e Escott-Stump, 2002; Lipid Maps)
Secosteróides	Síntese de vitamina D, modula a homeostase do cálcio e atua no crescimento, diferenciação e processos de desenvolvimento celular.		(Khalil, et al., 2014; Lipid Maps)
Ácidos biliares e derivados	Absorve gordura da dieta e atua no sistema imune e inflamação.		(Wollam e Antebi, 2011; Lipid Maps)

2.2.6 Lipídios prenólicos

Os lipídios prenólicos (LP) são sintetizados a partir de precursores do carbono 5-difosfato de isopentenilo e difosfato de dimetilalilo e produzidos principalmente através da via do ácido mevalônico. Ele e seus derivados fosforilados apresentam papel importante no transporte de oligossacarídeos através das membranas. A classe de moléculas biologicamente importantes que compõem os LP são isoprenoide, poliprenoide e quinonas e hidroquinonas (Tabela 9) (YAN et al., 2016).

Tabela 9: Estrutura química e função das subclasses dos lipídios prenólicos

LP	Função LP	Estrutura LP	Referências
Isoprenoide	Regula a célula e atua na diferenciação e crescimento tecidual (vitamina A).		(Fahy et al., 2005; Lipid Maps)
Poliprenoide	Transporta oligossacarídeos para a membrana.		(Fahy et al., 2005; Lipid Maps)
Quinona e Hidroquinona	Antioxidante (vitamina E) e atua na modificação pós-traducional de proteínas (vitamina K).		(Fahy et al., 2005; Lipid Maps)

2.3 Metabolismo de lipídios e câncer

Os lipídios, presentes nos tecidos de mamíferos adultos, são obtidos a partir da corrente sanguínea pela absorção de AG livres e lipoproteínas (LDL). Sua biossíntese ocorre no fígado, tecido adiposo e em lactantes pela síntese *de novo* (BAENKE et al., 2013).

Mudanças no metabolismo lipídico podem afetar diversos processos celulares, incluindo crescimento, proliferação, diferenciação e motilidade celular e, conseqüentemente, desencadear várias doenças, entre elas o câncer (SANTOS e SCHULZE, 2012). Como o câncer é a principal causa de mortalidade em todo o mundo, esforços são realizados para identificar os mecanismos que levam ao seu desenvolvimento e progressão, bem como a presença de biomarcadores diagnósticos. Estudos confirmam a importância da síntese *de novo* para o desenvolvimento das células cancerígenas, já que os lipídios podem ser

degradados para fornecerem adenosina trifosfato e assim, contribuir para a bioenergia celular (RÖHRIG e SCHULZE, 2016).

O aumento da lipogênese *de novo* é um evento comum no desenvolvimento do câncer já que esta doença requer maior produção de lipídios para atender as necessidades da rápida proliferação celular. Durante este processo, a enzima ácido graxo sintase (FAS) cataliza as etapas finais na biossíntese *de novo* dos AGS a partir da acetil-coenzima A. Os AGS são convertidos em AGMI pela estearoil-coenzima A dessaturase 1 (SCD-1) e em seguida geram fosfatidilcolina monossaturada modificada por uma série de enzimas (colina quinase α – CK α) e a lisofosfatidilcolina aciltransferase (GUO et al., 2014).

Estudo realizado por Guo et al. (2014) sugere que a lipogênese *de novo* em tecidos foi ativada em seis diferentes tipos de câncer (tireóide, estômago, esôfago, mama, fígado e colorretal) e que o aumento de FAS, SCD-1 e CK α podem estar associados com o aumento dos níveis de lipídios monoinsaturados e diminuição de espécies poli-insaturadas. Zaytseva et al (2014) mostrou que a alta regulação das enzimas lipogênicas, em especial a FAS, proporciona uma proliferação seletiva e vantagens de sobrevivência para células cancerígenas de camundongos nude atímico, já que o nível de expressão desta enzima é alto em tumores metastático, principalmente em CCR.

Não é surpresa que o metabolismo lipídico, em particular a síntese *de novo*, se torne cada vez mais reconhecido como um potencial alvo terapêutico e que as enzimas FAS, SCD-1 e CK α possam ser usadas como potenciais biomarcadores para diagnóstico do câncer (RÖHRIG e SCHULZE, 2016).

2.4 Estresse oxidativo e biomarcadores de oxidação

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as espécies reativas do metabolismo do oxigênio – ERO ou ERO) e o sistema de defesa antioxidante. As ERO são geradas endogenamente como consequência direta do metabolismo do O₂ e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O₂. Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido

ascórbico, pela glutathione-redutase (GSH-Rd) e pela GSHPx, entre outros. Com exceção da vitamina E (α - tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (ROSS et al., 1991).

O desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres, o que é denominado estresse oxidativo. O estresse oxidativo leva à peroxidação de membranas lipídicas, dano oxidativo de ácidos nucleicos, carboidratos e oxidação de proteínas e lipídios. Os radicais livres causam dano ao DNA, promovendo carcinogênese, aterosclerose, infarto, artrite e isquemia, além de serem considerados hepatotóxicos em altas concentrações, devido ao seu potencial de reação com a maioria das macromoléculas celulares e enzimas inativas, modificando proteínas e induzindo reações em cadeia de lipoperoxidação (VASCONCELOS et al., 2007; LIMA e ABDALLA, 2001)

Os efeitos gerais da peroxidação lipídica incluem diminuição da fluidez da membrana, dano às proteínas de membrana, desarranjo e inativação dos receptores das enzimas e de canais de íons e potenciação de lise celular (FERRARI, 2012). É conhecido que os AGPI contidos nas membranas celulares fazem com que estas sejam potentes geradoras de radicais alcóxila ($LO^{\bullet}$) e peróxila ($LO_2^{\bullet}$), por meio da lipoperoxidação (BARBOSA et al., 2010).

Nos sistemas biológicos, a peroxidação pode ocorrer principalmente por duas vias: 1) enzimática envolvendo as lipoxigenases e cicloxigenases na oxidação dos AGPI, as quais geram, respectivamente, leucotrienos e lipoxinas e prostaglandinas e tromboxanos; 2) a peroxidação não enzimática que envolve a participação das ERO, metais de transição e outros radicais livres (LIMA e ABDALLA, 2001). Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (Figura 11). A reação inicia com o sequestro do hidrogênio do AGPI da membrana celular pelo radical hidroxila ou pelo alcóxila, com consequente formação do radical lipídico. Na primeira equação da propagação, o radical lipídico reage rapidamente com o oxigênio, resultando no radical peróxila, que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do AGPI, formando novamente o radical lipídico na segunda equação da propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais lipídicos produzidos nas etapas anteriores propagam-se até formarem complexos mais estáveis (BATISTA, COSTA e SANT'ANA, 2007).

Os marcadores de peroxidação lipídica são classificados em primários (hidroperóxidos lipídicos) e secundários, que derivam da β -ruptura dos hidroperóxidos lipídicos. As principais metodologias utilizadas para a avaliação da lipoperoxidação oxidativa em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo (FRANÇA et al., 2013). Dentre estes produtos, os mais estudados são: isoprostanos, hidroperóxidos lipídicos, aldeídos, fosfolípidios oxidados e aqueles produzidos durante os processos bioquímicos de oxidação do colesterol. Os produtos derivados da oxidação de AGI e do colesterol podem ser mensurados para a avaliação da lipoperoxidação que ocorre em tecidos, fluidos biológicos e lipoproteínas (GÓMEZ, 2003).

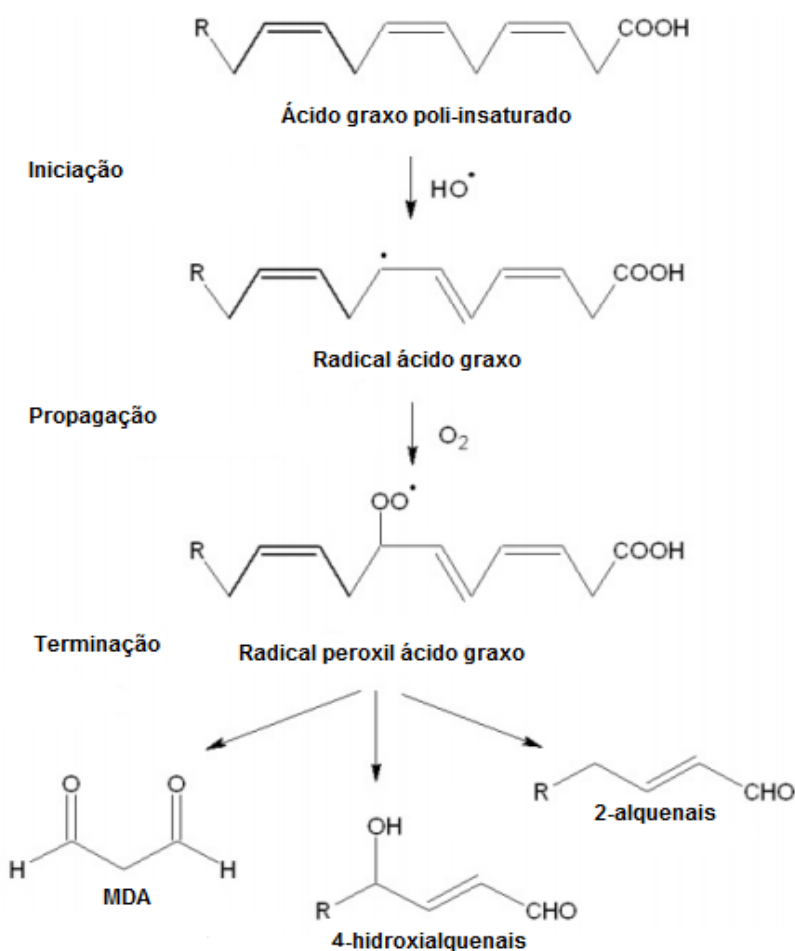


FIGURA 11: Peroxidação lipídica. Reação em cadeia. Fonte: figura adaptada de Mimica-Dukic (2012, p. 194)

O malondialdeído (MDA), produto secundário da peroxidação lipídica, é um biomarcador derivado da β -ruptura de endociclicização de AGPI, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosahexaenóico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2002). Este produto é utilizado para quantificar o índice de peroxidação lipídica através da reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido e com alta temperatura (Figura 12), formando como produto um cromógeno de cor rosa fluorescente capaz de ser detectado através de leitura espectrofotométrica e cuja absorção ocorre em comprimento de onda de 532 nm (OHKAWA et al., 1979).

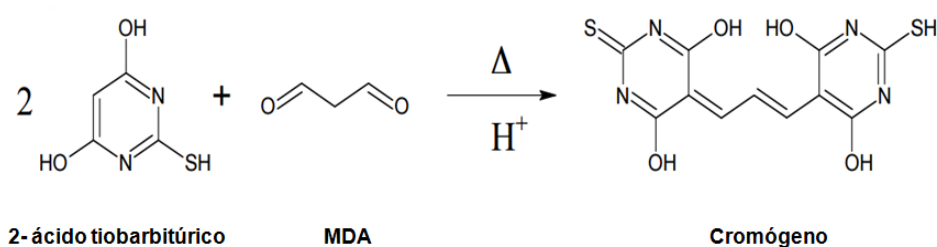


FIGURA 12: Reação do teste de TBA. Quantificação do MDA. Fonte: figura adaptada de Osawa et al. (2005, p. 655)

Apesar de sua simplicidade e facilidade de execução, o teste do TBA não é específico para o malondialdeído, reagindo com uma ampla variedade de compostos como açúcares, aminoácidos, proteínas, aminas e bilirrubina. Por este motivo é também denominado teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (em inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* -TBARS) (BARBOSA et al., 2010).

A dosagem dos isoprostanos é um dos mais recentes e promissores métodos na mensuração da peroxidação lipídica *in vivo*. Os isoprostanos comumente determinados pertencem à família F_2 -isoprostano, derivados da oxidação do ácido araquidônico por um processo não-enzimático de peroxidação lipídica (Figura 13), catalisado por ERO, na membrana celular e em partículas de LDL (LIMA e ABDALLA, 2001). Sua síntese inicial ocorre nos fosfolípidios da membrana celular e em seguida são liberados para os fluidos biológicos pela fosfolipase (LABAER, 2005). Estes compostos são estruturalmente semelhantes à prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) sendo o 15- F_{2t} -IsoP, também conhecido como 8-epi- $PGF_{2\alpha}$, $iPF_{2\alpha}$ -III, 8-isoprostano e 8-iso- $PGF_{2\alpha}$, o composto desta classe que tem sido mais amplamente estudado (MILNE et al., 2008).

Em humanos, F₂-isoprostanos são detectáveis em todos os tecidos, incluindo sangue, plasma, urina, lavado broncoalveolar, fluido cérebro-espinhal e bile, tanto quanto em vários outros tecidos e têm sido descritos em humanos saudáveis (MILNE et al, 2008; FERRERI e CHATGILIALOGLU, 2012).

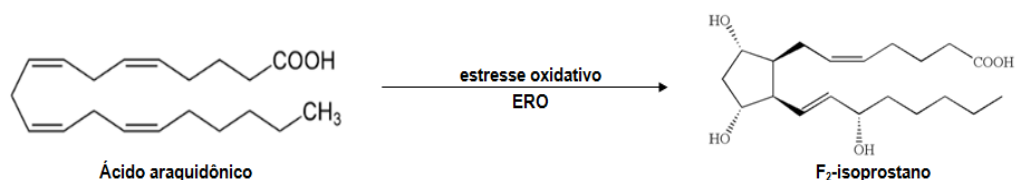


FIGURA 13: Formação do F₂-isoprostano. Fonte: figura adaptada de Basu (2007, p. 50)

2.5 Biomarcadores lipídicos em câncer

Determinar o risco de desenvolvimento e o prognóstico, bem como, o sucesso do tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constituem a principal razão para a identificação de marcadores biológicos ou biomarcadores (FONSECA et al., 2016).

Biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde. (LINHARES, 2014).

Assim um biomarcador é um parâmetro biológico, medido no organismo, o qual reflete as modificações geradas por um estímulo biológico (doenças, contaminação ambiental, modificação genética, entre outros). Para o propósito da prevenção, um biomarcador considerado ideal é aquele que mede uma alteração biológica em um estágio ainda reversível (ou precoce), quando ainda não representa agravo à saúde. Geralmente, as alterações bioquímicas são consideradas como uma fonte potencial de indicadores biológicos de efeito. Se considerarmos que estas alterações precedem um dano estrutural, a detecção destas alterações biológicas permite a identificação precoce de uma doença, possibilitando tomar medidas de intervenção para prevenir um efeito irreversível. Esta estratégia é baseada na identificação das alterações bioquímicas precoces que são indicadores sensíveis e específicos de uma resposta do organismo (AMORIM, 2003).

São várias as opções de origem e composição dos marcadores lipídicos circulantes, como o plasma, soro, saliva, fluido aspirado de mama e urina. Em resposta às diversas situações patológicas, como infecções e neoplasias, a composição do sangue, assim como a concentração das proteínas e lipídios, podem ser alteradas tornando-o um fluido-alvo de muitas pesquisas (ALVES e DELMONICO, 2015).

No contexto da oncologia, os biomarcadores são indicadores do estado fisiológico e de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico e sua expressão pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais, como hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, inflamação, alterações enzimáticas relacionadas com o desenvolvimento tumoral, entre outros (TERMINI e VILLA, 2008).

A lipidômica tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico e no estudo do mecanismo de ação envolvendo a patogênese do câncer, como exemplo o CCR (OKUNO et al., 2013). A tabela 10 descreve alguns artigos publicados recentemente relacionando os principais biomarcadores lipídicos identificados em CCR, assim como as amostras e as técnicas de análise descritas.

Estudo realizado em 1998, por um grupo espanhol (BARÓ et al., 1998), mostrou que o plasma de pacientes com câncer de colorretal apresenta níveis maiores de ácido oleico (18:1 n-9) e menores de ácido linoleico (18:2 n-6) comparado ao controle. Foi observado aumento de ácido palmítico (16:0) nas frações de fosfolipídios e de ésteres de colesterol e de ácido oleico (18:1 n-9) nas frações de triacilglicerol e ésteres de colesterol.

Okuno et al (2013) mostraram alterações na composição de AG do plasma, dos eritrócitos e do tecido adiposo de pacientes japoneses com CCR comparado aos saudáveis. Foi observado aumento da somatória de AGS e redução de AGPI n-3 nos fosfolipídios do plasma, redução nos níveis de ácido linoleico e EPA nos fosfolipídios dos eritrócitos enquanto que no tecido adiposo foi observado níveis maiores de ácido araquidônico comparados ao grupo controle (saudáveis). Os perfis de AG nas membranas dos eritrócitos não refletem as alterações encontradas nos níveis plasmáticos de lipídios, provavelmente por causa do “turnover” mais lento de lipídios estruturais nas membranas do que no compartimento de plasma (GLATZ et al., 1989).

Por outro lado, Qiu et al. (2009) mostraram que os níveis séricos de ácido oleico estavam aumentados enquanto os níveis de seu derivado amidado, a oleamida (cis-9, 10-octadecenoamida), dos ácidos mirístico e palmítico e da carnitina (carreador de AG) estavam reduzidos em voluntários com CCR, indicativos da disfunção no processo de β -oxidação dos

AG. Além disto, os níveis de ácido 3-hidroxibutírico, produto final da oxidação dos AG, estavam aumentados.

Li et al. (2012) reportaram que entre os diferentes metabólitos diferenciais no soro de voluntários com CCR e de saudáveis, destaca-se o aumento sérico de lisofosfatidilcolina (16:0, 18:2, 20:4, 22:6) nos estágios iniciais de desenvolvimento do câncer e a redução dos AG: 16:2, 18:0 e 20:3. Dados anteriores também relataram o aumento de FC e FI nos estágios iniciais de CCR, e também a relação entre metástase hepática e aumento de FE (LI et al., 2004).

Conforme recentemente reportado por Kühn et al. (2016), os níveis de fosfatidilcolina (30:0) e de lisofosfatidilcolina (18:0) foram positiva e negativamente, correlacionados com o risco de câncer próstata, mama e cólon, respectivamente.

Em adenoma de cólon, os níveis de ácido palmítico nos fosfolipídios estavam reduzidos enquanto dos ácidos palmitoleico (16:1) e elaídico (C18:1 trans) estavam aumentados no plasma de homens adultos comparado aos saudáveis. Os autores estimaram uma maior atividade das enzimas SCD-1 e elongase de AG de cadeia muito longa (ELOVL 6- (*elongation of very long chain fatty acids*) com o maior risco de adenoma comparado ao grupo com pólipos hiperplásicos (PICKENS et al., 2016).

Tabela 10: Principais biomarcadores lipídicos em tecido e sangue de pacientes com CCR

	Amostra	n	Biomarcador	Método Analítico	Referências
Câncer colorretal	Plasma	17 câncer 12 controle	↑ 18:1 ↓ 18:2 (lipídios totais e frações)	TLC CG-FID	Baró et al., 1998
Câncer colorretal	Soro	64 câncer 65 saudáveis	↓ Oleamida (cis-9, 10-octadecenoamide) ↓ 14:0 e 16:0	GCTOFMS UPLC-QTOFMS	Qiu et al., 2009
Câncer colorretal	Plasma e eritrócitos (fosfolipídios) e tecido adiposo (TAG)	61 câncer 42 saudáveis	Plasma: ↑AGS e ↓AGPI n-3 (20:5 n-3) Eritrócitos: ↓18:2 n-6 e 20:5 n-3 Tecido adiposo: ↑20:4 n-6	TLC CG-FID	Okuno et al., 2013
Câncer colorretal	Soro	26 estadio I e II 26 estadio III e IV 52 saudáveis	↑ LFC (16:0); LFC (18:2); LFC (20:4); LFC (22:6) ↓ ácido graxo: 16:2, 18:0 e 20:3	DI-FTICR-MS	Li et al., 2013
Câncer de mama, próstata e colorretal	Soro, plasma, eritrócitos e camada leucoplaquetária	362 câncer mama 310 câncer próstata 163 câncer colorretal	Diminui o risco de câncer: ↑ lisofosfatidilcolina (18:0) Aumenta o risco de câncer: ↑ fosfatidilcolina (30:0)	LC-MS/MS	Kühn et al., 2016

2.6 Lipidômica e métodos analíticos aplicados a lipidômica

Entende-se por lipidômica a análise de todos os metabólitos relacionados ao estudo dos lipídios da célula. Assim, pode-se incluir em seu campo de estudo a análise qualitativa e quantitativa de todas as classes de lipídios, transportadores de lipídios, enzimas envolvidas no metabolismo e os mecanismos moleculares através dos quais os lipídios auxiliam nas funções celulares (VAN MEER et al., 2007).

A lipidômica é considerada uma das mais recentes ciências “ômicas”, sendo um segmento da metabolômica e útil para documentar o perfil de lipídios e revelar alterações que ocorrem em distúrbios metabólicos, além de desempenhar um papel fundamental na compreensão dos mecanismos do câncer (ALVES e DELMONICO, 2015). Além disso, devido ao fato dos lipídios serem, também, reguladores de processos de produção das proteínas e de participarem de diversas rotas bioquímicas, o estudo da lipidômica pode prover informações que integram a genômica, proteômica e metabolômica para a elucidação e tratamento de diversas doenças (BUCZYNSKI, 2009).

Há na literatura a descrição de uma grande variedade de métodos que envolvem a extração e análise de lipídios. No processo de extração dos lipídios de plasma, o uso de um único solvente não é recomendável. A mistura de solventes ideal para extração da matéria graxa de plasma deve ser suficientemente polar para removê-la das associações com as membranas celulares ou com lipoproteínas, sem que ocorra reação química (CHRISTIE, 1982). Folch et al. (1957), desenvolveram um método usando uma mistura de clorofórmio e metanol, seguida pela adição de solução de cloreto de potássio, visando uma melhor separação das fases.

Em relação aos métodos de separação, emprega-se o uso somente de uma técnica ou a combinação entre as técnicas cromatográficas o que tem se mostrado útil devido à alta complexidade da matriz (amostras biológicas). Para a determinação da composição em AG há vários métodos analíticos tais como a cromatografia em fase gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

A cromatografia gasosa (CG) é um método altamente sensível utilizado para identificar e quantificar a composição em AG dos lipídios de tecidos, células e no plasma/soro, obtendo-se resultados com elevada precisão e reprodutibilidade. Para a análise de AG por cromatografia a gás, é necessário aplicar procedimentos de esterificação para converter os AG em compostos mais voláteis, chamados ésteres metílicos de ácidos graxos (em inglês *Fatty Acid*

Methyl Esters, FAME). Os métodos de esterificação normalmente se subdividem em duas categorias: catálises ácidas e básicas (GUTNIKOV, 1995). Na catálise ácida, os reagentes mais comuns são soluções em metanol, com ácido clorídrico, ácido sulfúrico e trifluoreto de boro. Entretanto devido a sua cinética lenta, a reação deve ser realizada com aquecimento. Por outro lado, os reagentes mais utilizados em reações de transesterificação por catálise básica são o metóxido de sódio e hidróxido de sódio em metanol. A principal vantagem com relação ao uso deste tipo de catálise é que a reação procede à temperatura ambiente, entretanto uma limitação desta reação é a baixa cinética de conversão de AG livres, assim este reagente é indicado para análise de lipídios tais como triacilglicerídeos e seus derivados (CHRISTIE, 1989). Os ésteres metílicos dos AG são, então, analisados por Cromatografia Gasosa com detecção por ionização em chama (*Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*, GC-FID).

Por outro lado, a análise de lipídios por espectrometria de massa tem desempenhado um papel chave neste campo (IVANOVA et al., 2009). A espectrometria de massas é uma técnica utilizada para identificação de moléculas presentes nas mais distintas matrizes, por meio da análise de íons gerados por uma fonte de ionização. A discriminação dos íons analisados é obtida de acordo com a razão massa/carga (m/z). Assim, em íons mono carregados ($M+1$, se protonado; $M+23$, se sodiado; $M+39$, se potassiado; $M-1$, se desprotonado, etc) a razão massa/carga (m/z) reflete na massa molecular do íon, em Daltons (Da). Por meio de experimentos de fragmentação (MS/MS), pode-se ainda estabelecer a estrutura molecular do íon.

A espectrometria de massa é uma das técnicas mais sofisticadas para mensurar a relação massa/carga das moléculas, utilizando de suas propriedades de ionização. Por ser um método rápido, de fácil manuseio e com alta sensibilidade, ele fornece informações detalhadas das moléculas, identificando-as de forma precisa, através da monitorização constante do destino dos compostos químicos presentes na amostra (MANIKANDAM et al., 2016). Por ser dotada de diversas vantagens, esta técnica é dividida em duas categorias distintas: a primeira para análise de sólidos (MALDI, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) e a segunda aplicada para análise de solução (ESI, do inglês *electrospray ionization*) (TAKÁTS, WISEMAN e COOKS, 2005).

O acoplamento dos espectrômetros de massas a sistemas de separação como, por exemplo, em fase gasosa, conhecido como GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*), ou em fase líquida como LC-MS (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

tem sido útil para a identificação e confirmação estrutural de inúmeros compostos. A GC-MS é uma ferramenta analítica poderosa, utilizada usualmente na análise de misturas complexas de compostos em fase gasosa, de baixa polaridade e baixa massa molecular. Para compostos de massa molecular maior e/ou maior polaridade e menor volatilidade, a técnica LC-MS é a técnica de preferência (MOREAU, 2006).

No sistema ESI, a amostra é introduzida na câmara de ionização por um capilar de aço inoxidável. Uma alta voltagem é aplicada na ponta do capilar, gerando um campo elétrico que com auxílio de um gás nebulizante dispersam as gotas carregadas eletronicamente. Essas gotas, à medida que entram em contato com o gás de secagem, ficam livres do solvente e liberam os íons que são transferidos para uma região do equipamento conhecida como analisador de massas, onde sua relação m/z é medida. Os analisadores mais conhecidos são o quadruplo de tempo de voo (do inglês *Quadrupole time-of-flight*, Q-TOF), de setor magnético (do inglês *magnetic sector*) e os de armadilha de íons (do inglês *ion trap*). O Q-TOF é ideal para a determinação do perfil lipidômico, identificando compostos de baixo peso molecular. Nele o quadruplo funciona como um filtro permitindo que os íons de diferentes valores de m/z cheguem em momentos diferentes ao detector e desta forma possam ser fragmentados separadamente, permitindo sua caracterização (DINIZ, 2011).

Existem duas grandes abordagens na análise de lipídios por espectrometria de massa. Uma foi desenvolvida realizando-se a análise após a infusão direta da amostra, chamada de “*shotgun lipidomics*”, no qual a amostra é infundida diretamente no espectrômetro de massas; enquanto a outra usa separações cromatográficas líquidas antes da análise por espectrometria de massa. A técnica “*shotgun lipidomics*” permite a análise direta de extratos orgânicos de amostras biológicas com de alto rendimento (WANG et al., 2016). As amostras são passíveis de análise pela técnica de infusão direta quando o fenômeno de supressão iônica não afeta os analitos alvos – fenômeno no qual demais espécies presentes na amostra competem com o analito alvo pelo agente ionizante.

Trabalhos mais recentes têm mostrado que as técnica de “*shotgun lipidomics*” em espectrômetro de massa de alta resolução (Orbitrap) (WOOD et al., 2016) e em espectrômetro de massas multidimensional (em inglês “*Multidimensional Mass Spectrometry-Based Shotgun Lipidomics* - MDMS-SL”) podem ser eficientemente usadas para avaliar diferentes classes de lipídios (HAN, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os biomarcadores de estresse oxidativo e de perfil lipidômico em plasma de pacientes com câncer de reto visando contribuir no conhecimento das alterações no metabolismo destas moléculas e na sua possível utilização no diagnóstico precoce da doença.

3.2 Objetivos Específicos

No plasma de pacientes com câncer de reto e de voluntários saudáveis:

- ✓ Quantificar os biomarcadores de oxidação (malondialdeído e isoprostano);
- ✓ Identificar e quantificar (% ou abundância relativa) os AG e as classes e sub-classes que compõem o perfil lipídico total;
- ✓ Identificar os metabólitos diferenciais utilizando análises multifatoriais, Análise do Componente Principal (PCA), Análise Discriminatória Parcial dos Quadrados Mínimos (PLS-DA) e Análise Discriminatória Ortogonal Parcial dos Quadrados Mínimos (OPLS-DA) como possíveis biomarcadores para a doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Grupos de estudo

Para o desenvolvimento do estudo foram utilizadas amostras de plasma de 23 pacientes com câncer de reto e 18 de voluntários saudáveis no grupo controle (Figura 14). Os projetos foram aprovados pelos Comitês de Ética e Pesquisa da Universidade São Francisco (USF, CAAE: 51356315.5.0000.5514 – Anexo 1) e da Faculdade de Ciências Médicas (FCM – UNICAMP, CAAE: 08287012.0.0000.5404 – Anexo 2). A Tabela 11 mostra os principais dados demográficos e características clínicas dos participantes deste estudo.

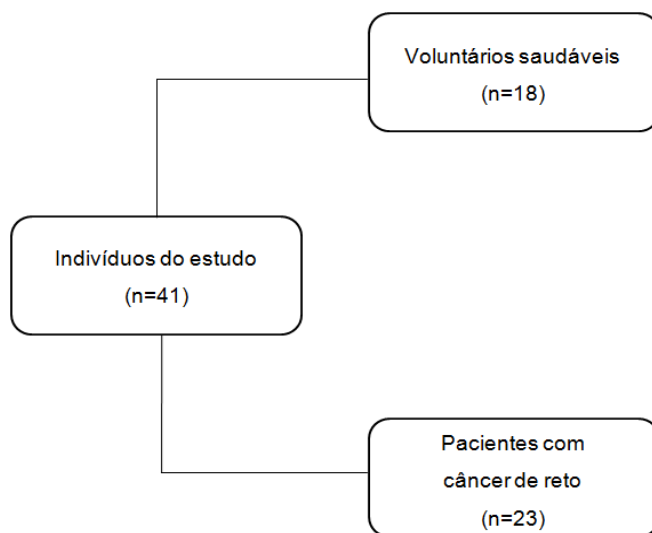


FIGURA 14: Triagem dos pacientes e voluntários saudáveis do estudo.

4.2 Seleção dos voluntários

4.2.1 Seleção dos voluntários doentes

Os pacientes com câncer de reto foram recrutados no Gastrocentro da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas (UNICAMP) no período de 2013 a 2014. Os seguintes critérios de inclusão foram usados para que o voluntário participasse do estudo: homem ou mulher com idade acima de 18 anos, índice de massa corpórea maior ou igual a 18,5 e menor ou igual a 29,9 kg/m² e capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo o

que vem a ser confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram usados os seguintes critérios de exclusão: pacientes submetidos a qualquer tipo de tratamento (radio e quimioterápico) ou com doenças crônicas associadas (como doenças cardiovasculares; diabetes; obesidade; doenças respiratórias; hipertensão). As amostras foram separadas, catalogadas e enviadas ao Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa da USF.

4.2.2 Seleção dos voluntários saudáveis

Foram usadas as amostras de sangue de voluntários adultos saudáveis de ambos os sexos, de 18 a 50 anos, recrutados para os estudos de biodisponibilidade realizados na UNIFAG da Universidade São Francisco (USF) e coletados no Laboratório São José do Hospital Universitário São Francisco da Providência de Deus (HUSF). Somente os indivíduos que atenderam aos requisitos necessários segundo os critérios da seleção para o estudo de bioequivalência. Os voluntários saudáveis foram triados previamente com base na história médica, exame físico, dados antropométricos (pulso, altura, peso e índice de massa corpórea) e os exames laboratoriais (análise hematológica, bioquímica e sorológica) que antecederam a admissão no estudo.

Tabela 11: Dados demográficos e características clínicas de pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis

	Pacientes com câncer reto	Voluntários saudáveis
N	23	18
Sexo (M/F)	10 : 13	10 : 8
Idade (anos)	56,6 ± 11,0	55,9 ± 11,9
Raça (%)		
Branca	20 (87)	16 (89)
Negra	2 (8,7)	2 (11)
Parda	1 (4,3)	0
Amarela	0	0
IMC (kg/m²)	27,5 ± 4,6	25,3 ± 5,1
Tabagismo (%)		--
Sim	4 (17,4)	--
Não	8 (34,8)	--
Ex	5 (21,7)	--
Não informado	6 (26,1)	--
Estadio (%)		--
0	4 (17,4)	--
I e II	9 (39,1)	--
III e IV	10 (43,5)	--

4.3 Coleta de sangue

As coletas de sangue foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da USF e no Gastrocentro da UNICAMP. Quatro mililitros de sangue venoso foram coletados em tubo *Vacutainer*[®], pela manhã (entre 7:00 e 9:00 hs) e após jejum de 12 horas. Para o estudo foi coletado um tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA 1,0 mg/mL sangue). As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos para separação dos componentes sanguíneos, de onde foram retiradas alíquotas de plasma e armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

4.4 Determinação do perfil lipidômico

4.4.1 Determinação do perfil de ácidos graxos por cromatografia a gás

Os lipídios totais do plasma foram levados para a reação de transesterificação onde os AG foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) usando BF_3 metanol como reagente esterificante (AOCS, 1993). A cada tubo contendo os lipídios totais e as frações lipídicas foram adicionados 2 mL de NaOH 5N em metanol, para banho Maria a 100°C por 5 minutos e, após, resfriado com água corrente. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de reagente esterificante BF_3 metanol, levado novamente ao banho Maria a 100°C por 5 minutos e, posteriormente, resfriado com água corrente. Foram adicionados 2 mL de solução saturada de NaCl e agitado em vórtex por 30 segundos. Acrescentou-se 1,5 mL de hexano, agitou-o em vórtex e em seguida foi centrifugado a 2000rpm por 5 minutos. O sobrenadante contendo os ésteres metílicos em hexano foram analisados por cromatografia à gás usando cromatógrafo *CHROMPACK*[®] (modelo CP 9001) com o detector de ionização e a coluna capilar *CP-Sil 88* (*WCOT Fused Silica* 59 m x 0.25 mm), com detector a 280°C e injetor a 250°C. A temperatura inicial foi de 180°C por 2 minutos, programado para aumentar 10°C por minuto até 210°C por 30 minutos. O carregador a gás usado foi o hidrogênio na frequência de fluxo de 2,0 mL/ minuto. A identificação dos AG foi realizada por comparação do tempo de retenção dos componentes das amostras com padrões autênticos de ésteres de AG injetados sob as mesmas condições (*Supelco Chemical Co*). A composição dos AG foi expressa em relação ao percentual dos AG totais (análise qualitativa), calculada segundo o valor de área de cada pico usando o *software Chromatostation N2000*.

4.4.2 Identificação das classes de lipídios por ESI-Q-TOF

Este experimento foi realizado em parceria com o laboratório ThoMSON de Espectrometria de Massas do Instituto de Química (IQ) da UNICAMP.

Os lipídios totais do plasma de pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis foram extraídos pelo método de Folch et al. (1957). A fase inferior resultante contendo os lipídios totais foi coletada e seca em nitrogênio. Na análise no ESI, o extrato bruto foi diluído em 300µL de uma solução de metanol:clorofórmio (2:1) e 100µL desta foi re-diluída em 400µL de ACN:clorofórmio (3:1), em seguida, 1µL foi injetado num espectrômetro de massa usando LC (*Agilent 1290*), sem coluna e com um fluxo de 0,5 mL min⁻¹ de ACN:H₂O (1:1). Os experimentos no espectrômetro de massa foram realizados em 6550 *iFunnel Q-TOF* (*Agilent Technologies*), juntamente acoplado a uma fonte *Dual Agilent Jet Stream ESI* (*Dual-AJS-ESI*). O modo de íon positivo foi selecionado para a coleta dos espectros de massa utilizando as seguintes condições: *gas temp* a 290°C, *drying gas flow* em 11 Lmin⁻¹, *nebulizer* a 45 *psi*, *sheath gas temp* a 350°C, *sheath gas flow* 12 Lmin⁻¹, *Vcap* 3000, *nozzle voltage* 320 V, *fragmentor* 100V e OCT 1 RFVpp 750 V.

4.5 Quantificação de biomarcadores de oxidação

4.5.1 Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O MDA, considerado um dos principais metabólitos secundários da lipoperoxidação, é capaz de reagir com duas moléculas de TBA, formando assim um complexo de coloração rosa que é lido em um comprimento de onda específico no espectrofotômetro (532-535 nm). Para avaliar a lipoperoxidação foi utilizada a medida de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) de acordo com o método desenvolvido por Ohkawa et al. (1979). A alíquota de 250µL de amostra de plasma foram misturados com 25µL BHT 4% em metanol, 1mL de ácido tricloroacético a 12%, 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,73% e 750µL 0,1 mol/L tampão Tris-HCl contendo 0,1mmol/L EDTA pH 7,4. Após 60 minutos de incubação em banho-maria fervente, as amostras foram rapidamente resfriadas em banho de gelo e adicionado 1,5mL de n-butanol. As amostras foram homogeneizadas por 30 segundos em vórtex e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 532nm. A quantificação foi realizada utilizando uma curva de calibração com tetrametoxipropano (TMP).

4.5.2 Dosagem de F₂-isoprostano (8-epi-prostaglandina 2,8-epi-PGF₂)

A dosagem de F₂-isoprostano foi realizada no plasma dos pacientes, conforme instruções do fabricante, utilizando-se o *kit* 8-isoprostane EIA (Cayman Chemical, MI, EUA). Este *kit* é um imunoensaio competitivo entre o 8-isoprostano da amostra e o 8-isoprostano conjugado com acetilcolinesterase (8-isoprostano *Tracer*), em um número limitado de sítios de ligação de anticorpos específicos para 8-isoprostano. A concentração de 8-isoprostano *Tracer* mantém-se constante enquanto a de 8-isoprostano varia. Portanto, a quantidade de 8-Isoprostano *Tracer* capaz de se ligar ao anticorpo será inversamente proporcional à concentração de 8-isoprostano no poço. Os anticorpos 8-isoprostano (livre ou *Tracer*) ligam-se à anti-imunoglobulina G (IgG) *rabbit*, previamente aderida ao poço. A placa é lavada para remover reagentes não ligados. Então, o reagente de *Ellman*, o qual contém o substrato para acetilcolinesterase, é adicionado ao poço. O produto desta reação enzimática tem uma coloração amarela, medida em 412 nm. A intensidade da coloração é proporcional à quantidade de 8- Isoprostano *Tracer* ligado ao poço, o qual é inversamente proporcional à quantidade de 8-Isoprostano livre no poço durante a incubação (CORREA, 2012).

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas de forma comparativa entre os grupos experimentais. Para as médias e desvio padrão dos AG, TBARS e Isoprostano, foi aplicado o teste de *Tukey*, considerando o nível de significância do $p < 0,05$ (5%). Os dados estatísticos foram avaliados no *software InStat* (GraphPad Software, versão 2.0) e os gráficos elaborados com o auxílio do *software Prism* (GraphPad Software, versão 5.0).

Na avaliação das classes de lipídios foi utilizado o *software Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis* (versão B.07.00) para controle e aquisição dos dados. Para o ESI (+)-MS foi realizada a exportação dos arquivos em CSV. Para a análise dos conjuntos de dados foi utilizado o *website MetaboAnalyst* (versão 2.0). Primeiramente foram feitos três métodos de análise multifatorial: PCA, PLS-DA e OPLS-DA e de acordo com os resultados obtidos por essas três primeiras análises, foram feitos testes de análise de variância (ANOVA) e posteriormente, quando necessário, o teste *t* ou teste de *Fisher*. A Importância da Variável na Projeção (VIP) foi utilizada para identificar os íons que tiveram maior efeito discriminatório entre os grupos em cada comparação.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização lipidômica do plasma

5.1.1 Perfil das classes de lipídios

Na avaliação lipidômica no plasma de pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis, foi utilizada a técnica de ESI-Q-TOF e a análise de dados multivariados para diferenciar os grupos estudados.

Para o estudo dos dados foram realizados três métodos de análises multivariadas: Análise de Componente Principal (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) (Figura 15), Análise Discriminatória Parcial dos Quadrados Mínimos (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) (Figura 16) e a Análise Discriminatória Ortogonal Parcial dos Quadrados Mínimos (OPLS-DA, do inglês *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*) (Figura 17), onde os indivíduos do estudo foram agrupados com o propósito de reter o máximo de informação dos dados através do escore de pontuação (*score plot*) e assim obter uma maior separação entre os grupos. Como pode ser observado, nas figuras 15, 16 e 17 houve uma separação satisfatória entre os grupos, mostrando que foram identificadas moléculas diferenciais entre eles. A validação cruzada interna mostrou valores de Q^2 de 0,97 e o teste de permutação mostra valores de $p < 5e^{-4}$.

As amostras de câncer retal revelaram 15 íons importantes (possíveis biomarcadores) para a PLS-DA (Figura 18). As caixas coloridas laterais relacionam as concentrações dos metabólitos selecionados em cada grupo, ou seja, a cor vermelha representa uma tendência relativa mais alta e a verde uma tendência mais baixa para este possível biomarcador.

De todos os íons detectados, o primeiro de m/z de 478, identificado como um metabólito reduzido de lisofosfatidilcolina (LFC) esterificada ao ácido palmitoleico (16:1) apresentou um *VIP score* de maior importância com uma tendência baixa em pacientes com câncer de reto e alta em voluntários saudáveis (Figura 19). Trata-se de uma molécula de LFC (P-16:1) ou 1Z-alquenilglicerofosfocolina que contém uma cadeia de plasmalogênio (P) na posição sn-1 do glicerol (éter alquil) (Figura 20).

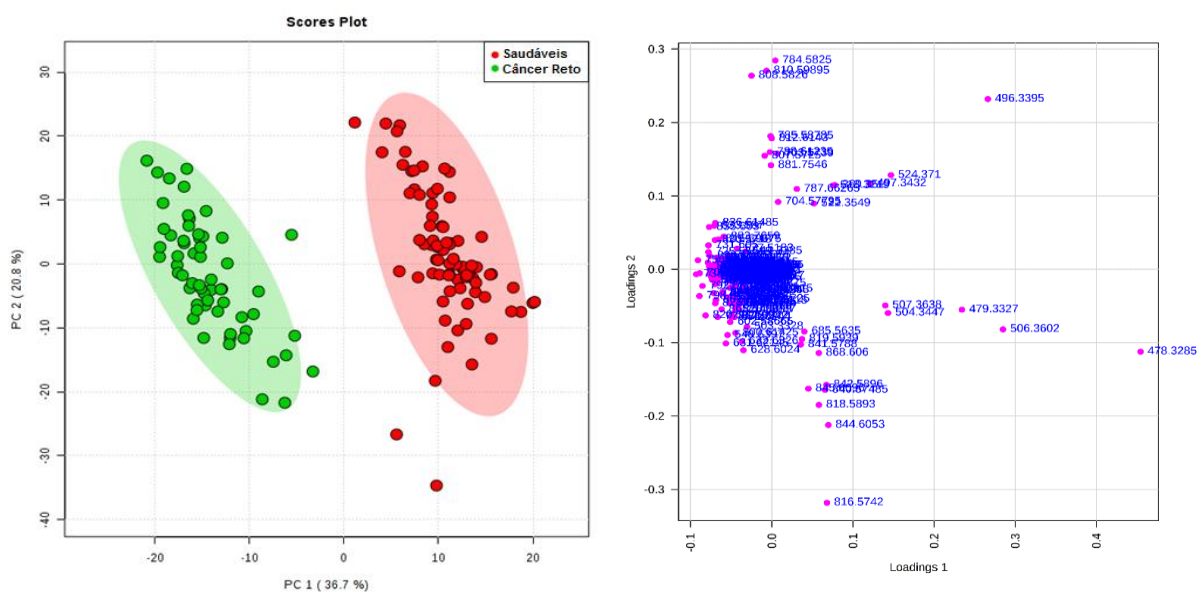


FIGURA 15: Representação gráfica da PCA e *loadings* do conjunto de dados dos pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis. As variâncias explicadas pelas PC1 (36,7%) versus PC2 (20,8%).

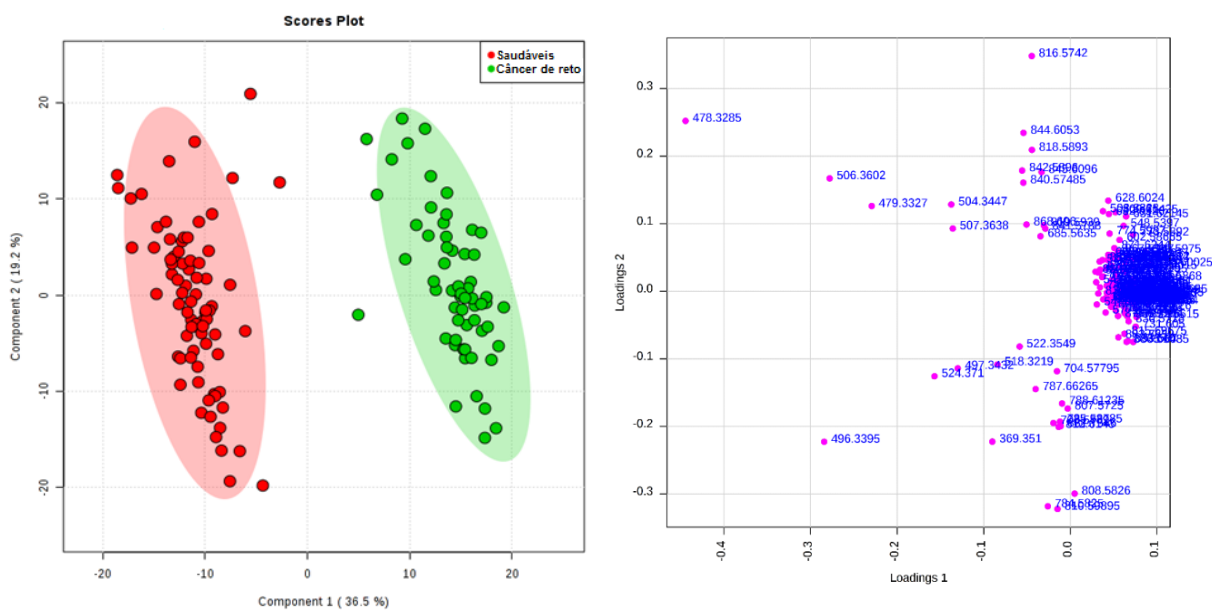


FIGURA 16: Escores de discriminação PLS-DA e *loadings* de dados ESI-MS de pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis. O teste de permutação mostra valores de $p < 5e^{-4}$.

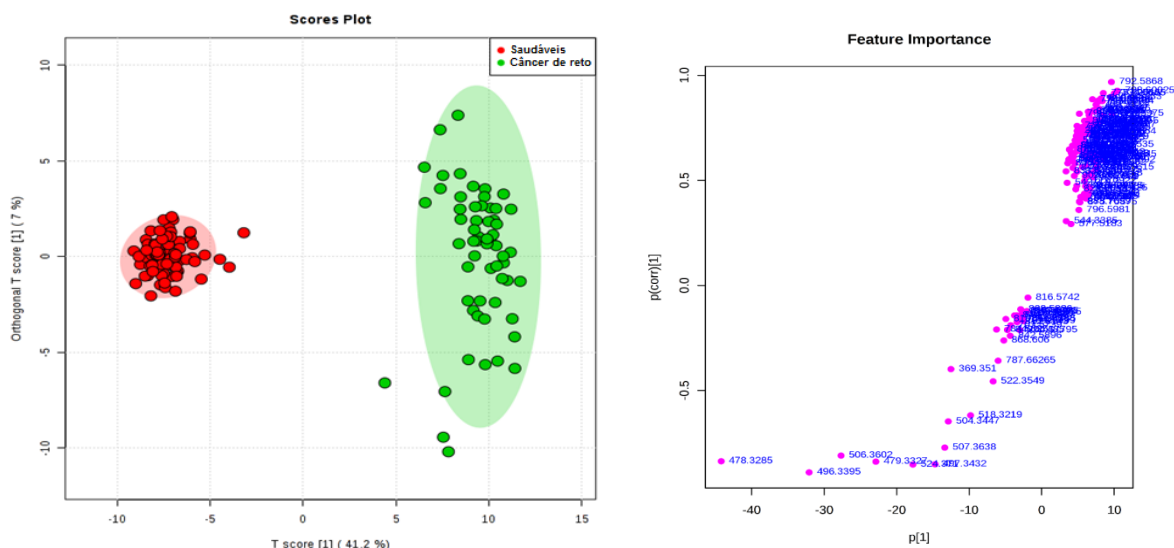


FIGURA 17: Escores de discriminação OPLS-DA e *loadings* de dados ESI-MS de pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis. A validação cruzada interna mostra valores de Q^2 de 0,97.

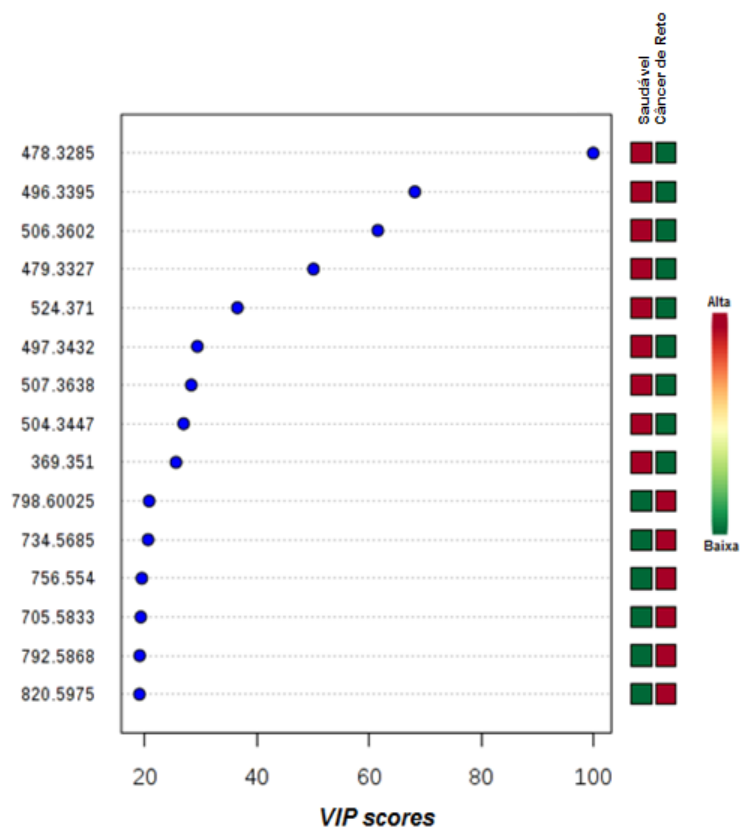


FIGURA 18: Íons identificados como importantes pelo PLS-DA para a separação dos grupos de pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis.

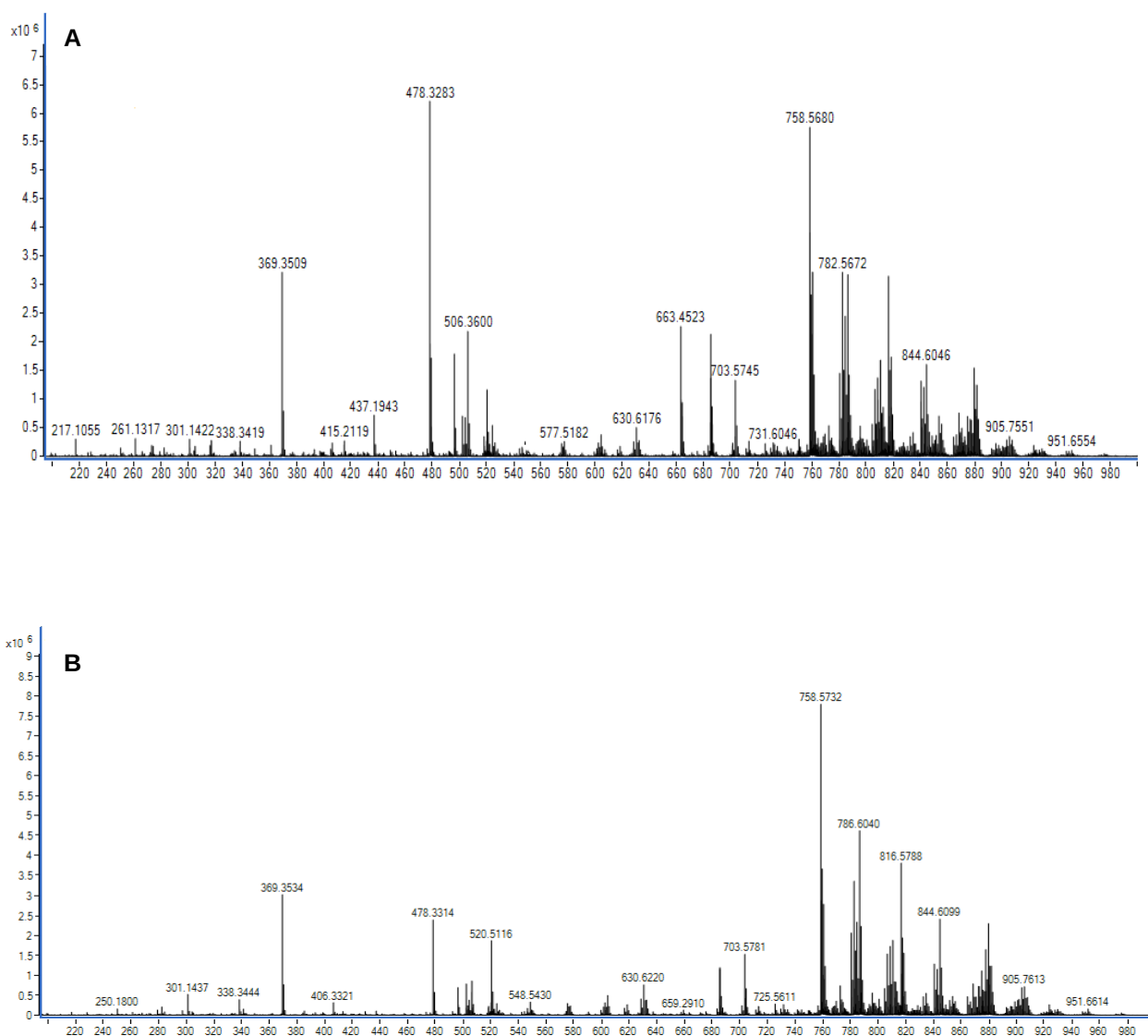


FIGURA 19: Espectros ESI (+)-MS representativo do grupo Saudável (A) e Câncer de Reto (B) mostrando o perfil lipídico da extração do plasma.

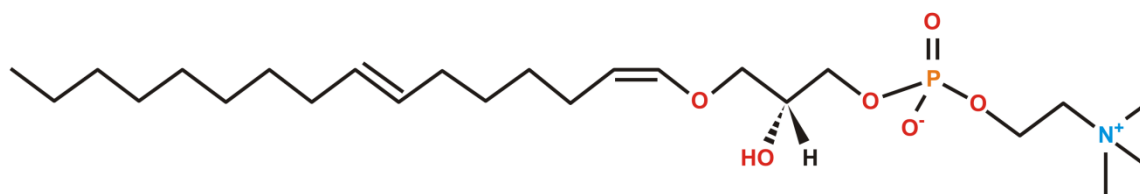


FIGURA 20: Estrutura da molécula (C₂₄H₄₈NO₆P) de m/z 478 identificada pela massa exata como LFC (P-16:1)

As diferenças nos perfis lipídicos entre os grupos avaliados foram observadas somente na classe das glicerofosfocolinas. A abundância relativa dos íons de m/z 478, 496, 506, 504 e 524, identificados como moléculas de LFC, em pacientes com câncer de reto está significativamente diminuída, enquanto que a dos íons fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina está aumentada neste grupo de pacientes (Tabela 12).

Os dados foram analisados e identificados usando o agrupamento *HeatMap* (Figura 21). A identificação dos lipídios distingue claramente o perfil metabólico dos pacientes com câncer de reto. As colunas representam diferentes lipídios (m/z) detectados pelo equipamento, às linhas as amostras e as cores as intensidades alta (vermelho) e baixa (azul).

Tabela 12: Principais classes de lipídios identificadas no plasma de pacientes com câncer de reto

m/z	Lipídio	Massa molecular	Classe Lipídio	Tendência
734.5685	FC(12:0/20:0) FC(14:0/18:0) FC(16:0/16:0) FC(O-16:0/O-18:0) FE (20:0/15:0)	$C_{40}H_{80}NO_8P$	Glicerofosfocolina Glicerofosfoetanolamina	Alta
756.554	FE(14:0/20:3) FE(16:0/18:3) FE (16:1/18:2)	$C_{42}H_{78}NO_8P$	Glicerofosfoetanolamina	Alta
792.5868	FC(O-16:0/22:6) FC(20:4/P-18:1)	$C_{46}H_{82}NO_7P$	Glicerofosfocolina	Alta
820.5975	FC(O-18:0/22:6) FC(22:4/P-18:1)	$C_{48}H_{86}NO_7P$	Glicerofosfocolina	Alta
478.3285	LFC (P16:1)	$C_{24}H_{48}NO_6P$	Glicerofosfocolina	Baixa
496.3395	LFC(16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	Glicerofosfocolina	Baixa
506.3602	LFC(P18:1)	$C_{26}H_{52}NO_6P$	Glicerofosfocolina	Baixa
504.3447	LFC(P18:2)	$C_{26}H_{50}NO_6P$	Glicerofosfocolina	Baixa
524.371	LFC(18:0)	$C_{26}H_{54}NO_7P$	Glicerofosfocolina	Baixa
369.351	Desconhecido			Baixa

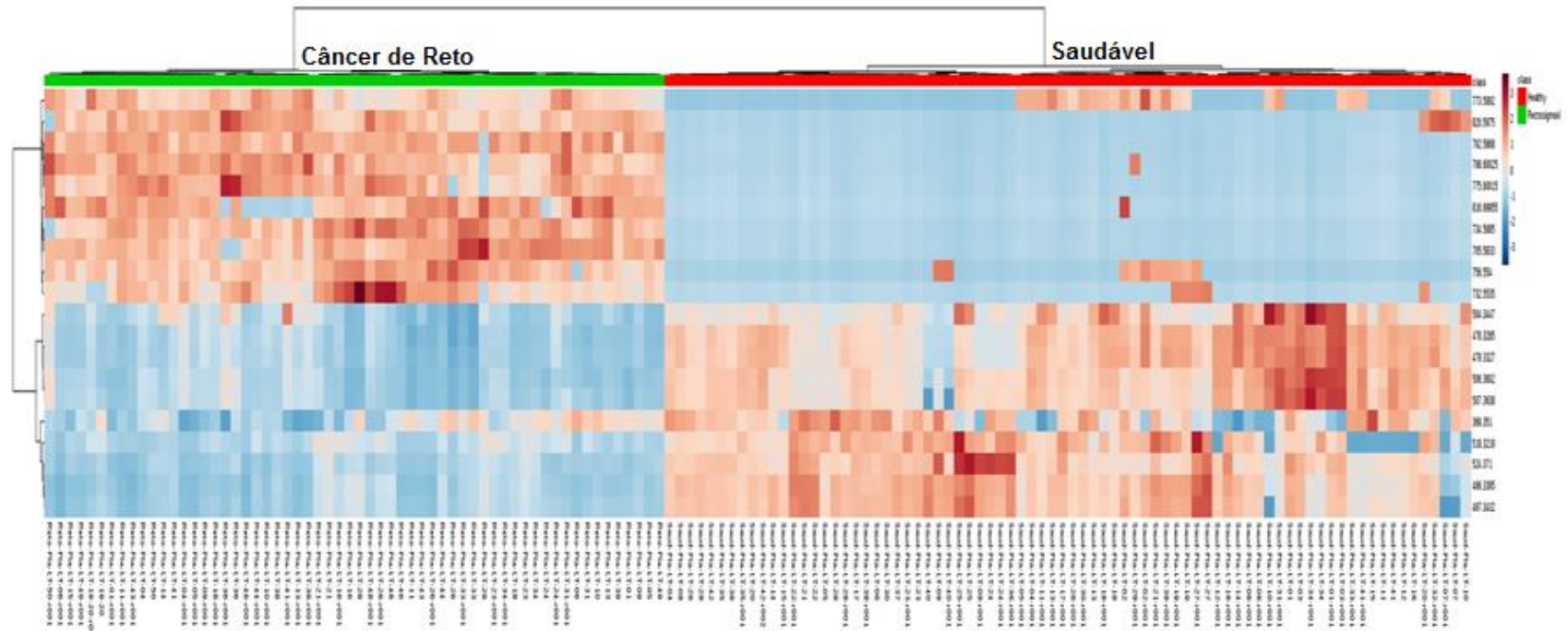


FIGURA 21: HeatMap mostrando a distribuição dos grupos de pacientes com câncer de reto e voluntários saudáveis. Os dados foram agrupados de acordo com os grupos de estudo sendo o vermelho para voluntários saudáveis e verde para pacientes com câncer de reto.

5.1.2 Perfil dos ácidos graxos

O perfil de AG do plasma determinado por cromatografia gasosa foi expresso em porcentagem relativa (%) de cada AG em relação ao total.

A Tabela 13 expressa os resultados das porcentagens dos principais AG do plasma de voluntários saudáveis e de pacientes com câncer de reto, separados segundo o estadiamento do câncer em dois grupos (Estadio I e II e Estadio III e IV). Os principais AG encontrados do plasma humano são os AGS (ácido palmítico, C16:0) seguido dos AGPI da família n-6 (ácido linoleico, C18:2 n-6) e dos AGMI (ácido oléico, C18:1 n-9). Quando comparado com voluntários saudáveis, os resultados evidenciaram uma redução dos ácidos palmitoleico (C16:1) e dos AGPI, araquidônico (C20:4) da família n-6 e dos ácidos docosapentaenoico (C22:5) e docosahexaenóico (C22:6) da família n-3 no grupo com estadio I e II, do AGPI n-3 C22:5 no grupo com estadio III e IV e dos AGPI n-3 C22:5 e C22:6 no grupo de pacientes com câncer. Quanto à somatória dos AG separados por classes (AGS, AGMI e AGPI) não houve diferença estatística entre os grupos de pacientes com câncer de reto comparado ao controle saudável (Figura 22).

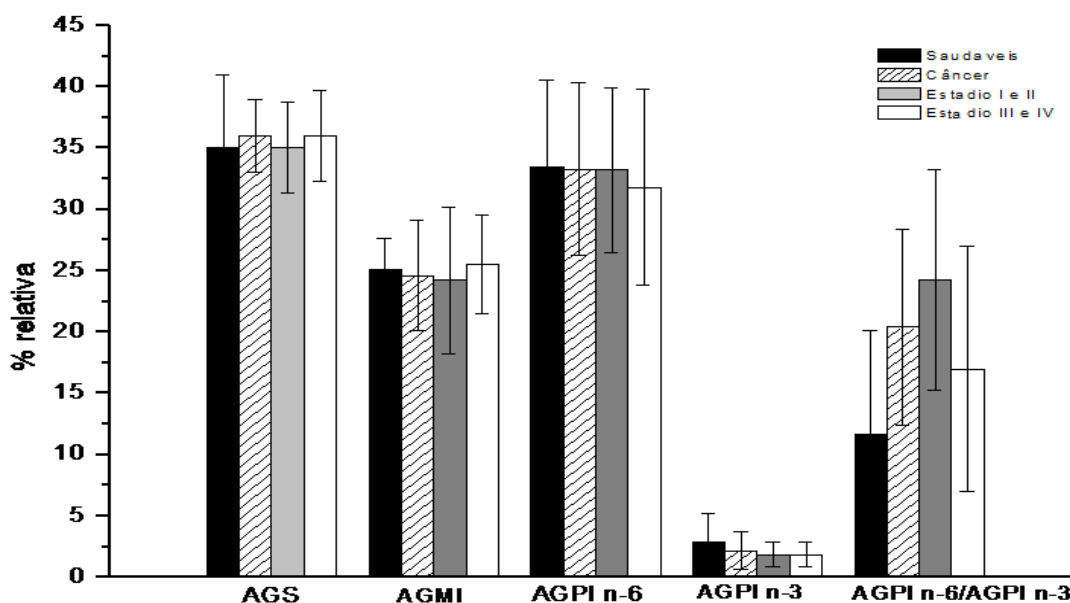


FIGURA 22: Porcentagem relativa das classes de AG do grupo controle e dos pacientes com câncer de reto, segundo o estadio.

Tabela 13: Composição de ácidos graxos (% relativa) dos lipídios totais do plasma de voluntários saudáveis (n=18) e pacientes com câncer de reto (n=19), segundo estadio

Ácidos graxos	Voluntários saudáveis (n=18)	Pacientes com câncer de reto (n=19)	Estadio 0 ^a (n=4)	Estadio I e II (n=9)	Estadio III e IV (n=10)
Ácidos graxos					
16:0	27,33 ± 4,37	28,83 ± 2,62	26,27 ± 4,14	28,67 ± 2,75	28,96 ± 2,64
18:0	7,68 ± 1,44	7,44 ± 1,02	8,11 ± 0,89	7,39 ± 0,96	7,48 ± 1,12
Σ AGs saturados	35,01 ± 5,81	36,26 ± 3,64	34,37 ± 5,03	36,07 ± 3,71	36,44 ± 3,76
16:1 n-7	5,08 ± 0,79	4,22 ± 1,70	4,21 ± 1,20	4,18 ± 1,45* (p=0,0455)	4,25 ± 1,97
18:1 n-9	20,06 ± 3,36	20,79 ± 3,27	19,73 ± 4,28	20,25 ± 4,38	21,29 ± 1,92
Σ AGs monoinsaturados	25,14 ± 4,15	25,01 ± 4,96	23,93 ± 5,48	24,23 ± 5,83	25,54 ± 3,90
18:2 n-6	28,35 ± 5,66	27,27 ± 5,79	27,08 ± 5,20	28,89 ± 5,97	25,82 ± 5,51
20:4 n-6 (ARA)	5,12 ± 1,01	5,23 ± 2,03	6,26 ± 2,42	4,33 ± 0,72* (p= 0,0472)	6,04 ± 2,50
Σ AGPI n-6	33,47 ± 6,67	32,50 ± 7,82	33,33 ± 7,62	33,22 ± 6,69	31,85 ± 8,01
18:3 n-3	1,35 ± 1,38	0,94 ± 0,60	1,91 ± 1,36	0,97 ± 0,64	0,91 ± 0,59
20:5 n-3 (EPA)	0,54 ± 0,42	0,33 ± 0,18	0,60 ± 0,55	0,37 ± 0,23	0,30 ± 0,13
22:5 n-3 (DPA)	0,33 ± 0,19	0,18 ± 0,08* (p=0,0032)	0,49 ± 0,43	0,17 ± 0,10* (p= 0,0268)	0,19 ± 0,06* (p= 0,0330)
22:6 n-3 (DHA)	0,63 ± 0,28	0,42 ± 0,17* (p=0,0088)	0,79 ± 0,75	0,35 ± 0,12* (p=0,0086)	0,49 ± 0,18
ΣAGPI n-3	2,85 ± 2,27	1,87 ± 1,03	3,79 ± 3,08	1,86 ± 1,09	1,88 ± 0,97
Relação Σ AGPI n-6/Σ AGPI n-3	11,7 ± 8,4	17,4 ± 8,7	11,5 ± 7,4	17,8 ± 9,2	16,9 ± 9,5

*p<0,05 comparados ao grupo voluntários saudáveis (média ± desvio padrão, teste *Tukey* entre três ou mais grupos). ^aForam excluídos os pacientes do grupo com estágio 0. AGS: ácidos graxos saturados, AGMI: ácidos graxos mono-insaturados, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados.

5.2 Biomarcadores de oxidação

Os níveis de malondialdeído (nmol/mL) e de F₂-isoprostano (pg/mL) no plasma dos voluntários saudáveis e dos pacientes com câncer retal, separados segundo o estadiamento do câncer estão expressos nas Figuras 23 e 24 respectivamente.

Os níveis plasmáticos de malondialdeído nos pacientes com câncer de reto no estadio III e IV foram superiores aos valores observados nos pacientes com câncer no estágio 0 e I e II, e também aos valores encontrados no grupo de pacientes saudáveis ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças nos níveis de malondialdeído encontrados nos grupos de pacientes com câncer e daqueles no estágio 0 e I e II em relação ao controle (saudáveis) (Figura 23). Quanto aos níveis de F₂-isoprostano não houve diferença estatística entre os grupos de pacientes com câncer de reto comparado ao controle (Figura 24).

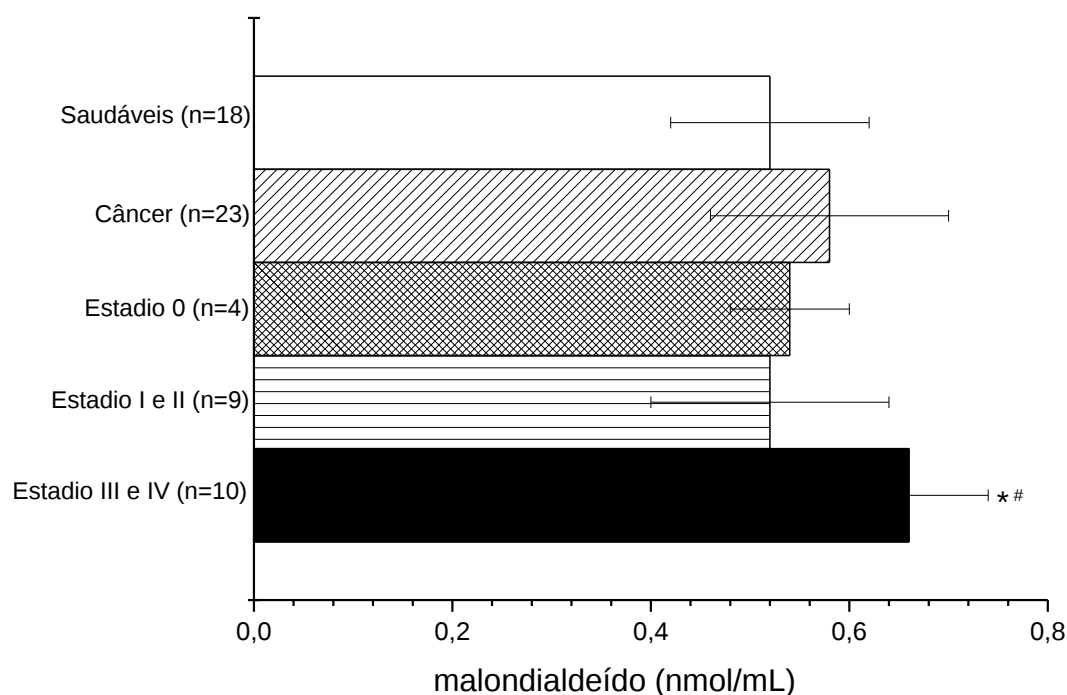


FIGURA 23: Concentração plasmática de MDA (nmol/mL) do grupo controle e dos pacientes com câncer de reto, segundo o estadio. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ comparado ao grupo estágio 0.

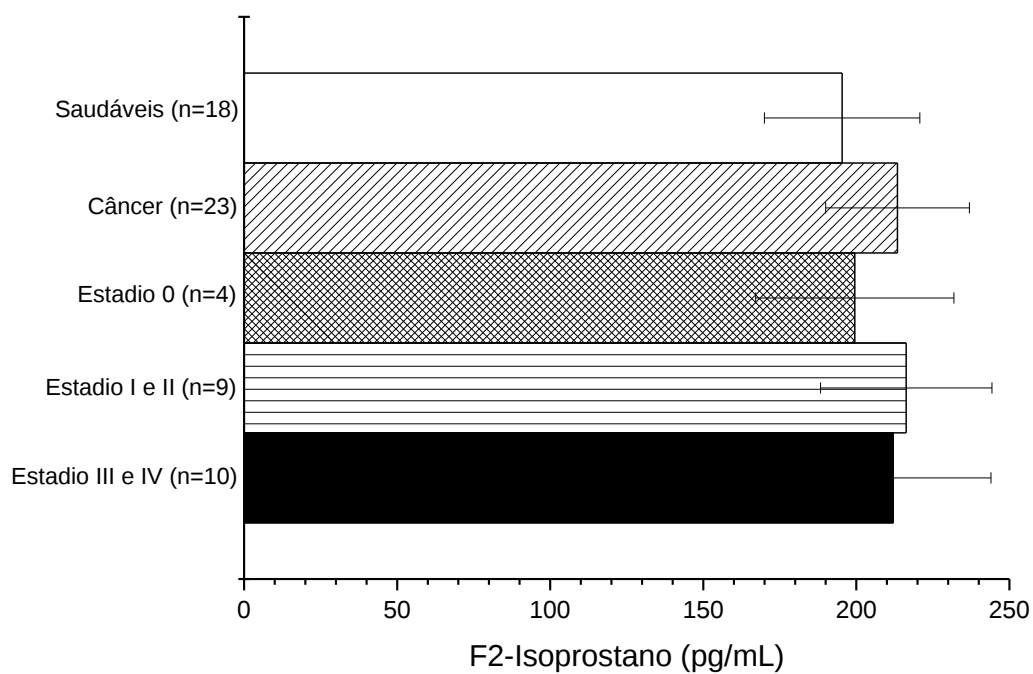


FIGURA 24: Concentração plasmática de F₂-isoprostano do grupo controle e dos pacientes com câncer de reto, segundo o estadio. Não houve diferenças significativas entre os grupos (p=0,224).

6. DISCUSSÃO

6.1. Biomarcadores de perfil lipidômico

Nossos resultados mostraram que o perfil lipidômico sérico dos pacientes com CCR apresentou diferenças significativas quando comparado ao dos saudáveis. Os níveis séricos de FC estavam aumentados e de LFC estavam significativamente reduzidos nos pacientes com câncer de reto, sugerindo que os fosfolipídios podem ser utilizados como possíveis biomarcadores da doença. O aumento dos fosfolipídios na membrana celular pode ser observado em cânceres, mas isso depende de algumas características como a natureza da célula, o crescimento celular e a malignidade. (DOBRZYNSKA et al., 2005).

Denota-se uma redução dos níveis séricos dos metabólitos de fosfolipídios que podem ser provenientes da ação das fosfolipases. As fosfolipases são uma família de enzimas que hidrolizam ligações éster em fosfolipídios e são encontradas em muitos seres vivos incluindo procariotos e organismo superiores. Estas enzimas podem ser divididas em dois grupos: esterases alifáticas (A1, A2 e B) e fosfodiesterases (C e D) que liberam AG e diacilglicerol ou ácido fosfatídico, respectivamente, quando a fosfatidilcolina é hidrolisada. O papel destas ainda é controverso e parece depender do tipo de câncer, do microambiente local e da enzima estudada (WINSTEAD et al., 2000; BRGLEZ et al., 2014).

Os resultados apontam para uma possível redução na atividade da fosfolipase A2 (FLA2), considerando que a principal molécula que sofreu significativa redução nos pacientes com câncer de reto foi o LFC (P-16:1). A FLA2 hidroliza fosfolipídios na posição *sn*-2 liberando lisofosfolipídios e AG. O papel das sFLA2 no câncer tem sido tradicionalmente associado com a sua atividade enzimática e a sua capacidade de participar da liberação de potentes mediadores lipídicos biologicamente ativos, em particular os eicosanóides derivados do AA, que promovem a tumorigênese por estimulação da proliferação celular, aumentando a inflamação local e a angiogênese (BRGLEZ et al., 2014).

As FLA2 têm sido caracterizadas e subdivididas em quatro grandes grupos, o das FLA2 citosólicas (cFLA2), o das secretórias (sFLA2), as independentes de cálcio (iFLA2) e as FAF acetil-hidrolases (FAF-AH). As isoformas de iFLA2 ou Grupo VI são enzimas expressas de forma constitutiva, atuando principalmente no remodelamento da membrana, controlando o conteúdo de AA disponível para liberação por outras FLA2 (WINSTEAD et al., 2000). Essas

enzimas são ativadas após fosforilação seguida por uma translocação para sítios onde hidrolizam especificamente fosfolipídios contendo AA.

Vários indícios apontam para a participação de sFLA2 em câncer. Estudos clínicos indicaram elevados níveis de sFLA2-IIA em soro e na mucosa do cólon de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn, que são pacientes de alto risco para câncer de cólon (HAAPAMAKI et al., 1999). A expressão de sFLA2-X é detectada em tumores de cólon humanos, o que se correlaciona com a expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2) nestes tecidos (MORIOKA et al., 2000). Há fortes evidências de que a expressão de algumas sFLA2s, em especial as enzimas do grupo IIA, III e X, é desregulada em vários tecidos malignos e que existem múltiplos mecanismos de ação envolvidos.

Wei et al. (2013) relatam a redução da LFC em plasma, indicando-a como uma importante molécula sinalizadora do câncer. Joo et al. (2014) avalia que a redução da LFC ocorre pelo alto consumo desta no tecido tumoral.

Por outro lado, Li et al. (2012) utilizando a espectrometria de massas de ressonância ciclônica de íons (FT-ICR-MS), observaram aumento de LFC (16:0), LFC (18:2), LFC (20:4), LFC (22:6), LFA (16:0), LFA (18:0) e redução das amidas graxas (16:0 e 18:1) e dos AG (16:2, 18:0 e 20:3) no soro de pacientes com CCR comparado ao controle.

Assim como as fosfolipases, a enzima lisofosfolipídio aciltransferase também pode estar relacionada com a redução dos níveis séricos dos metabólitos de fosfolipídios já que esta é acilada a acil-CoA durante a biossíntese de fosfolipídios da membrana (RODWELL et al., 2016).

Conforme recentemente reportado por Kühn et al. (2016), a lisofosfatidilcolina aciltransferase 1 (LFCAT1), que converte LFC em FC é superexpressa em vários cânceres aumentando a incorporação de FC em membranas celulares podendo facilitar a proliferação, adesão e motilidade de células cancerosas. Estudo semelhante foi relatado anteriormente por Mansilla et al. (2009) em amostras de tecido de pacientes com adenocarcinoma colorretal. O acúmulo da FC (16:0/16:1) também foi observado em CCR por ação da LFCAT1 (KURABE et al., 2013).

Os dados sobre o perfil de AG séricos em pacientes com câncer e sua relação com o risco de desenvolvimento da doença ainda são bastante controversos. Sabe-se que AGMI são importantes mediadores de transdução de sinal e na diferenciação celular e que as concentrações desequilibradas desses mediadores têm implicações na carcinogênese (MIYAZAKI et al., 2000). Em nossos resultados foi possível observar uma diminuição dos AG

16:1 n-7, 20:4 n-6, 22:5 n-3 e 22:6 n-3 nos estadios I e II e também uma diminuição de 22:5 n-3 nos estadios III e IV.

Alguns estudos mostraram associação direta entre níveis séricos de AGPI n-6 com o risco de CCR (KOH et al., 2004; POT et al., 2008), outros mostraram uma associação inversa (KURIKI et al., 2006; ZHANG et al., 2015). Zhang et al. (2013) observaram uma diminuição entre as razões 16:1 n-7/16:0 e 18:1 n-9/18:0 no tecido de CCR sugerindo que alterações nos AG podem estar envolvidas no mecanismo de progressão do CCR.

Baró et al. (1998) relataram concentrações reduzidos de AG no plasma, além de maiores porcentagens de ácido oleico (18:1) e menores de ácido linoléico (18:2) no plasma de pacientes com CCR comparados aos saudáveis. Esta alteração também foi observada nas frações de fosfolipídios, triacilglicerol e ésteres de colesterol. Os autores postularam que as alterações na concentração e no perfil de ácidos são resultantes do efeito metabólico da doença, uma vez que os parâmetros bioquímicos, nutricionais e antropométricos eram semelhantes entre os grupos de estudo.

Okuno et al. (2013) observaram aumento da somatória de AGS e redução de AGPI n-3 nos fosfolipídios do plasma, redução nos níveis de ácido linoleico e EPA nos fosfolipídios dos eritrócitos, enquanto que no tecido adiposo foi observado níveis maiores de AA em pacientes japoneses com CCR comparado aos saudáveis. Hodge et al (2015) mostraram que os AGS total, AGMI total, palmítico, palmitoleico, esteárico e oléico estão associados com câncer de reto.

Guo et al. (2014) também observaram *upregulation* (regulação ascendente ou positiva) das enzimas FAS, SCD-1 e CK α , responsáveis pelo aumento da biossíntese de fosfatidilcolina com AGMI e supressão dos metabólitos com AGPI.

A expressão de SCD-1, a principal isoforma de SCD em humanos, está elevada em alguns tumores induzidos quimicamente (KUMAR-SINHA et al., 2003). Em adenoma de cólon, os níveis de ácido palmítico nos fosfolipídios estavam reduzidos enquanto dos ácidos palmitoleico (16:1) e elaídico (C18:1 trans) estavam aumentados no plasma de homens adultos comparado aos saudáveis. Os autores estimaram uma maior atividade das enzimas SCD-1 e elongase de AG de cadeia muito longa (ELOVL 6) com o maior risco de adenoma comparado ao grupo com pólipos hiperplásicos (PICKENS et al., 2016).

Alguns relatos também mostram a hiperativação da enzima FAS, em certos tipos de cânceres, como colorretal (NOTARNICOLA et al., 2012), nasofaríngeo (KAO et al., 2013) e de

mama (JIN et al., 2010). Os AG de cadeia longa são construídos por uma sequência de reações catalisadas por FAS. A FAS é um complexo multienzimático citosólico que catalisa a síntese de AG *de novo* utilizando acetil-CoA como iniciador, malonil-CoA como doador de carbonos e nicotinamida adenidadinucleotídeo fosfato (NADPH) como agente redutor, dando origem ao palmitato (MENENDEZ e LUPU, 2007). Na maioria dos tecidos humanos normais a FAS apresenta baixos níveis de expressão, tanto de seu gene como de sua proteína, pois as células usam preferencialmente os AG exógenos em detrimento dos sintetizados endogenamente para a síntese de novos lipídios estruturais (KUHAJDA, 2000). Entretanto, diversos tumores e suas lesões precursoras levam ao aumento da biossíntese endógena de AG, independentemente dos níveis de lipídeos extracelulares. A maior parte dos AG produzidos endogenamente nas células cancerígenas é esterificada predominantemente a fosfolipídios e, portanto, incorporados a lipídios de membrana durante a proliferação das células tumorais (MENENDEZ e LUPU, 2007).

6.2 Biomarcadores de oxidação de lipídios

Os biomarcadores relacionados à oxidação de lipídios (MDA e isoprostanos) vem adquirindo relevância significativa, uma vez que desempenham fundamental papel na gênese de enfermidades crônicas degenerativas como o câncer. Evidências mostram que a lipoperoxidação tem um papel importante na carcinogenética de diferentes cânceres humanos, incluindo o CCR. Os produtos finais da lipoperoxidação, MDA e F₂-isoprostano, são mutagênicos e apresentam uma grande probabilidade de estarem envolvidos no desenvolvimento do câncer já que participam da cascata de transdução de sinal, proliferação celular e nas vias de apoptose (CAI, DUPERTUIS e PICHARD, 2012).

No presente estudo, o estadiamento do câncer também se associou positivamente ao estresse oxidativo em relação aos níveis plasmáticos de MDA, mas não aos níveis de F₂-isoprostano, os quais não mostraram alterações significativas entre os grupos. Nossos dados mostraram que somente nos pacientes no estágio avançado da doença, estadio III e IV, os níveis de MDA foram superiores aos observados nos demais grupos.

Recentemente, Mendonça et al (2014) relataram que níveis elevados de MDA foram associados positivamente ao grau de estadiamento do tumor e as concentrações séricas foram superiores no grupo CCR ($4,1 \pm 2,9$ $\mu\text{M/L}$) em relação ao grupo sem câncer ($1,1 \pm 0,4$ $\mu\text{M/L}$). A média de MDA foi de $2,3 \pm 1,5$ entre o grupo com estadiamento inicial (II) e de $5,4 \pm 3,0$ entre o

grupo com estadiamento avançado (III) ($p < 0,001$). Surinenaite et al. (2009), mostraram num estudo realizado com soro de 65 pacientes em estadio II e III que o MDA estava muito mais elevado no estadio III do que no estadio II pré cirúrgico.

Por outro lado, Gopčević et al. (2013) mostraram que pacientes japoneses portadores de CCR apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de MDA em todos os estágios quando comparados com indivíduos saudáveis. No entanto, diferente do nosso estudo, não encontraram diferença significativa entre os graus de estadiamento e as concentrações de MDA.

Em colite (lesões pré-carcinogênicas do CCR) e nos estados inflamatórios e pré-neoplásicos de modelos animais com CCR, o MDA esteve significativamente aumentado. Soro de pacientes com CCR avançado e inoperável apresentou concentração muito mais alta de MDA do que em CCR primário (CAI, DUPERTUIS e PICHARD, 2012; KONG et al., 2014).

Níveis maiores de ERO, MDA e de 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE), um aldeído originado a partir da oxidação de fosfolípidios, foram encontrados em pacientes com CCR em estágio avançado da doença com invasão venosa do tumor (YÜCEL et al., 2012). Também foi verificada a relação entre os níveis de ERO, citocinas e de óxido nítrico com a progressão do câncer de cólon e metástase (PADUCH et al., 2010).

Estudos apontam que, quanto maior o estadiamento do câncer menores serão as concentrações de antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD) e não enzimáticos, como a vitamina E (KOCOT et al., 2013). Menor capacidade antioxidante total e atividade da SOD foi observada em tecidos de pacientes com CCR no estadio IV (KOCOT et al., 2013) e também nos níveis séricos de pacientes com câncer comparado aos saudáveis (OZGONUL et al., 2009).

Alguns autores já sugerem o uso do MDA como um biomarcador de gravidade do câncer. Farias et al. (2011) encontraram associação positiva entre os níveis de MDA e elevadas concentrações de antígeno carcinoembrionário (CEA) com o pior prognóstico em pacientes com CCR após tratamento quimioterápico.

7 CONCLUSÕES

Mesmo com os avanços recentes relacionados ao desenvolvimento do CCR, ao seu diagnóstico e ao tratamento, ainda ocorre, com alta frequência, o diagnóstico em uma fase tardia da doença. Assim, o rastreamento adequado e o diagnóstico precoce são medidas fundamentais para instituir a terapêutica precoce e reduzir os índices de mortalidade. Novos exames, mais rápidos, menos invasivos e de alta sensibilidade vêm sendo avaliados. A estratégia metabolômica por dispor dessas qualidades vem ganhando espaço na área acadêmica e mostrando que tem potencial para ser desenvolvida como ferramenta de diagnóstico na prática clínica. Neste estudo foi possível demonstrar que a análise lipidômica por cromatografia e espectrometria de massas associada a técnicas de estatística multivariada permitiu identificar moléculas com tendências diferenciais no plasma de pacientes com câncer de reto e os saudáveis de forma rápida e não invasiva. Também foi possível observar redução nos níveis plasmáticos de uma molécula de LFC reduzida e contendo ácido palmitoleico (LFC P-16:1) em pacientes com câncer de reto. O trabalho mostra uma associação positiva entre os níveis séricos de marcadores de estresse oxidativo, medido pelo TBARS e estágios mais avançados da doença (estadio III e IV).

O trabalho contribui para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvendo o metabolismo de lipídios plasmáticos em câncer de reto e mostra potencial futuro para ser desenvolvido como ferramenta para identificar novos metabólitos mediadores na carcinogênese e, portanto, auxiliar no diagnóstico precoce da doença e ampliar as possibilidades de terapia adequada.

8 REFERÊNCIAS

- AILTE, L.; et al. Addition of lysophospholipids with large head groups to cells inhibits Shiga toxin binding. **Scientific Reports**. p. 1-13, 2016.
- AJCC. American Joint Committee on Cancer. 7 ed. **Colon and rectum cancer staging**. 2010.
- ALVES, G.; DELMONICO, L. O presente e futuro dos marcadores circulantes de câncer. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v. 14, p. 66-72, 2015.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 6, p. 158. 2003.
- AOCS. American Oil Chemist's Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society**. 3 ed. Washington: 1993.
- ARMSTRONG, D. Lipidomics. Volume 1: Methods and Protocols. **Humana Press**. New York: 2009.
- BAENKE, F.; et al. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. **Disease Models & Mechanisms**. v. 6, p. 1353-1363, 2013.
- BANDU, R.; MOK, H. J.; KIM, K. P. Phospholipids as cancer biomarkers: mass spectrometry based analysis. **Mass Spectrometry Reviews**. p. 1-24, 2016.
- BARBOSA, K. B. F.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. v. 23, n.4, p. 629-43, 2008.
- BARÓ, L.; et al. Abnormalities in plasma and red blood cell fatty acid profiles of patients with colorectal cancer. **British Journal of Cancer**. v. 77, p. 1978-1983, 1998.
- BARROSO, A. M. M. **Esfingolipídios: mediadores moleculares da resposta celular e potenciais alvos terapêuticos**. Universidade Fernando Pessoa, 2012. 45p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, 2012.
- BASU, S. The enigma of in vivo oxidative stress assessment isoprostanes as an emerging target. **Scandinavian Journal of Food and Nutrition**. v. 51, p. 48-61, 2007.
- BATISTA, E. C. S.; COSTA, A. G. V.; SANT'ANA, H. M. P. Adição da vitaminas aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. **Revista de Nutrição**. v. 20, p. 525-535, 2007.

BITTMAN, R. **Encyclopedia of Biophysics**. Cap 495, p. 907-914, 2013.

BRAVERMAN, N.; MOSER, A. B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1822, p. 1442-1452, 2012.

BRGLEZ, V.; et al. Secreted phospholipases A2 in cancer: diverse mechanisms of action. **Biochemie**. v. 107, p. 114-123, 2014.

BRÜGGER, B. Lipidomics: analysis of the lipid composition of cells and subcellular organelles by electrospray ionization mass spectrometry. **The Annual Review of Biochemistry**. v. 83, p. 79-98, 2014.

BUCZYNSKI, M. W.; DUMLAO, D. S.; DENNIS, E. A. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. **Journal of Lipid Research**. v. 50, p. 1015-1038, 2009.

BUI, T. T.; SUGA, K.; UMAKOSHI, H. Roles of sterol derivatives in regulating the properties of phospholipid bilayer systems: **American Chemical Society**. v. 32, p. 6176-6184, 2016.

CAI, F.; DUPERTUIS, M.; PICHARD, C. Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. **Current Opinion**. v. 15, p. 99-106, 2012.

CALDER, P. C. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **The Journal of Nutrition**. v. 592-599, 2012.

CARDOSO, M. A. **Nutrição humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.36,38,39,40.

CERQUEIRA, S. R. P. **Os ácidos gordos ômega 3 e os seus efeitos anti-inflamatórios**. Porto: UFP, 2013. 83 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

CHRISTIE, W. W. **Gas Chromatography and Lipids**. The Oily Press LTD, 1989.

CHRISTIE, W. W. Lipid analysis. Cap. 2. **Pergamon Press**. Oxford: 1982.

CLARKE, O. B., et al. Structural basis for phosphatidylinositol - phosphate biosynthesis. **Nature Communications**. v. 6, p. 1, 2015.

COLEMAN, R. A.; MASHEK, D. G. Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis and signaling. **Chemical Reviews**. p. 6359-6389, 2011.

CORREA, T. A. F. **Comparação da capacidade antioxidante de torras de café sobre fatores de risco cardiovascular em indivíduos saudáveis**. São Paulo: USP, 2012. 172p. Tese (Doutorado de Nutrição em Saúde Pública). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CORREIA, C. F. O. **Preparação de novos derivados de esteroides através de reações de cicloadição [8r + 2 r] de anions metil 1,2-diazafulvenio**. Coimbra: UC, 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado em Química Farmacêutica Industrial). Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. São Paulo: Ed. Manole: 2007, p. 151-190.

CROTTI, S.; et al. Altered plasma levels of decanoic acid in colorectal cancer as a new diagnostic biomarker. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 408, 2016.

D'ARRIGO, P.; SERVI, S. Synthesis of lysophospholipids. **Molecules**. v. 15, p.1354-1377, 2010.

DIAZ, B. L.; ARM, J. P. Phospholipase A₂. **Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids**.v. 69, p. 87-97, 2003.

DINIZ, M. E. R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. Belo Horizonte: UFMG, 2011, 108 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Química. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

DOBZYNSKA, I. et al. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**.v. 276, p. 113-119, 2005.

FAHY, E.; COTTER, D.; SUD, M.; SUBRAMANIAM, S. Lipid classification, structures and tools. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1811, p. 637-647, 2011.

FAHY, E.; et al. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**. v. 46, p. 839-862, 2005.

FARIAS, I. L. G.; et al. Correlation between TBARS levels and glycolytic enzymes: the importance to the initial evaluation of clinical outcome of colorectal cancer patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**.v. 65, p. 395-400, 2011.

FELTES, M. M. C. et al. Enzymatic production of monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) from fish oil in a solvent-free system. **Journal American Oil Chemistry**. v. 89, p. 1057-1065, 2012.

FERRARI, M. **The protective role of antioxidants and the aldoketo reductase AKR&A2 against toxic aldehydes in cell lines.** Strathclyde: UDSP, 2012, 136 p. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular). Università Degli Studi Di Parma, Strathclyde, 2012.

FERRERI, C.; CHATGILIALOGLU, C. Role of fatty acid-based functional lipidomics in the development of molecular diagnostic tools. **Expert Reviews**. v. 12, p. 767-780, 2012.

FOLCH, J.; et al. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 226, p. 497-499, 1957.

FONSECA, F. V.; et al. O papel da expressão imunoistoquímica do P16INK4a e do P53 na predição da recorrência da nic-ag após tratamento por conização. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**.v. 43, p. 35-41, 2016.

FRANÇA, B. K.; et al.. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Portuguese Journal Gastroenterology**. v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

FÜRST, P.; KUHN, K. S. Fish oil emulsions: what benefits can they bring? **ESPEN Journals**. v. 19, n. 1, p. 7-14, 2000.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Revista de Nutrição**. v. 19, n. 5, p. 611-621, 2006.

GLATZ J., et al. Fatty acid composition of serum cholesterol esters and erythrocyte membranes as indicators of linoleic acid intake in man. **American Journal of Clinical and Nutrition**.v. 49, 269-274, 1989.

GÓMEZ, M. E. L. D. B. **Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados omega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa.** São Paulo: USP, 2003, 149 p. Tese (Doutorado em Bromatologia). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências dos Alimentos. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GOMEZ-CAMBRONERO, J. Phosphatidic acid, phospholipase D and tumorigenesis. **Advances in Biological Regulation**. v. 54, p. 197-206, 2013.

GOPČEVIĆ, K. R., et al. Activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in different stages of colorectal carcinoma. **Digestive Disease of Science**. v. 58, n. 9, p. 2646-52, 2013.

GUO, S.; et al. Significantly increased monounsaturated lipids relative to polyunsaturated lipids in six types of cancer microenvironment are observed by mass spectrometry imaging. **Scientific Reports**. v. 4, p. 1-9, 2014.

GUTNIKOV, G. Fatty acid profiles of lipid samples. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**. v. 671, p. 71-89, 1995.

HAAPAMAKI, M. M.; et. al. Phospholipase A2 in serum and colonic mucosa in ulcerative colitis. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**., v. 59, n. 4, p. 279-287, 1999.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3 ed. Oxford University Press: 2002.

HAN, X. Lipidomics: **Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids**. New Jersey: Wiley, 2016. p. 496.

HASHIMOTO, T.; et al. Increasing use of colonoscopy over a decade has detected an increased prevalence of colorectal tumors on the elderly. **Journal of Gastrointestinal & Digestive System**. v. 6, p. 1, 2016.

HERNANDEZ, E. M.; KAMAL-ELDIN, A. 5 ed. **Chemical and physical properties of lipids**. John Wiley & Sons, 2013.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**. v. 26, 277-85, 1989.

HIL, C. S. T.; et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B signaling pathway in arachidonic acid-stimulated human myeloid and endothelial cells. Involvement of the ErbB receptor family. **Journal of Biological Chemistry**. v. 276, n. 29, p. 27246-27255, 2001.

HINTERWIRTH, H.; STEGEMANN, C.; MAYR, M. Lipidomics: quest for molecular lipid biomarkers in cardiovascular disease. **Circulation Cardiovascular Genetic**. v. 9, p. 41-954, 2014.

HISHIKAWA, D. et al. Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. **Journal of Lipid Research**. v. 55, p. 799, 2014.

HODGE, A. M.; et al. Dietary and biomarker estimates of fatty acids and risk of colorectal cancer. **International Journal of Cancer**. v. 137, p. 1224-1234, 2015.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer**. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2015, p 122.

ISHIKAWA, M.; et al. Plasma and serum from ninfasting men and women differ in their lipidômico profiles. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 36, n. 4, p. 682-685, 2013.

IVANOVA, P. T.; et al. Lipidomics: a mass spectrometry based systems level analysis of cellular lipids. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 13, n. 5-6, p. 526-531, 2009.

JIN, Q. et al. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. **Breast Cancer Research**. v. 12, n. 6, p.1-15, 2010.

JOO, E. J. et al. Carbohydrate-containing molecules as potential biomarkres in colon cancer. **Journal of Integrative Biology**. v. 18, p. 231-243, 2014.

KAO, Y. C.; et al. Fatty acid synthase overexpression confers an independent prognosticator and associates with radiation resistance in nasopharyngeal carcinoma. **Tumor Biology**. v. 34, n. 2, p. 759-768, 2013.

KHALIL, O. A.; et al. Vitamin D metabolism gene CYP27B1 promoter polymorphism and type I diabetes in the Egyptian population. A genetic association study. **International Journal of Advanced Research**. v. 2, n. 5, p. 1110-1115, 2014.

KOCOT, J., et al. Total antioxidant status value and superoxide dismutase activity in human colorectal cancer tissue depending on the stage of the disease: a pilot study. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**. v. 22, n. 3, p. 431-7, 2013.

KOH, W. P.; et al. Interaction between cyclooxygenase-2 gene polymorphism and dietary n-6 polyunsaturated fatty acids on colon cancer risk: the Singapore Chinese Health Study. **British Journal Cancer**. v. 90, p. 1760-1764, 2004.

KONG, S. Y. J.; et al. Oxidative balance score, colorectal adenoma and markers of oxidative stress and inflammation. **Cancer Epidemiology**. v. 23, 2014.

KUHAJDA, F. P. Fatty-Acid Synthase and Human Cancer: New Perspectives on Its Role in Tumor Biology. **Nutrition**. v. 16, n. 3, p. 202-208, 2000.

KÜHN, T.; et al. Higher plasma levels of lysophosphatidylcholine 18:0 are related to a lower risk of common cancers in a prospective metabolomics study. **Bio Med Central Medicine**. v. 14, n. 13, p. 1-9, 2016.

KUMAR-SINHA, C.; et al. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. **Cancer Research**. v. 63, p.132–139, 2003.

KURABE, N.; et al. Accumulated phosphatidylcoline (16:0/16:1) in human colorectal cancer; possible involvement of LPCAT4. **Cancer Science**. v. 104, p. 1295-1302, 2013.

KURIKI, K.; et al. Risk of colorectal cancer is linked to erythrocyte compositions of fatty acids as biomarkers for dietary intakes of fish, fat, and fatty acids. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**. v. 15, p. 1791-1798, 2006.

- LABAER, J. Introduction to the special biomarkers. **Proteoma Research**. p. 1053-1059, 2005.
- LABOUREUR, L.; OLLERO, M.; TOUBOUL, D. Lipidomics by supercritical fluid chromatography: **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, p. 13868-13884, 2015.
- LI, H. et al. Elevated and secreted phospholipase A2 activities as new potential therapeutic targets in human epithelial ovarian cancer: **FASEB JOURNAL**. v. 26, p. 3306-3320, 2012.
- LI, M.; FAN, P.; WANG, Y. Lipidomics in health and diseases – beyond the analysis of lipids. **Glycomics & Lipidomics**. v. 5, p. 1-15, 2015.
- LI, S. Y.; et al. Effects of cell membrane phospholipid level and protein kinase c isoenzyme expression on hepatic metastasis of colorectal carcinoma. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**. v. 3, p. 411-416, 2004.
- LIMA, E. S., ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**. v. 37, n. 3293-303, 2001.
- LINHARES, J. B. **Metodologias bioanalíticas para a análise de biomarcadores com diferentes detectores - uma revisão bibliográfica**. Paraíba: UFP, 2014. 40 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2014.
- LIPID MAPS. **Lipid Metabolites and Pathways Strategy**. Lipidomics gateway. Disponível em: < www.lipidmaps.org.>
- LOPES, A. B. **Efeitos do ácido palmitoleico na captação e metabolismo de glicose e triacilglicerol em adipócitos brancos**. São Paulo: USP, 2014. 21 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Fisiologia Humana, Universidade de São Paulo, 2014.
- MACIEL, A. C.; MACIEL, I. C. Colonografia por tomografia computadorizada: um método de rastreamento conhecido porém pouco utilizado. **Radiologia Brasileira**. v. 47, p. 5-6, 2014.
- MAHAN, K.; ESCOTT-STUMP, S. **KRAUSE: alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10 ed. São Paulo: Roca, 2002.
- MANIKANDAN, M.; et al. Biological desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS) unequivocal role of crucial ionization factors, solvent system and substrates. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 78, p. 109-119, 2016.
- MANNOCK, D. A.; et al. The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid-sterol interactions in lipid bilayer model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 163, p. 403-448, 2010.

MANSILLA, F.; et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT 1) overexpression in human colorectal cancer. **Journal of Molecular Medicine**. v. 87, n. 1, p. 85-97, 2009.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**. v. 21, n. 3, 361-70, 2000.

MARTINS, J. M.; GRUEZO, N. D. Ácido graxo w 6 na etiologia do câncer de cólon e reto. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 55, p. 69-74, 2009.

MAYER, K.; et al. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 167, p. 1321-1328, 2003.

MEJIA, E. M.; NAUYEN, H.; HATCH, G. H. Mammalian cardiolipin biosynthesis. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 179, p. 11-16, 2014

MENDONÇA, P. S.; CARIOCA, A. A. F.; MAIA, F. M. M. Interações entre estresse oxidativo, terapia utilizada e estadiamento em paciente com câncer colorretal. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 60, p. 129-134, 2014.

MENENDEZ; J. A.; LUPU; R. Fatty acid synthase and lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. **Nature**. v. 7, n. 10, p.763-777, 2007.

MILNE, G. L., YIN, H., MORROW, J.D. Human biochemistry of the isoprostane pathway. **Journal Biology & Chemistry**. v. 283, n. 23, 15533-7, 2008.

MIMICA-DUKIC, N.; et al. **The effect of plant secondary metabolites on lipid peroxidation and eicosanoid pathway**. In: Lipid Peroxidation, chapter 9. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. p. 194, 2012.

MIYAZAKI, M.; et al. The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 30, p.132–138, 2000.

MONTEALEGRE, C. et al. Analysis of glycerophospho and sphingolipids by CE. **Electrophoresis**. v. 35, p. 779-792, 2014.

MORAIS, D. R. **Avaliação de métodos de extração lipídica em plasma humano**. Maringá: UEM, 2009. 37 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Química, Universidade Estadual do Maringá, Maringá, 2009.

MOREAU, R. A. The analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector. **Lipids**. v. 41, p. 727-734, 2006.

MORGAN, N. G.; DHAYAL, S. Unsaturated fatty acids as cytoprotective agents in the pancreatic beta cell. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 82, p. 231-236, 2010.

MORIOKA, Y.; et al. Potential role of group X secretory phospholipase A(2) in cyclooxygenase-2-dependent PGE(2) formation during colon tumorigenesis. **FEBS Letters**, v. 487, n. 2, p. 262-266, 2000.

MURAKAMI, K.; ROUTTENBERG, A. Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca²⁺. **FEBS Letters**, v. 192, n. 2, p. 189-193, 1985.

NICOLUSSI, A. C.; SAWADA, N. O. Qualidade de vida de pacientes com câncer colorretal em terapia adjuvante. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 22, p. 155-161, 2009.

NIE, J. et al. A novel function the human CLS1 in phosphatidylglycerol synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, p. 438-445, 2010.

NOTARNICOLA, M.; et al. Serum levels of fatty acid synthase in colorectal cancer patients are associated with tumor stage. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, v. 43, n. 3, p. 508-511, 2012.

OHKAWA, H.; et al. Assay for lipid peroxyde in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OKUNO, M.; et al. Abnormalities in fatty acids in plasma, erythrocytes and adipose tissue in japanese patients with colorectal cancer. **In Vivo**, v. 27, p. 203-210, 2013.

OSAWA, C. C.; et al. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, p. 655-663, 2005.

OZGONUL, A.; et al. Measurement of total antioxidant response in colorectal cancer using a novel automated method. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 39, p. 503-506, 2009.

PADUCH, R.; et al. Transforming growth factor b-1 modulates metalloproteinase -2 and -9, nitric oxide, RhoA and a-smooth muscle actin expression in colon adenocarcinoma cells. **Cell Biology International**, v. 34, p. 213-223, 2010.

PHILIPPI, S. T. **Pirâmide dos alimentos** - Fundamentos básicos da nutrição. Barueri: Manole, 2008, p. 245.

PIAZZOLLA, L. P. **Influência da idade na apresentação clínica, no estadiamento patológico, no tratamento e nos resultados oncológicos de pacientes com câncer colorretal esporádico**. Brasília: UnB, 2015. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PICKENS, C. A.; et al. Altered saturated and monounsaturated plasma phospholipid fatty acid profiles in adult males with colon adenomas. Cancer Epidemiology, **Biomarkers & Prevention**, v. 25, n. 3, p. 498-506, 2016.

POT, G. K., et al. Opposing associations of serum n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids with colorectal adenoma risk: an endoscopy-based case-control study. **International Journal of Cancer**. v. 123, p. 1974-1977, 2008.

QIU, Y. P.; et al. Serum metabolite profiling of human colorectal cancer using GC-TOFMS and UPLC-QTOFMS. **Journal of Proteome Research**. v. 8, p. 4844-4850, 2009.

RÊGO, A. G. S.; et al. Câncer colorretal em pacientes jovens. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 58, p. 173-180, 2012.

RODWELL, V. M.; et al. **Bioquímica ilustrada de Harper**. 30 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

RÖHRIG, F.; SCHULZE, A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. **Nature Reviews**. p. 1-18, 2016.

ROSEN, H.; et al. Sphingosine-1 phosphate and its receptors: structure, signaling and influence: **Annual Review of Biochemistry**. v. 82, p. 637-662, 2013.

ROSS, D., MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: Vigo-Pelfrey C: Membrane lipid oxidation. 1 ed. **CRC Press**, p. 151-70, 1991.

SANTOS, C. R.; SCHULZE, A. Lipid metabolism in cancer. **The FEBS Journal**. v. 279, n. 15, p. 2610-2623, 2012.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. Grupo Técnico de Avaliação e Informações de Saúde. A relevância do câncer colorretal. **Boletim de Epidemiologia**. v. 6, n.68, p. 01-14, 2009.

SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos: estrutura, classificação, nutrição e saúde. **Arquivo APEDEC**. v. 2, p. 102-106, 1998.

SOUZA, R. H. S. **Dos primeiros sintomas ao início do tratamento: trajetória dos pacientes do sistema único de saúde com neoplasia colorretal atendidos em um hospital público de Curitiba**. Curitiba: UFP, 2016.92 p. Tese (Doutorado em Medicina Interna) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

SURINENAITE, B.; et al. The influence of surgical treatment and red blood cell transfusion on changes in antioxidative and immune system parameters in colorectal cancer patients. **Medicina (Kaunas)**. v. 45, n. 10, p. 785, 2009.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos**. Nepa – Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação. 4 ed. Universidade Estadual de Campinas: 2011, p. 161.

TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T. Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. **Journal of Lipid Research**. v. 53, p. 1437-1450, 2012.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; COOKS, R. G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry and biology. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 40, p. 1261-1275, 2005.

TERMINI, L.; VILLA, L. L. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. DST – Jornal **Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 20, n. 2, p. 125-31, 2008.

VALENZUELA, R. B.; VALENZUELA, A. B. Overview about lipid structure. **INTECH**, p.1-16, 2013.

VAN MEER, G.; et al. The European lipidomics initiative: enabling technologies. **Methods in Enzymology**. v. 432, p. 213-32, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L., et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos graxos em óleo e gordura: identificação e quantificação**. 2. ed. Maringá: EDUEM, 2012. p. 16-17.

WAGNER, S.; RICHLING, E. LC-ESI-MS determination of phospholipids and lysophospholipids. **Chromatographia**. v. 72, p. 659-664, 2010.

WANG, M.; et al. Novel advances in shotgun lipidomics for biology and medicine. **Progress in Lipid Research**. v. 61, p. 83-108, 2016.

WEI, Y.; et al. Polystyrene spheres-assisted matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for quantitative analysis of plasma lysophosphatidylcholines. **Analytical Chemistry**. v. 85, 4729-4734, 2013.

WINSTEAD, M. V.; BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1488, n. 1-2, p. 28-39, 2000.

WOLLAM, J.; ANTEBI, A. Sterol regulation of metabolism, homeostasis and development: **Annual Review Biochemistry**. v. 80, p. 885-916, 2011.

WOOD, P. L.; et al. Targeted lipidomics distinguishes patient subgroups in mild cognitive impairment (MCI) and late onset Alzheimer's disease (LOAD). **BBA Clinical**. v. 5, p. 25–28, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Colorectal Cancer**. Estimated incidence, mortality and prevalence worldwide. 2012.

YAGI-UTSUMI, M.; KATO, K. Structural and dynamic views of gm1 ganglioside. ***Glycoconjugate Journal***. v. 32, p. 105-112, 2015.

YAN, G.; et al. Lipidome in colorectal cancer. ***Oncotarget***. p. 1-11, 2016.

YE, X.; CHUN, J. Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in vertebrate reproduction. ***Trends in Endocrinology and Metabolism***. v. 21, p. 17-24, 2010.

YÜCEL, A. F.; et al. Relationship between the levels of oxidative stress in mesenteric and peripheral serum and clinicopathological variables in colorectal cancer. ***Balkan Medical Journal***. v. 29, p. 144-147, 2012.

ZAYTSEVA, Y. Y.; et al. Cancer cell-associated fatty acid synthase activates endothelial cells and promotes angiogenesis in colorectal cancer. ***Carcinogenesis***. v. 42, p. 1-11, 2014.

ZHANG, G. M.; et al. Serum lipid profiles: novel biomarkers predicting advanced prostate cancer in patients receiving radical prostatectomy. ***Asian Journal of Andrology***. p. 239-244, 2015.

ZHANG, J.; et al. Characteristics of fatty acid distribution is associated with colorectal cancer prognosis. ***Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty acid***. v. 88, n. 5, p. 355-360, 2013.

ZHONG, N.; CHEONG, L. Z.; XU, X. Strategies to obtain high content of monoacylglycerols. ***European Journal of Lipid Science and Technology***. v. 116, p. 97-107, 2014.

9 ANEXOS

Anexo 1: Parecer do comitê de ética e pesquisa da Universidade São Francisco – Bragança Paulista



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de potenciais biomarcadores avaliados em sangue humano usando a estratégia lipidômica

Pesquisador: Giovana Colozza Mecatti

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57114716.8.1001.5514

Instituição Proponente: ASSOCIACAO LAR SAO FRANCISCO DE ASSIS NA PROVIDENCIA DE DEUS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.617.254

Apresentação do Projeto:

No presente trabalho é proposta uma avaliação sistemática (quali e quantitativa) e ampla de lipídeos contidos em amostras de sangue (plasma e eritrócitos) de voluntários saudáveis e doentes com o objetivo de identificar potenciais biomarcadores para diferentes patologias. Trata-se de um estudo multicêntrico para a identificação de

biomarcadores com foco nas desordens cognitivas, psiquiátricas e em oncologia. As amostras de sangue dos voluntários adultos saudáveis (n=100)

serão fornecidas pela UNIFAG (Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia – Universidade São Francisco) e dos doentes (n=500) coletadas em pacientes atendidos nos ambulatórios do HUSF (Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus) e no Serviço de Psiquiatria (Hospital DIA -USF). Também serão usadas amostras de sangue coletadas em outros centros de pesquisa previamente aprovados pelo

CEP da instituição participante. Será empregada a estratégia lipidômica, onde o conjunto de lipídeos contidos nas amostras será caracterizado a

partir de análises cromatográficas e por espectrometria de massas de alta resolução e, então, os lipídeos diferenciais serão indicados por meio de ferramentas estatísticas multivariadas. A abordagem lipidômica será de fundamental importância na descoberta de biomarcadores, bem

Endereço: SAO FRANCISCO DE ASSIS 218

Bairro: JARDIM SAO JOSE

CEP: 12.916-900

UF: SP

Município: BRAGANCA PAULISTA

Telefone: (11)2454-8981

Fax: (11)4034-1825

E-mail: comite.etica@saofrancisco.edu.br



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 1.617.254

como na compreensão das bases moleculares das patologias de interesse.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliação sistemática (quali e quantitativa) de lipídeos contidos em amostras de sangue (plasma e eritrócitos) de indivíduos saudáveis e de pacientes com diferentes

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos estão relacionados a punção venosa para coleta de amostras para a análise (hematomas, dor no local da punção). Não haverá benefícios para os sujeitos da pesquisa. Entretanto se encontrado biomarcador relacionado as patologias estudadas o diagnóstico dessas doenças poderá ser feita mais precocemente, permitindo rápida intervenção e melhoria da assistência.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa pertinente

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Inserir o endereço completo do CEP no termo de consentimento

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 30/06/2016, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISAS.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_667420.pdf	16/06/2016 14:46:03		Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	16/06/2016 14:43:28	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	13/06/2016 14:46:13	Giovana Colozza Mecatti	Aceito

Endereço: SAO FRANCISCO DE ASSIS 218

Bairro: JARDIM SAO JOSE

CEP: 12.916-900

UF: SP

Município: BRAGANCA PAULISTA

Telefone: (11)2454-8981

Fax: (11)4034-1825

E-mail: comite.etica@saofrancisco.edu.br



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 1.617.254

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	13/06/2016 14:34:59	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ABC.pdf	13/06/2016 14:31:42	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Gastrocentro.jpg	13/06/2016 14:31:14	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Outros	neurologia.pdf	22/02/2016 22:43:53	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Outros	hospitaldia.pdf	22/02/2016 22:41:16	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Outros	oncologia.pdf	22/02/2016 22:38:23	Giovana Colozza Mecatti	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRAGANCA PAULISTA, 01 de Julho de 2016

Assinado por:
Alessandra Gambero
(Coordenador)

Endereço: SAO FRANCISCO DE ASSIS 218

Bairro: JARDIM SAO JOSE

CEP: 12.916-900

UF: SP

Município: BRAGANCA PAULISTA

Telefone: (11)2454-8981

Fax: (11)4034-1825

E-mail: comite.etica@saofrancisco.edu.br

Anexo 2: Parecer do comitê de ética e pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – Campinas

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Implementação de diagnóstico e prognóstico molecular no Câncer Colorretal Familiar: prevalência e fatores associados

Pesquisador: Laura Credidio

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 08287012.0.0000.5404

Instituição Proponente: Gastrocentro

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 218.751

Data da Relatoria: 22/02/2013

Apresentação do Projeto:

O diagnóstico e tratamento do câncer colorretal familiar são temas de extrema relevância para a genética clínica, coloproctologia, oncologia, epidemiologia e medicina preventiva. No Brasil, o câncer em geral configura-se como problema de saúde pública de dimensões nacionais. Com o aumento da expectativa de vida do povo brasileiro e com a progressiva industrialização e globalização, as neoplasias ganharam importância crescente no perfil de mortalidade do país, ocupando o segundo lugar como causa de óbito. O objetivo do estudo é a implementação e validação de testes genéticos moleculares para o diagnóstico e marcador prognóstico do câncer colorretal familiar em pacientes do SUS, através de teste de instabilidade microssatélite com 5 marcadores moleculares (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S2720). Acreditam que os índices de portadores da Síndrome de Lynch (3 a 5%) esteja subdimensionado.

Objetivo da Pesquisa:

Implementação e validação de testes genéticos moleculares para o diagnóstico e marcador prognóstico do câncer colorretal familiar em pacientes do SUS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Na coleta de sangue, o paciente sentirá somente uma dor de pequena intensidade e pequena duração no local da punção da veia, para coleta do sangue periférico; como já terá passado pelo

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



procedimento cirúrgico necessário ao seu tratamento, o pesquisador irá coletar somente uma amostra do sangue periférico, a peça cirúrgica é de responsabilidade do laboratório de patologia do gastrocentro ou do HC.

Maior risco se deve à não realização do teste genético, uma vez que as gerações subsequentes poderão se expor a risco aumentado de desenvolvimento da doença.

Benefícios diretos poderão ocorrer para os sujeitos da pesquisa, de modo a redirecionar ou auxiliar no tratamento em curso.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem escrito e esclarece a metodologia a ser seguida.

Atende às recomendações das Resoluções 106/96 e 441/2011.

coleta de dados se iniciará a partir do mês 6/2013, conforme dados do cronograma.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovar.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



CAMPINAS, 14 de Março de 2013

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br