

**Modelos Ortotópicos de Adenocarcinoma Colorretal:
Caracterização Funcional e Molecular.**

Marcos António dos Santos Rodrigues Gomes

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Patologia Experimental submetida à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Orientador: Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho
Coorientador: Professor Doutor José Guilherme Lopes Rodrigues Tralhão

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

*** Este texto foi escrito ao abrigo do novo Acordo Ortográfico ***

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

*** This text was written under the new Portuguese Orthographic Agreement ***

**Orthotopic models of Colorectal Adenocarcinoma:
Functional and Molecular Characterization.**

Marcos António dos Santos Rodrigues Gomes

Dissertation for applying to a Master's degree in Experimental Pathology submitted to the
Faculty of Medicine of University of Coimbra

Supervisor: Professor Maria Filomena Botelho Rabaça Roque
Co-supervisor: Professor José Guilherme Lopes Rodrigues Tralhão

Agradecimentos

Embora pela sua finalidade académica uma Dissertação seja um trabalho individual, há contributos que não podem deixar de ser destacados.

Por essa razão desejo expressar os meus sinceros agradecimentos desde logo à Professora Doutora Filomena Botelho, diretora do Serviço de Biofísica e orientadora, pelo acolhimento, confiança, permanente orientação e partilha de conhecimento e, ao Professor Doutor José Guilherme Tralhão, coorientador deste trabalho, pela disponibilidade permanente e assistência e pelos conhecimentos cruciais de microcirurgia, sem os quais não haveria este trabalho.

Ao Professor Doutor António Manuel Cabrita, diretor do Mestrado em Patologia Experimental, por todo o apoio, disponibilidade permanentes e partilha de conhecimento e ao restante corpo docente do Mestrado.

À Professora Doutora Rosa Gouveia, diretora do Serviço de Tanatologia do Instituto Nacional de Medicina Legal (Delegação Sul), pela sua colaboração para a análise histológica, pela partilha de conhecimento e por toda a assistência disponibilizada, ao Professor Doutor Duarte Nuno do Serviço de Patologia Forense do Instituto de Medicina Legal e, à Professora Doutora Lina Carvalho, diretora do Instituto de Anatomia Patológica, bem como a todo o corpo do Instituto de Anatomia Patológica pela colaboração importante e acolhimento para o processamento das amostras colhidas para análise histopatológica.

À Professora Doutora Denise Priolli, Coordenadora do curso de Medicina da Universidade São Francisco (USF), Bragança Paulista – Brasil e investigadora convidada da FMUC, pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho, pelo “*brainstorming*” de ideias e pela disponibilidade mesmo do outro lado do Atlântico.

À Mestre Ana Margarida Abrantes, pela supervisão e disponibilidade permanentes e por toda as contribuições para este trabalho, difíceis de enumerar; ao Dr. Edgar Tavares Silva, Interno de Urologia dos HUC, pela colaboração para o desenvolvimento das técnicas cirúrgicas, pela disponibilidade e apoio permanentes e pela partilha de conhecimento.

Ao Professor Doutor Pedro Almeida e Professor Doutor Nuno Matela, do Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica da FCUL, ao Professor Doutor João Varela, do Instituto Superior Técnico, pela colaboração e oportunidade de

utilização do Clear-PEM, bem como ao restante grupo: destacando a Doutora Catarina Ortigão, pelo processamento das imagens, mas também à Doutora Mónica Vieira Martins, ao Eng.º Ricardo Bugalho, à Mestre Cláudia Sofia Ferreira e à Mestre Ana Sofia Rodrigues do Laboratório de Instrumentação e Física Experimental de Partículas de Lisboa; bem como à Mestre Sara Carvalho do Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde e ao Professor Doutor Nuno Chichorro Ferreira do Serviço de Biofísica da Faculdade de Medicina (UC), um especial agradecimento pelas suas colaborações nesta parte do trabalho.

À Dr.^a Bárbara Oliveiros, pela sua ajuda e apoio no tratamento dos dados e análise estatística dos resultados.

À Dr.^a Camila Lopes, da Faculdade de Medicina da Universidade São Francisco (USF), Bragança Paulista – Brasil, pela cooperação, resultado do seu estágio em Portugal.

Às Mestres Rita Gomes, Salomé Pires, Catarina Mamede, Ana Brito, Marta Braga, Rita Silva, Daniela Sarmiento, Mónica Mendes e Liliana Pedrosa e à Licenciada Antonieta Saborano pelo ambiente descontraído no laboratório, mas também pelo conhecimento partilhado e apoio, destacando a Mestre Mafalda Laranjo pelo apoio e paciência na formação em técnicas de cultura celular, bem como a todo o corpo do Serviço de Biofísica, destacando a Cláudia Caridade e a todos aqueles que apesar de não aparecerem mencionados, a sua ajuda e cooperação não foi esquecida.

Por último, mas não menos importantes, aos meus amigos mais próximos, destacando o Telmo Catarino, ao meu irmão Paulo Gomes e sobretudo aos meus pais, António e Ana Gomes, tantas vezes negligenciados pelo trabalho, mas sempre do meu lado em todas as minhas decisões, as minhas vitórias e os meus dissabores. A eles devo todo o meu percurso.

“Um modelo é uma mentira que nos ajuda a ver a verdade.”

Howard E. Skipper (1915-2006)
Professor de Patologia Experimental
Universidade de Alabama, EUA

Sumário

RESUMO	I
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
INTRODUÇÃO	9
I. Cancro Colorretal.	11
I.1. Epidemiologia	11
I.2. Fatores de Risco	13
I.2.1. Idade e Etnicidade	13
I.2.2. Histórico Pessoal e Familiar	13
I.2.3. Doença Inflamatória do Intestino	14
I.2.4. Dieta e Estilo de Vida	14
I.2.5. Obesidade	15
I.2.6. Diabetes Mellitus e Hiperinsulinémia	16
I.2.7. Álcool e tabaco	16
I.2.8. Genética	17
I.3. Apresentação clínica, Rastreio e Vigilância	19
I.3.1. Sinais e Sintomas	19
I.3.2. Rastreio e Vigilância	20
I.4. Tipos de Carcinomas colorretais e Localização	21
I.5. Estadiamento	22
I.6. Tratamento cirúrgico e tratamentos (neo) adjuvantes de CCR	24
2. Modelos Animais em Cancro	28
2.1. O Modelo Ideal de Cancro	28
2.2. Modelos Animais como modelos pré-clínicos.	30
2.2.1. Genetically Engineered Mouse Models (GEMM) no estudo da Oncogénese	33
2.2.2. Ensaio experimental de metastização	35
2.2.3. Modelos singénicos	35
2.2.4. Modelos tumorais de xenotransplante	36
2.2.5. Modelos murinos ortotópicos de Cancro Colorretal	39
OBJETIVOS	43
MATERIAL E MÉTODOS	47
I. Cultura celular	49

1.1.	Linha celular	49
1.2.	Reagentes e soluções	50
1.4.	Preparação do meio de cultura	51
2.	Experimentação Animal	52
2.1.	Técnicas cirúrgicas	53
2.1.1.	Modelo ortotópico de cólon sigmoide	53
2.1.2.	Modelo ortotópico de ceco	55
2.2.	Cuidados pós-operativos	57
3.	Inoculação das células tumorais	57
3.1.	Preparação das células para implantação	57
3.1.1.	Viabilidade Celular	57
3.2.	Procedimento de inoculação	59
4.	Técnicas de imagem molecular in vivo por Medicina Nuclear	59
4.1.	Imagens com ^{99m} Tecnécio-MIBI	59
4.2.	Imagens com ¹⁸ F-fluordeoxiglucose	61
5.	Análise histopatológica	64
6.	Processamento de dados e análise estatística	64
	RESULTADOS	65
1.	Mortalidade e sobrevida dos animais	67
1.1.	Avaliação da mortalidade e sobrevida dos animais após intervenção cirúrgica e antes de implantação celular.	67
1.2.	Avaliação da mortalidade e sobrevida após a implantação celular.	68
2.	Avaliação das Imagens com ^{99m} Tc-MIBI	72
3.	Avaliação das Imagens com ¹⁸ F-FDG	74
4.	Análise Histopatológica	76
	DISCUSSÃO	81
	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	97
	BIBLIOGRAFIA	103

Índice de Figuras

FIGURA 1: INCIDÊNCIA MUNDIAL DE CANCRO COLORRETAL ESTIMADA. TAXAS DE INCIDÊNCIA PADRONIZADAS À IDADE E SEXO POR 100 000 INDIVÍDUOS (GLOBOCAN 2008).	11
FIGURA 2: EVENTOS MOLECULARES NO DESENVOLVIMENTO DO ADENOCARCINOMA COLORRETAL (ADAPTADO)(DAVIES ET AL., 2005).	19
FIGURA 3: ANATOMIA DO INTESTINO GROSSO (GILROY ET AL., 2012).	22
FIGURA 4: TIPOS DE MODELOS MURINOS USADOS NO TESTE DE NOVAS TERAPIAS DE CANCRO (ADAPTADO)(FRANCIA AND KERBEL, 2010).	32
FIGURA 5: ESQUEMA DA COLOSTOMIA COM FÍSTULA DISTAL (À ESQUERDA) E FOTOGRAFIA DE ANIMAL SUBMETIDO À CIRURGIA (À DIREITA).	55
FIGURA 6: ESQUEMA DA CECOSTOMIA (À DIREITA) E FOTOGRAFIA DE ANIMAL SUBMETIDO À CIRURGIA (À ESQUERDA).	56
FIGURA 7: ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS QUATRO QUADRANTES DO HEMOCITÔMETRO UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR (KIM, 2010).	58
FIGURA 8: ESTRUTURA QUÍMICA DO ^{99m} Tc-MIBI - C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆ Tc (ABRAM AND ALBERTO, 2006).	59
FIGURA 9: MECANISMO DE CAPTAÇÃO DO ^{99m} Tc-MIBI PELAS CÉLULAS. ESTE MECANISMO É CONDUZIDO PELO POTENCIAL TRANSMEMBRANAR CELULAR, ΔΨ _C . APÓS A ENTRADA DO ^{99m} Tc-MIBI ACUMULA-SE NA MITOCÔNDRIA EM RESPOSTA AO POTENCIAL MITOCONDRIAL TRANSMEMBRANAR, ΔΨ _M (ADAPTADO)(MORETTI ET AL., 2005B).	60
FIGURA 10: MECANISMO DE CAPTAÇÃO DO ¹⁸ F-FDG EM CÉLULAS TUMORAIS (ADAPTADO)(HAUBNER, 2010).	62
FIGURA 11: FOTOGRAFIA DO CLEAR-PEM SCANNER.	63
FIGURA 12: GRÁFICO REPRESENTATIVO DA VARIAÇÃO DE MASSA RELATIVAMENTE AO INSTANTE INICIAL PARA CADA CIRURGIA, AO LONGO DE 60 DIAS; ‘ P <0,100, “ P <0,050.	69
FIGURA 13: CURVAS DE KAPLAN MEIER REPRESENTATIVAS DA PROBABILIDADE ESTIMADA DE SOBREVIDA ENTRE AS DIFERENTES ABORDAGENS CIRÚRGICAS, AO LONGO DE 60 DIAS.	70
FIGURA 14: GRÁFICO REPRESENTATIVO DA VARIAÇÃO DE MASSA DOS ANIMAIS QUE SOBREVIVERAM E QUE MORRERAM DENTRO DE UMA JANELA TEMPO DE 56 DIAS.	71
FIGURA 15: CURVAS DE KAPLAN MEIER REPRESENTATIVAS DA PROBABILIDADE ESTIMADA DE SOBREVIDA GLOBAL DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AS DIFERENTES ABORDAGENS CIRÚRGICAS, AO LONGO DE 60 DIAS.	71
FIGURA 16: IMAGENS DA CAPTAÇÃO TUMORAL DE UM ANIMAL SUBMETIDO A UMA CECOSTOMIA, 1 SEMANA APÓS IMPLANTAÇÃO DA CÉLULAS TUMORAIS (A), E DE UM ANIMAL SUBMETIDO A UMA COLOSTOMIA PROXIMAL E FÍSTULA DISTAL, 2 SEMANAS APÓS A IMPLANTAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS (B).	73
FIGURA 17: IMAGENS DA CAPTAÇÃO TUMORAL DE UM ANIMAL SUBMETIDO A UMA CECOSTOMIA 4 SEMANAS APÓS A IMPLANTAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS E 45 MINUTOS APÓS ADMINISTRAÇÃO DO RADIOFÁRMACO (¹⁸ F-FDG).	75
FIGURA 18: IMAGENS DA CAPTAÇÃO TORÁCICA (→) E DA COLUNA (→) DE UM ANIMAL SUBMETIDO A UMA CECOSTOMIA 4 SEMANAS APÓS A IMPLANTAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS E 45 MINUTOS APÓS ADMINISTRAÇÃO DO RADIOFÁRMACO (¹⁸ F-FDG).	75

FIGURA 19: ASPETO MICROSCÓPICO DOS TUMORES, EM GRANDE AMPLIAÇÃO (MICROSCÓPIO <i>LEICA DM1000</i>), QUER NO GRUPO DAS COLOSTOMIAS A: RATO 24) QUER NO DAS CECOSTOMIAS (B: RATO 9). SALIENTA-SE O PADRÃO ARQUITETURAL CRIBIFORME E O ELEVADO NÚMERO DE MITOSES (→).	76
FIGURA 20: A, B: RATO 9 - DISTRIBUIÇÃO TRANSMURAL DO TUMOR [*] (M – MUCOSA, SM – SUBMUCOSA, MP – MUSCULAR PRÓPRIA, S - SEROSA).	77
FIGURA 21 A, B: RATO 9 - REAÇÃO INFLAMATÓRIA (*) INDUZIDA PELO TUMOR (T). É CONSTITUÍDA POR CÉLULAS MONONUCLEADAS, FOCALMENTE ASSOCIADAS A EOSINÓFILOS.	77
FIGURA 22: RATO 24 – IMAGEM DE NECROSE TUMORAL (*).	78
FIGURA 23: RATO COM COLOSTOMIA E FÍSTULA CUTÂNEO-MUCOSA INJETADO COM 14×10^6 CÉLULAS WIDR APÓS 2 MESES. ASPETO MACROSCÓPICO DAS FORMAÇÕES NODULARES NO FÍGADO (A) E NO PULMÃO (B).	78
FIGURA 24 A, B: RATO 9: SECÇÕES HISTOLÓGICAS DAS FORMAÇÕES NODULARES DESCRITAS MACROSCOPICAMENTE, ESTAS NOS PULMÕES (B - BRÔNQUIOS); E QUE CORRESPONDEM A “BAL” (*).	79
FIGURA 25: INÍCIO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DESPOLETADA POR AGENTES MICROBIANOS E DO TECIDO LESADO (ADAPTADO)(NATHAN AND DING, 2010).	88
FIGURA 26: INFEÇÃO MICROBIANA, IRRITAÇÃO QUÍMICA E LESÕES DOS TECIDOS: SUMÁRIO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO DO CANCRO (ADAPTADO) (LU ET AL., 2006).	90
FIGURA 27: MODELO DA FUNÇÃO DA IMUNIDADE INATA E ADQUIRIDA DURANTE INFLAMAÇÃO ASSOCIADA AO DESENVOLVIMENTO TUMORAL (ADAPTADO)(DE VISSER ET AL., 2006).	92

Índice de Tabelas

TABELA 1: DESCRIÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DO CCR.	18
TABELA 2: ESTADIAMENTO TNM E DE DUKES PARA O CANCRO COLORRETAL.	23
TABELA 3: VANTAGENS E LIMITAÇÕES DOS DIFERENTES MODELOS MURINOS DE CANCRO (ADAPTADO)(CÉSPEDES ET AL., 2006).	32
TABELA 4: PADRÃO METASTÁTICO OBSERVADO EM MODELOS ORTOTÓPICOS TRANSPLANTADOS DE TUMORES HUMANOS EM MURINOS <i>NUDE</i> E NOS CORRESPONDENTES TUMORES HUMANOS(CLARKE, 1996; HOFFMAN, 1999, 2002; KIM ET AL., 2004; HEIJSTEK ET AL., 2005).	39
TABELA 5: DESCRIÇÃO GLOBAL DOS ANIMAIS SUBMETIDOS A COLOSTOMIA PROXIMAL COM FÍSTULA DISTAL E CECOSTOMIA ANTES DA IMPLANTAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS.	67
TABELA 6: DESCRIÇÃO GLOBAL DOS ANIMAIS SUBMETIDOS ÀS DIFERENTES ABORDAGENS CIRÚRGICAS E APÓS A IMPLANTAÇÃO CELULAR.	68
TABELA 7: SUMÁRIO DE INFORMAÇÕES RECOLHIDAS DA AVALIAÇÃO DAS IMAGENS COM ^{99m}Tc -MIBI.	72
TABELA 8: SUMÁRIO DE INFORMAÇÕES RECOLHIDAS DA AVALIAÇÃO DAS IMAGENS COM ^{18}F -FDG.	74
TABELA 9: RESULTADO DA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	76
TABELA 10: PAPÉIS DESEMPENHADOS PELOS DIFERENTES SUBTIPOS DE CÉLULAS IMUNES E INFLAMATÓRIAS NA IMUNIDADE ANTITUMORAL E NA INFLAMAÇÃO PRÓ-TUMORAL (MUNITZ AND LEVI-SCHAFFER, 2004; GRIVENNIKOV ET AL., 2010).	93

Resumo

Os modelos animais são fundamentais no estudo dos mecanismos moleculares do cancro, mas devem mimetizar as características da progressão tumoral; contudo, os atuais modelos heterotópicos não evidenciam metástases, fator importante a ter em conta num bom modelo de cancro. O modelo ortotópico (ORT) de tumores humanos em ratos imunodeprimidos provou ser mais adequado em relação ao modelo heterotópico (subcutâneo); uma vez que caracteriza o microambiente, podendo evidenciar o processo de metastização. O modelo ORT mais usado no adenocarcinoma colorretal (CCR) é a implantação no ceco; contudo, esta localização representa 30% de todos CCR, pelo que se torna necessário estabelecer e comparar dois modelos ORT de CCR, o do ceco e o do cólon esquerdo com fístula mucosa.

Recorrendo à linha humana WiDr injetada na fístula mucosa, avaliámos a progressão através de Medicina Nuclear, utilizando o ^{99m}Tc -MIBI e o ^{18}F -FDG.

Ratos RNU *nude* (n=30) foram submetidos aos dois tipos de procedimentos cirúrgicos (cecostomia – n=13 e, colostomia descendente com fístula mucosa distal – n=17), nos quais foram injetados células ($10\text{-}14 \times 10^6$ células/animal) da linha WiDr, após retorno normal intestinal, na mucosa da cecostomia e da fístula distal. As avaliações com ^{99m}Tc -MIBI e ^{18}F -FDG foram realizadas após injeção endovenosa e as imagens adquiridas através de uma câmara-gama e um protótipo ClearPEM, respetivamente.

Evidenciou-se uma taxa de mortalidade estatisticamente pouco significativa entre as duas cirurgias, contudo verificou-se uma tendência para uma maior mortalidade no grupo da cecostomia. O grupo de cecostomia apresentou mais quadros de inflamações associadas à cirurgia, que resultaram em oscilações e perdas mais acentuadas de massa, comparativamente com o outro grupo. As taxas de desenvolvimento de tumor primário foram semelhantes entre os dois tipos de cirurgia, e nenhum dos modelos evidenciou metastização. Foi manifesta uma forte resposta inflamatória (quer aguda quer crónica) nos dois modelos.

Os estudos imagiológicos mostraram que ambos os radiofármacos têm captação tumoral nos dois modelos, contudo o radiofármaco ^{18}F -FDG apresentou alguma inespecificidade, com captação de reação inflamatória local e à distância.

Demonstrou-se o potencial que ambos os modelos têm para o estudo dos diversos tipos de CCR e, contrariamente a outros modelos ortotópicos, evidenciaram-se respostas imunes e respostas inflamatórias locais e à distância, reforçando o potencial que estes modelos têm para a compreensão não só da fisiopatologia do CCR, mas também da influência da

inflamação e da resposta imune nesta patologia. Além do potencial que este modelo tem para o desenvolvimento e melhoria de fármacos para a terapia e, eventualmente radiofármacos uteis para o diagnóstico e para avaliar a progressão da doença.

Abstract

Animal models are fundamental to study the molecular mechanisms of cancer, but should mimic the characteristics of tumor progression, however, current heterotopic designs do not show metastasis, an important factor to be considered in a good model of cancer. The orthotopic model (ORT) of human tumors in immunodeficient mice proved to be more appropriate compared to heterotopic model (subcutaneous); since it characterizes the microenvironment, which can show the metastasis pattern. The ORT model most used in colorectal cancer (CRC) is the implantation in the cecum, however, this location represents 30% of all CRC, and it is therefore necessary to establish and compare two ORT models of CRC, in the cecum and left colon with mucous fistula.

Using the human line WiDr injected into the mucous fistula, we evaluated the progression through Nuclear Medicine, using ^{99m}Tc -MIBI and ^{18}F -FDG.

RNU nude rats (n=30) were subjected to two types of surgical procedures (cecostomy – n=13, and decent colostomy with distal mucous fistula – n=17), in which cells were injected (10-14×10⁶ cells/animal) with the cell line WiDr, after the returning of normal intestinal function, in the mucosa of the cecostomy and the distal fistula. Assessments with ^{99m}Tc -MIBI and ^{18}F -FDG were performed after intravenous injection and acquired using a gamma camera and a ClearPEM prototype, respectively.

It was evident a mortality rate statistically insignificant between the two surgeries, however there was a trend toward higher mortality in the cecostomy group. The cecostomy group presented more clinical features of surgery-associated inflammation, which resulted in more pronounced fluctuations and loss of mass in comparison with the other group. The rates of development of primary tumors were similar between the two surgery-types, and none of the models showed metastasis. It was expressed a strong inflammatory response (both acute and chronic) in both models.

The imaging studies showed that both radiopharmaceuticals have tumor uptake in both models; however the radiopharmaceutical ^{18}F -FDG showed some specificity, with uptake in localized inflammatory reaction and at distance.

It demonstrates the potential that both models have to study the various types of CRC, and unlike other orthotopic models, there was immune and local inflammatory responses and at distance, reinforcing the potential that these models have in understanding not only the pathophysiology of CRC, but also the influence of inflammation and immune response in this disease. Besides this model has potential for the development and

improvement of drugs for the therapy and eventually radiopharmaceuticals useful for the diagnosis and to assess disease progression.

Lista de Abreviaturas

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CERN	<i>Organisation européenne pour la recherche nucléaire</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
ICNAS	<i>Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde</i>
NIH	<i>US National Institute of Health</i>
SPCAL	<i>Sociedade Portuguesa de Ciência em Animais de Laboratório</i>
¹⁸F-FDG	<i>¹⁸F-fluorodeoxiglucose</i>
5-FU	<i>5-Fluoracilo</i>
^{99m}Tc-MIBI	<i>^{99m}Tc-hexakis-2metoxi-isobutil-isonitrilo</i>
AMIDE	<i>Medical Image Data Analysis Tool</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli gene</i>
BALT	<i>Bronchus-associated lymphoid tissue</i>
BCG	<i>vacina Bacillus Calmette-Guérin</i>
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BRCA 1	<i>Breast Cancer type 1 gene</i>
BRCA 2	<i>Breast Cancer type 2 gene</i>
CCR	<i>Cancro Colorretal</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer gene</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

DMH	<i>1,2-dimetilhidrazina</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
fdUMP	<i>Fluorodeoxyuridine monophosphate</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GEMM	<i>Genetically Engineered Mouse Models</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GLUT	<i>Glucose transporters</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor I</i>
IGFBP-3	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i>
IL	<i>Interleucina</i>
KI	<i>knockin</i>
KO	<i>Knockout</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LOH	<i>Loss of Heterozigoty</i>
LV	<i>Leucovorin</i>
MAM	<i>Acetato de metilazoximetanol</i>
MAP2K (ou MEK)	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCC	<i>Mutated in Colon Cancer gene</i>
MMR	<i>Mismatch repair genes</i>
MRP	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
MYC	<i>Myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>

NK (células)	<i>Natural killer cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEM	<i>Positron Emission Mamography</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
Pgp	<i>P-glycoprotein</i>
RB	<i>Retinoblastoma (gene)</i>
RER	<i>Replication Error</i>
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
RNU	<i>Rowett Nude Rat</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
Tc	<i>Tecnécio</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TP53	<i>Tumor protein 53 gene</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Introdução

I. Cancro Colorretal.

1.1. Epidemiologia

O cancro colorretal (CCR) é um problema de saúde pública em Portugal e em todo o mundo. Este cancro é o terceiro mais comum nos homens (663 000 casos em 2008), que se traduz em 10% de todos os cancros, e o segundo mais comum nas mulheres (571 000 casos em 2008), representando 9,4% dos cancros(Ferlay et al., 2010).

Apesar de prevalente em muitos países, como podemos observar na figura 1, o CCR é mais usual em países desenvolvidos, apresentando variações geográficas marcadas. As menores taxas de incidência são registadas na África Central (2,3 por 100 000 indivíduos), contrastando com o Japão (49,3 por 100 000 indivíduos), onde se registam as maiores taxas de incidência desta patologia(Coleman et al., 2008).

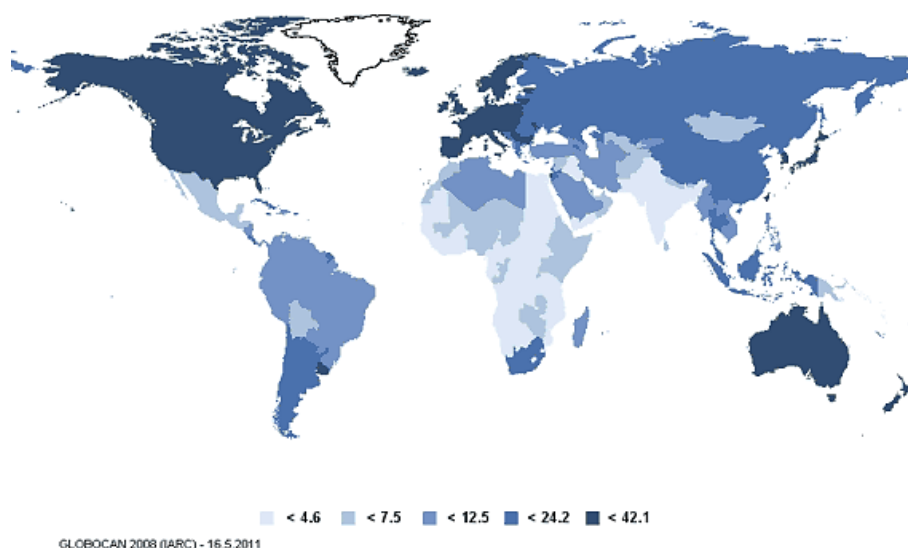


Figura 1: Incidência mundial de cancro colorretal estimada. Taxas de incidência padronizadas à idade e sexo por 100 000 indivíduos (GLOBOCAN 2008).

Portugal não é exceção. O CCR é o segundo carcinoma mais frequente quer em homens quer em mulheres, com uma incidência de 16,5% e 15,5%, respetivamente, verificando-se cerca de 4000 novos casos por ano em homens e 2100 em mulheres. Em termos de mortalidade, o CCR é responsável por 14,4%

de mortes no género masculino e por 16,4% no feminino, ocupando o segundo lugar entre os cancros mais letais no nosso país, ultrapassada apenas pelo cancro do pulmão e da mama (Ferlay et al., 2010; Jemal et al., 2010).

Os hábitos de vida, nomeadamente os alimentares, conjugados com fatores genéticos, são cada vez mais valorizados e responsabilizados pelo aumento da incidência em países desenvolvidos.

As taxas de mortalidade por CCR são elevadas, contribuindo para aproximadamente, 608 000 mortes/ ano a nível mundial (8% de todas as mortes relacionadas com cancro) e tornando o CCR o quarto mais letal entre os cancros (Coleman et al., 2008; Center et al., 2009; Ferlay et al., 2010; Jemal et al., 2010; Watson and Collins, 2011).

A maior mortalidade é verificada na Europa Central e de Leste, em ambos os sexos (com 20,1 casos por 100 000 indivíduos do sexo masculino e 12,2 casos por 100 000 indivíduos do sexo feminino). Já as menores taxas registam-se na África Central (3,5 e 2,7, respetivamente) (Coleman et al., 2008; Center et al., 2009; Ferlay et al., 2010; Jemal et al., 2010; Watson and Collins, 2011).

Dados norte-americanos salientam que nos indivíduos que migram de regiões onde existe menor incidência de CCR, para regiões onde esta é maior verifica-se a incidência dos países de acolhimento (Elder et al., 1991). As razões para a ocorrência destas disparidades entre raças e grupos étnicos, tal como evidenciadas nos EUA, onde Afro-Americanos apresentam taxas de incidência e mortalidade para CCR superiores quando comparados com populações Caucasianas, Asiático-americanas, Indo-americanas e Hispânicas, ainda não são totalmente compreendidas. Contudo, já foi postulado que diferenças no acesso a rastreios regulares de qualidade, na cronologia de diagnóstico e tratamento, no estilo de vida e hábitos alimentares, bem como na situação socioeconómica têm um papel muito relevante (Albano et al., 2007; Jemal et al., 2010).

Dados recentes demonstram ainda que a prevalência tem vindo a aumentar nos países em crescimento económico como a Europa de Leste, a Ásia e alguns países da América do Sul, ultrapassando países desenvolvidos de economias mais influentes como os Estados Unidos da América, o Canadá ou a Austrália, onde as taxas de incidência têm vindo a estabilizar, com exceção dos EUA onde tem vindo a decrescer. Contudo e, contrastando com essa tendência, o Japão, nação desenvolvida com uma economia forte, apresenta um dramático aumento da

incidência de CCR (Center et al., 2009), provavelmente devido à ocidentalização da dieta japonesa, com aumento do consumo de laticínios, gorduras e carne (Kuriki and Tajima, 2006; Matsushita et al., 2008). Fatores que podem ter contribuído para esta variação mundial da incidência do CCR incluem diferenças na prevalência de fatores de risco e práticas de rastreio (Center et al., 2009; Jemal et al., 2010). Estudos mostram que o aumento do rastreio e deteção do cancro podem reduzir o seu desenvolvimento ou mesmo a morte devido a CCR em 10-75%, dependendo do tipo de testes de rastreio usados e da regularidade com que estes são efetuados (Lieberman, 2009).

Fatores de risco de cancro colorretal incluem obesidade, inatividade física, tabagismo, consumo excessivo de álcool, dieta rica em carnes vermelhas e/ou processadas, consumo inadequado de frutas e vegetais (Giovannucci, 2002; Botteri et al., 2008), os quais são fatores associados ao desenvolvimento económico ou à ocidentalização (Popkin, 1994).

1.2. Fatores de Risco

1.2.1. Idade e Etnicidade

A idade é um fator de risco conhecido de CCR. A vasta maioria de casos de CCR ocorre em pessoas acima dos 50 anos de idade, com um crescimento exponencial a partir dessa idade (Lieberman, 2009).

A etnicidade, tal como referido anteriormente, desempenha o seu papel na incidência, muito devido a fatores como a ocidentalização da alimentação e mesmo a herança acrescida de riscos associada aos países de acolhimento com diferentes etnias e culturas.

1.2.2. Histórico Pessoal e Familiar

Doentes com histórico pessoal de pólipos adenomatosos ou de CCR prévio têm maior risco de desenvolverem cancro do cólon no futuro. O número, o tamanho e a histologia dos pólipos são fatores importantes no prognóstico (Atkin et al., 1992).

Antecedentes familiares de CCR em parentes de primeiro grau aumenta o risco de se desenvolver esta patologia em duas a três vezes, sendo ainda maior caso hajam mais que um parente de primeiro grau com cancro do cólon ou se for diagnosticado antes dos 50 anos. Casos de cancro em familiares de segundo grau levam a um aumento de risco de CCR, em média, de 25-50% (Burt et al., 2010).

Antecedentes familiares de adenoma no cólon também aumentam o risco de cancro colorretal, especialmente se este é diagnosticado em idades mais jovens. Já um adenoma grande ou histologicamente com um grau de indiferenciação mais avançado confere um risco semelhante à presença de um antecedente familiar de CCR (Winawer et al., 1996).

1.2.3. Doença Inflamatória do Intestino

Colite ulcerosa e doença de Crohn são fatores de risco bem conhecidos de CCR. Para a colite ulcerosa, fatores como a extensão e a duração da doença também são fatores de prognóstico. O risco associado a indivíduos com colite ulcerosa com 10, 20 e 30 anos de doença está aumentado e varia entre os 2%, 8% até 18%, respetivamente (Eaden et al., 2001; Jess et al., 2012). Características e incidência semelhantes de CCR foram também descritas na doença de Crohn (Gillen et al., 1994). Nesta patologia, a presença de fístulas e a duração prolongada da doença representam fatores de risco para o desenvolvimento de CCR (Freeman, 2008).

1.2.4. Dieta e Estilo de Vida

A lista de fatores de risco associados à dieta e estilo de vida que estão correlacionados com um aumento do risco de CCR é infindável. A ocidentalização dos hábitos alimentares, como já referimos, onde incluímos o aumento de consumo de carne vermelha e gorduras, associadas ao decréscimo de consumo de frutas e vegetais estão correlacionados com o CCR. A típica dieta ocidental inclui elevados níveis de gorduras (uma mistura de lípidos e gorduras saturadas) que estão diretamente ligadas à promoção da carcinogénese do cólon (Larsson and Wolk, 2006). Também o consumo elevado de carne vermelha e

processada está associada a um maior risco de desenvolver cancro do cólon distal (Chao et al., 2005; Chan et al., 2011). Enquanto o consumo de carne de aves e de peixe é protetor (Calle et al., 2003; Norat et al., 2005).

Efeitos protetores contra o CCR podem ser exercidos pelas fibras, vitaminas antioxidantes, ácido fólico, flavonas e outros micronutrientes (Lin, 2009). Um maior consumo de fibras tem sido correlacionado com um menor risco de CCR em alguns estudos (Bingham et al., 2003; Peters et al., 2003; Larsson et al., 2005a), mas não em outros (Fuchs et al., 1999; Michels et al., 2006). Apesar do consumo de vegetais e frutas no que toca aos seus efeitos não ser consensual, há um consenso geral que apesar do aumento do consumo não fornecer dados relevantes sobre proteção de CCR, dados mostram que um consumo baixo destes alimentos de fibras aumenta o risco de CCR (Koushik et al., 2007; Skjelbred et al., 2007).

1.2.5. Obesidade

A obesidade também está correlacionada com um aumento do risco de CCR em ambos os sexos. A obesidade está associada a elevados níveis séricos de leptina e inversamente associada com níveis de adiponectina. Alterações nos níveis das adipocitocinas têm efeitos na proliferação celular, angiogénese e promoção tumorigénica em estudos *in vitro* que podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasias colorretais em indivíduos obesos (Stattin et al., 2004; Tilg and Moschen, 2006). A adiposidade visceral também foi associada com um estado crónico, de baixo grau de inflamação onde se evidencia a ativação persistente do fator de transcrição nuclear NF- κ B (do inglês, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), com subsequente transcrição de genes promotores de tumorigénese (Donohoe et al., 2010).

Contudo, continua pouco claro se intervenções para perder peso podem ou não ter impacto no desenvolvimento do CCR. A perda de peso sustentada entre doentes obesos é rara (Levy et al., 2007), todavia a atividade física está bem correlacionada com uma diminuição do risco de cancro do cólon, mas não do reto (Samad et al., 2005). É interessante salientar que estudos têm associado mutações genéticas no desenvolvimento de CCR com níveis de atividade física. Mutações no gene *KRAS* (do inglês, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) e

no gene *TP53* (do inglês, *Tumor protein 53 gene*) têm sido associados a níveis reduzidos de atividade física (Slattery et al., 2001, 2002).

1.2.6. Diabetes Mellitus e Hiperinsulinémia

Há uma maior evidência que a diabetes mellitus e/ou resistência à insulina são fatores de risco para o CCR. A partir de uma metanálise de 15 estudos conseguiu-se concluir que o risco estimado de CCR em diabéticos é 30% maior que em não diabéticos (risco relativo 1,30; intervalo de confiança de 95%, de 1,20 a 1,40) (Larsson et al., 2005b). Uma explicação possível é a hiperinsulinémia associada à diabetes ou até o tratamento crônico com insulina para a diabetes (Yang et al., 2004). A insulina é um fator de crescimento para as células da mucosa do cólon. Concentrações plasmáticas aumentadas do fator de crescimento insulínico de tipo I (IGF-I – do inglês, *Insulin-like growth factor I*), que promove a migração e proliferação celular, angiogénese e inibe a apoptose ou a adesão celular, estão relacionadas com o aumento do risco de CCR. Enquanto a proteína-3 de ligação do fator de crescimento insulínico (IGFBP-3 – do inglês, *Insulin-like growth factor-binding protein 3*) tem sido correlacionada com uma diminuição do risco (Pollak, 2008).

1.2.7. Álcool e tabaco

Tal como acontece para outros fatores ambientais associados com o CCR, há alguma discordância no que toca à potencial contribuição do consumo abusivo de álcool para o desenvolvimento do CCR. O consumo abusivo de álcool, definido como aquele maior que 30g/dia (ou mais de 2 bebidas por dia), está correlacionado com um aumento moderado do risco de CCR (risco relativo 1,07 a 1,41; intervalo de confiança de 95%). A associação é menor com a diminuição do consumo de álcool e é independente do tipo de bebida alcoólica consumida (Cho et al., 2004; Thygesen et al., 2008).

A associação entre o tabagismo e o CCR não é simples. A maioria das evidências encontradas mostram que este hábito tem maior impacto em doentes com certos polimorfismos, p.e. dois polimorfismos diferentes no gene *CYP1A2*, que estão envolvido na ativação e metabolismo de hidrocarbonetos no tabaco,

conferem maior risco de CCR em fumadores (Slattery et al., 2004). Outro estudo populacional sobre CCR esporádico demonstrou que, embora não estatisticamente significativo, o tabagismo é positivamente associado a tumores que exibem mutações do gene *KRAS* (especialmente transversões) comparativamente a tumores sem este tipo de mutações. Já o inverso foi sugerido para a ocorrência de mutações do gene *APC* (do inglês – *Adenomatous polyposis coli*), onde não é clara a associação com instabilidade de microssatélites. Estes dados ainda sugerem que tumores relacionados com o tabagismo se desenvolvem através de uma via de sobreexpressão de $p53_{neg}$ (Diergaarde et al., 2003).

1.2.8. Genética

A tumorigênese colorretal é certamente uma doença dos genes, com a acumulação de alterações genéticas e ondas progressivas de expansão clonal de células com vantagens de crescimento sobre os seus progenitores. As três principais categorias de genes que estão implicados no desenvolvimento do CCR, são os oncogenes (como o *KRAS*), os genes supressores tumorais (como o *APC*; o *DCC* – do inglês, *Deleted in Colorectal Cancer*; *TP53* e *MCC* – do inglês, *Mutated in Colon Cancer gene*) e, os genes reparadores de erros de DNA (*MMR* – do inglês, *Mismatch repair genes*) (como o *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1* e o *hPMS2*) (Boland and Goel, 2010; Fearon, 2011) [tabela 1].

Tabela 1: Descrição de genes envolvidos no desenvolvimento do CCR.

Gene	<i>APC</i>	<i>DCC</i>	<i>TP53</i>	<i>KRAS</i>	<i>MMR</i>
Localização	5q	18q	17p	12p	*
Função	Importância na adesão e comunicação intercelular e fixação ao citoesqueleto	Produto envolvido na adesão célula-célula e nas interações célula-matriz	Importante determinante de malignidade na tumorigênese colorretal; Ativa a expressão de genes.	É um Oncogene;	Necessários para as células repararem erros de replicação do DNA, bem com a perda da reparação espontâneas de bases.
Envolvimento na tumorigênese	Mutado em FAP (polipose adenomatosa familiar); síndrome de Gardner e Turcot; Mutado em 63% dos adenomas e carcinomas colorretais, contudo não detetado em tecidos circundantes (mutação somática); Mutação ocorre cedo no processo tumorigênico.	Importante na prevenção de crescimento tumoral, invasão e metastização; No CCR esporádico, a mutação deste gene desempenha um papel crítico na capacidade do tumor metastizar (marcador prognóstico de metastização)	Inativação ou mutação neste gene leva à não regulação do crescimento celular; Mutações são encontradas em mais de metade de todos os cancros (componente central da carcinogênese).	Mutado em 50% de adenomas grandes e 47% dos carcinomas de CCR esporádicos. A sua proteína interage com moléculas efetoras, transmitindo uma resposta de crescimento; processo de transdução de sinal é perturbado com uma proteína mutante <i>KRAS</i> , conduzindo à formação de tumores.	Contribuem para o HNPCC (Cancro Colorretal Hereditário não Polipóide)

* *hMSH2* – 2p; *hMSH6* – 2p; *hMLH1* – 3p; *hPMS1* – 2q; *hPMS2* – 7p.

O CCR desenvolve-se a partir de uma sequência de mutações genéticas com várias etapas, denominada perda de heterozigotia (LOH – do inglês, *Loss of Heterozigoty*), que pode ser observada em CCR esporádico ou hereditário. Estudos mostraram que pelo menos sete alterações genéticas acontecem antes do desenvolvimento deste cancro; contudo, outra via completamente distinta pode ocorrer para o desenvolvimento deste tipo cancro, que pode ser iniciada por defeitos dentro dos *MMR*, que leva ao aumento de erros de replicação, culminando em instabilidade de microssatélites e mau funcionamento do gene.

Esta via é denominada como RER (do inglês, *Replication Error*) e ocorre em 20% de todos os tumores colorretais (Boland and Goel, 2010).

Assim são múltiplos os fatores ambientais que podem ter ação sobre a predisposição genética ou aquisição de defeitos, resultando em malignidade colorretal [figura 2].

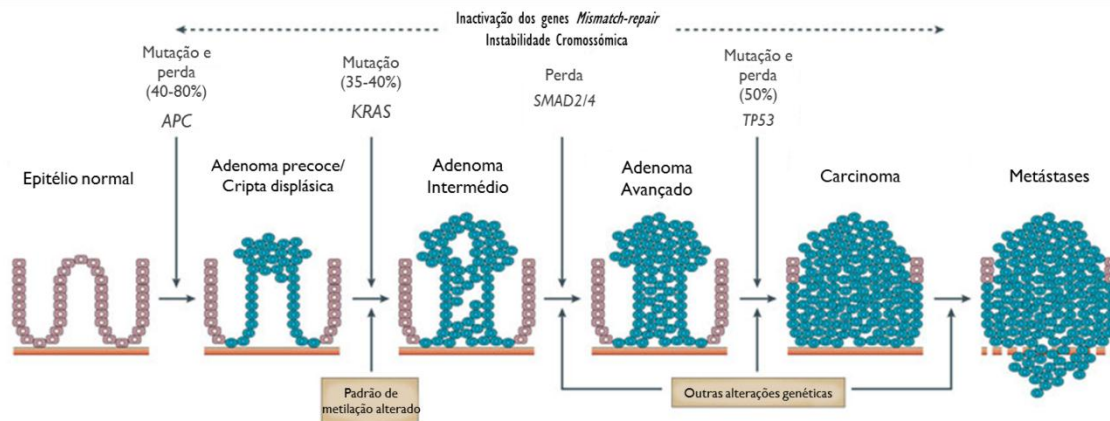


Figura 2: Eventos moleculares no desenvolvimento do adenocarcinoma colorretal (adaptado) (Davies et al., 2005).

Apesar da grande maioria de casos de CCR serem esporádicos e não familiares, a suscetibilidade hereditária resulta num dramático aumento do risco de desenvolver CCR. As síndromes genéticas são uma herança autossômica dominante e estão associadas com um elevado risco de desenvolver CCR.

1.3. Apresentação clínica, Rastreio e Vigilância

1.3.1. Sinais e Sintomas

O quadro clínico de CCR mais comum é a instalação insidiosa de sinais e sintomas crônicos (77-92%), seguida por obstrução intestinal (6-16%) e perfuração com peritonite localizada ou generalizada (2-7%) (Aldridge et al., 1986; Runkel et al., 1991; Mandava et al., 1996).

A hemorragia é o sinal mais comum. Essa hemorragia pode estar oculta e associada a anemia hipocrômica e microcítica por déficit de ferro, ou então

visível nas fezes sob a forma de retorragia, hematoquezia ou melena, de acordo com a localização do cancro.

A alteração do trânsito intestinal é o segundo sinal mais frequente e caracteriza-se por obstipação e/ou diarreia (Beart et al., 1983). A obstipação intestinal está mais vezes associada a lesões do cólon esquerdo.

Dor abdominal é também uma apresentação tão comum como as alterações nos hábitos intestinais (Beart et al., 1995). Lesões obstrutivas no cólon esquerdo podem causar dores abdominais tipo cólica, associadas por vezes a náuseas e vômitos. Os tumores do cólon direito podem causar dores difíceis de localizar. As lesões do reto podem estar presentes com tenesmo. A dor pélvica está geralmente associada com tumores avançados. Sinais e sintomas menos comuns incluem perda de massa, mal-estar, febre, massa abdominal e sinais envolvendo o trato urinário (p.e. pneumatúria e fecalúria) (Belinkie et al., 1983; Silver, 1984; Boleij et al., 2009).

1.3.2. Rastreio e Vigilância

O rastreio do cancro refere-se a testar uma população de indivíduos aparentemente assintomáticos e determinar o risco de desenvolver cancro colorretal. Vigilância refere-se à monitorização contínua de indivíduos que têm um risco elevado de desenvolvimento da patologia. Para o cancro colorretal, a vigilância é reservada a doentes com doença inflamatória intestinal, síndromes familiares de cancro e àqueles com histórico de CCR ou de adenomas colorretais. Várias modalidades de rastreio e vigilância estão disponíveis para detetar cancros colorretais e pólipos adenomatosos (Lieberman, 2009), como o teste de pesquisa de sangue oculto nas fezes (cujas vantagens incluem a disponibilidade, conveniência e baixo custo e as desvantagens incluem a baixa sensibilidade, especificidade e incapacidade de detetar adenomas) (Hol et al., 2010); retossigmoidoscopias flexíveis (Kewenter et al., 1995), colonoscopias (Rex et al., 1991); clister com duplo contraste (Kewenter et al., 1995) e colonoscopia virtual (Pickhardt et al., 2003).

1.4. Tipos de Carcinomas colorretais e Localização

As distintas características epidemiológicas e clinico-patológicas dos carcinomas colorretais baseadas na sua localização anatômica sugerem diferentes fatores de risco e vias de transformação associadas à carcinogênese do cólon distal e proximal. Estas diferenças podem refletir características biológicas distintas da mucosa do cólon distal ou proximal, adquiridas no desenvolvimento embrionário ou pós-natal, que determinam uma resposta diferencial a fatores ambientais distribuídos uniformemente (Beart et al., 1983; Milne, 1994; Pocard et al., 1995; Distler and Holt, 1997; Iacopetta, 2002; Gervaz et al., 2004; Meguid et al., 2008).

Alternativamente as diferenças na epidemiologia dos carcinomas de cólon proximal e distal podem resultar da presença de fatores pró-carcinogênicos no cólon ascendente e no cólon descendente, atuando em células com características biológicas semelhantes ou distintas (Milne, 1994; Pocard et al., 1995; Distler and Holt, 1997; Iacopetta, 2002; Gervaz et al., 2004; Meguid et al., 2008).

Os carcinomas colorretais do lado direito (proximal) constituem até 30% de todos os CCR; já os câncros do cólon transversal são relativamente incomuns, constituindo apenas 10% de tumores primários de cólon. Lesões da flexura esplênica e do cólon descendente são também menos comuns (cerca de 15% de todos os CCR). Os tumores do cólon sigmoide (distal) são comuns, e representam até 25% de todos os tipos de câncros de cólon (Milne, 1994) [figura 3].

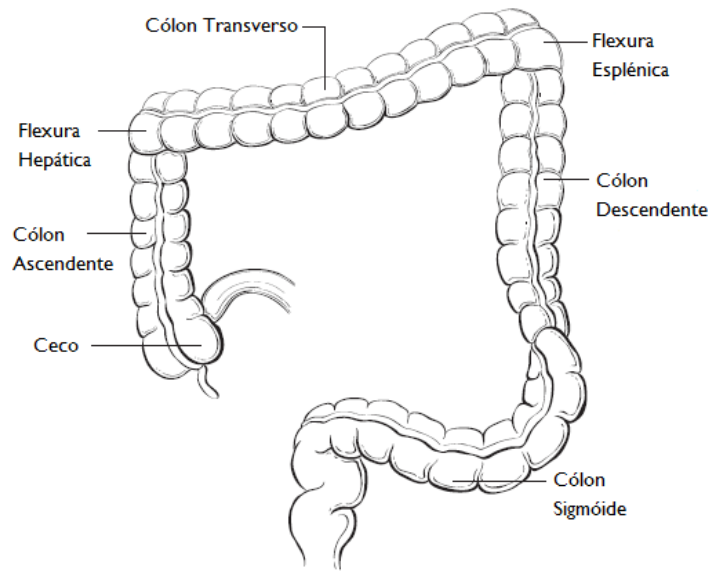


Figura 3: Anatomia do intestino grosso (Gilroy et al., 2012).

1.5. Estadiamento

Os sistemas de estadiamento são importantes para prever a evolução da patologia e para selecionar os doentes para as diversas opções terapêuticas. Para um tumor ser considerado como cancro invasivo e em estadiamento avançado, tem que atravessar a *muscularis mucosa*. O tumor localizado acima da *muscularis mucosa* tem um menor potencial de metastização devido à escassez de vasos linfáticos e são consideradas carcinomas *in situ*. Em 1932, Dukes propôs uma classificação baseada no grau de extensão direto juntamente com a presença ou ausência de metástases linfáticas regionais para o estadiamento do cancro retal. O sistema de classificação TNM foi proposto pela Comissão sobre Cancro do Colégio Americano de Cirurgiões para incorporar descobertas por laparotomia [tabela 2].

O grau histológico, o tipo celular, a invasão linfática, venosa ou perineural, a ploidia tumoral, a expressão do antígeno carcinoembrionário (CEA - do inglês, *Carcinoembryonic antigen*) e a presença de perfuração do intestino, permitem uma melhor subclassificação dos tumores e, conseqüentemente, melhor prognóstico. O *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) estabeleceu duas classes de classificação, o baixo grau (bem e moderadamente diferenciado) e alto grau (pouco diferenciado ou indiferenciado) (Compton et al., 2000). A avaliação da ploidia dos cromossomas mede a quantidade de DNA nas células. A diploidia está

correlacionada com bom prognóstico, ao contrário da aneuploidia que está relacionada com um mau prognóstico. A perfuração do intestino e níveis pré-operatórios elevados de CEA estão associados a piores prognósticos (Rognum et al., 1982; Schutte et al., 1985; Chen et al., 2005).

Tabela 2: **Estadiamento TNM e de Dukes para o Cancro colorretal.**

Estágio	Tumor Primário (T)	Gânglios Linfáticos Regionais (N)	Metástases à distância (M)
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b
Classificação (Modificada) Dukes			
Dukes	Tumor	Gânglios Linfáticos Regionais	Doença Distante
A	Tis, T1, T2, T3	N0	M0
B	T4	N0	M0
C1	T1, T2, T3	Qualquer N (exceto N0)	M0
C2	T4	Qualquer N (exceto N0)	M0
D	Qualquer T	Qualquer N	M1

Tumor primário (T): **TX** O tumor primário não pode ser avaliado; **T0** Não há evidência de tumor primário; **Tis** Carcinoma *in situ*: intraepitelial ou invasão da lâmina própria; **T1** Tumor invade submucosa; **T2** Tumor invade *muscularis mucosa*; **T3** Tumor invade através da *muscularis mucosa* tecidos pericorretais; **T4a** Tumor penetra na superfície do peritoneu visceral; **T4b** Tumor invade diretamente ou é aderente a outros órgãos ou estruturas.

Gânglios linfáticos regionais (N): **NX** Gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados; **N0** Ausência de metástases em gânglios linfáticos regionais; **N1** Metástases em 1-3 gânglios linfáticos regionais; **N1a** Metástase num gânglio linfático regional; **N1b** Metástases em 2-3 gânglios linfáticos regionais; **N1c** Tumor deposita-se na subserosa, mesentério, ou tecidos pericólicos ou peri-retais, não envolvidos pelo peritoneu, sem metástases ganglionares; **N2** Metástases em 4 ou mais gânglios linfáticos regionais; **N2a** metástases em 4-6 gânglios linfáticos regionais; **N2b** Metástases em 7 ou mais gânglios linfáticos regionais.

Metástases à distância (M): **M0** Sem metástases à distância; **M1** Metástases à distância; **M1a** Metástases confinadas a um órgão ou local (p.e., fígado, pulmão, ovário, não regional); **M1b** Metástases em mais de um órgão/local ou do peritoneu.

A descoberta da mutação *KRAS* como fator preditivo de resistência aos anticorpos monoclonais do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR – do inglês, *Epidermal growth factor receptor*) trouxe uma mudança importante no tratamento do cancro colorretal metastático. Os fármacos que inibem alterações oncogénicas, tais como fosfo-MAP2K (também chamado MEK - do inglês, *Mitogen-*

activated protein kinase), fosfo-AKT, e mutante *BRAF* (do inglês – *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) parecem promissores como tratamento único ou quando administrado com inibidores do EGFR. No entanto, a nossa compreensão do papel exato que estes potenciais alvos de fármacos têm nos câncros colorretais assim como a influência que os tumores podem ter sobre esses componentes, não progrediu ao mesmo ritmo. Como resultado, a seleção dos doentes e predição dos efeitos do tratamento continuam a ser problemáticas (Heinemann et al., 2009; Deschoolmeester et al., 2010; De Roock et al., 2011).

1.6. Tratamento cirúrgico e tratamentos (neo) adjuvantes de CCR

A maioria dos pólipos que aparecem ao longo do cólon pode ser removida por via endoscópica através de polipectomias. Esta técnica é relativamente segura, com uma incidência de perfuração baixa (0,3% a 1%) e uma incidência baixa de hemorragia (0,7% a 2,5%). Várias intervenções cirúrgicas são usadas para tratar lesões neoplásicas do cólon e do reto, como por exemplo a colectomia total, a hemicolectomia, a resseção anterior do reto, a amputação abdominopereineal ou a proctocolectomia total (Church et al., 2003).

A resseção cirúrgica quer no cancro do cólon quer no cancro do reto continua a ser a única opção com intuíto curativos. Apesar disso e, contrariamente ao cancro do cólon, após a resseção cirúrgica no cancro do reto há um risco não negligenciável de recidiva local. Desse modo tende-se a adicionar como abordagem terapêutica para o cancro retal a radioquimioterapia neoadjuvante, de modo a reduzir esse risco (1997; Sauer et al., 2004).

As abordagens pós-cirúrgicas de tratamento para o cancro colorretal envolvem principalmente regimes baseados no 5-fluorouracilo (5-FU), usado na quimioterapia do CCR desde os anos 60. Um metabolito do 5-FU, o monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP – do inglês, *Fluorodeoxyuridine monophosphate*), tem como função inibir a enzima timidilato sintetase e, assim, interferir com a síntese de DNA (Pinedo and Peters, 1988; Gusella et al., 2009). Vários ensaios prospetivos demonstraram o benefício clínico da terapêutica adjuvante com 5-FU em combinação com o leucovorin (LV) (ácido fólico) ou o levamisole (um agente anti-helmíntico) (Wolmark et al., 1993; Francini et al., 1994; 1995, 2011; O'Connell et al., 1997).

Outros regimes de tratamento para o carcinoma colorretal são baseados na oxaliplatina. Este composto de terceira geração com platina faz ligações cruzadas do DNA e induz a apoptose, sendo diferente de outros compostos com platina como a cisplatina e a carboplatina. Os modelos pré-clínicos mostraram grande atividade em linhas celulares de CCR resistentes à cisplatina e sinergismo quando combinado com 5-FU (André et al., 2004). Apesar de provocar pouca nefrotoxicidade, ototoxicidade e alopecia, a oxaliplatina partilha efeitos supressivos na medula óssea e tem a sua neuropatia sensorial própria que é tipicamente reversível, cumulativa, e exacerbada pela exposição ao frio (de Gramont et al., 2000; André et al., 2004).

Outra linha de tratamento são regimes baseados no irinotecano, um derivado da camptotecina que inibe a topoisomerase I estabilizando as quebras do DNA que surgem no desenrolar do DNA para a transcrição e replicação (McLeod and Watters, 2004). Dois ensaios clínicos randomizados mostraram melhorias em pacientes que receberam irinotecano juntamente com 5-FU/LV, comparado com 5-FU/LV sozinho, como terapia de primeira linha em doença metastática (Douillard et al., 2000; Saltz et al., 2000).

As mais recentes terapias aprovadas para o CCR são direcionadas ao carcinoma metastático com “alvos” específicos, com agentes “biológicos” em contraste com os fármacos citotóxicos standardizados. Os dois agentes já aprovados são os anticorpos monoclonais, o bevacizumab (anti-VEGF – do inglês, *Vascular endothelial growth factor*) e o cetuximab (anti-EGFR) (Tol et al., 2009).

A necessidade de desenvolver estes agentes partiu da falta de efetividade por parte dos fármacos usados no CCR metastático. Quando o 5-FU era o único agente ativo a ser usado, a sobrevida global era de 11 a 12 meses. Atualmente a sobrevida média dobrou, com pacientes a viverem mais de 2 anos. Este aumento deveu-se principalmente à disponibilidade de novos agentes ativos. Existem 5 categorias diferentes de fármacos com atividade significativa antitumoral, incluindo fluoropirimidinas, irinotecano, oxaliplatina, *cetuximab* e *bevacizumab*. Para a maioria dos pacientes o tratamento será paliativo e não curativo, sendo os objetivos de tratamento prolongar a sobrevida global e manter a qualidade de vida durante o máximo tempo possível. Para a grande maioria dos pacientes com CCR metastático não curável a primeira linha de terapia paliativa são combinações duplas concebidas de forma racional, como o FOLFOX (ácido fólico,

5-FU, oxaliplatina) (de Gramont et al., 2000; Goldberg et al., 2004) ou FOLFIRI (ácido fólico, 5-FU, irinotecano) (Saltz et al., 2000; Tournigand et al., 2004).

O bevacizumab é um anticorpo monoclonal recombinante humanizado direcionado contra o VEGF (do inglês – *vascular endothelial growth factor*). Pela ligação ao ligando e impedindo a sinalização do recetor do VEGF, o bevacizumab parece interferir com o recrutamento e crescimento de vasos sanguíneos de “alimentação” do tumor. Ensaios de fase II demonstraram melhorias quer no que toca a sobrevida livre de doença quer a sobrevida global depois da adição do bevacizumab a regimes baseados no 5-FU combinados quer com oxaliplatina ou irinotecano no contexto metastático (Hurwitz et al., 2004; Giantonio et al., 2007). Os efeitos secundários nestes ensaios, que se pensou serem devidos à adição do bevacizumab, incluem hipertensão arterial reversível e proteinúria, assim como efeitos graves e raros, como perfuração gastrointestinal, deiscência de ferida, hemorragias e coagulação (Hurwitz et al., 2004; Giantonio et al., 2007). Desde 2004 que a maioria dos doentes com CCR metastático recebem bevacizumab como componente de terapia de primeira linha independentemente do regime específico escolhido de quimioterapia.

O cetuximab, por sua vez, é um anticorpo monoclonal direcionado contra o EGFR, recetor que está envolvido em múltiplas vias de sinalização celulares. Este agente recebeu aprovação de uso para o tratamento de doença metastática resistente ao irinotecano desde 2004. Efeitos secundários do cetuximab incluem uma erupção acneiforme sobre a face, peito e costas na maioria dos doentes (Cunningham et al., 2004). O ensaio CRYSTAL, ensaio retrospectivo que estudou o benefício do cetuximab quando adicionado a terapias de primeira ou segunda linha contendo irinotecano em 1198 doentes não tratados aos quais foram tratados com FOLFIRI com e sem cetuximab (Cutsem et al., 2007), investigou o papel da mutação KRAS na sobrevida livre de doença e na taxa de resposta ao tratamento. Este estudo demonstrou que na população com KRAS *wild-type*, a sobrevida de um ano livre de progressão para aqueles que receberam FOLFIRI e cetuximab foi de 43% contra os 25% para aqueles que receberam só FOLFIRI e que o risco de progressão reduziu em 32% no tratamento com a combinação (Lièvre et al., 2008). Já na população com mutação KRAS não foram encontradas diferenças na sobrevida livre de progressão em nenhuns dos braços do tratamento, o que leva a esperar que com os novos avanços moleculares seja possível identificar para quais pacientes o cetuximab possa trazer mais benefícios.

Muitos avanços têm sido feitos nas últimas décadas para o tratamento e gestão do cancro colorretal. Só na última década, e com o desenvolvimento de novos agentes “biológicos”, um grande salto foi dado com o objetivo de melhorar o prognóstico e tratamento desta patologia, bem como do cancro em geral. Contudo, muito trabalho está ainda pela frente já que nesta necessidade de se alcançar melhores agentes “biológicos”, também é necessário alcançar melhores modelos que validem esses agentes. A realidade é que a taxa de insucesso dos ensaios randomizados e controlados de fase III duplamente cegos é maior em oncologia do que em qualquer outra área terapêutica (Kola and Landis, 2004), e isso é em grande parte devido às inúmeras dificuldades de prever os mesmos resultados e comportamentos que os tumores têm *in vitro*, *in vivo* e nos doentes (Johnson et al., 2001; Peterson and Houghton, 2004).

2. Modelos Animais em Cancro

Os modelos animais têm sido um meio muito importante no estudo dos mecanismos moleculares do cancro e no desenvolvimento de novos agentes antitumorais. Contudo dadas as limitações dos modelos animais conhecidos existe uma vasta área de investigação a realizar para melhorar a modelação do cancro.

2.1. O Modelo Ideal de Cancro

A utilidade dos modelos *in vivo* em oncologia depende de quão próximo estes replicam a doença humana, na sua forma e função (Van Dyke and Jacks, 2002). O modelo animal ideal deverá mostrar características histopatológicas semelhantes às do tumor humano, progredir através dos mesmos estágios e causar os mesmos efeitos sistémicos e fisiológicos e envolver os mesmos genes e vias de sinalização na sua génese e progressão. Mais ainda, a resposta tumoral num modelo pré-clínico deverá estreitamente refletir a resposta do tumor humano a um tratamento e prever a eficácia terapêutica em ensaios clínicos humanos (Céspedes et al., 2006).

Quanto mais nos aproximarmos deste modelo ideal, mais fácil será compreender as alterações que levam à tumorigénese, em relação às proteínas envolvidas na reparação do DNA, ciclo celular, apoptose, metastização, entre outros. Além disso, a sua disponibilidade permitirá a validação de novos “alvos”, a descoberta de novos agentes preventivos e antitumorais (Grever et al., 1992; Van Dyke and Jacks, 2002), bem como o estudo *in vivo* dos mecanismos de ação e da resistência aos fármacos antitumorais.

Hoje, o ratinho e o rato continuam a ser os modelos mais usados para a análise do processo tumorigénico devido ao nosso conhecimento genómico e bioquímico destas espécies, o seu uso extenso e fácil manipulação (Céspedes et al., 2006; M. Treuting and M. Dintzis, 2011).

A metastização é um fator crítico quando falamos em modelação do cancro, já que a maioria dos tumores humanos se apresentam com metástases na altura do

diagnóstico, quer clinicamente evidentes quer micrometástases, que comprometem órgãos vitais, e que determinam o percurso da doença e levam à morte a maioria dos doentes (Hughes, 2005). O processo de metastização é compreendido como sendo uma sucessão de passos pelos quais células tumorais ultrapassam as restrições impostas pelo ambiente do órgão onde se iniciaram e se disseminam através de algumas etapas, incluindo neovascularização, invasão e colonização (Ruoslahti, 1999; Leber and Efferth, 2009). Na progressão metastática, a relação entre a célula tumoral e o ambiente hospedeiro é importante e pode definir quais os órgãos específicos que participam no processo de metastização (Kurschat and Mauch, 2006; Bos et al., 2010; Hanahan and Weinberg, 2011; Swartz et al., 2012). A progressão tumoral era até recentemente aceite como uma sucessão de expansões clonais de células variantes raras, capazes de ultrapassar as barreiras já descritas, pela aquisição de mutações genéticas adicionais (Nowell, 1976). Contudo esta teoria foi desafiada pela proposta que a tendência a metastizar é fortemente determinada por mutações adquiridas cedo durante a tumorigénese (Bernards and Weinberg, 2002; Hanahan and Weinberg, 2011). Tal deveu-se à identificação de diversos perfis de expressão génica de tumores primários, semelhantes aos das metástases derivadas desses mesmos tumores, sugerindo que as mesmas alterações dos oncogenes e/ou genes supressores tumorais que induzem o tumor, podem determinar a progressão metastática (Ramaswamy et al., 2003). Além disso, para além das mutações somáticas, o *background* genético com polimorfismos genéticos constitucionais e *loci* modificadores podem ter um impacto significativo na capacidade metastática (Hunter, 2006).

Apesar da relevância clínica das metástases, a maioria dos modelos de cancro em murinos raramente as desenvolvem. Isto sublinha a necessidade de desenvolver novos modelos animais, mais próximos da situação clínica, que facilitem a compreensão do processo metastático, ao nível funcional e molecular e repliquem os padrões de disseminação para órgãos específicos, para cada tipo de tumor. Este objetivo só será cumprido se formos capazes de mimetizar as interações relevantes entre o estroma e as células tumorais, para que seja possível completar o processo metastático (Khanna and Hunter, 2005).

2.2. Modelos Animais como modelos pré-clínicos.

O processo de descoberta no desenvolvimento de terapêuticas em oncologia pode começar por triagem empírica ou *design* racional de novos fármacos. Em ambos os casos, as etapas necessárias no desenvolvimento de um fármaco que se segue à identificação de uma descoberta, necessita de um modelo animal apropriado. Para além da simples previsão da toxicidade limitante da dose, metabolismo do fármaco ou distribuição nos tecidos e compartimentos, os modelos animais estão cada vez mais a ser usados para guiarem no escalonamento das doses em ensaios da fase I e poderem proporcionar o microambiente tumoral que mimetize a situação clínica (Eccles et al., 1994; Johnson et al., 2001; Bibby, 2004; Peterson and Houghton, 2004).

A investigação básica em oncobiologia proporciona novos alvos para o desenvolvimento de novos fármacos e trouxe velhos alvos de volta aos holofotes, levando a novas e inovadoras abordagens para a prevenção e tratamento do cancro (Hanahan and Weinberg, 2011; DeVita and Rosenberg, 2012). Agentes com potencial para interferir com a cascata de metastização, interromper os ciclos de crescimento autócrinos e parácrinos, diferenciação tumoral ou capazes de reverter a resistência a fármacos são agora os mais estudados em ensaios clínicos. Modelos animais apropriados e evoluídos são necessários para ajudarem à descoberta de fármacos anticancro de última geração (Francia and Kerbel, 2010).

O aumento sustentado de novas terapias em oncologia ao longo dos últimos anos traduziu-se em melhorias progressivas nos desfechos em tipos de tumores específicos. Contudo, cerca de metade dos doentes oncológicos continuam sem responder aos esquemas terapêuticos correntes ou apresentam recidivas depois de uma resposta inicial e, por fim, morrem devido ao processo metastático (Hughes, 2005). Consequentemente, a descoberta de novos agentes antitumorais mantém-se crítica se quisermos beneficiar os doentes com cancros refratários, ou seja, cancros que não respondem ou que têm escassas probabilidades de resposta aos tratamentos (Grever et al., 1992). Além disso, o tratamento de muitos doentes oncológicos requer a resseção do tumor primário, seguido de quimioterapia e/ou radioterapia adjuvantes para controlar a doença sistémica. Dependendo do seu estágio e localização, muitos tumores sólidos são tratados com quimioterapia neoadjuvante para melhorar a sua ressecabilidade, expondo

quer o tumor primário quer as metástases ao tratamento (DeVita and Chu, 2008). É um facto que a maioria das terapias experimentais é primariamente avaliada em pacientes com metástases, e como os tumores primários e as metástases respondem de forma diferente ao tratamento, um modelo de cancro útil deverá apresentar metástases de acordo com a localização do tumor primário (Slack and Bross, 1975; Fidler, 1991).

O impacto que os modelos animais tiveram na compreensão da oncogénese, não se traduziu no tratamento, já que os modelos mais usados carecem de previsibilidade (Kamb, 2005). Tradicionalmente, a avaliação *in vivo* da atividade antitumoral tem sido feita com a implantação subcutânea de tumores humanos em ratinhos atímicos. Apesar de esta situação ter vindo a mudar, este continua a ser o modelo mais usado na avaliação pré-clínica de potenciais fármacos, continuando a ser aceite pela FDA (do inglês – *Food and Drug Administration*) e EMA (do inglês – *European Medicines Agency*). Contudo, a sua utilidade tem vindo continuamente a ser questionada, devido principalmente à falta de correlação com a resposta clínica (Staquet et al., 1983). A sua falta de previsibilidade pode ser devida, não só à implantação heterotópica mas também devido à incapacidade de induzir depósitos metastáticos, que expressam uma resposta diferencial à terapia (Gura, 1997).

As limitações dos modelos atuais de cancro continuam a incentivar a procura intensa para novas abordagens para a sua “humanização”. Eles incluem, entre outros, os *GEMM* (do inglês – *Genetically Engineered Mouse Models*, onde incluímos os modelos geneticamente modificados e os transgénicos), os ensaios experimentais de metastização, os modelos de xenotransplantes e os modelos singénicos (Céspedes et al., 2006; Francia and Kerbel, 2010) [figura 4]. Cada abordagem tem alcançado diferentes níveis de sucesso, dependendo do tipo de tumor e estágio modelado, bem como muitas limitações (Céspedes et al., 2006) [tabela 3].

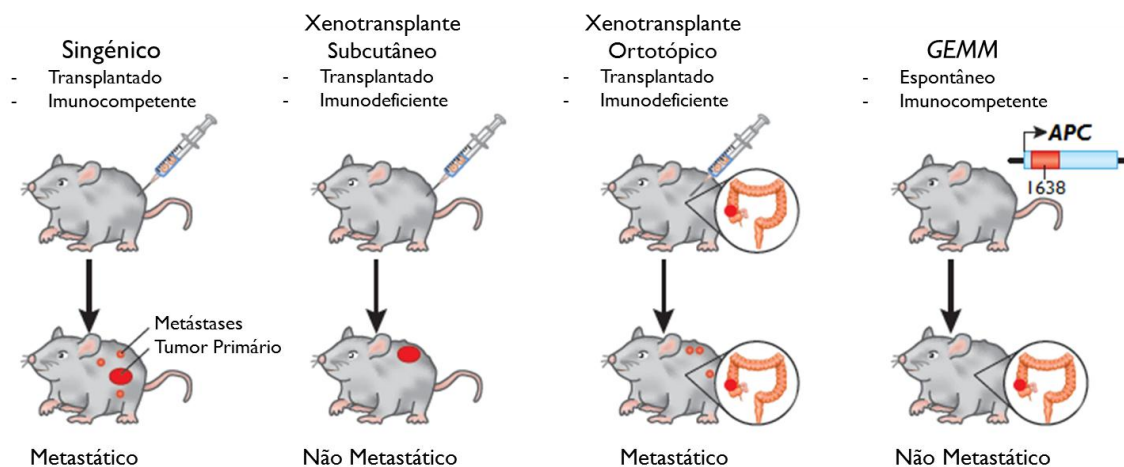


Figura 4: Tipos de modelos murinos usados no teste de novas terapias de cancro (adaptado)(Francia and Kerbel, 2010). Tumores experimentais podem ser induzidos por transplantação singénica de células tumorais ou tumores humanos, transplantação subcutânea de células tumorais, Transplantação de células tumorais no mesmo local (ortotópico) a partir do qual a célula de cancro é originária e modelos geneticamente modificados, portadores de oncogenes e/ou genes supressores tumorais mutados levando a uma elevada incidência de câncros espontâneos (no exemplo, tumor primário colorretal).

Tabela 3: Vantagens e Limitações dos diferentes modelos murinos de cancro (adaptado)(Céspedes et al., 2006).

Modelo	Vantagens	Desvantagens
Geneticamente modificado	<ul style="list-style-type: none"> - Evento genético conhecido; - Tumores com aparecimento <i>in situ</i>, no contexto de células de estroma normais; - Gene alterado expresso em níveis fisiológicos; - Tumor e células do estroma são da mesma espécie; - Sistema imunitário intacto; - Reproduz estádios precoces da oncogénese; - Útil em estudo de quimioprevenção. 	<ul style="list-style-type: none"> - Replica apenas parcialmente a histologia e fisiologia dos tumores em humanos; - Mutações secundárias diferentes dos tumores humanos; - Raramente metastático; - Ainda desconhecido se preveem resposta a agentes antitumorais.
Transgénico	<ul style="list-style-type: none"> - Evento genético conhecido; - Tumor e células do estroma da mesma espécie; - Sistema imunitário intacto. 	<ul style="list-style-type: none"> - Expressão do transgene em todas as células alvo, contrariamente em humanos; - Transgenes expressos em níveis elevados.
Ensaio experimental de metastização	<ul style="list-style-type: none"> - Tumor e células do estroma da mesma espécie; - Passível de estudar a colonização metastática; - Sistema imunitário intacto; - Rápido e fácil de usar. 	<ul style="list-style-type: none"> - Impossibilidade de estudar invasão local e disseminação linfática; - Uso limitado na avaliação de fármacos.
Singénico	<ul style="list-style-type: none"> - Tumor e células do estroma da mesma espécie; - Sistema imunitário intacto; - Rápido e fácil de usar. 	<ul style="list-style-type: none"> - A utilização de animais endogâmicos impede o estudo de modificadores genéticos; - Baixa produção de metástases.
Xenotransplantes subcutâneos	<ul style="list-style-type: none"> - Uso de células tumorais humanas; - Rápido e fácil de usar. 	<ul style="list-style-type: none"> - Incapazes de montar uma resposta imunitária; - A implantação heterotópica do tumor não é fisiológica; - Tumor e células do estroma são de espécies diferentes; - Não metastático; - Difícil previsão da resposta a agentes antitumorais.
Xenotransplantes ortotópicos	<ul style="list-style-type: none"> - Uso de células tumorais humanas; - Replica a histologia dos tumores humanos; - Metastático: replica a invasão local, e disseminação linfática e hematogénica; - Permite manipulação genética <i>ex vivo</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Incapazes de montar uma resposta imunitária; - Tumor e células do estroma são de espécies diferentes; - Incapazes de reproduzir oncogénese precoce; - Menor rendimento que os subcutâneos. - Poucos dados que confirmem a resposta a agentes antitumorais.

2.2.1. Genetically Engineered Mouse Models (GEMM) no estudo da Oncogénese

A tecnologia de alvos génicos oferece a possibilidade do controlo de ganho de funções ou inativação de mutações. Animais geneticamente modificados permitem o estabelecimento causal na tumorigénese (Clarke, 2000; Van Dyke and Jacks, 2002; Hanahan and Weinberg, 2011) e a identificação de vias sinérgicas (Alexander, 2000; Berns, 2001; Johnstone et al., 2002). Tal, facilita a compreensão dos oncogenes, genes supressores tumorais ou modificações genéticas funcionais *in vivo*, e de como se relacionam com as características do cancro: desregulação da proliferação, apoptose, comunicação intercelular, adesão ou invasão e motilidade celular (Jacks, 1996; Balmain, 2002; Hanahan and Weinberg, 2011). Estes modelos têm a vantagem de sabermos *à priori* o evento genético de iniciação, e o seu efeito é estudado no contexto de um sistema imunitário intacto.

Contudo, usando os métodos standardizados, a inativação génica está presente em todas as células do organismo (do inglês, *knockouts* – *KO* clássicos) e os transgenes podem estar sobreexpressos em mais do que um tipo celular (transgénicos clássicos) (Adams and Cory, 1991); porém, estes modelos não reproduzem os estádios iniciais da tumorigénese em humanos. Além disso, esta alteração precoce pode ser letal na fase embrionária, impedindo a análise da oncogénese (Clarke, 2000). Logo, os transgénicos clássicos não podem replicar uma janela temporal específica nem o subtipo de células alvo nas quais mutações podem ser induzidas ambientalmente em tumores humanos, já que a mutação irá afetar todo o animal e não um subtipo celular específico, num ambiente específico.

Além disso, na maioria dos casos, os ratinhos *KO* clássicos geraram um espectro tumoral diferente daquele observado em tumores humanos que apresentem as mesmas mutações (McClatchey, 1999; Hakem and Mak, 2001; Herzig and Christofori, 2002; Jonkers and Berns, 2002; Tuveson and Jacks, 2002; Van Dyke and Jacks, 2002; Rangarajan and Weinberg, 2003). Um exemplo disso acontece com ratinhos *KO* dos genes *BRCA1* (do inglês – *Breast Cancer type 1 gene*) ou *BRCA2* (do inglês – *Breast Cancer type 2 gene*) que não evidenciam nenhuma suscetibilidade tumoral; contudo, em humanos estes genes estão fortemente relacionados com carcinomas de mama e ovário. Por outro lado, as diferenças na transformação entre células de rato e humanas são consistentes com a

descoberta que os tumores resultantes de *GEMMs* raramente replicam o padrão de mutações secundárias observadas em tumores humanos (p.e. *KO* para o *APC*, *RB* (Retinoblastoma) ou *BRCA1*, e transgênicos para o *RAS* ou *MYC* – do inglês, *Myelocytomatosis viral oncogene homolog*) (Jacks, 1996).

A identificação de elementos do promotor, específicos do tipo celular cujo alvo são transgenes, bem como o desenvolvimento de tecnologia de recombinação para sequências específicas (Gu et al., 1994) e de controle de expressão gênica (Lewandoski, 2001; Jonkers and Berns, 2002) permitiu superar as limitações dos clássicos transgênicos ou modelos *KO*. Desse modo conseguiu-se a ativação condicional – do inglês, *knockin* (*KI*) ou ganho de função, ou inativação – *knockout* (*KO*) ou perda de função – da expressão do gene de uma maneira dependente do tempo ou do tipo celular. Tal aproxima estes modelos ao início da carcinogênese em seres humanos (Van Dyke and Jacks, 2002), uma vez que os tumores surgem *in situ*, com o gene alterado expresso em níveis fisiológicos ou inativado, apenas nas células alvo, e para um intervalo de tempo determinado. Estes *GEMMs* mais avançados reproduzem melhor os tumores observados em seres humanos pela mesma modificação, contudo alguns deles ainda não reproduzem o tipo de tumor humano (p.e. *RB*, *BRCA1*). Além disso, modelos que reproduzem o tipo de tumor humano correspondente variam de agressividade e/ou induzem tumores adicionais não observados na clínica (Céspedes et al., 2006).

Para a maioria dos tipos de tumor, é consensual que os *GEMM* podem modelar a doença humana nos estádios precoces da tumorigênese e podem ser usados no desenvolvimento de intervenções terapêuticas precoces (terapias preventivas). Contudo, estes modelos têm trazido escassas evidências e novos conhecimentos dos estádios avançados de cancro, principalmente por não haver nenhum *GEMM* que recapitule a frequência elevada de metástases observada em tumores humanos sólidos. Assim e apesar de estes tumores aparecerem no contexto normal, os *GEMM* (Khanna and Hunter, 2005) não replicam o local nativo metastático, evidenciam penetrância significativamente baixa para a disseminação de acordo com a incidência tumoral, são necessários meses para que surjam metástases e metastizam de forma mais variável e menos reprodutível (Céspedes et al., 2006; Francia and Kerbel, 2010).

Apesar de se continuar a melhorar estes modelos de forma a solucionar alguns destes problemas, como acelerar o processo de tumorigênese através do

aumento do nível mutacional nas células alvo (p.e. reduzindo a atividade da telomerase e dos telómeros) (Van Dyke and Jacks, 2002), tais abordagens aceleram a iniciação tumoral, mas inibem a progressão tumoral (Rudolph et al., 2001).

2.2.2. Ensaios experimentais de metastização

Os ensaios experimentais de metastização colocam as células oncológicas na circulação sistêmica, de forma singénica ou em animais imunodeprimidos para, subsequentemente, analisar a sua capacidade de colonizar órgãos distantes, após a injeção na veia lateral da cauda, de forma a tentar colonizar o pulmão, na veia porta ou esplênica de forma a colonizar o fígado, na almofada da pata para de forma espontânea invadir e entrar na corrente sanguínea e, no coração, de forma a tentar colonizar todos os órgãos do corpo.

Apesar de todos estes procedimentos mostrarem uma evolução temporal rápida, a sua maior desvantagem é que apenas podem estudar a fase de colonização metastática, estádios precoces no processo – como invasão local no foco primário – e a obtenção de acesso aos vasos linfáticos e sanguíneos é contornada. Por essa razão, o seu uso no desenvolvimento pré-clínico de novos fármacos é limitado.

2.2.3. Modelos singénicos

Já os modelos murinos singénicos transplantados consistem na transplantação de tumores em animais endogâmicos (que têm o mesmo *background* genético como os animais onde o tumor inicial se desenvolveu). Por essa mesma razão apresentam a grande desvantagem de quer o tumor transplantado quer o estroma do hospedeiro serem da mesma espécie. Estes sistemas apresentam falta da complexidade genética que apresentam os tumores humanos, além de que, a sua taxa de metastização é geralmente baixa (Céspedes et al., 2006).

2.2.4. Modelos tumorais de xenotransplante

Uma forma de humanizar os modelos animais de cancro faz-se recorrendo a murinos imunodeprimidos (*nude* ou NOD-SCID), como hospedeiros para a xenotransplantação de tumores humanos.

Antes da disponibilidade de animais atímicos ou *nude*, os tumores humanos eram xenotransplantados em ratos imunossuprimidos por radiação, timentomia ou esteroides (Davies et al., 1966). O primeiro ratinho *nude* surgiu espontaneamente numa colónia fechada (mas não consanguínea) de ratinhos albinos, num laboratório no Hospital Ruchill, em Glasgow (Escócia), e foi descrito por Issacson e Cattnach como “sem pelo”. O primeiro xenotransplante em ratos *nude* foi feito por Rygaard e Povlsen em 1969 usando adenocarcinoma do cólon humano (Rygaard and Povlsen, 1969).

Flanagen inicialmente descreveu a importante componente genética da imunodeficiência neste modelo. Ele descobriu que o gene mutado (*nu*, de *nude*) estava presente no cromossoma II como um gene autossómico recessivo. Este é responsável pela ausência de pelo, em adição a outras anormalidades incluindo crescimento retardado, baixa fertilidade, e expectativa de vida curta (100% de mortalidade dentro de 25 semanas após nascimento e 45% de mortalidade ao fim de 2 semanas após nascimento). Foi só em 1968 que Pantelouris reparou que alguns destes animais não tinham timo. Estes ratinhos tinham uma mutação homozigótica *nu/nu*, enquanto os fenotipicamente normais *///* e os heterozigóticos *nu//* tinham timo (Pantelouris, 1968). Imunologicamente, os ratinhos *nu/nu* atímicos têm um número reduzido de células T que são residuais após a passagem transplacentária de mães heterozigotas.

Entre 1979-1980 foi desenvolvido nos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) dos EUA o rato *nude* (*RNU* – do inglês, *Rowett Nude Rat*), através de uma série de acasalamentos consanguíneos envolvendo 8 estirpes de ratos. Estes ratos também atímicos (*rnu/rnu*), com deficiência de células T, mostram populações de células esgotadas em áreas timo-dependentes de órgãos linfoides periféricos (Davies et al., 1983).

Contudo estas células T não afetam a rejeição de transplantes de tecidos (ou outros marcadores com função de células T) (Raff and Wortis, 1970). Estes animais preservam a função das células B (Sprent and Miller, 1972) e exibem uma

maior atividade de células NK (do inglês, *Natural killer cells*) (Herberman, 1978). Estas características levaram a um uso alargado destes animais em transplantes de tecidos e em outras áreas da investigação biomédica, incluindo o seu uso em transplantes de tumores humanos.

Assim, e diferente do que acontece com os *GEMM*, os xenotransplantes permitem a avaliação direta do comportamento biológico, assim como a resposta a fármacos, de tumores humanos. Neste caso as células tumorais são humanas enquanto as células do estroma derivam do murino.

Desse modo o sucesso do xenotransplantes de tumores humanos em murinos *nude* e a capacidade de manterem a identidade histológica e biológica dos tumores, através de passagens sucessivas *in vivo*, revolucionaram muitos aspetos da investigação em oncologia, incluindo o desenvolvimento de novos fármacos. A transplantação de linhas celulares tumorais para ratos *nude* pode ser alcançada através de diversas vias: subcutânea, intraperitoneal, intravenosa, intratecal, intraesplénica, subcapsular renal, ou através da recente via ortotópica, por inoculação no órgão específico de origem tumoral. Cada uma destas vias tem as suas vantagens e limitações.

Os modelos subcutâneos, tal como já mencionado, continuam a ser os modelos mais usados para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, contudo questionou-se sempre a falta de correlação com a resposta clínica, as diferenças na angiogénese dos xenotransplantes subcutâneos e dos tumores autóctones (Johnson et al., 2001; Sikder et al., 2003; Alani et al., 2004) e/ou alterações na regulação da apoptose e do ciclo celular entre tumores subcutâneos e ortotópicos (Farré et al., 2002).

Além disso, o local da implantação das células oncológicas muda a sensibilidade aos fármacos, de forma reversível, o que sugere a importância crítica das interações células tumorais-estroma local e microambiente. Assim, é aparente que modelos de xenotransplantação subcutânea não devem ser usados para a seleção de compostos que estão correntemente a ser avaliados em ensaios clínicos (Gura, 1997; Johnson et al., 2001; Bibby, 2004; Peterson and Houghton, 2004; Kamb, 2005; Céspedes et al., 2006). Dadas estas limitações, as agências reguladoras deverão insistir numa definição mais clara dos modelos pré-clínicos que melhor representem a população clínica que irá receber o fármaco (Kamb, 2005).

Partindo da importância da existência de metástases no curso clínico do cancro, surgiu a vontade de se desenvolver diferentes abordagens para gerar modelos de cancro que tenham a capacidade de produzir metástases (tabela 3).

O modelo ortotópico de implantação (no órgão que originou o tumor) de tumores humanos xenotransplantados em murinos imunodeprimidos é melhor que os modelos implantados subcutaneamente, já que reproduz de forma mais próxima o comportamento clínico do tumor, relativamente ao seu padrão de invasão e disseminação (Fidler, 1991; Eccles et al., 1994; Hoffman, 1994, 1999; De Wever and Mareel, 2003) [tabela 4]. Os modelos ortotópicos são também mais próximos da histologia e vascularização dos tumores humanos, que os xenotransplantes subcutâneos (Killion et al.; Radinsky, 1995; Bibby, 2004).

Contudo, coexistem diversas mutações no tumor, o que dificulta o estudo da contribuição de cada mutação para o fenótipo tumoral, além de que durante a adaptação a cultura celular, as linhas celulares podem sofrer mudanças devido às passagens *in vitro*, que podem alterar as vias que conduzem o processo metastático.

Apesar de todas as vantagens claras sobre todos os outros modelos, principalmente numa perspectiva de modelo pré-clínico, a capacidade de previsão da resposta clínica a novos fármacos ainda não está totalmente estabelecida. Assim, são necessários estudos sistemáticos para determinar o valor preditivo em diferentes tipos de tumores. O uso pela Indústria Farmacêutica destes modelos tem crescido exponencialmente, sendo postos de parte os modelos subcutâneos, quando falamos no teste de potenciais fármacos. Tal tem vindo a acontecer principalmente pelo uso de proteínas fluorescentes, como a proteína verde fluorescente – GFP (do inglês, *Green fluorescent protein*), a luciferase ou proteínas similares a serem expressas em tumores, o que permite a avaliação da evolução quer do tumor primário, quer das metástases, recorrendo a procedimentos não invasivos (Hoffman, 2002).

Tabela 4: Padrão metastático observado em modelos ortotópicos transplantados de tumores humanos em murinos *nude* e nos correspondentes tumores humanos (Clarke, 1996; Hoffman, 1999, 2002; Kim et al., 2004; Heijstek et al., 2005).

Tumor primário	Locais metastáticos em humanos	Locais metastáticos em modelos murinos
Cólon	Gânglios linfáticos mesentéricos, fígado e pulmão	Gânglios linfáticos, fígado e pulmão
Mama	Gânglios linfáticos, osso, cérebro, pulmão, glândula adrenal e fígado	Pulmão, fígado e gânglios linfáticos
Próstata	Osso, fígado, gânglios linfáticos, pulmão, tecidos moles, dura-máter, glândula adrenal, cérebro e pâncreas	Osso, sistema nervoso central, pulmão fígado, rim, pleura, glândula adrenal e cérebro
Pulmão	Osso, pulmão, cérebro e fígado	Osso, pulmão, gânglios linfáticos e pleura
Pâncreas	Gânglios linfáticos, fígado e peritoneu	Baço, peritoneu, fígado, gânglios linfáticos portais
Melanoma	Gânglios linfáticos, fígado, pulmão, osso e cérebro	Osso, medula óssea, cérebro, pulmão, pleura, fígado, rim, glândula adrenal, gânglios linfáticos, músculo e pele

2.2.5. Modelos murinos ortotópicos de Cancro Colorretal

Tal como já foi abordado, um bom modelo de cancro colorretal deverá mimetizar o padrão metastático observado em humanos: gânglios linfáticos mesentéricos, fígado e pulmão, já que são as metástases a principal causa de morte dos doentes com cancro colorretal. Contudo são muito poucos os modelos descritos que evidenciem.

Os *GEMMs* (que cada vez mais são modelos preferidos para o estudo do papel de genes específicos no desenvolvimento de tumorigénese) até agora descritos para cancro colorretal raramente evidenciam adenocarcinomas, muito menos cancros invasivos e/ou metastáticos, além de que são modelos de progressão lenta, uma vez que se chega a esperar largos meses até que haja sinais de progressão de doença. Exemplo disso são os modelos *KO* de *APC*, *Gai2*, *MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *MSH6* ou *ATM*, que na grande maioria desenvolvem linfomas e adenomas e não carcinomas colorretais. O mesmo acontece com modelos *KI* de *KRAS* que desenvolvem adenomas e cancros do intestino delgado de pequenas dimensões (Rudolph et al., 1995; Jacks, 1996; McClatchey, 1999; Hakem and Mak, 2001; Herzig and Christofori, 2002; Jonkers and Berns, 2002; Tuveson and Jacks, 2002; Van Dyke and Jacks, 2002; Rangarajan and Weinberg, 2003). Apesar do

desenvolvimento e utilidade dos modelos genéticos em murinos para adenomas benignos, bem como para outras patologias em doenças intestinais, não se encontram ainda disponíveis modelos murinos tumorais espontâneos no intestino e que se tornem invasivos ou metastizem (Taketo and Edelman, 2009). Os modelos de xenotransplantes têm sido os modelos de eleição quando se fala nesta patologia, como importantes ferramentas para a avaliação de uma variedade de compostos terapêuticos.

A via mais usada em modelos de xenotransplante tem sido a subcutânea, principalmente por proporcionar uma melhor monitorização macroscópica do tumor, sem intervenção cirúrgica. Apesar de ser a abordagem mais fácil é das que é menos comparável com as neoplasias humanas de cólon, uma vez que para além do microambiente subcutâneo ser muito diferente do microambiente do cólon, todo o perfil genético associado a cada um dos locais é completamente distinto e tal correlaciona-se com o facto de raramente surgirem metástases (Morikawa et al., 1988; Xie et al., 1992; Garofalo et al., 1993).

O primeiro modelo metastático de cancro colorretal em murinos *nude* ocorreu em 1987 pelo grupo de Robert Bresalier, gastroenterologista americano, que decidiu injetar 5×10^6 células de uma linha de cancro humano do cólon (LS174T) em ratinhos atímicos BALB/c NCR-NU por via subcutânea e na submucosa do ceco. As suas conclusões foram que o modelo subcutâneo não evidenciou metástases, mesmo após 10 semanas da inoculação e que os tumores atingiram aproximadamente 1 cm em diâmetro, contrastando com os animais com inoculação em ceco. Estes apresentavam tumores mais pequenos, com cerca de 0,5 cm em diâmetro em cerca de 50% dos animais, e foram detetadas metástases na região dos gânglios linfáticos mesentéricos e no fígado, ao fim de 6 semanas (Bresalier et al., 1987).

Desde então diversos novos modelos e estudos de validação dos modelos ortotópicos surgiram, validando, entre outras coisas, a expressão metastática destes modelos no cancro colorretal (Fidler, 1991; Céspedes et al., 2007; Tseng et al., 2007). Não só com recurso a linhas celulares de cancro humano (já que o seu uso é por vezes criticado dado serem linhas altamente seletivas, geralmente em monoculturas, com capacidade de crescimento *in vitro*) mas também recorrendo à implantação de tecido tumoral no ceco dos animais imunodeprimidos, com a mesma expressão metastática (Furukawa et al., 1993; Kuo et al., 1993).

Apesar de todos os progressos feitos desde a descoberta do modelo, a grande maioria dos estudos realizados com recurso a este modelo continuaram a usar a implantação quer de células quer de tecidos intactos de tumores humanos de cancro colorretal em ceco dos animais.

As diferenças anatómicas do trato intestinal entre ratos e humanos são claras, contudo são ainda muitas as semelhanças, que fazem deste modelo um bom modelo para o estudo e compreensão do adenocarcinoma colorretal. O intestino grosso apresenta as mesmas divisões quer em murinos quer em humanos, sendo divididos em ceco, cólon e reto. Além disso, histologicamente as estruturas básicas da parede do intestino em humanos e em ratos também são similares, incluindo a mucosa, a submucosa, a muscularis e a serosa, com presenças de estruturas celulares semelhantes, na generalidade, como células caliciformes e mucinas, entre outras (Boivin et al., 2003; M. Treuting and M. Dintzis, 2011).

São conhecidas as diferenças na origem embrionária do cólon proximal e do distal, que se traduzem não só em diferenças anatómicas mas também em patogénese moleculares distintas (Milne, 1994; Glebov et al., 2003; Minoo et al., 2010), que por sua vez se traduzem a distintos fatores de risco associadas às duas localizações distintas (Iacopetta, 2002; Li and Lai, 2009).

Enquanto o ceco, ascendente e dois terços do cólon transversal têm origem no intestino médio, já a flexura esquerda, o cólon descendente, o cólon sigmoide e o reto surgem a partir do intestino posterior embrionário. Estas diferenças refletem distintos aspetos anatómicos, quando se considera o suprimento sanguíneo arterial, drenagem venosa, linfática e inervação de cada um dos segmentos do cólon. Além disso, o epitélio da mucosa adulta de cólon proximal e distal pode ser distinguido pelo seu padrão de expressão génica já que mais de 1000 genes são expressos diferencialmente no cólon ascendente contra cólon descendente (Glebov et al., 2003). Fisiologicamente, a absorção de sódio e água normalmente ocorre no cólon proximal, diminuindo progressivamente em direção ao reto, onde o armazenamento fecal compreende a principal função fisiológica. Fermentação bacteriana produz ácidos gordos de cadeia curta predominantemente no cólon proximal, onde podem ser passivamente absorvidos (Iacopetta, 2002; Gervaz et al., 2004; Li and Lai, 2009). Além disso, os sais biliares, que parecem estar associados a um risco aumentado de cancro de cólon, têm maior concentração no cólon proximal (Gervaz et al., 2004).

Estudos clínicos demonstram que os tumores do cólon direito são maiores que os tumores do cólon esquerdo e reto e apresentam mais instabilidade de microssatélites que os tumores de colon distal e reto. Mutações do *KRAS* são também mais frequentes no cólon proximal e menos no reto (Frattini et al., 2004; Slattery et al., 2009; Minoo et al., 2010)

O desenvolvimento de melhores modelos ortotópicos de cancro colorretal é por isso crucial, visto esta patologia apresentar diferenças determinantes que o atual modelo não contempla

Objetivos

Este trabalho tem como objetivos principais:

- 1) Comparação entre diferentes abordagens cirúrgicas (colostomia proximal com fístula distal e cecostomia), avaliando a resposta dos animais à cirurgia, bem como a avaliação da progressão da doença após a implantação das células tumorais humanas da linha celular WiDr, na submucosa do estoma da fístula distal (nos animais submetidos a colostomia) e da cecostomia;
- 2) Avaliação da progressão tumoral e de doença nos dois grupos de animais através de técnicas de Medicina Nuclear com ^{99m}Tc -hexakis-2metoxi-isobutil-isonitrilo (^{99m}Tc -MIBI) e ^{18}F -fluorodeoxiglucose (^{18}F -FDG), avaliando comparativamente estes radiofármacos no contexto oncológico;
- 3) Avaliação histológica do local da implantação das células tumorais, no local de implantação e dos locais principais de metastização locoregional ou à distância.

Material e Métodos

Este trabalho foi sujeito a aprovação pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (ref^a CE-129/2011), cumprindo todas as Orientações da Sociedade Portuguesa de Ciência em Animais de Laboratório (SPCAL), a Diretiva 2010/63/EU, sempre numa perspetiva dos 3R's (*Replacement*, *Reduction* e *Refinement*) em pesquisa com animais, sempre sob a orientação e executado por pessoal devidamente formado e creditado para o manuseamento de animais de laboratório.

1. Cultura celular

A cultura de células (cultivo de células dispersas, retiradas de um tecido original, de uma cultura primária ou de uma linha celular) tem sido muito usada como principal modelo *in vitro* para os estudos quer do comportamento, quer das vias de sinalização dos cancros. Apesar de todos os contras apontados ao uso de linhas imortalizadas, a grande vantagem é a sua replicabilidade, servindo como modelo inicial para novos estudos na área da oncobiologia.

Para a sua manutenção é necessário assegurar rigorosas condições de assepsia, bem como condições ambientais propícias, tais como pH, humidade, temperatura e concentrações de CO₂ e O₂, meios de cultura apropriados e substratos adequados.

A linha celular CCL-218™ (WiDr) de adenocarcinoma colorretal foi usada neste estudo. Esta foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC) e mantidas de acordo com as recomendações fornecidas pela mesma, utilizando meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma D-5648, EUA). Deste modo as células foram mantidas a 37°C em atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO₂ em incubadora Binder®.

1.1. Linha celular

A linha celular WiDr (*Homo sapiens*) foi estabelecida nos Laboratórios Lederle de uma porção de um adenocarcinoma primário do cólon retosigmoide, retirada de uma doente com 78 anos de idade a 26 de Maio de 1971 (Noguchi et al., 1979). Esta linha expressa CEA (118ng/10⁶ células/10dias), bem como

antigénio específico do cólon (CSAp), TGF- β (do inglês, *Transforming growth factor beta*) e queratina. Além disso tem recetores para o EGF e as células expressam o gene TP53, cuja p53 produzida tem uma mutação G»A, que resulta numa troca Arg»His na posição 273 (Rodrigues et al., 1990).

1.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados na execução deste trabalho experimental foram de qualidade analítica e a água utilizada para a sua preparação era destilada ou quando necessário ultrapura, fornecida por um sistema de purificação de água Simplicity™ da Millipore S.A., EUA.

Assim, na realização de cultura celular como meios e substratos para as células e soluções foi necessário meio de DMEM - 4500mg/L (de glucose e L-glutamina) – composto altamente rico em vitaminas, aminoácidos e sais inorgânicos; piruvato de sódio (GIBCO 11360, Reino Unido) – ácido orgânico metabolizado na glicólise, que na cultura de células é usado como fonte energética e ajuda quer na manutenção de células especializadas, quer em processos anabólicos, de clonagem, e também quando a concentração de soro bovino fetal (FBS, do inglês, *Fetal Bovine Serum*) é baixa no meio de cultura; bicarbonato de sódio – que desempenha o papel de tampão, ajudando à manutenção do pH do meio de cultura; antibiótico – solução contendo uma mistura de antibiótico e antifúngico: penicilina G, 10 000U/mL; estreptomicina, 10 000mg/mL; anfotericina B, 10 000 μ g/mL – GIBCO 15240, Reino Unido; FBS (Sigma F-7524, EUA) (inativado a 60°C, procedimento para a inativação do complemento, durante 40 minutos e distribuído em alíquotas de 50mL, para armazenamento a -20°C) – que tem elevado conteúdo de fatores de crescimento embrionários e ajuda a satisfazer as necessidades metabólicas das células.

Uma vez que a linha celular utilizada é mantida em condições aderentes, para a sua manipulação foi necessário destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares. Para tal recorreu-se a tripsina-EDTA (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid* – ácido etilendiamino tetra-acético) a 0,25% (GIBCO 25200, Reino Unido) (20mg/mL de EDTA, 500mg/mL de tripsina – enzima proteolítica que quebra ligações das proteínas de adesão entre células e entre células e matriz extracelular), e uma solução salina de tampão fosfato – PBS (do

inglês, *Phosphate buffered saline*) (Sigma, USA), cuja composição proporciona a concentração iónica ideal à vida celular.

1.3. Material e Equipamento

Para a manutenção da cultura de células foram utilizados diferentes materiais tais como frascos de cultura de poliestireno (75 e 175cm² – Sarstedt, USA); tubos de Falcon (15 e 50mL; Sarstedt, USA); pipetas de Pasteur; pipetas de vidro graduadas; microtubos (1,5 e 2mL; Eppendorf, Alemanha); micropipetas (Pipetman – Gilson, France); pipetador (IBS Integra Biosciences, Alemanha) e bomba de vácuo (IBS Integra Biosciences, Alemanha).

Relativamente ao equipamento utilizado para realizar a cultura celular utilizou-se a câmara de fluxo laminar vertical (Steril-Polaris, Itália); centrífuga refrigerada de bancada (D-78532 Tuttlingen, Hettich Zentrifugar, Universal 320R; Rotor: 6318, Portugal); incubadora (Binder, Portugal); microscópio ótico invertido e direto (Motic AE31, Hg 100W, China); sistema de purificação de água Simplicity™ da Millipore S.A., USA; incubadora HeraCell 150 (Alemanha); frigorífico (4°C (Indesit, Polónia)) e arcas (-20°C (Samsung, Coreia) e -80°C (Snijders Scientific, Holanda)).

1.4. Preparação do meio de cultura

Para a preparação de 500mL de meio, DMEM, foi adicionado 10% (v/v) de FBS (50ml), 0,5g de bicarbonato de sódio, 1,25mL de piruvato de sódio e 5mL de solução de antibiótico. O meio foi filtrado e armazenado a 4°C para posterior utilização nas linhas celulares. Antes da sua utilização foi previamente testado para evitar contaminação das linhas celulares.

1.5. Descongelação e propagação das linhas celulares

A linha celular em estudo, WiDr é uma linha aderente e cresce em monocamada. Durante a manipulação celular, sempre que as culturas atingiam cerca de 90% de confluência, foram estabelecidas novas culturas (geralmente a

cada 2 semanas), processo este designado por “passagem”, que visa a manutenção das linhas celulares. Assim, para iniciar a cultura celular o *vial* contendo a linha celular pretendida foi retirado da arca a -80°C ou do azoto líquido e foi descongelado parcialmente (até que o bloco de solução gelada se solte das paredes do *vial*) em banho-maria a 37°C . Na câmara de fluxo laminar vertical transferiu-se a suspensão celular para um frasco de 175cm^2 contendo previamente meio DMEM a 37°C de temperatura e 48 horas após o descongelamento mudou-se o meio.

Para a manutenção da linha celular aspirou-se o meio DMEM consumido do frasco contendo as células e lavou-se o frasco de cultura com PBS 1x. Aspirou-se o PBS 1x, adicionaram-se 3mL de tripsina-EDTA 0,25% e colocou-se o frasco de cultura a incubar durante breves minutos a 37°C e 5% de CO_2 , de modo a destacar as células. Confirmou-se ao microscópio o destacamento celular e adicionou-se novo meio de cultura e ressuspendeu-se muito bem a suspensão celular. Distribuiu-se a suspensão por novos frascos de modo a obter uma densidade adequada e adicionou-se meio novo até perfazer o volume correto mediante o frasco utilizado e deixou-se a incubar a 37°C com 5% de CO_2 até à próxima passagem, nunca excedendo as 50 passagens.

2. Experimentação Animal

A carcinogénese é um processo biológico altamente complexo, cuja compreensão necessita também de um sistema experimental complexo, e tal só consegue ser alcançando com um modelo animal.

Foram utilizados 30 ratos *nude* (*Rowett Nude Rat- RNU*) adquiridos aos Laboratórios Internacionais Charles River, Inc. (Espanha), com 6 semanas de idade, mantidos numa sala climatizada própria, sujeitos a ciclos de 12 horas de luz diárias, ração padrão de laboratório para murinos *nude* (Mucedola 4RFN, Itália) e acesso livre a água devidamente filtrada.

Quando atingiram as 8 semanas de idade, incluindo um período de quarentena (1 semana), os animais foram postos em jejum 12 horas antes. No dia das cirurgias os ratos foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de $2\mu\text{L/g}$ de uma solução contendo uma proporção de 3:1 de quetamina (50mg/ml) (Ketalar®, Parke-Davis, Pfizer Laboratories Lda., Portugal.) e clorpromazina a

2,5% (Largatil®, Rhône-Poulenc Rorer, Laboratórios Vitória, Portugal). A ketamina é um fármaco anestésico que também promove sedação e amnésia anterógrada por ação direta no córtex e sistema límbico, causando interferência na percepção sensorial dos estímulos dolorosos. A clorpromazina é um fármaco do grupo dos fenotiazídicos, que são usados com propriedades antipsicóticas e antieméticas.

Depois de avaliados os indicadores sensitivos da profundidade da anestesia (comprimir a cauda e as extremidades podais, tocar na córnea – por ordem decrescente de confiança), o abdómen foi esterilizado com tintura de iodo a 0,2%. Destes animais, 17 foram submetidos a colostomias em cólon sigmoide com fístula mucosa distal e 13 submetidos a cecostomias.

Todos os procedimentos realizados foram executados em condições estéreis em câmara de fluxo laminar, e cujo material cirúrgico utilizado fora autoclavado previamente a 121°C, durante 35 minutos.

2.1. Técnicas cirúrgicas

2.1.1. Modelo ortotópico de cólon sigmoide

A colostomia é uma cirurgia comumente realizada em doentes com cancro colorretal, decorrendo de uma colectomia parcial, isto é remoção do segmento do intestino grosso associada a linfadenectomia como forma de abordagem curativa para esta patologia. Partindo de esta prática clínica tão comum, nasce a ideia de aplicação desta abordagem cirúrgica num modelo ortotópico novo.

O desvio do cólon foi realizado por meio de colostomia proximal e fístula distal. Foi feita uma incisão mediana, na porção inferior do abdómen, com cerca de 1,5cm de comprimento. Após abertura da cavidade abdominal expôs-se o cego para melhor visualização do cólon, surgindo a porção distal do cólon à esquerda da linha mediana. Para confirmação de que se trata realmente do cólon pode-se exercer uma tração suave e verificar como o orifício do ânus se movimenta. Na grande maioria dos casos há uma ansa de intestino delgado aderente ao mesocólon, que é necessário separar com cuidado para não lesar as estruturas

vasculares. Após se ter referenciado o cólon, colocou-se o cego novamente no interior da cavidade abdominal para não ficar com a superfície serosa seca.

Foi feita a seleção do local de abertura do cólon mais adequada, tendo em atenção a arcada vascular e o comprimento dos topos para chegarem à pele. Procedeu-se então à abertura do mesocólon e laqueação com duas pinças da arcada vascular e à abertura do cólon e secção do vaso. Completou-se a laqueação com fio (vicryl 4/0), deixando uma das pontas do fio comprida para referência. Em seguida, selecionou-se o local onde será executado o estoma. Para a colostomia optou-se por fazer o estoma à esquerda da linha mediana em localização médio-abdominal. Para o topo retal optou-se por fazer em localização à esquerda da linha média, na porção inferior do abdómen. Teve-se atenção na localização do topo retal de forma a não ficar muito lateral e distal. Nessa posição, quando o rato se coloca sobre as quatro patas, o estoma ficará na prega cutânea da base da pata. Os dois topos nunca deverão ficar a menos de 1cm de distância um do outro.

Após a secção de uma porção circular de pele com cerca de 0,5cm de diâmetro, também se removeu um segmento de aponevrose da parede ântero-lateral do abdómen e de músculo. Procedeu-se à passagem dos topos pelos respetivos orifícios. A ponta comprida do fio de laqueação serviu para referenciar o cólon caso os topos entrassem inadvertidamente na cavidade abdominal, a manipulação da parede para criação dos estomas, e para referenciar a posição natural do cólon. Assim é menos provável que fique torcido e condicione obstrução intestinal. O topo proximal deve ficar com o fio de laqueação voltado para baixo. No topo distal deve ficar voltado para cima; Por fim, para os pontos de fixação do estoma usou-se prolene 5/0 e optou-se por pontos separados, geralmente quatro. A agulha penetrou na pele a cerca de 3mm, juntamente com aponevrose e músculo, depois atravessava a parede do cólon a cerca de 4mm do bordo e no bordo, de maneira a deixar o topo bem aberto em cima e com a mucosa evertida. Fixaram-se os dois topos e encerrou-se a cavidade abdominal com seda 4/0.

O resultado da cirurgia é ilustrado na figura 5.



Figura 5: Esquema da colostomia com fistula distal (à esquerda) e fotografia de animal submetido à cirurgia (à direita).

2.1.2. Modelo ortotópico de ceco

A cecostomia é uma intervenção cirúrgica de uso menos comum, usada em caso de oclusão intestinal para esvaziar todo o intestino a montante da obstrução intestinal. É uma opção muito eficaz, em alguns casos, de oclusão do cólon associado a muito mau estado geral do doente que impossibilita um tratamento com intuitos curativos.

O facto de, através desta abordagem cirúrgica, conseguimos expor esta zona do intestino, facilita não só a implantação das células tumorais, mas também a um melhor controlo da formação e crescimento do tumor primário.

A exposição do ceco foi realizada após uma incisão com cerca de 0,5cm de comprimento, vertical, na linha paramediana direita. Esta incisão não pode ser muito distal nem muito lateral. Nessa posição, quando o rato se coloca sobre as quatro patas, o estoma ficará na prega cutânea da base da pata distal direita.

Após abertura da cavidade abdominal, fez-se ressecção de um pequeno segmento de pele, aponevrose e músculo de maneira a obter um orifício com cerca de 0,5cm de diâmetro. Levantando as camadas da parede abdominal e

olhando em direção ao meio da cavidade abdominal foi possível identificar facilmente o ceco.

O ceco foi exteriorizado da cavidade abdominal, inspecionou-se e verificou-se a continuidade com o intestino grosso e o intestino delgado.

Procedeu-se à abertura do ceco no seu *apex*, no bordo antimesentérico e colocou-se o ceco quase todo e o intestino delgado para dentro da cavidade abdominal. Assim, o ceco ficou já preparado para se passarem os pontos para fixação do estoma com prolene 5/0, optando-se por pontos separados, geralmente seis a oito. A agulha penetrou na pele a cerca de 3mm, juntamente com aponevrose e músculo, depois atravessou a parede do ceco a cerca de 4mm do bordo e no bordo, de maneira a deixar o topo bem aberto em cima e com a mucosa evertida.

O resultado da cirurgia é ilustrado na figura 6.

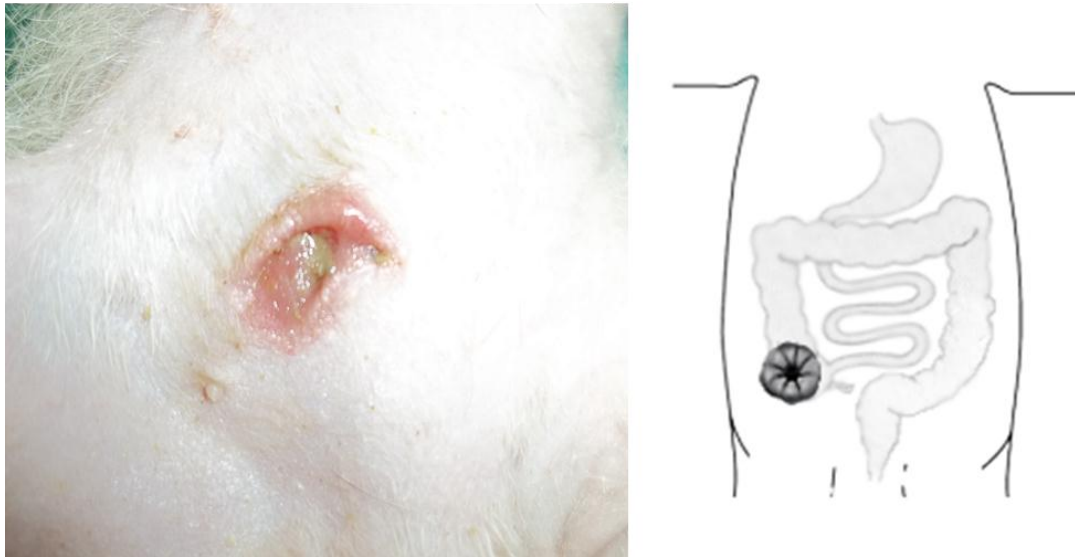


Figura 6: Esquema da cecostomia (à direita) e fotografia de animal submetido à cirurgia (à esquerda).

2.2. Cuidados pós-operativos

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram colocados em gaiolas individuais. Os animais foram monitorizados diariamente, sendo mudadas as camas das gaiolas duas vezes por semana, o que ajudou a avaliação do funcionamento intestinal, e feitas pesagens de dois em dois dias.

Para a monitorização dos animais foi feita a pesquisa de sinais de doença: sinais de condições físicas anormais, como desidratação, apatia, indiferença, prostração, dispneia, movimentação em círculos, cabeça tombada, etc.; e também sinais de condições fisiológicas anormais, como alterações na diurese, alteração no volume das fezes, alterações de massa, diminuição da ingestão de ração e/ou água.

3. Inoculação das células tumorais

Após o restabelecimento do trânsito intestinal, procedeu-se à preparação das células tumorais e em seguida à sua inoculação na submucosa do cólon.

3.1. Preparação das células para implantação

Para a inoculação das células foi necessário começar por destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares.

3.1.1. Viabilidade Celular

De forma a assegurar o número de células pretendido para a implantação celular, mas também para verificar a viabilidade celular, usou-se o método de exclusão do azul de tripano que se baseia na entrada do azul de tripano nas células que possuem a membrana celular destruída corando estas de azul. Assim, as células inviáveis aparecem azuis e as viáveis mantêm-se brancas ou brilhantes.

Desta forma, aspirou-se o meio DMEM consumido do frasco contendo as células (com uma confluência elevada, isto é, que aparentem estar cheios) e

lavou-se o frasco de cultura com PBS 1x. Aspirou-se o PBS 1x e adicionaram-se 3mL de tripsina-EDTA a 0,25%. Colocou-se o frasco de cultura a incubar durante breves minutos a 37°C em ambiente com 5% de CO₂, de modo a destacar as células. Confirmou-se ao microscópio o destacamento celular e adicionou-se novo meio de cultura e ressuspendeu-se a suspensão celular. Transferiu-se a suspensão celular do frasco de cultura para um tubo de falcon de 15mL e centrifugou-se a 1000G durante 5 min. Aspirou-se a maioria do sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 5mL de meio. De seguida, retiraram-se 20µL de suspensão celular e homogeneizou-se com 20µL de azul de tripano (0,02% em PBS) e transferiu-se para o hemocitómetro. Contaram-se as células num hemocitómetro [figura 7] recorrendo ao microscópio ótico invertido (numa ampliação de 100x).

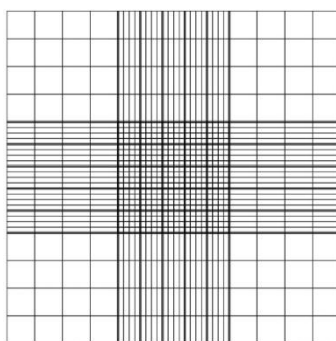


Figura 7: Esquema representativo dos quatro quadrantes do hemocitómetro utilizados na determinação da viabilidade celular (Kim, 2010).

Ao microscópio, as células foram contadas nos quatro quadrantes dos cantos do hemocitómetro. A percentagem de células viáveis é determinada pela fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células mortas}} \times 100$$

Mediante o resultado da contagem estimou-se o número de inoculações que seriam possíveis de realizar, sendo necessárias entre 10-14×10⁶ células por inoculação/animal.

3.2. Procedimento de inoculação

Para a inoculação o tubo de falcon foi novamente centrifugado e descartou-se o meio. As células foram aspiradas com o auxílio de uma seringa de 1mL, com uma agulha hipodérmica de calibre 21G, no menor volume possível, de modo a assegurar o melhor sucesso da inoculação e menor riscos de extravasamento. Descartou-se a agulha, substituindo-se esta por uma agulha hipodérmica de calibre 30G. A inoculação foi feita, sempre que possível num só foco, na submucosa do cólon da fístula cecal e da colostomia cecal, em ambiente estéril numa câmara de fluxo laminar.

4. Técnicas de imagem molecular in vivo por Medicina Nuclear

4.1. Imagens com ^{99m}Tc -MIBI

O ^{99m}Tc -MIBI [^{99m}Tc -hexakis-2metoxi-isobutil-isonitrilo] é um composto lipofílico e catiónico, inicialmente desenvolvido para estudos de perfusão do miocárdio. Através de análise química, foi possível conhecer que este agente é um catião monovalente, no qual o átomo de tecnécio (Tc) ocupa uma posição central, rodeado por 6 ligandos alquil-isonitrilos, dispostos segundo uma geometria octaédrica [figura 8] (Abram and Alberto, 2006).

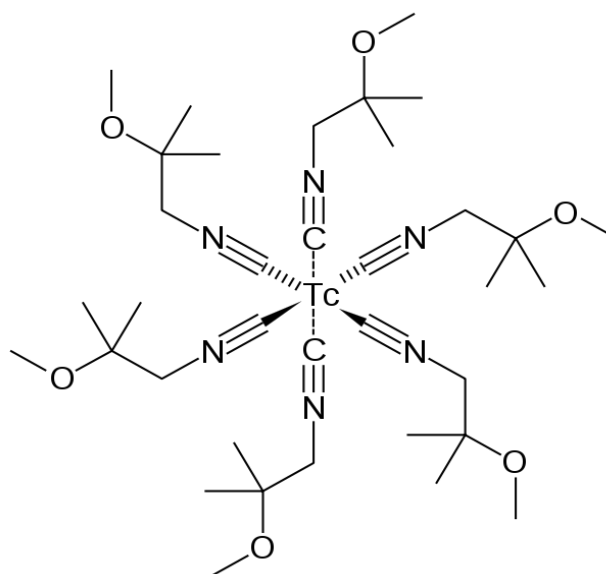


Figura 8: Estrutura química do ^{99m}Tc -MIBI - $\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{N}_6\text{O}_6\text{Tc}$ (Abram and Alberto, 2006).

A sua captação realiza-se por difusão passiva, assim como, pela diferença de potencial através da membrana mitocondrial. Tendo por base estes mecanismos, a sua captação é maior nos tecidos ou órgãos ricos em mitocôndrias, pelo que está indicado para o estudo funcional do miocárdio nas situações de insuficiência coronária e na deteção de patologia proliferativa, nomeadamente na área oncológica.

A lipofilicidade e a carga catiónica do $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ desempenham um papel muito importante na sua acumulação e retenção nas células: a carga catiónica deste composto promove a interação eletrostática com a carga negativa do citosol e dos potenciais da membrana mitocondrial; a lipofilicidade e a estrutura da molécula favorecem a difusão passiva através da bicamada lipídica da membrana plasmática [figura 9] (Barbarics et al., 1998). Outro fator que influencia a captação do $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ por parte do tumor é o grau de perfusão do mesmo.

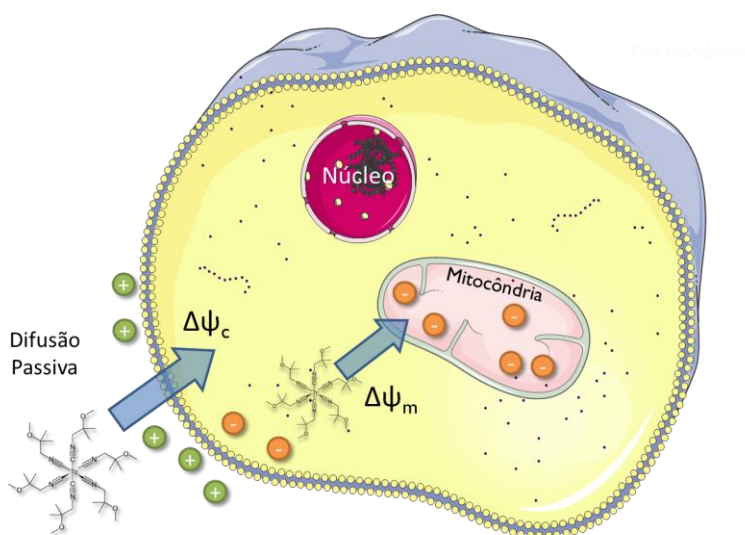


Figura 9: Mecanismo de captação do $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ pelas células. Este mecanismo é conduzido pelo potencial transmembranar celular, $\Delta\psi_c$. Após a entrada do $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ acumula-se na mitocôndria em resposta ao potencial mitocondrial transmembranar, $\Delta\psi_m$ (adaptado)(Moretti et al., 2005).

Num estudo com utilização de cobaias demonstraram que o local de acumulação intracelular do $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ é precisamente a mitocôndria (Crane et al., 1993). Este estudo juntamente com outros, verificaram que o $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ se localiza em tecidos com elevados níveis de mitocôndrias, no sentido de suportar

o aumento de metabolismo, com consequente aumento do potencial negativo de membrana mitocondrial, como ocorre em tumores malignos e no miocárdio (Piwnica-Worms et al., 1990; Maffioli et al., 1996; Fukumoto, 2004).

Para a aquisição de imagens os animais (n=18; colostomias: n=11; cecostomias: n=7) foram anestesiados, como anteriormente descrito. As injeções do radiofármaco foram realizadas por via endovenosa, na veia dorsal da cauda, com atividade de $100,6 \pm 65,3$ MBq de ^{99m}Tc -MIBI (STAMICIS®, IBA-Molecular, Espanha), 1, 2, 3 e 4 semanas após a injeção das células nos animais de modo a avaliar a implantação das células tumorais, bem como a progressão da doença e possível metastização.

Imediatamente após a injeção, iniciou-se uma aquisição dinâmica através de uma câmara-gama (Millennium 2010 *GE-Healthcare, General Electric Company, EUA*). A aquisição foi controlada por computador pelo *software* GenieAcq, sendo feita em duas fases sequenciais. Durante a fase dinâmica, as imagens foram registadas a cada 30 segundos durante 10 minutos. Em seguida, foram obtidas imagens estáticas aos 10, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção. As imagens obtidas foram depois transferidas para uma estação de trabalho Xeleris (HP xw6400, Hewlett-Packard, EUA) onde foram processadas.

4.2. Imagens com ^{18}F -fluorodeoxiglucose

Na atualidade um dos radiofármacos mais usado para a avaliação semiquantitativa do metabolismo tumoral tem sido a ^{18}F -fluorodeoxiglucose (^{18}F -FDG) já que, nos cancros, se espera observar altas taxas de metabolismo glicolítico.

A glucose é um nutriente importante para todas as células, desempenhando um papel essencial no metabolismo energético celular. O ^{18}F -FDG compete com a glucose para ser incorporada na célula através de um mecanismo de transporte facilitado, através das proteínas de transporte de glucose 1 e 3 (GLUT-1 e GLUT-3, do inglês *Glucose transporters*). Quando dentro da célula, o ^{18}F -FDG é fosforilado pela hexoquinase originando ^{18}F -FDG-6-Fosfato, que fica aprisionado dentro da célula devido ao seu complexo polar que não consegue ser metabolizado mais. A molécula ^{18}F -FDG-6-fosfato pode ser desfosforilada a ^{18}F -FDG através da enzima glucose-6-fosfatase, contudo este processo é mais lento

nas células cancerígenas que nas células não malignas, pois as primeiras apresentam níveis baixos desta enzima, figura 10 (Nabi and Zubeldia, 2002; Haubner, 2010).

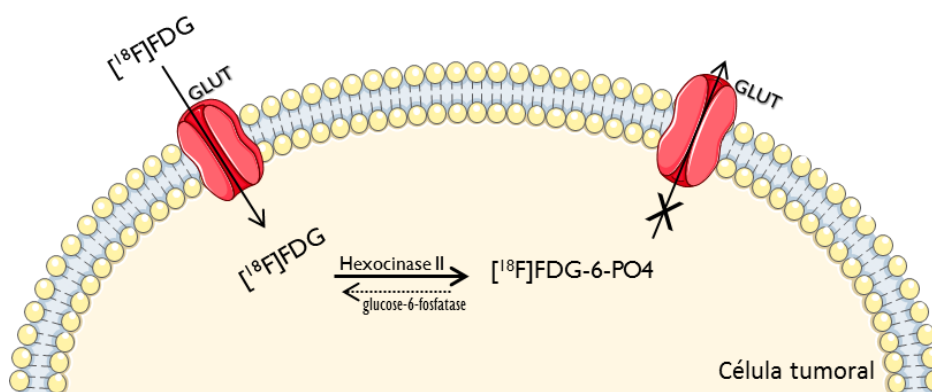


Figura 10: Mecanismo de captação do ^{18}F -FDG em células tumorais (adaptado)(Haubner, 2010).

A captação de ^{18}F -FDG está diretamente relacionada com a atividade glicolítica do tumor. A sua aplicação clínica tem-se alargado progressivamente ao estadiamento, seguimento e avaliação de resposta à terapêutica em diversos tipos de câncros (pulmão, colorretal, mama, próstata, cabeça e pescoço, linfomas, melanoma). Outra aplicação relaciona-se com a possibilidade de previsão da resposta a quimioterapia, em função das modificações observadas na captação tumoral do ^{18}F -FDG. A deteção de recorrência tumoral, após uma determinada terapêutica, é também uma área onde a Tomografia por emissão de positrões – PET (do inglês, *Positron Emission Tomography*) com ^{18}F -FDG fornece importante informação indicando a existência (ou não) de viabilidade tumoral (Nabi and Zubeldia, 2002).

Contudo, não são só as células tumorais que expressam maior captação de ^{18}F -FDG, p.e. na substância cinzenta normal verifica-se um elevado metabolismo de glucose de que resultam razões tumor-*background* diminuídas na imagiologia de tumores cerebrais. Além disso, devido a mecanismos de reparação induzidos por reações após intervenções cirúrgicas, os macrófagos acabam também por infiltrar o leito tumoral, expressando captações de ^{18}F -FDG comparáveis a células tumorais viáveis. Assim, a análise dos dados da PET com ^{18}F -FDG tem que ser feita com o máximo cuidado, tendo sempre em conta as limitações desta técnica.

Para a aquisição de imagens com ^{18}F -FDG, os animais ($n=6$; colostomias: $n=3$; cecostomias: $n=3$) foram anestesiados, tal como foi descrito anteriormente. As injeções do radiofármaco foram por via intravenosa com atividades de $9,9\pm 3,4\text{MBq}$ de ^{18}F -FDG (FDG*UC, ICNAS – Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde, Portugal), 4 semanas após a injeção das células tumorais de modo a avaliar a sua implantação, bem como a progressão da doença e possível metastização.

Quarenta e cinco minutos após a injeção intravenosa do radiofármaco, foram adquiridas imagens 3D de 20 minutos, através de um protótipo ClearPEM OSEM [figura 11] (PEM Consortium, CERN), utilizando quatro posições angulares.



Figura 11: Fotografia do Clear-PEM Scanner.

O Clear-PEM Scanner é um sistema de mamografias por emissão de positrões (PEM – do inglês, *Positron Emission Mamography*) de alta resolução, que pretende detetar tumores com diâmetros a partir de 2mm (Abreu et al., 2006). Este sistema está a ser desenvolvido em Portugal através de um consórcio PEM e CERN (do francês, *Organisation européenne pour la recherche nucléaire* – Organização Europeia para a Pesquisa Nuclear) no âmbito do quadro *Crystal Clear Collaboration*, com a colaboração de diversas instituições nacionais, sob a direção do Professor Doutor João Varela.

Os dados obtidos foram depois processados (pelo Laboratório de Instrumentação e Física de Partículas de Lisboa) e depois foram então transferidos para o AMIDE (*Medical Image Data Analysis Tool*) onde as imagens foram analisadas.

5. Análise histopatológica

Sob efeito de anestesia profunda, os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical tendo sido realizadas necropsias subsequentes com colheita do tumor, dos gânglios linfáticos locoregionais, dos pulmões, fígado ou de qualquer outro órgão que apresentasse alterações macroscópicas relevantes.

As amostras retiradas foram fixadas em formalina a 10% (252549 SIGMA, EUA) e enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica para processamento segundo o protocolo utilizado no Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. O exame macroscópico dos espécimes e a observação microscópica das lâminas coradas com Hematoxilina/Eosina foram realizados pelo mesmo Anatomopatologista.

6. Processamento de dados e análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada adotando-se nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$) e apresentados sob a forma de média \pm erro padrão (Med \pm EP), mediante os seguintes modelos: estatística descritiva; testes de associação (teste de Qui-quadrado, teste de Mann-Whitney, teste de Friedman, teste do Log-Rank); coeficiente de correlação de Spearman; análise de variância (ANOVA) e de sobrevivência (Curvas de Kaplan-Meier).

Para a avaliação da recuperação e sobrevida dos animais ao longo da experiência avaliou-se a percentagem de variação de massa relativamente à massa inicial para cada tipo de intervenção cirúrgica, cujos dados foram obtidos através da fórmula:

$$\Delta_{massa} = \frac{Massa_i - Massa_0}{Massa_0}$$

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de análise estatística *Statistical Package for Social Sciences (SPSS) program for Windows*, versão 18.0 (IBM Corporation, USA).

Resultados

Os métodos referidos no capítulo anterior foram usados na tentativa de desenvolver dois modelos *in vivo* de adenocarcinoma colorretal, através da implantação ortotópica de células tumorais humanas de cancro colorretal, da linha celular WiDr, recorrendo a uma colostomia proximal com fístula distal e a uma cecostomia, usando metodologias apoiadas na medicina nuclear para avaliação da progressão tumoral e possível disseminação metastática.

1. Mortalidade e sobrevida dos animais

A partir dos registos da massa recolhidos procedemos à análise estatística desses dados, de forma a avaliar o impacto das diferentes intervenções cirúrgicas e da implantação celular na mortalidade e na sobrevida dos animais.

1.1. Avaliação da mortalidade e sobrevida dos animais após intervenção cirúrgica e antes de implantação celular.

Após o registo das massas dos animais de dois em dois dias, realizado da mesma forma e utilizando a mesma balança, os dados foram processados e foram obtidos os seguintes resultados:

Tabela 5: Descrição global dos animais submetidos a colostomia proximal com fístula distal e cecostomia antes da implantação das células tumorais.

Cirurgia	Nº de animais	Média da massa inicial (g)	Mortalidade por cirurgia	Mortalidade global
Colostomia	17 (56,7%)	211,35 ± 52,07 *	4/17 (23,5%)**	6/30 (20%)
Cecostomia	13 (43,3%)	237,23 ± 54,82 *	2/13 (15,4%)**	

* p=0,263, teste de Mann-Whitney; ** p=0,929, teste de qui-quadrado

Dos dados recolhidos representados na tabela 5 observou-se que um animal morreu aos 2 dias, 2 animais aos 4 dias, 1 animal aos 10 dias, 1 animal aos 16 dias e 1 animal aos 18 dias. A mortalidade global (dos dois grupos) foi de 20%. O tempo médio de sobrevida destes 6 ratos foi de $9 \pm 2,77$ dias.

Os animais submetidos a colostomia proximal com fístula distal a mortalidade foi de 23,5% (4 casos). Destes 2 animais morreram aos 4 dias, 1 animal aos 10 dias e 1 animal aos 16 dias.

Os animais que morreram e foram submetidos a cecostomia apresentaram uma mortalidade de 15,4% (2 casos), 1 animal morreu aos 2 dias e outro aos 18 dias.

A taxa de mortalidade após a intervenção cirúrgica e antes da implantação das células tumorais foi idêntica nos dois grupos, não havendo diferenças.

1.2. Avaliação da mortalidade e sobrevida após a implantação celular.

Após o registo da massa dos animais, adotando a mesma metodologia descrita no ponto anterior, verificaram-se os seguintes resultados:

Tabela 6: Descrição global dos animais submetidos às diferentes abordagens cirúrgicas e após a implantação celular.

Cirurgia	Média de dias até implantação	Nº de animais	Média de massa inicial (g)	Mortalidade por cirurgia	Mortalidade global
Colostomia	20,77±7,0	13 (54,2%)	236,08 ± 17,61*	4/11 (30,8%)**	11/24 (45,8%)
Cecostomia	18,73±7,6	11 (43,3%)	234,64 ± 17,36*	7/11 (63,6%)**	

* p=0,955, teste de Mann-Whitney; ** p=0,107, teste de qui-quadrado

Dos dados recolhidos representados na tabela 6, observou-se que a taxa de mortalidade após a implantação das células tumorais foi de 45,8% não tendo significado estatístico quando comparada entre os dois grupos (p=0,955), apesar de ser maior no grupo da cecostomia (63,6%) que no grupo da colostomia proximal com fístula distal (30,8%).

Relativamente à percentagem de variação de massa relativamente à massa inicial para cada tipo de intervenção cirúrgica, verificou-se que para o grupo com colostomia proximal com fístula distal o ganho ponderal é crescente e com uma velocidade sensivelmente constante, que se traduziu num aumento ponderal estatisticamente significativo ao longo do tempo (Teste de Friedman: p <0,001) [Figura 12].

Já relativamente ao grupo de animais submetidos a cecostomia observou-se que o padrão de ganho ponderal foi diferente do anterior. Os animais começaram por perder massa, oscilando entre pequenas perdas e ganhos ponderais até cerca de 10 dias. A partir dessa data os animais começaram a recuperar e aos 12 dias ultrapassaram, em média, a massa inicial. Aqui, o ganho foi lento até aos 18 dias, entre os 18 e os 32 a 34 dias a velocidade de ganho ponderal diminuiu drasticamente continuando a diminuir mais lentamente até cerca dos 48 dias, altura em que o ganho ponderal continuou a existir de forma mais constante [Figura 12].

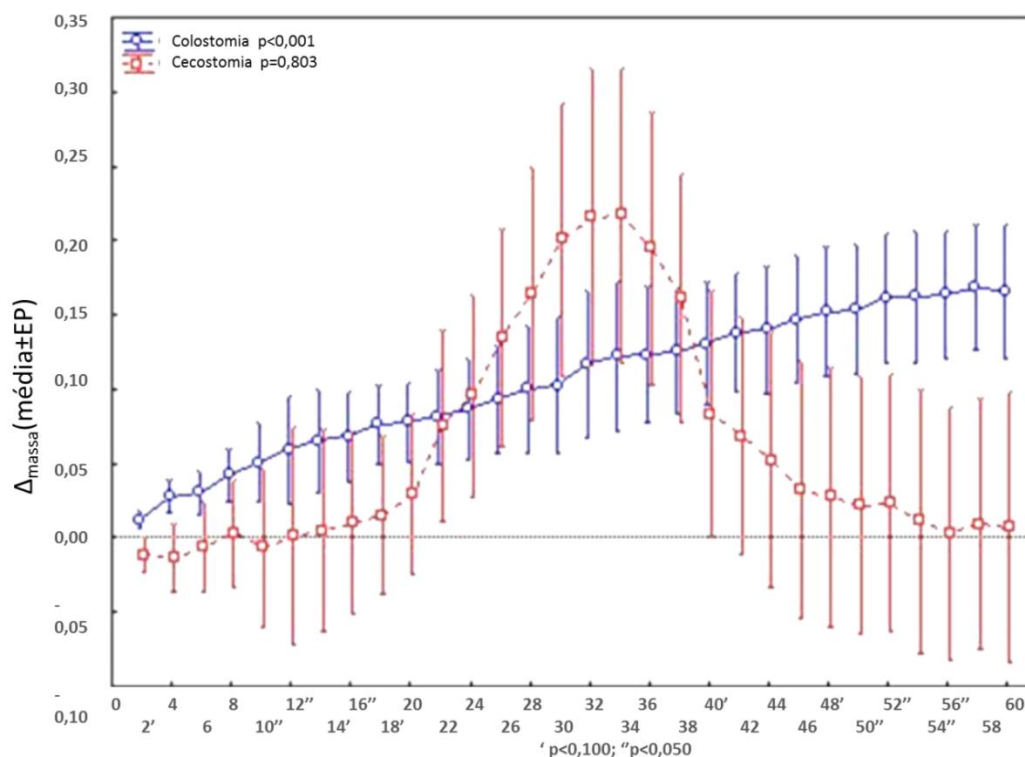


Figura 12: Gráfico representativo da variação de massa relativamente ao instante inicial para cada cirurgia, ao longo de 60 dias; ' $p < 0,100$, " $p < 0,050$.

Por outro lado, verificou-se que logo aos 2 dias existiu uma tendência para que os animais submetidos a colostomia proximal com fístula distal recuperaram mais massa que os animais que foram submetidos a cecostomia (Teste de Mann-Whitney: $p < 0,055$), e que entre os 10 e os 18 dias os animais submetidos a colostomia proximal com fístula distal ganharam mais massa que os animais submetidos a cecostomia (de facto, enquanto no grupo de animais submetidos a colostomia proximal com fístula distal existiu um ganho ponderal, no grupo de animais submetidos a cecostomia existiu em média perda de massa). Os resultados foram semelhantes por volta dos 40 dias e entre os 48 e os 56 dias.

Na análise da sobrevida média entre as diferentes abordagens cirúrgicas, através de curvas de Kaplan Meier, verificou-se que não existe diferença estatisticamente significativa (Teste de Log-Rank: $p=0,304$) [Figura 13].

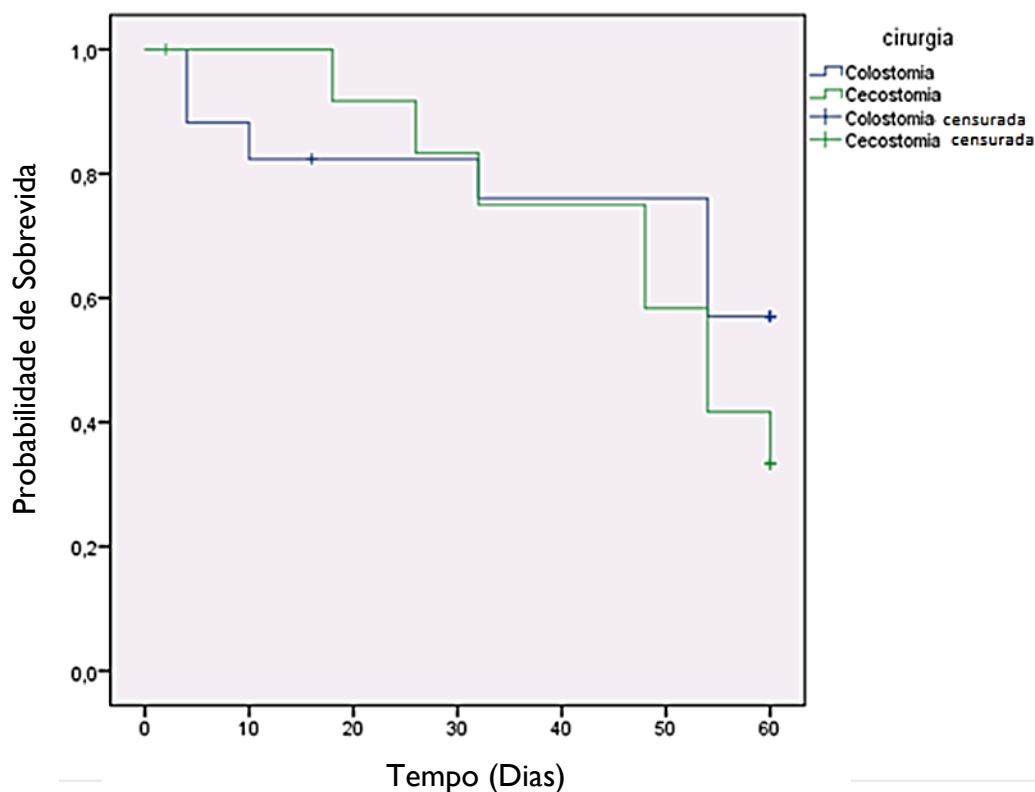


Figura 13: Curvas de Kaplan Meier representativas da probabilidade estimada de sobrevida entre as diferentes abordagens cirúrgicas, ao longo de 60 dias.

Analisando a mortalidade e a sobrevivência global dos animais submetidos as diferentes abordagens cirúrgicas, independentemente destas, observou-se [Figura 14] que o grupo de animais sobreviventes tem um ganho ponderal sensivelmente constante ao longo dos 56 dias de avaliação possíveis (teste de Friedman: $p=0,464$), principalmente até cerca do 38-40 dias, momento a partir do qual o ganho ponderal estabiliza. Contrariamente, nos animais que morrem existiu perda de massa; a tendência é no sentido de ocorrer um ganho ponderal pouco marcado, com muitas oscilações, até cerca do 38º dia, começando a haver perda de massa, em média, a partir desta data e até à morte (teste de Friedman: $p<0,001$).

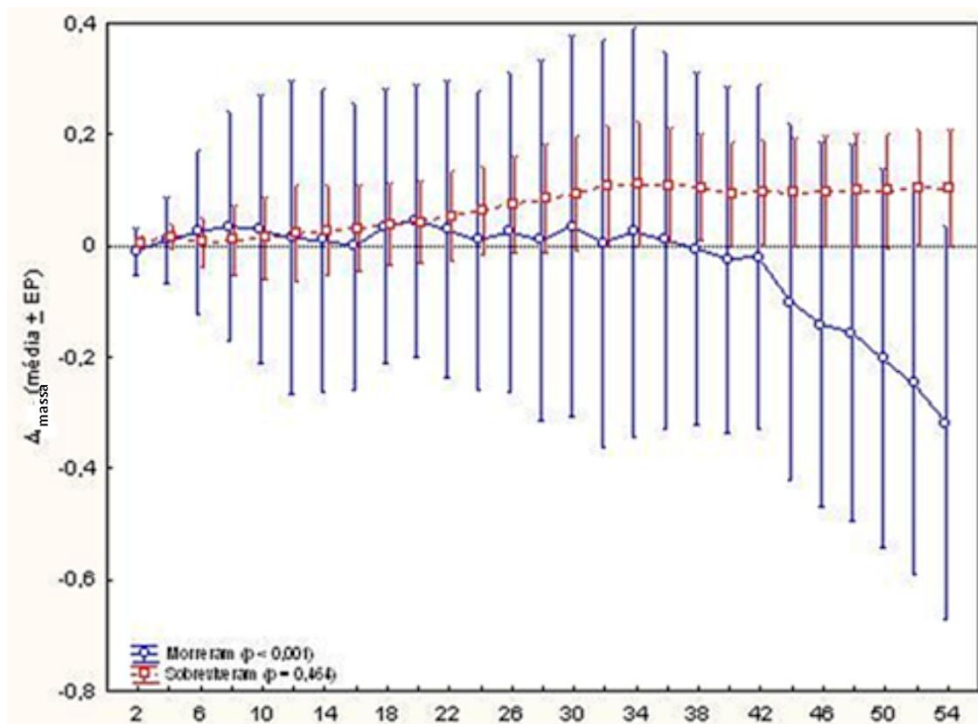


Figura 14: Gráfico representativo da variação de massa dos animais que sobreviveram e que morreram dentro de uma janela tempo de 56 dias.

Analisando a sobrevivência (tempo de *follow-up* até aos 60 dias), verificamos que o tempo médio de sobrevida é de $47,74 \pm 3,52$ dias, esperando-se que, na população, este tempo possa variar entre os 40,85 dias e os 54,64 dias, com 95% de intervalo de confiança [Figura 15].

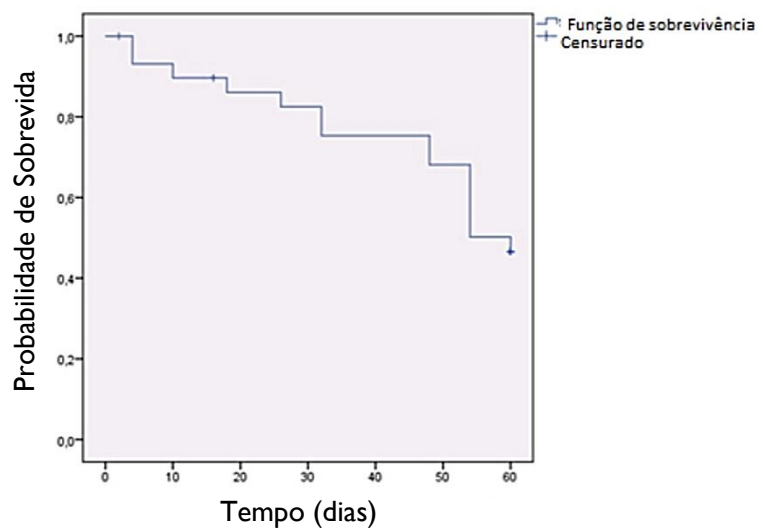


Figura 15: Curvas de Kaplan Meier representativas da probabilidade estimada de sobrevida global dos animais submetidos às diferentes abordagens cirúrgicas, ao longo de 60 dias.

2. Avaliação das Imagens com $^{99m}\text{Tc-MIBI}$

Ao longo de várias semanas após a implantação foi realizada imagiologia com $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ para verificar se havia desenvolvimento tumoral e desenvolvimento de metástases nos principais órgãos [tabela 7].

Tabela 7: Sumário de informações recolhidas da avaliação das imagens com $^{99m}\text{Tc-MIBI}$.

Animal nº	Cirurgia	Captação no local de implantação	Nº de semanas após implantação	Captação à distância.
1	Colostomia	n	-	n
4	Colostomia	n	-	n
5	Cecostomia	n	-	n
8	Colostomia	n	-	n
9	Cecostomia	s	1	n
10	Cecostomia	s	3	n
11	Colostomia	n	-	n
12	Colostomia	s	1	n
17	Colostomia	s	4	n
18	Cecostomia	n	-	n
19	Colostomia	s	4	n
21	Colostomia	s	4	n
22	Colostomia	s	4	n
24	Colostomia	s	2	n
26	Colostomia	n	-	n
27	Colostomia	s	2	n
28	Cecostomia	n	-	n
29	Cecostomia	s	2	n

s- sim; n-não

Os animais que expressaram tumor tiveram captação tumoral, contudo esta captação foi heterogénea. Os tumores que evidenciaram maior necrose tumoral na histopatologia foram os mesmos que apresentaram menores captações do radiofármaco.

Nas figuras 16a e 16b pode-se visualizar a captação do radiofármaco e observar que a captação desta é heterogénea,

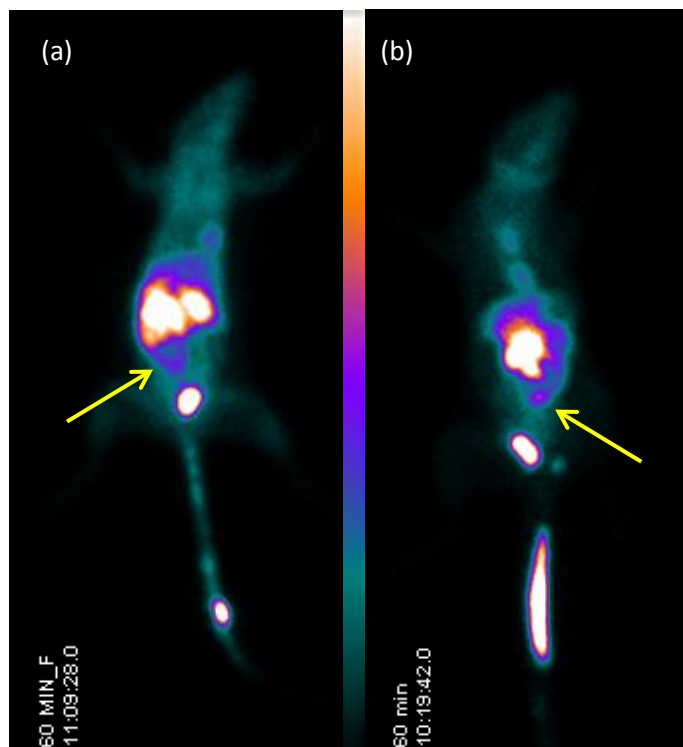


Figura 16: Imagens da captação tumoral de um animal submetido a uma cecostomia, 1 semana após implantação das células tumorais (a), e de um animal submetido a uma colostomia proximal e fistula distal, 2 semanas após a implantação das células tumorais (b). Ambas as imagens foram obtidas 60 minutos após administração do radiofármaco ($^{99m}\text{Tc-MIBI}$). As setas a amarelo indicam os locais cuja maior captação do radiofármaco na cecostomia ou na colostomia distal, demonstrando o possível sucesso da xenotransplantação.

3. Avaliação das Imagens com ^{18}F -FDG

Quatro semanas após a injeção das células tumorais foi realizada imagiologia com ^{18}F -FDG para verificar se havia desenvolvimento tumoral e desenvolvimento de metástases nos principais órgãos [tabela 8].

Tabela 8: Sumário de informações recolhidas da avaliação das imagens com ^{18}F -FDG.

Animal nº	Cirurgia	Captação no local de implantação	Captação à distância	Correlação com Histologia
4	Colostomia	n	n	-
5	Cecostomia	n	s (torácica e coluna)	Presença de BALT ¹ , sem correlação com a coluna
8	Colostomia	s	n	Não apresentou tumor primário
9	Cecostomia	s	n	Apresentou tumor primário
10	Cecostomia	s	n	Apresentou tumor primário
11	Colostomia	s	s (coluna)	Não apresentou tumor primário

s- sim; n-não

1- do inglês, *Bronchus-associated lymphoid tissue*; tecido linfoide associado aos brônquios.

Os animais que apresentaram tumores primários apresentaram captação tumoral (animal 9 e 10) [figura 17], contudo houve captação do radiofármaco, em locais sobreponíveis com o local de implantação celular em animais que não apresentaram tumor primário no estudo histológico (animal 8 e 11); por outro lado, em dois casos (animal 5 e 11) verificou-se captação do radiofármaco à distância, sendo que o animal 5 apresentou forte captação torácica [figura 18], e os animais 5 e 11 na coluna.

Nas figuras 17 e 18 pode-se visualizar a captação do radiofármaco análogo da glucose.

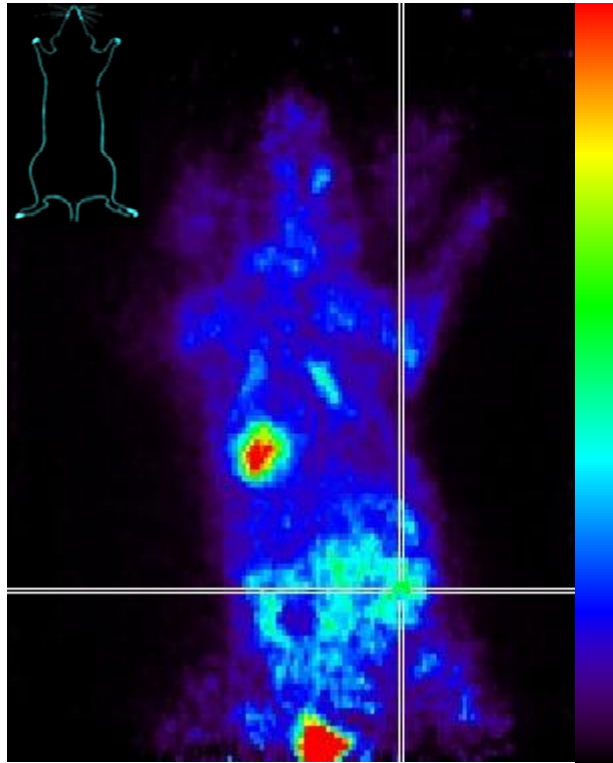


Figura 17: Imagens da captação tumoral de um animal submetido a uma cecostomia 4 semanas após a implantação das células tumorais e 45 minutos após administração do radiofármaco (^{18}F -FDG).

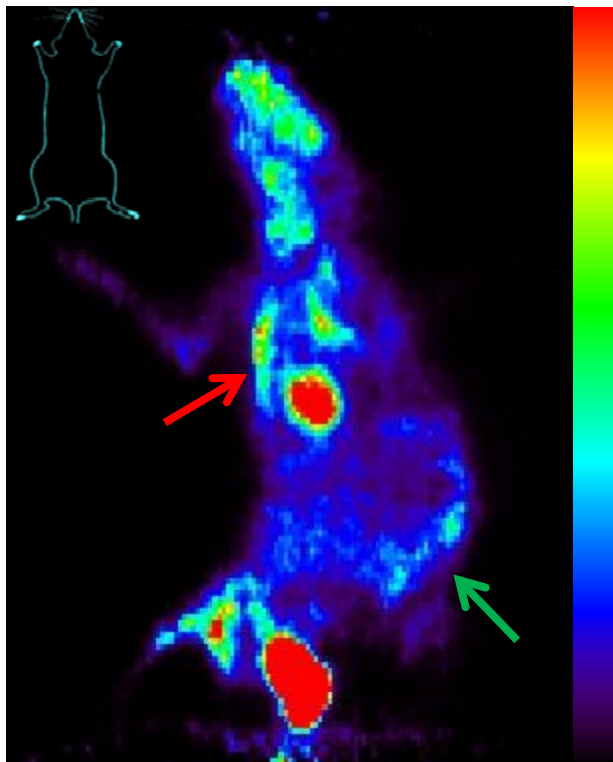


Figura 18: Imagens da captação torácica (→) e da coluna (→) de um animal submetido a uma cecostomia 4 semanas após a implantação das células tumorais e 45 minutos após administração do radiofármaco (^{18}F -FDG).

4. Análise Histopatológica

O resultado da avaliação histológica dos espécimes excisados consta da tabela 9.

Tabela 9: Resultado da avaliação histológica

Cirurgia	Desenvolvimento tumoral	Metástases encontradas em ratos com tumor		
		Metástases nos gânglios linfáticos	Metástases hepáticas	Metástases pulmonares
	Número de ratos (%)	Número de ratos (%)	Número de ratos (%)	Número de ratos (%)
Colostomia	6/13 (46%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
Cecostomia	4/10 (36%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)

Independentemente do tipo de intervenção cirúrgica realizada, os tumores desenvolvidos no local da implantação celular são adenocarcinomas invasivos moderadamente diferenciados [Figuras 19a e 19b], com padrão morfológico sobreponível ao observado nos humanos.

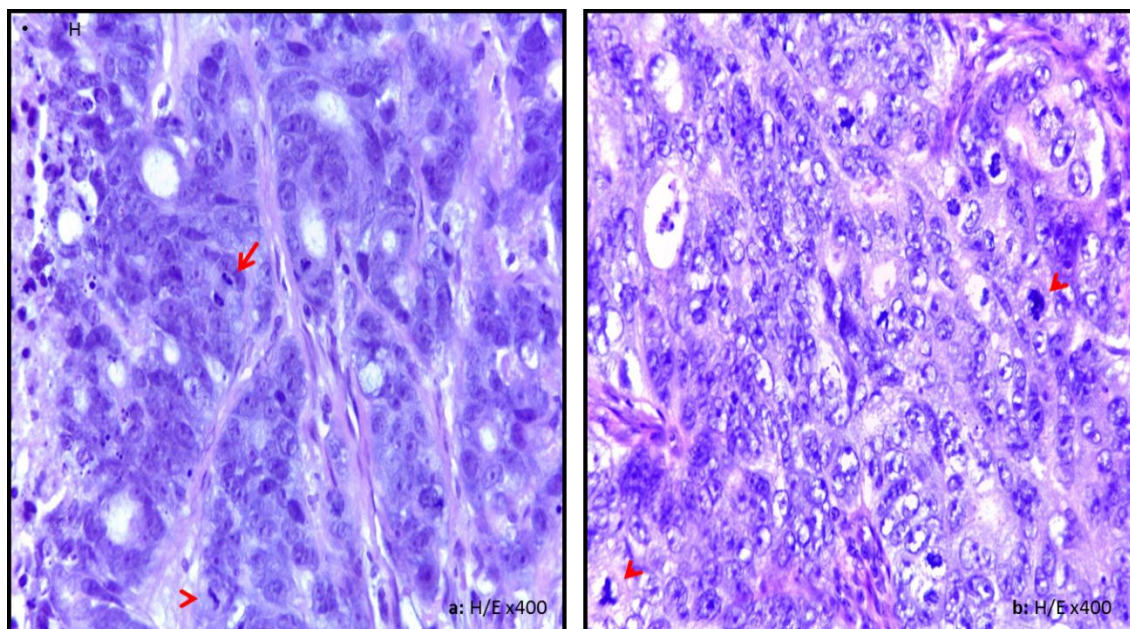


Figura 19: Aspeto microscópico dos tumores, em grande ampliação (microscópio Leica DM1000), quer no grupo das colostomias a: rato 24) quer no das cecostomias (b: rato 9). Salienta-se o *padrão arquitetural cribriforme* e o elevado número de mitoses (→).

Os tumores infiltram todas as tunicas da parede intestinal [Figura 20a e 20b], induzem o aparecimento de reacao inflamatória mononucleada [Figura 21a e 21b] e/ou reacao desmoplásica e tem necrose [Figura 22].

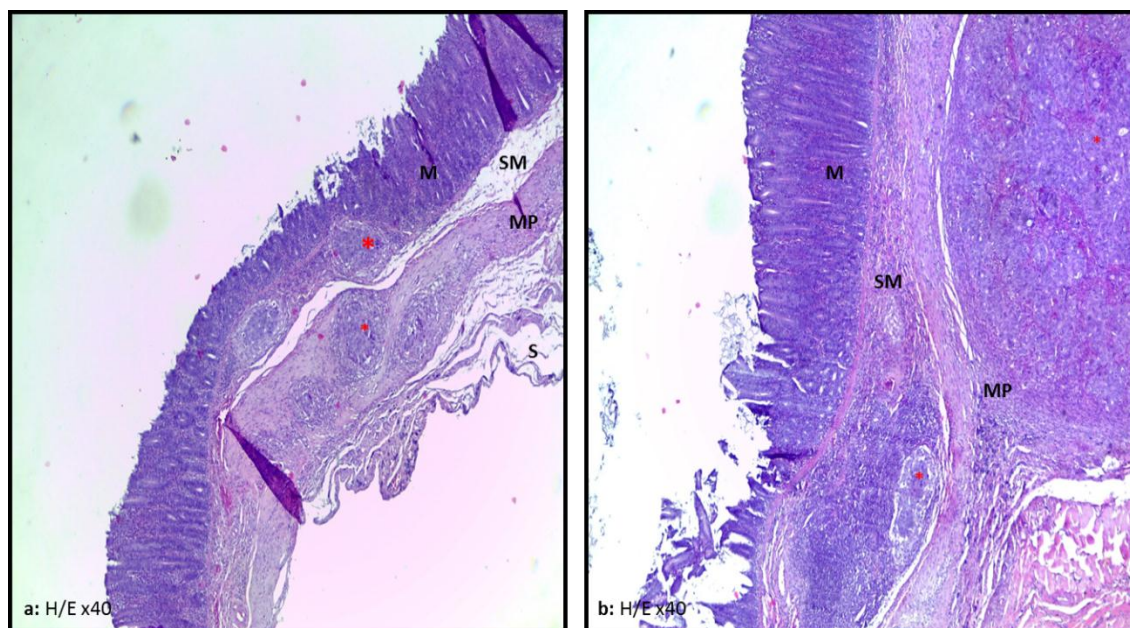


Figura 20: a, b: Rato 9 - Distribuicao transmural do tumor [*] (M – mucosa, SM – submucosa, MP – muscular própria, S - serosa).

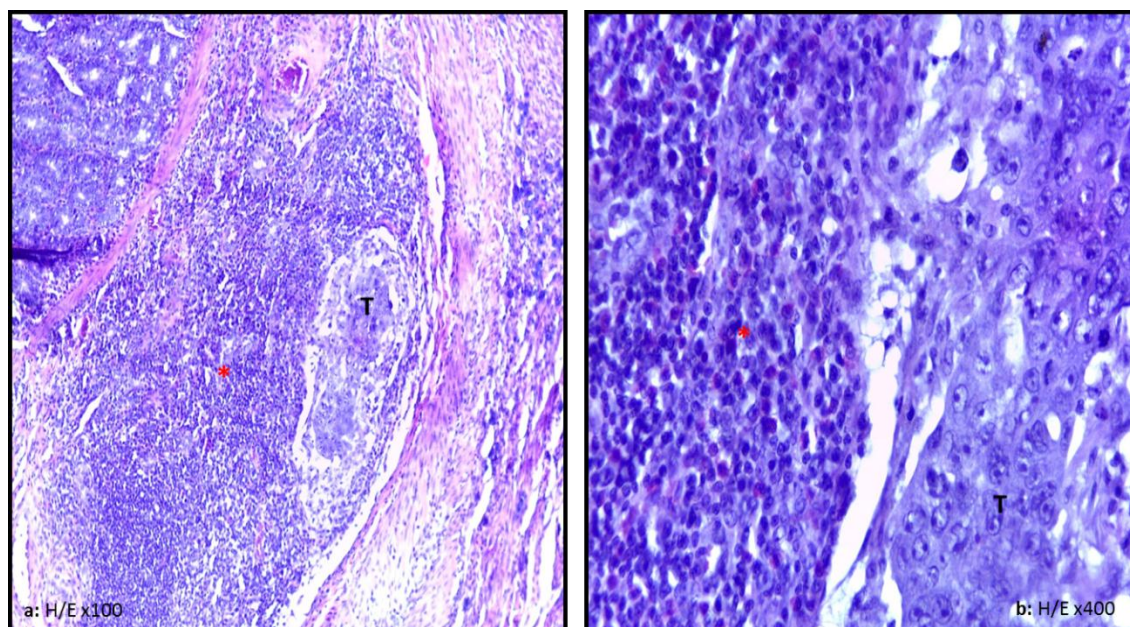


Figura 21 a, b: Rato 9 - Reacao Inflamatória (*) induzida pelo tumor (T).  constituída por células mononucleadas, focalmente associadas a eosinófilos.

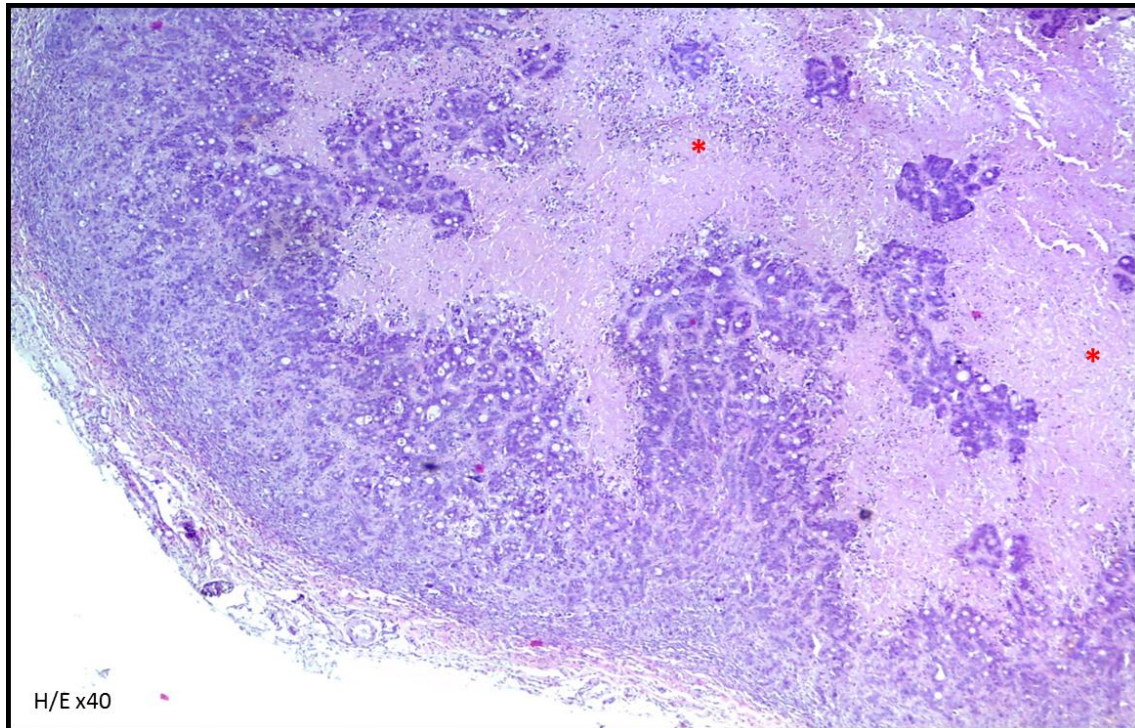


Figura 22: Rato 24 – Imagem de necrose tumoral (*).

Nenhum dos animais em que se documentou adenocarcinoma apresentou metástases, quer nos gânglios linfáticos loco-regionais quer à distância no fígado ou nos pulmões; ainda que a observação macroscópica das superfícies externa e de secção destes órgãos o sugerisse, pela presença de pequenas formações nodulares brancas [Figura 23a e 23b]. A análise microscópica revelou tratar-se de agregados inflamatórios benignos, que nos pulmões correspondem a “Tecido Linfóide Associado aos Brônquios – BALT” [Figura 24a e 24b].

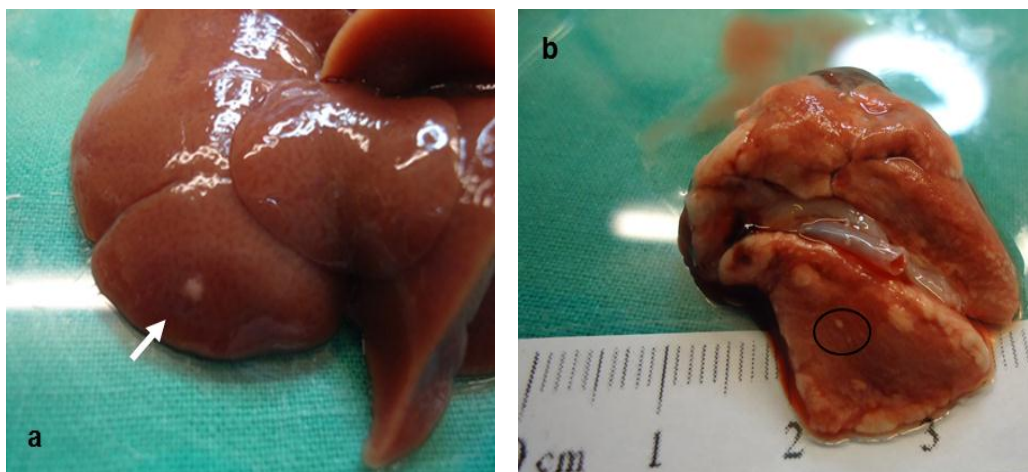


Figura 23: Rato com colostomia e fistula cutâneo-mucosa injetado com 14×10^6 células WiDr após 2 meses. Aspeto macroscópico das formações nodulares no fígado (a) e no pulmão (b).

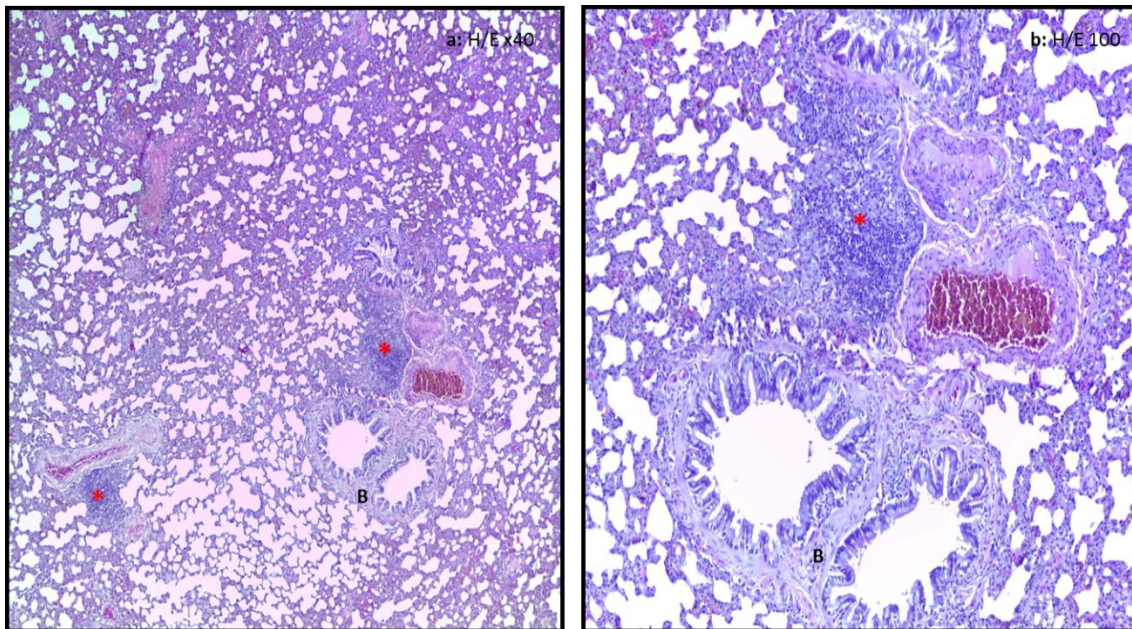


Figura 24 a, b: Rato 9: Secções histológicas das formações nodulares descritas macroscopicamente, nos pulmões (B - brônquios); e que correspondem a “BALT” (*).

Discussão

O desenho de modelos experimentais viáveis que mimetizem melhor a doença oncológica é uma vontade há muito tempo idealizada, desse modo, a concretização do primeiro modelo de xenotransplantação, em 1969 (Rygaard and Povlsen, 1969), constituiu um marco histórico científico na investigação em oncologia, tornando-se uma ferramenta imprescindível em qualquer estudo para a compreensão do cancro. Apesar das claras vantagens sobre os modelos *in vitro*, até à altura disponíveis, rapidamente as desvantagens que o modelo de xenotransplantação subcutâneo apresentava levaram à idealização de novos modelos e mais “próximos” do Homem. Foi praticamente 20 anos depois que foi apresentado o primeiro modelo ortotópico colorretal, pelo grupo de Robert Bresalier (Bresalier et al., 1987), com a implantação de células tumorais no cego de animais atímicos. Apesar das vantagens que este modelo apresentava em relação ao subcutâneo, a realidade é que o modelo teve menor aceitação por parte da comunidade científica que o modelo anterior, que continuou a singrar como modelo *in vivo* preferencialmente usado. Tal deveu-se à sua maior facilidade de manipulação e controlo da experimentação (Céspedes et al., 2006). Contudo, recentemente (2006), após se ter reconhecido o papel da interação tumor-estroma, mecanismo não evidenciado e de difícil compreensão no modelo subcutâneo (Bhowmick and Moses, 2005; Langley and Fidler, 2011; Briest et al., 2012; DeVita and Rosenberg, 2012), os modelos ortotópicos têm ganho nos últimos anos maior importância, nomeadamente pela Indústria Farmacêutica, que reconheceu nestes modelos maior interesse enquanto modelos de estudo pré-clínicos (Killion et al.; Kubota, 1994; Hoffman, 1999; Bibby, 2004; Céspedes et al., 2006). Nas últimas décadas de investigação em oncologia muito poucos ensaios clínicos de fase 3 têm qualquer tipo de sucesso, comparativamente a qualquer outra área terapêutica (Francia and Kerbel, 2010), o que sublinha a necessidade de validar o sucesso de muitas novas moléculas moléculas têm em estudos *in vitro* e *in vivo* (Matarese et al., 2012).

A ideia do desenvolvimento de modelos experimentais recorrendo a colostomia para o estudo do adenocarcinoma colorretal não é propriamente uma novidade. O primeiro modelo experimental para a compreensão do desenvolvimento deste cancro, recorrendo a esta abordagem cirúrgica, nasceu em 1994, onde submeteram ratos Fischer F344 a colostomias duplas no cólon transverso e os animais foram depois tratados com DMH (1,2-dimetilhidrazina) e MAM (acetato de metilazoximetanol), obtendo resultados muito interessantes, já que 48,1% dos tumores excisados foram identificados como adenomas e 51,9% como adenocarcinomas (Zhang and Lam, 1994). Ainda que este trabalho seja um modelo induzido, os seus resultados abriram portas para o desenvolvimento de modelos ortotópicos que possibilitassem melhor acesso e controlo da experiência. Contudo só em 2009 é que nasce o primeiro modelo ortotópico de adenocarcinoma colorretal com recurso a

colostomia, onde ratinhos atímicos sem pelo BALB/C *nu/nu* foram submetidos a colostomia em ceco (cecostomia) e sendo posteriormente implantados, na mucosa cecal, fragmentos de tumores excisados de ratinhos da mesma estirpe que haviam sido injetados subcutaneamente com células deficientes do gene *hMSH2* da linha celular LoVo (Jin et al., 2009).

É sabido que a incidência do adenocarcinoma colorretal difere nas diferentes zonas do próprio intestino grosso, já que 30% de todos os cancros colorretais surgem no colon proximal e 25% no colon sigmoide, que juntamente com a incidência do cancro do reto são os mais frequentes (Milne, 1994). Estas diferenças na incidência do cancro no cólon e reto, vêm de encontro a outros factos que se sabem sobre o intestino grosso, como as diferenças embrionárias existentes, já que o cólon proximal deriva do intestino médio embrionário, e o colon distal deriva do intestino posterior embrionário (Sadler, 2012). Tais factos levam a diferenças anatómicas como a irrigação sanguínea diferente, a expressão de diferentes antigénios, diferente metabolização de glucose e de butirato, além da própria concentração de ácidos biliares e da composição ou da população bacteriana (Bufill, 1990; Pocard et al., 1995; Distler and Holt, 1997). Mais recentemente, foi descoberto que a expressão génica é diferente em mais de 1000 genes entre estas duas regiões do intestino (Glebov et al., 2003; Birkenkamp-Demtroder et al., 2005; Meguid et al., 2008).

Deste modo o atual modelo ortotópico de adenocarcinoma colorretal, descrito anteriormente, de ceco, não mimetiza, por exemplo, a fisiopatologia do cancro do cólon esquerdo e reto.

O desenvolvimento do modelo animal de cecostomia, juntamente com o desenvolvido em 1994, da colectomia do sigmoide e formação de colostomia, foram avanços muito importantes para o desenvolvimento de um melhor modelo que viesse preencher as falhas dos modelos até agora desenvolvidos.

Modelos ortotópicos em cólon distal nunca foram descritos, tal deve-se à curta longevidade destes animais quando injetados com células tumorais humanas na mucosa do colon, que com o crescimento tumoral, leva à oclusão intestinal, e deste modo à morte precoce, sem que surjam metástases. O facto de propormos um modelo com uma colostomia para a normal eliminação das fezes e uma fístula distal na zona do cólon sigmoide de forma a se poder implantar as células tumorais humanas de cancro colorretal ou até mesmo fragmentos de tecidos, vem descorar essas limitações e é um modelo inovador.

De forma a comparar o novo modelo com o modelo de cecostomia proposto pelos autores chineses (Jin et al., 2009), submeteu-se 17 animais a colostomias proximais com fístula

distal e 13 a cecostomias, através de procedimentos de microcirurgia, tendo obtido uma mortalidade global de 20% ao fim de 18 dias.

Após uma otimização do procedimento cirúrgico da colostomia com fístula distal, de forma a adequar a abordagem do procedimento usado na prática clínica alteramos o procedimento cirúrgico proposto pelo grupo chinês, já que no procedimento proposto por este grupo, que colocam o estoma no lado esquerdo do abdómen, mesmo que não seja esta a localização do cego (Jin et al., 2009). No nosso modelo a cecostomia foi construída à direita dos animais e no caso da colostomia proximal com fístula distal os dois estomas foram colocados à esquerda do abdómen dos animais, respeitado assim a localização habitual dos diferentes segmentos do cólon,

Apesar da rápida recuperação dos animais à intervenção cirúrgica, a total normalização do trânsito intestinal foi lento. No caso dos animais submetidos a colostomias proximais, o normal retorno do funcionamento intestinal foi uma das principais dificuldades com que nos deparamos, dado que a presença de quadros de obstrução intestinal ocorreram, bem como quadros de diarreia, constituindo as principais causas de morte (4 casos). No caso dos animais submetidos a cecostomia a principal dificuldade deveu-se à difícil cicatrização, pouco tempo após a cirurgia, começavam a aparecer sinais de eritema cutâneo, devido ao contacto dos das fezes com a pele, com o aparecimento de sinais de dermatite química. Em alguns casos, os animais acabaram por desenvolver deiscência das suturas, com conseqüente prolapso intestinal e morte (2 casos).

Analisando a mortalidade observada nos 20 após a intervenção cirúrgica, a taxa de mortalidade global foi de 20% (n=6). Não se verificaram diferenças com significado estatístico quando comparamos as taxas de mortalidade de cada grupo. A mortalidade no grupo da cecostomia foi de 15,4% (2 casos) e no grupo da colostomia de 23,5% (4 casos).

Após cicatrização da cecostomias ($18,73 \pm 7,6$ dias) e do normal funcionamento intestinal dos submetidos a colostomia proximal com fístula distal ($20,77 \pm 7,0$ dias), procedemos à implantação das células da linha celular WiDr.

Através da monitorização diária e registo da massa destes animais constatou-se que, no grupo das colostomias proximais com fístula distal, houve poucas complicações após a implantação, com ganhos ponderais e crescentes de massa. No grupo da cecostomia, o padrão de ganho ponderal expressou-se de maneira totalmente diferente, que se refletiu numa maior dispersão de erros padrão, resultado das diferentes complicações associadas ao procedimento cirúrgico, já que a grande maioria destes animais apresentou quadros de dermatites químicas ligeiras, que em casos de exposição mais persistente levou ao aparecimento de pápulas

vermelhas em torno do estoma. Em situações mais raras observou-se uma resposta inflamatória mais exuberante, com o aparecimento úlceras e granulomas junto do estoma, cujas causas podem ser devidas à má cicatrização e infecção, complicações comuns ao Homem (Husain and Cataldo, 2008; Butler, 2009; Burch, 2010).

O cego do rato é metabolicamente muito ativo, e maior comparativamente ao humano, sendo uma cuba de fermentação funcional que contém concentrações elevadas de bactérias (Boivin et al., 2003; M. Treuting and M. Dintzis, 2011).

Esta abordagem cirúrgica leva a alguma exposição cutânea dos animais aos conteúdos do ceco. Tal como observado em humanos, a pele dos ratos possui as células necessárias para o início de uma resposta imunológica, que são células apresentadoras de antígenos e linfócitos, cuja função é regulada e modelada por outras células, tais como os queratinócitos, mastócitos, eosinófilos e células endoteliais (Salles et al., 2009; M. Treuting and M. Dintzis, 2011). Mesmo que estes animais possuam deficiência de células T, continuam a preservar a função das células B e expressam maior atividade das células NK (Raff and Wortis, 1970; Sprent and Miller, 1972; Herberman, 1978; Davies et al., 1983), o que apesar de alterar a atividade e a resposta imunitária, não impede que ocorra. O contato das fezes com a pele precipita esta resposta inflamatória que agrava ao longo do tempo.

Um fator muito interessante de salientar é que logo aos dois dias, após a implantação das células, existe uma tendência para que o grupo da colostomia recuperasse mais massa do que o grupo de cecostomia, mostrando a maior vulnerabilidade dos animais submetidos a cecostomias. Voltando a verificar-se este quadro em diversos períodos de tempo ao longo do estudo (entre os 10-18 dias, aos 40 dias e entre os 48 e os 60 dias).

A mortalidade comparada entre os dois grupos, apesar de não expressar uma diferença estatística significativa, mostrou uma tendência para uma maior mortalidade no grupo da cecostomia, com uma taxa de mortalidade de 63,6% (7/11 animais) o que corrobora os resultados que a monitorização e o registo de massas evidenciaram. A ocorrência de menos complicações associadas à cirurgia, levaram a uma maior longevidade e melhor progressão e evolução do xenotransplante, traduzindo-se numa menor taxa de mortalidade (30,8% - 4/13 animais), no grupo da colostomia relativamente ao da cecostomia.

A partir dos resultados obtidos também observou-se que a perda de massa acaba por ser um bom indicador da mortalidade já que o grupo de animais sobreviventes, expressaram ganhos ponderais sensivelmente constantes ao longo do tempo. Nos animais que morreram a perda de peso, é estatisticamente significativa.

As Curvas de Kaplan Meier representativas da sobrevida média entre as diferentes abordagens cirúrgicas, ao longo de 60 dias, reforçando o que mostram os outros resultados, já que mesmo sem que haja diferenças estatisticamente significativas comparando a sobrevida média entre os dois grupos de animais, há uma tendência para melhor sobrevida por parte dos animais submetidos a colostomia proximal com fístula distal.

O sucesso da implantação da celular e do desenvolvimento de tumor primário foi apesar de tudo baixo para esta linha, independentemente do tipo de intervenção cirúrgica, o que vai de encontro a outros trabalhos com recurso a esta linha, que destacam a baixa tumorigénese e a baixa taxa de metastização à distância (Wang et al., 2003; Flatmark et al., 2004). Contudo, os animais que desenvolveram tumor, quer no caso do grupo da colostomia proximal com fístula distal (6/13 casos - 46%), quer no grupo da cecostomia (4/10 casos - 40%) apresentaram adenocarcinomas invasivos moderadamente diferenciados com padrão morfológico sobreponível ao observado em humanos (Bosman et al., 2010), e semelhante ao observado no trabalho do grupo chinês (Jin et al., 2009).

Uma das desvantagens encontradas nos modelos ortotópicos em detrimento de outros é o facto de estes não apresentarem uma resposta imunitária (Céspedes et al., 2006), devido principalmente a estes animais apresentarem um sistema imunitário alterado (Herberman, 1978; Davies et al., 1983). Contudo, e partindo do que observamos pelo estudo histológico há uma forte presença de células imunitárias não só na mucosa intestinal, mas também em tecidos circundantes, e nos casos em que há presença tumoral, ainda podemos observar algum infiltrado de células imunitárias, independente da cirurgia submetida e, uma resposta inflamatória local aguda, por vezes crónica e até uma forte presença de morte celular por necrose, sem metástases à distância.

O facto é que a mutação genética induzida nestes animais que leva ao deterioramento ou ausência do timo, é tido como fator crítico na não formação de respostas imunitárias por parte destes animais, contudo esta alteração leva a que estes animais não consigam gerar linfócitos T maduros, impedindo que consigam formar a maioria das respostas imunes, já que a formação de muitos anticorpos, algumas respostas mediadas por células e a rejeição de (xeno)transplantes ser mediada por células T (auxiliares e citotóxicas), bem como glicoproteínas associadas às células T (p.e. CD4+ e CD8+). Apesar disso, respostas imunitárias associadas e despoletadas por outros tipos de células continuam ativas, além do que estes animais possuem expressões baixas de células T, e raramente estas estão completamente ausentes (Fogh and Giovanella, 1982; River, 2010).

A inflamação é um processo fisiológico em resposta a lesões tecidulares resultantes de infeções patogénicas microbianas, irritação química, e/ou feridas (Philip et al., 2004; Lu et al., 2006; Grivennikov et al., 2010). Nas primeiras fases da resposta inflamatória, os neutrófilos são as primeiras células a migrarem aos locais de inflamação sob a regulação de moléculas rapidamente produzidas por macrófagos e mastócitos dos tecidos (Coussens and Werb, 2002; Nathan, 2002; Lu et al., 2006). Com a progressão da inflamação, vários tipos de leucócitos, linfócitos e outras células inflamatórias são ativadas e atraídas ao local por uma rede de sinalização que envolve um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (Coussens and Werb, 2002; Nathan, 2002; Medzhitov, 2008). Todas as células recrutadas para o local de inflamação contribuem para a degradação do tecido e são benéficas, fortalecendo e mantendo a defesa contra a infeção (Coussens and Werb, 2002) [figura 25].

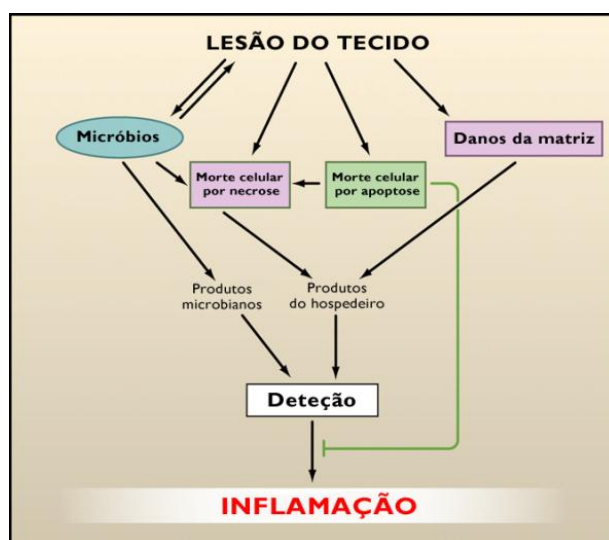


Figura 25: Início da resposta inflamatória despoletada por agentes microbianos e do tecido lesado (adaptado) (Nathan and Ding, 2010).

Contudo também existem mecanismos que previnem que a resposta inflamatória perca por demasiado tempo (Maiuri et al., 2004). A mudança de danos nos tecidos por uma ação antibacteriana para reparação dos tecidos ocorre com o auxílio de moléculas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias (Maiuri et al., 2004; Lu et al., 2006), como a prostaglandina E_2 , TGF- β e espécies reativas de oxigénio (ROS – do inglês, *Reactive Oxygen Species*) e intermediários de azoto (RNS – do inglês, *Reactive Nitrogen Species*) (Hodge-Dufour et al., 1998; Levy et al., 2001; Reuter et al., 2010). A resolução da inflamação requer também uma rápida depuração programada de células inflamatórias: desde macrófagos vizinhos, células dendríticas, e fagócitos de apoio cumpram este papel através da indução de apoptose à fagocitose (Savill et al., 1989, 2002; Savill and Fadok, 2000; Lu et al., 2006).

Porém, caso a resolução da inflamação esteja desregulada, as respostas celulares mudam para um padrão de inflamação crónica. Na inflamação crónica, os focos inflamatórios são dominados por linfócitos, células do plasma e macrófagos com morfologia variada (Philip et al., 2004; Colotta et al., 2009; Grivennikov et al., 2010). Macrófagos e outras células inflamatórias geram uma grande quantidade de fatores de crescimento, citocinas e espécies reativas de oxigénio e de azoto que podem levar a danos no DNA (Coussens and Werb, 2002; Mantovani et al., 2004; Hanahan and Weinberg, 2011). Se os macrófagos bem como outras células com ação inflamatória forem ativadas de forma persistente, estes podem levar a contínuos danos dos tecidos (Macarthur et al., 2004). Um microambiente constituído por todos os elementos descritos acima evolui numa proliferação celular sustentada induzida por danos contínuos tecidulares, que predispõem à inflamação crónica, e à neoplasia (Balkwill and Mantovani, 2001; Medzhitov, 2008).

Uma resposta inflamatória aguda pode escalar rapidamente e agravar-se, desencadeando-se a libertação de mediadores pro-inflamatórios como os eicosanóides, citocinas, quimiocinas e proteases, que levam ao recrutamento de leucócitos e sua ativação (Lawrence et al., 2002; Lawrence, 2007). Existe uma enorme capacidade de sinergia e redundância dentro desta resposta, mas diversos mediadores-chave foram identificados, cuja inibição pode levar a um profundo efeito anti-inflamatório. Um desses mediadores parece ser o TNF- α (do inglês, *Tumor necrosis factor*) que foi estabelecido como um importante alvo terapêutico numa variedade de doenças inflamatórias crónicas (Feldmann and Maini, 2003) e, que fornecem a prova mais evidente da ligação do cancro à inflamação (Moore et al., 1999; Arnott et al., 2004; Feng et al., 2010).

Apesar da inflamação progredir, por vezes, de aguda a crónica (Nathan and Ding, 2010), estes dois tipos de inflamação foram sempre tidos como atores que desempenham papéis opostos: a inflamação crónica promove o desenvolvimento tumoral, e a inflamação aguda opõe-se a esse desenvolvimento (Philip et al., 2004; Disis, 2010). A ideia desta dualidade de papéis vem por diversos estudos, principalmente na última década. Virchow observara que a inflamação crónica levava à proliferação celular e ao desenvolvimento tumoral, em 1858, contudo os patologistas prestavam pouca atenção ao facto de algum tipo de inflamação estar na maioria das vezes associada a um cancro invasivo (Balkwill and Mantovani, 2001). Além disso, estudos que demonstraram o papel oposto por parte da inflamação aguda partiram por Fehleisen (Fehleisen, 1882) e Bruns (Bruns, 1887). Estes cientistas infetaram artificialmente com a bactéria *erysipelas* e obtiveram uma dramática regressão de, por vezes, cancros incuráveis. A hipótese gerada por estes estudos levou ao desenvolvimento de um tratamento de cancro superficial de bexiga, em que após a ressecção cirúrgica, organismos vivos através da

vacina Bacillus Calmette-Guérin (BCG) são infundidos na bexiga de modo a causar uma infeção local/inflamação, que parece destruir células tumorais residuais e desse modo prevenir a recidiva (Morales et al., 1976; Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009).

Atualmente sabe-se que a progressão da inflamação aguda a crónica, é uma consequência de uma resposta imunitária inapropriada, resultando numa inflamação sem aparentes sinais de melhoria, que se acredita que cause uma “combustão latente” crónica, e por vezes subclínica podendo ser a causa de muitas doenças no Homem, nomeadamente o cancro (Nathan and Ding, 2010).

Quer a inflamação quer o cancro são processos patológicos complexos sob o controlo de muitos fatores (Coussens and Werb, 2002; Nathan, 2002; Hanahan and Weinberg, 2011), cujos papéis estão relacionados. Na figura 26, encontramos sumariados os mecanismos subjacentes ao envolvimento da inflamação no desenvolvimento do cancro, aqui brevemente abordado, apesar de muitas associações ainda estarem por revelar.

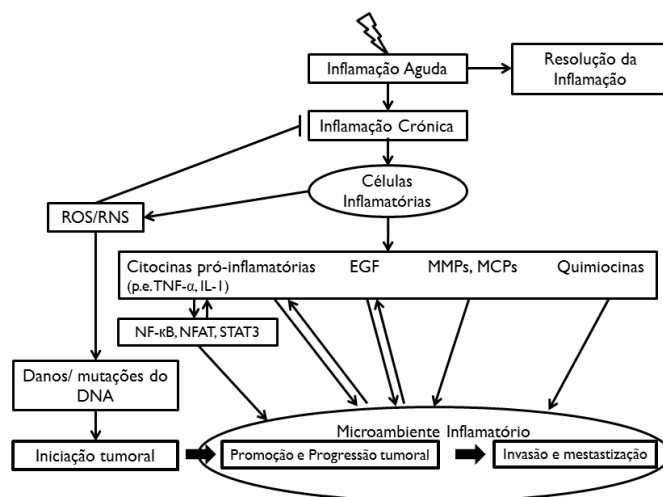


Figura 26: Infeção microbiana, irritação química e lesões dos tecidos: sumário dos mecanismos envolvidos na inflamação e no desenvolvimento do cancro (adaptado) (Lu et al., 2006).

O facto é que a partir dos resultados que fomos obtendo logo após as intervenções cirúrgicas não podemos descorar a importância que a inflamação e a resposta imunitária acabaram por trazer a este trabalho.

Os animais foram submetidos a intervenções cirúrgicas que despoletaram por si só uma resposta inflamatória normal associada. O stress induzido por cirurgia, apesar de geralmente controlado, tem como principais causas o stress fisiológico, a lesão dos tecidos, a

redistribuição do volume intracelular ou as disfunções dos órgãos (Holbrook and Udelsman, 1994), que leva ao desencadeamento de uma resposta inflamatória localizada, que ativa uma resposta mediada por citocinas.

Esta cascata inflamatória é iniciada pela produção, principalmente, de IL (interleucina) - $I\beta$ e de TNF- α seguida de IL-6 e IL-8 (Damas et al., 1997).

Já se sabe que as citocinas estão envolvidas na resposta ao tratamento cirúrgico, e a resposta sistêmica que produzem foi bem estudada e revista (Lin et al., 1998; Chalhoub et al., 2011). Esta resposta no que diz respeito a tipos de intervenções cirúrgicas específicos, como cirurgias localizadas, esta resposta também tem sido bem estudada (Tsukada et al., 1993; Ono et al., 1995; Lin et al., 1998; van Berge Henegouwen, 1998; Krohn et al., 1999; Grellner et al., 2000; Sido et al., 2004).

Estudos mostraram que especificamente intervenções cirúrgicas no abdômen, onde podemos incluir as cirurgias gastrointestinais, levam à produção exacerbada de TNF entre outras citocinas, que se podem manter elevadas durante alguns dias (Tsukada et al., 1993; Lin et al., 1998; van Berge Henegouwen, 1998; Sido et al., 2004), mas que podem manter-se elevadas na presença de complicações pós-cirúrgicas (van Berge Henegouwen et al., 1998).

Apesar de aprovado como agente anticancerígeno, o fator de necrose tumoral (TNF) foi implicado tanto no desenvolvimento como na progressão do cancro em alguns modelos pré-clínicos (Mocellin and Nitti, 2008). Em particular, como um mediador central da inflamação, o TNF pode representar uma das ligações moleculares entre inflamação crônica e subsequente desenvolvimento de doença maligna (Locksley et al., 2001; Bertazza and Mocellin, 2008, 2010; Mocellin and Nitti, 2008). Além disso, a expressão desregulada de TNF dentro do microambiente do tumor parece favorecer a invasão de tecidos malignos de células, a migração e finalmente formação de metástases (Balkwill, 2006; Mocellin and Nitti, 2008; Bertazza and Mocellin, 2010). Por outro lado, o TNF possui efeitos antitumorais, não apenas em modelos pré-clínicos, mas também no contexto clínico (van Horssen et al., 2006; Assier et al., 2012; Schneiders et al., 2012), já que o TNF é inicialmente produzido por macrófagos (tipo M1) e células NK, que também desempenham papéis antitumorais (Whiteside and Herberman, 1995; Mantovani et al., 2004).

Partindo do conhecimento acerca do TNF, o da sua dualidade de papéis e forte presença associada a intervenções cirúrgicas no abdômen, podemos afirmar que no contexto deste trabalho, esta citocina deve ser tida em conta e o seu duplo papel valorizado, já que, ainda que não quantificado, haverá fortes indícios que também possa influenciar alguns resultados obtidos. Principalmente já que poderá ajudar a compreender a baixa taxa de

sucesso de implantação celular, e de invasão celular e metastização para a linha celular utilizada, uma vez que estudos, *in vitro*, demonstram que o crescimento da linha celular usada neste trabalho, WiDr, é inibido pelo TNF- α (Sugarman et al., 1985; Sidhu and Bollon, 1993), o que neste microambiente com presença inflamatória do TNF- α , desempenhando um papel antitumoral mas também promotor da tumorigênese, acabaria por criar mais dificuldades para a instalação e promoção desta linha celular, assim como à invasão e metastização à distância.

É ainda necessário considerar na resposta imunitária inata, para além do papel dos macrófagos, as células dendríticas, os mastócitos, os linfócitos – que no caso deste modelo falamos das células B e *Natural killers* (NK) – mas também os neutrófilos e os eosinófilos, já que no estudo histológico também foi possível identificar muitas destas estruturas associadas aos tumores desenvolvidos. Estas células também desempenham, na sua maioria uma função anti e pró-tumorais (Whiteside and Herberman, 1995; de Visser et al., 2006; Disis, 2010; Grivennikov et al., 2010) [figura 27; tabela 10].

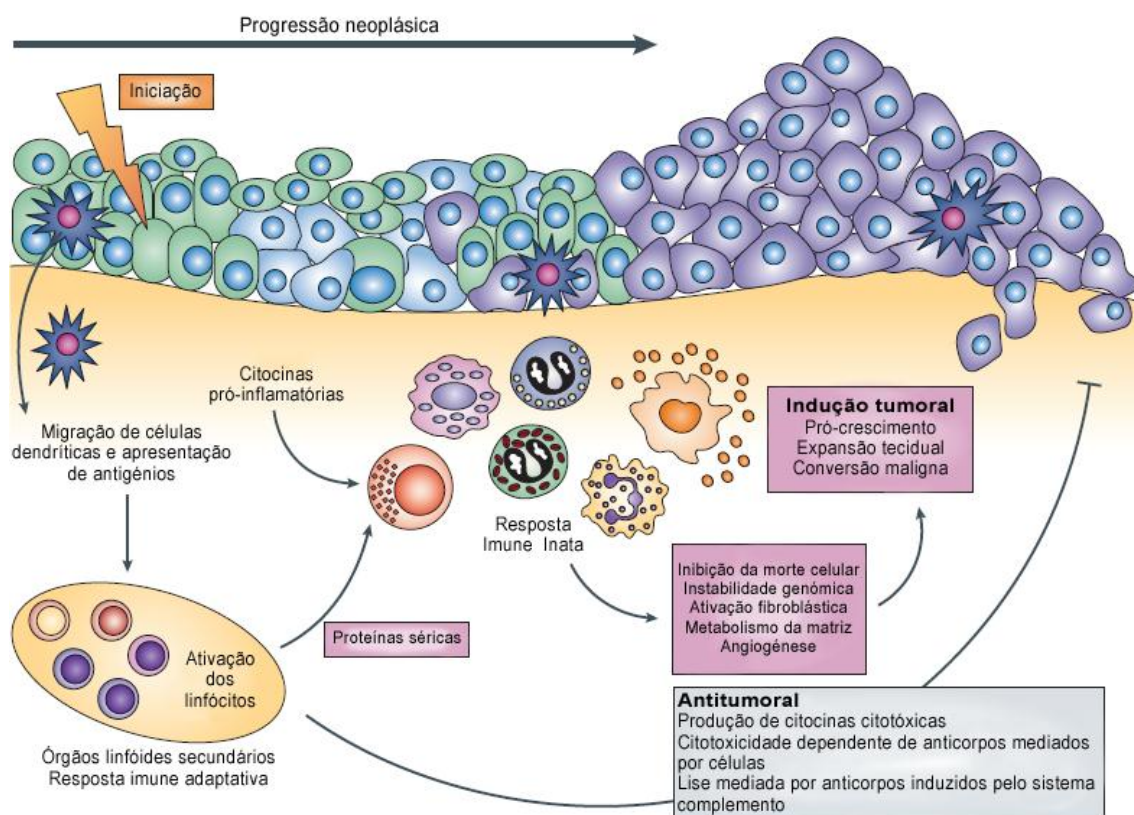


Figura 27: Modelo da função da imunidade inata e adquirida durante inflamação associada ao desenvolvimento tumoral (adaptado)(de Visser et al., 2006). Antígenos que estão presentes em tecidos em estado precoce neoplásico são transportados para os órgãos linfoides por células dendríticas que ativam respostas imunes adaptativas culminando em efeitos promotores de tumorigênese e antitumorais. A ativação das células B e respostas imunes humorais resultam na ativação crônica de células imunes inatas nos tecidos neoplásicos. Células imunes ativadas, como os mastócitos, granulócitos e macrófagos, promovem o desenvolvimento tumoral através da libertação de moléculas solúveis pró-sobrevivência que modulam programas de expressão gênica nas células neoplásicas, culminando na progressão alterada do ciclo celular e no aumento da sobrevivência destas células. Simultaneamente são ativados mecanismos que tentam deter e reparar estas alterações.

Tabela 10: Papéis desempenhados pelos diferentes subtipos de células imunes e inflamatórias na imunidade antitumoral e na inflamação pró-tumoral (Munitz and Levi-Schaffer, 2004; Grivennikov et al., 2010).

Tipos de células	Efeitos antitumorais	Efeitos pró-tumorais
Macrófagos e Células dendríticas	Apresentação de antígenos; produção de citocinas antitumorais	Imunossupressão; produção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e fatores angiogênicos.
Mastócitos		Produção de citocinas
Células NK	Citotoxicidade direta contra as células tumorais; produção de citocinas citotóxicas	
Células B	Produção de anticorpos e células imunes inatas	Produção de citocinas e anticorpos; ativação de mastócitos; imunossupressão.
Neutrófilos	Citotoxicidade direta;	Produção de citocinas, proteases e ROS.
Eosinófilos	Citotoxicidade direta	Manutenção de condições patológicas como inflamação alérgica e fibrose.

A formação de tecido linfoide associado aos brônquios (BALT) detetado pela presença de agregados linfoides encontrados na mucosa bronquial tem sido associada à defesa do pulmão contra fatores patogênicos (Gregson et al., 1979). Pode ser encontrada ao longo dos brônquios principais como acumulações densas de linfócitos e também costumam estar presentes algumas células T e B (M. Treuting and M. Dintzis, 2011).

O papel do BALT na defesa imunológica do pulmão, não é bem conhecida (Breel et al., 1988). Sendo assim, a presença deste tecido linfoide associado aos brônquios, encontra-se associado à defesa imunológica, pela presença de linfócitos (células NK e linfócitos B; os linfócitos T não se encontram presentes, pois o sistema imunitário é deficiente nestas células) uma vez que as inflamações agudas e crônicas poderiam estar a afetar o pulmão. Uma das razões para o aparecimento de BALT poderá ter sido a deficiência em células T (Kocks et al., 2007), outra das razões poderá dever-se à proteção do sistema respiratório, já que as infeções se tornaram crônicas, e agudas debilitando rapidamente os animais.

Em termos imagiológicos podemos verificar que não houve captação do radiofármaco à distância, excetuando o coração que é um local típico de marcação deste radiofármaco, concordando com os dados obtidos no estudo histológico, em que não houve formação de metástases.

A captação do radiofármaco feita no local da implantação também foi concordante com os resultados do estudo histológico.

Todos os animais que tiveram desenvolvimento tumoral apresentaram captação do radiofármaco. Mas a captação do radiofármaco apresentou diferentes intensidades, devido à presença mais elevada ou não de mitocôndrias no tecido tumoral. Os tumores que

evidenciaram maior necrose tumoral na histopatologia foram os mesmos que apresentaram menores captações do radiofármaco. Como os tumores apresentam geralmente maior concentração de mitocôndrias, o radiofármaco vai ser concentrado nos locais onde se verificam uma maior concentração de mitocôndrias (Piwnica-worms et al., 1993).

Os resultados obtidos vão de encontro e reforçam a papel que este traçador pode desempenhar no acompanhamento de resposta de tumores às terapias já que em resposta a terapia, uma menor captação tumoral pode significar morte celular associada.

Vários fatores celulares internos modulam a captação do MIBI, por exemplo, as proteínas multirresistentes da membrana (Pgp – do inglês, *P-glycoprotein* e MRPI – do inglês, *Multidrug resistance-associated protein 1*) e a proteína anti-apoptótica Bcl-2 da membrana mitocondrial externa pode limitar a retenção de MIBI. Contudo parece claro que o MIBI pode ser utilizado antes do tratamento para detetar resistência à terapêutica, avaliar estado anti-apoptótico e prever a eficácia do tratamento. Embora o MIBI possa ser utilizado para monitorizar a resposta do tumor ao tratamento, é necessário ter em conta que o MIBI é incapaz de diferenciar tumores com a apoptose em curso, daqueles que estão a desenvolver resistência a drogas (Moretti et al., 2005).

Uma grande quantidade de necrose celular acompanhada por irrigação sanguínea ineficiente e hipoxia pode alterar significativamente a cinética e reduzir a captação do MIBI em tumores. A hipoxia tecidual é um fator importante na determinação da resposta do tumor ao tratamento, e a ocorrência de células hipóxicas em tumores é uma das principais causas de insucesso da quimioterapia e radioterapia (Kinuya et al., 2002).

No contexto da quimioterapia, a absorção reduzida de MIBI está muitas vezes relacionada com a expressão de moléculas de superfície celular, a glicoproteína-P (Pgp) e proteínas associadas a multirresistência a fármacos (MRP). Assim, os tumores que não concentrem MIBI são mais propensos a deixar de responder à quimioterapia (Del Vecchio et al., 2000; Ballinger, 2001).

No que se refere aos resultados obtidos com o radiofármaco ^{18}F -FDG não houve resultados tão consensuais comparativamente aos resultados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI. Podemos afirmar que a captação do radiofármaco feita no local da implantação também foi concordante com os resultados do estudo histológico, uma vez que os dois casos sujeitos a ^{18}F -FDG PEM o estudo histológico, demonstrou a presença de tumor primário e a ausência de metástases à distância. Contudo em dois casos foi verificada captação do radiofármaco num local sobreponível com o local de injeção de células, que não mostraram no estudo histológico a presença de tumor primário. Além de que também se verificaram situações de captação à distância, principalmente marcação torácica (1 caso) e coluna (2 casos), sem que no estudo histológico fosse diagnosticada presença de metástases, mas sim a presença de BALT.

Recorrendo a esta técnica de imagiologia molecular podemos monitorizar o metabolismo de glucose nos tecidos, partindo do conhecimento que os tumores são hipermetabólicos (efeito de Warburg) (Miles and Williams, 2008). Contudo essa característica tumoral é multifatorial e muito complexa, para a qual contribuem componentes relacionados com o tumor (p.e. tipo e diferenciação histológica), alterações bioquímicas e moleculares (p.e. a via metabólica de glucose, hipoxia) e constituintes não relacionados diretamente com o tumor, como a inflamação (Haberkorn et al., 1994; Clavo et al., 1995; Pauwels et al., 1998; Mochizuki et al., 2001; Jadvar et al., 2009).

Em termos simples, postulou-se que a relação entre o crescimento tumoral e o metabolismo da glucose pode ser explicada em termos de adaptação à hipoxia através da regulação positiva de transportadores de glucose (GLUTs) e translocação e atividade enzimática aumentada de hexoquinase.

No entanto, a produção de energia através da glicólise é relativamente ineficiente (2 trifosfatos de adenosina produzida por glucose com a glicólise, em vez de 30 ATPs produzidos com oxidação completa) e produz um microambiente ácido tóxico (Gillies et al., 2008; Plathow and Weber, 2008).

Tem sido proposto que o aumento da produção de ácido extracelular pode ser a base subjacente para promover a sobrevivência e proliferação de tumores, no contexto a autossuficiência de fatores de crescimento, insensibilidade a sinais anticrescimento, evasão de apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogénese sustentada, e a invasão de tecidos e metastização. Tem sido sugerido mais duas características das células tumorais malignas que incluem a evasão dos tumores ao sistema imunitário e o aumento do metabolismo da glucose (Gambhir, 2008; Hanahan and Weinberg, 2011).

O facto é que cada vez mais estudos demonstram que este radiofármaco não é um agente específico do cancro e também pode acumular em situações de inflamação aguda, doenças granulomatosas e até doenças autoimunes (Strauss, 1996; Shreve, 1998; Nakamoto et al., 2000; Ishimori et al., 2002; Basu et al., 2009). No entanto, poucos estudos têm descrito ^{18}F -FDG sob estas condições usando modelos animais (Yamada et al., 1995; Ishimori et al., 2002; Zhuang and Alavi, 2002).

Os resultados obtidos reforçam estas afirmações, já que o facto de ter-mos observado captação do radiofármaco no local da implantação celular, sem observarmos no estudo histológico a presença de tumor, reforça a inespecificidade deste traçador e o valor que este modelo tem no desenvolvimento de novos traçadores tumorais mais específicos.

Não existem nenhuns estudos, com recurso a modelos animais, que estabeleçam uma correlação direta entre BALT e a acumulação de ^{18}F -FDG. Contudo, já é conhecida e comprovada a relação entre a infeção e a resposta imunitária e inflamatória e este traçador

(Elhaddad et al., 2004; Love et al., 2005; Pellegrino et al., 2005; Rini and Palestro, 2006; Basu et al., 2009). Além de que existem descritos, no contexto clínico, inúmeros casos de doentes cuja presença de Tecido Linfoide Associado aos Brônquios foi diagnosticado a partir de ^{18}F -FDG PET (Hashemi et al., 2007; Bae et al., 2008; Takama et al., 2010).

É também conhecido que o ^{18}F -FDG se acumula fisiologicamente na medula óssea (Cook et al., 1999). Contudo, apesar de esta acumulação ser geralmente moderada em indivíduos saudáveis, são por vezes encontrados casos de captação elevada deste radiofármaco na medula óssea em estudos PET clínicos. A significância patológica ou fisiológica das alterações na atividade do ^{18}F -FDG na medula óssea, todavia, permanece pouco clara. Mas sendo a medula óssea produtora de células hematológicas, estudos correlacionam esta captação com a atividade hematopoiética, principalmente depois de trabalhos demonstrarem uma maior atividade de medula óssea em imagens de FDG-PET, após a administração de citocinas hematopoiéticas como fator estimulante de colónias de granulócitos (G-CSF – do inglês, *Granulocyte colony-stimulating factor*) e o fator estimulante de colónias de macrófagos (GM-CSF – do inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Yao et al., 1995; Knopp et al., 1996; Hollinger et al., 1998; Sugawara et al., 1998; Kazama et al., 2005).

Diversos estudos, em diversas doenças inflamatórias, estabelecem uma forte associação entre o papel da inflamação no aumento dos níveis de citocinas (como as IL-1 e IL-6) detetados na medula óssea e o papel que o TNF- α tem neste processo, principalmente na estimulação direta das células do sangue, para a produção de citocinas pró-inflamatórias (Jongen-Lavrencic et al., 1997; Prasanna et al., 2010; Ingersoll et al., 2011).

Conclusão e perspectivas futuras

Este estudo teve como objetivo principal o desenvolvimento de novos modelos ortotópicos de adenocarcinoma colorretal, que permitam uma melhor compreensão da fisiopatologia do cancro colorretal humano comparativamente aos modelos animais existentes.

O modelo proposto para o estudo de adenocarcinomas colorretal no cólon distal, através de colostomia proximal com fístula distal associou-se a taxas de mortalidade pós-cirúrgica mais elevadas, comparativamente ao modelo até agora disponível (cecostomia), mas sem significado estatístico.

Apesar de uma maior taxa de mortalidade inicial (pós-cirúrgica), o grupo de colostomia proximal demonstrou maior recuperação e longevidade refletindo-se em ganhos de massa constantes e crescentes e culminando numa menor taxa de mortalidade 60 dias após a implantação das células tumorais.

Os animais em que foi realizada uma cecostomia, apesar de uma menor taxa de mortalidade inicial, após a cirurgia padeceram de mais complicações tais como uma maior inconstância da massa, sendo que as perdas acentuadas se refletiram numa taxa de mortalidade final maior quando comparadas com o outro grupo.

As complicações associadas a cada tipo de cirurgia foram distintas. O grupo de colostomia proximal com fístula distal apresentou quadros iniciais de obstrução e diarreia que, quando ultrapassados, não voltariam a surgir. O grupo da cecostomia apresentou uma maior diversidade de complicações, nomeadamente dermatites químicas ligeiras que em alguns casos foram evoluindo para o aparecimento de pápulas vermelhas. Que nos raros casos mais graves evoluíram para quadros de dermatites graves associadas a granulomas e placas erosionadas, as quais assemelhavam a complicações no Homem após esta intervenção cirúrgica.

Neste modelo animal, devido ao facto de o lúmen cecal se caracterizar pela presença de um número incontável de colónias bacterianas que em contacto com a pele podem desencadear uma resposta imune mais exuberante que a verificada no Homem.

A ausência de metastização locoregional e à distância (fígado e pulmão) é corroborada por outros estudos que recorreram a esta linha celular e evidenciaram baixas taxas de tumorigénese e metastização. Por outro lado, a exuberante reação inflamatória peritumoral verificada no estudo histopatológico dos tumores poderá também explicar estes resultados.

Os tumores desenvolvidos no local da implantação celular foram adenocarcinomas invasivos moderadamente diferenciados, com padrão morfológico sobreponível ao observado em humanos. Estes resultados realçam o potencial que estes modelos ortotópicos têm para o

estudo e compreensão da fisiopatologia e também para o seu uso em ensaios pré-clínicos de novos fármacos ou moléculas-alvo.

A presença de BALT foi outro fator evidenciado no trabalho reflete a resposta imunológica da espécie em causa.

Em termos imagiológicos os dois radiofármacos, ^{99m}Tc -MIBI e ^{18}F -FDG, evidenciaram a presença dos tumores primários, contudo o ^{18}F -FDG foi também captado em locais que não apresentaram desenvolvimento de tumores primários (tais como locais sobreponíveis ao da intervenção cirúrgica) e à distância, nos pulmões, mesmo que depois no estudo histológico não fossem evidenciadas metástases pulmonares mas apenas BALT. A captação também ocorreu na medula óssea. Os resultados obtidos para os dois radiofármacos vão de encontro a outros estudos (Del Vecchio et al., 2000; Ballinger, 2001; Moretti et al., 2005) que atestam o papel positivo que o ^{99m}Tc -MIBI tem no diagnóstico e deteção no estadiamento tumoral, mas também na avaliação da eficácia terapêutica às várias opções de tratamento.

Já no caso do ^{18}F -FDG, os resultados demonstraram a falta de especificidade deste radiofármaco, reforçando estudos (Love et al., 2005; Rini and Palestro, 2006; Basu et al., 2009) que realçam o potencial do mesmo na deteção de processos inflamatórios, para além do seu interesse em oncologia.

Os resultados do presente estudo permitem prespetivar as potencialidades deste modelo animal de cancro colorretal. Por um lado, o estudo do comportamento de outras linhas celulares de cancro colorretal nestes modelos, com linhas não só de cólon sigmoide mas também do cego. Por outro lado, o estudo e comparação das alterações genéticas observadas pelas diferentes linhas celulares, a estudar ao longo do crescimento e da disseminação tumorais (exemplo: as mutações *KRAS*, *TP53*, *BRAF*, entre outras).

Parece-nos, também, um modelo promissor para o estudo e compreensão da função da inflamação e da resposta imunitária na progressão e inibição tumoral, contribuindo para o conhecimento do papel de diferentes células envolvidas neste processo, como os macrófagos (M1 e M2), as células B e as NK, os eosinófilos entre outros; assim como de diferentes citocinas envolvidas no processo, dada a exuberante resposta inflamatória peri-tumoral observada no estudo histopatológico dos espécimes autópticos.

Este modelo de cancro colorretal poderá também permitir o estudo da eficácia de novos radiofármacos no que diz respeito ao diagnóstico de cancro, seu estadiamento e na avaliação da resposta terapêutica de novas opções terapêuticas desta entidade nosológica.

Deste modo, será, também, possível estudar o interesse de novas opções terapêuticas em modelos pré-clínicos e, desse modo, contribuir para alterar o prognóstico do cancro colorretal.

Bibliografia

- Abram, U., and Alberto, R. (2006). Technetium and rhenium: coordination chemistry and nuclear medical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17, 1486–1500.
- Abreu, M., Aguiar, J., Almeida, F., Almeida, P., Bento, P., Carrico, B., Ferreira, M., Ferreira, N.C., Goncalves, F., Leong, C., et al. (2006). Design and evaluation of the clear-PEM scanner for positron emission mammography. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 53, 71–77.
- Adams, J.M., and Cory, S. (1991). Transgenic models of tumor development. *Science* 254, 1161–1167.
- Alani, R.M., Silverthorn, C.F., and Orosz, K. (2004). Tumor angiogenesis in mice and men. *Cancer Biology & Therapy* 3, 498–500.
- Albano, J.D., Ward, E., Jemal, A., Anderson, R., Cokkinides, V.E., Murray, T., Henley, J., Liff, J., and Thun, M.J. (2007). Cancer mortality in the United States by education level and race. *Journal of the National Cancer Institute* 99, 1384–1394.
- Aldridge, M.C., Phillips, R.K., Hittinger, R., Fry, J.S., and Fielding, L.P. (1986). Influence of tumour site on presentation, management and subsequent outcome in large bowel cancer. *The British Journal of Surgery* 73, 663–670.
- Alexander, J. (2000). Use of transgenic mice in identifying chemopreventive agents. *Toxicology Letters* 112-113, 507–512.<
- André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., et al. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *The New England Journal of Medicine* 350, 2343–2351.
- Arnott, C.H., Scott, K.A., Moore, R.J., Robinson, S.C., Thompson, R.G., and Balkwill, F.R. (2004). Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene* 23, 1902–1910.
- Assier, E., Semerano, L., Duvallet, E., Delavallée, L., Bernier, E., Laborie, M., Grouard-Vogel, G., Larcier, P., Bessis, N., and Boissier, M.-C. (2012). Modulation of anti-tumor necrosis factor alpha (TNF- α) antibody secretion in mice immunized with TNF- α kinoid. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 19, 699–703.
- Atkin, W.S., Morson, B.C., and Cuzick, J. (1992). Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *The New England Journal of Medicine* 326, 658–662.
- Bae, Y.A., Lee, K.S., Han, J., Ko, Y.-H., Kim, B.-T., Chung, M.J., and Kim, T.S. (2008). Marginal zone B-cell lymphoma of bronchus-associated lymphoid tissue: imaging findings in 21 patients. *Chest* 133, 433–440.
- Balkwill, F. (2006). TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Reviews* 25, 409–416.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545.
- Ballinger, J.R. (2001). Imaging multidrug resistance with radiolabeled substrates for P-glycoprotein and multidrug resistance protein. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 16, 1–7.

- Balmain, A. (2002). Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models. *Cell* 108, 145–152.
- Barbarics, E., Kronauge, J.F., Davison, A., and Jones, A.G. (1998). Uptake of cationic technetium complexes in cultured human carcinoma cells and human xenografts. *Nuclear Medicine and Biology* 25, 667–673.
- Basu, S., Zhuang, H., Torigian, D.A., Rosenbaum, J., Chen, W., and Alavi, A. (2009). Functional imaging of inflammatory diseases using nuclear medicine techniques. *Seminars in Nuclear Medicine* 39, 124–145.
- Beart, R.W., Melton, L.J., Maruta, M., Dockerty, M.B., Frydenberg, H.B., and O’Fallon, W.M. (1983). Trends in right and left-sided colon cancer. *Diseases of the Colon and Rectum* 26, 393–398.
- Beart, R.W., Steele, G.D., Menck, H.R., Chmiel, J.S., Ocwieja, K.E., and Winchester, D.P. (1995). Management and survival of patients with adenocarcinoma of the colon and rectum: a national survey of the Commission on Cancer. *Journal of the American College of Surgeons* 181, 225–236.
- Belinkie, S.A., Narayanan, N.C., Russell, J.C., and Becker, D.R. (1983). Splenic abscess associated with *Streptococcus bovis* septicemia and neoplastic lesions of the colon. *Diseases of the Colon and Rectum* 26, 823–824.
- van Berge Henegouwen, M. (1998). Peritoneal Cytokine Release after Elective Gastrointestinal Surgery and Postoperative Complications. *The American Journal of Surgery* 175, 311–316.
- van Berge Henegouwen, M.I., van der Poll, T., van Deventer, S.J., and Gouma, D.J. (1998). Peritoneal cytokine release after elective gastrointestinal surgery and postoperative complications. *American Journal of Surgery* 175, 311–316.
- Bernards, R., and Weinberg, R.A. (2002). A progression puzzle. *Nature* 418, 823.
- Berns, A. (2001). Cancer. Improved mouse models. *Nature* 410, 1043–1044.
- Bertazza, L., and Mocellin, S. (2008). Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. *Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library* 13, 2736–2743.
- Bertazza, L., and Mocellin, S. (2010). The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. *Current Medicinal Chemistry* 17, 3337–3352.
- Bhowmick, N. a, and Moses, H.L. (2005). Tumor-stroma interactions. *Current Opinion in Genetics & Development* 15, 97–101.
- Bibby, M.C. (2004). Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *European Journal of Cancer* 40, 852–857.
- Bingham, S.A., Day, N.E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., et al. (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 361, 1496–1501.

- Birkenkamp-Demtroder, K., Olesen, S.H., Sørensen, F.B., Laurberg, S., Laiho, P., Aaltonen, L. a, and Orntoft, T.F. (2005). Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 54, 374–384.
- Boivin, G.P., Washington, K., Yang, K., Ward, J.M., Pretlow, T.P., Russell, R., Besselsen, D.G., Godfrey, V.L., Doetschman, T., Dove, W.F., et al. (2003). Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* 124, 762–777.
- Boland, C.R., and Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2073–2087.e3.
- Boleij, A., Schaeps, R.M.J., and Tjalsma, H. (2009). Association between *Streptococcus bovis* and colon cancer. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 516.
- Bos, P.D., Nguyen, D.X., and Massagué, J. (2010). Modeling metastasis in the mouse. *Current Opinion in Pharmacology* 10, 571–577.
- Bosman, F., Carneiro, F., Hruban, R., and Theise, N. (2010). WHO classification of tumours of the digestive system. (Lyon, France: IARC Press).
- Botteri, E., Iodice, S., Bagnardi, V., Raimondi, S., Lowenfels, A.B., and Maisonneuve, P. (2008). Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 300, 2765–2778.
- Breel, M., Van der Ende, M., Sminia, T., and Kraal, G. (1988). Subpopulations of lymphoid and non-lymphoid cells in bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) of the mouse. *Immunology* 63, 657–662.
- Bresalier, R.S., Raper, S.E., Hujanen, E.S., and Kim, Y.S. (1987). A new animal model for human colon cancer metastasis. *International Journal of Cancer*. 39, 625–630.
- Briest, F., Berndt, A., Clement, J., Junker, K., Eggeling, F. von, Grimm, S., and Friedrich, K. (2012). Tumor-stroma interactions in tumorigenesis: lessons from stem cell biology. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 4, 1871–1887.
- Bruns, P. (1887). Die heilwirkung des erysipels auf geschwulste. *Beitrage Kin Chir* 443–466.
- Bufill, J.A. (1990). Colorectal Cancer: Evidence for Distinct Genetic Categories Based on Proximal or Distal Tumor Location. *Annals of Internal Medicine* 113, 779–788.
- Burch, J. (2010). Management of stoma complications. *Nursing Times* 107, 17–18, 20.
- Burt, R.W., Barthel, J.S., Dunn, K.B., David, D.S., Drelichman, E., Ford, J.M., Giardiello, F.M., Gruber, S.B., Halverson, A.L., Hamilton, S.R., et al. (2010). NCCN clinical practice guidelines in oncology. Colorectal cancer screening. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 8, 8–61.
- Butler, D.L. (2009). Early postoperative complications following ostomy surgery: a review. *Journal of Wound, Ostomy, and Continence Nursing* 36, 513–519.
- Calle, E.E.E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., and Thun, M.J.M.J. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *New England Journal of Medicine* 348, 1625–1638.

Center, M.M., Jemal, A., and Ward, E. (2009). International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 18, 1688–1694.

Chalhoub, V., Pottecher, J., Asehnoune, K., Mazoit, J.X., Duranteau, J., and Benhamou, D. (2011). Cytokine response and reactive oxygen species production after low- and intermediate-risk surgery. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 55, 549–557.

Chan, D.S.M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., and Norat, T. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PloS One* 6, e20456.

Chao, A., Thun, M.J., Connell, C.J., McCullough, M.L., Jacobs, E.J., Flanders, W.D., Rodriguez, C., Sinha, R., and Calle, E.E. (2005). Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA* 293, 172–182.

Chen, C.-C., Yang, S.-H., Lin, J.-K., Lin, T.-C., Chen, W.-S., Jiang, J.-K., Wang, H.-S., and Chang, S.-C. (2005). Is it reasonable to add preoperative serum level of CEA and CA19-9 to staging for colorectal cancer? *The Journal of Surgical Research* 124, 169–174.

Cho, E., Smith-Warner, S.A., Ritz, J., van den Brandt, P.A., Colditz, G.A., Folsom, A.R., Freudenheim, J.L., Giovannucci, E., Goldbohm, R.A., Graham, S., et al. (2004). Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Annals of Internal Medicine* 140, 603–613.

Church, J., Burke, C., McGannon, E., Patean, O., and Clark, B. (2003). Risk of rectal cancer in patients after colectomy and ileorectal anastomosis for familial adenomatous polyposis: a function of available surgical options. *Diseases of the Colon and Rectum* 46, 1175–1181.

Clarke, A.R. (2000). Manipulating the germline: its impact on the study of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 435–441.

Clarke, R. (1996). Animal models of breast cancer: their diversity and role in biomedical research. *Breast Cancer Research and Treatment* 39, 1–6.

Clavo, A.C., Brown, R.S., and Wahl, R.L. (1995). Fluorodeoxyglucose uptake in human cancer cell lines is increased by hypoxia. *Journal of Nuclear Medicine* 36, 1625–1632.

Coleman, M.P., Quaresma, M., Berrino, F., Lutz, J.-M., De Angelis, R., Capocaccia, R., Baili, P., Rachet, B., Gatta, G., Hakulinen, T., et al. (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The Lancet Oncology* 9, 730–756.

Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073–1081.

Compton, C., Fenoglio-Preiser, C.M., Pettigrew, N., and Fielding, L.P. (2000). American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 88, 1739–1757.

Cook, G.J., Maisey, M.N., and Fogelman, I. (1999). Normal variants, artefacts and interpretative pitfalls in PET imaging with 18-fluoro-2-deoxyglucose and carbon-11 methionine. *European Journal of Nuclear Medicine* 26, 1363–1378.

- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- Crane, P., Laliberté, R., Heminway, S., Thoolen, M., and Orlandi, C. (1993). Effect of mitochondrial viability and metabolism on technetium-99m-sestamibi myocardial retention. *European Journal of Nuclear Medicine* 20, 20–25.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., et al. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 351, 337–345.
- Cutsem, E.V., Nowacki, M., and Lang, I. (2007). phase III study of irinotecan and 5-FU/FA with or without cetuximab in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): The CRYSTAL trial. *Journal of Clinical Oncology* 25, 4000.
- Céspedes, M.V., Casanova, I., Parreño, M., and Manges, R. (2006). Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clinical & Translational Oncology* 8, 318–329.
- Céspedes, M.V., Espina, C., García-Cabezas, M.A., Trias, M., Boluda, A., Gómez del Pulgar, M.T., Sancho, F.J., Nistal, M., Lacal, J.C., and Manges, R. (2007). Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *The American Journal of Pathology* 170, 1077–1085.
- Damas, P., Canivet, J.L., de Groote, D., Vrindts, Y., Albert, A., Franchimont, P., and Lamy, M. (1997). Sepsis and serum cytokine concentrations. *Critical Care Medicine* 25, 405–412.
- Davies, A.J.S., Leuchars, E., Wallis, V., and Koller, P.C. (1966). The Mitotic Response of Thymus-Derived Cells to Antigenic Stimulus. *Transplantation* 4,.
- Davies, G., Grant, A.G., Duke, D., and Hermon-Taylor, J. (1983). Antibody response of nude (RNU/RNU) and hairy (RNU/+) rats to circulating cell surface components from human pancreatic cancer xenografts. *British Journal of Cancer* 48, 239–245.
- Davies, R.J., Miller, R., and Coleman, N. (2005). Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nature Reviews. Cancer* 5, 199–209.
- DeVita, V.T., and Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research* 68, 8643–8653.
- DeVita, V.T., and Rosenberg, S. a (2012). Two hundred years of cancer research. *The New England Journal of Medicine* 366, 2207–2214.
- Deschoolmeester, V., Boeckx, C., Baay, M., Weyler, J., Wuyts, W., Van Marck, E., Peeters, M., Lardon, F., and Vermorken, J.B. (2010). KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis. *British Journal of Cancer* 103, 1627–1636.
- Diergaarde, B., Vrieling, A., van Kraats, A.A., van Muijen, G.N.P., Kok, F.J., and Kampman, E. (2003). Cigarette smoking and genetic alterations in sporadic colon carcinomas. *Carcinogenesis* 24, 565–571.
- Disis, M.L. (2010). Immune regulation of cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28, 4531–4538.

Distler, P., and Holt, P.R. (1997). Are right- and left-sided colon neoplasms distinct tumors? *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)* 15, 302–311.

Donohoe, C.L., Pidgeon, G.P., Lysaght, J., and Reynolds, J.V. (2010). Obesity and gastrointestinal cancer. *The British Journal of Surgery* 97, 628–642.

Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., et al. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355, 1041–1047.

Van Dyke, T., and Jacks, T. (2002). Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell* 108, 135–144.

Eaden, J.A., Abrams, K.R., and Mayberry, J.F. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48, 526–535.

Eccles, S.A., Box, G., Court, W., Sandle, J., and Dean, C.J. (1994). Preclinical models for the evaluation of targeted therapies of metastatic disease. *Cell Biophysics* 24-25, 279–291.

Elder, J.P., Castro, F.G., de Moor, C., Mayer, J., Candelaria, J.I., Campbell, N., Talavera, G., and Ware, L.M. (1991). Differences in cancer-risk-related behaviors in Latino and Anglo adults. *Preventive Medicine* 20, 751–763.

Elhaddad, G., Zhuang, H., Gupta, N., and Alavi, A. (2004). Evolving role of positron emission tomography in the management of patients with inflammatory and other benign disorders. *Seminars in Nuclear Medicine* 34, 313–329.

Farré, L., Casanova, I., Guerrero, S., Trias, M., Capellá, G., and Mangués, R. (2002). Heterotopic implantation alters the regulation of apoptosis and the cell cycle and generates a new metastatic site in a human pancreatic tumor xenograft model. *FASEB Journal* 16, 975–982.

Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology* 6, 479–507.

Fehleisen, F. (1882). Ueber die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. *Dtsch Med Wochenschr* 8, 553–554.

Feldmann, M., and Maini, R.N. (2003). Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nature Medicine* 9, 1245–1250.

Feng, Y., Santoriello, C., Mione, M., Hurlstone, A., and Martin, P. (2010). Live imaging of innate immune cell sensing of transformed cells in zebrafish larvae: parallels between tumor initiation and wound inflammation. *PLoS Biology* 8, e1000562.

Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*.

Fidler, I.J. (1991). Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. *Cancer Metastasis Reviews* 10, 229–243.

- Flatmark, K., Maelandsmo, G.M., Martinsen, M., Rasmussen, H., and Fodstad, Ø. (2004). Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *European Journal of Cancer* 40, 1593–1598.
- Fogh, J., and Giovanella, B. (1982). *The nude mouse in experimental and clinical research* (Academic Press).
- Francia, G., and Kerbel, R.S. (2010). Raising the bar for cancer therapy models. *Nat Biotech* 28, 561–562.
- Francini, G., Petrioli, R., Lorenzini, L., Mancini, S., Armenio, S., Tanzini, G., Marsili, S., Aquino, A., Marzocca, G., and Civitelli, S. (1994). Folinic acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Gastroenterology* 106, 899–906.
- Frattini, M., Balestra, D., Suardi, S., Oggionni, M., Alberici, P., Radice, P., Costa, A., Daidone, M.G., Leo, E., Pilotti, S., et al. (2004). Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clinical Cancer Research* 10, 4015–4021.
- Freeman, H.-J. (2008). Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology* 14, 1810–1811.
- Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Stampfer, M.J., Rosner, B., Speizer, F.E., and Willett, W.C. (1999). Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *The New England Journal of Medicine* 340, 169–176.
- Fukumoto, M. (2004). Single-photon agents for tumor imaging: ²⁰¹Tl, ^{99m}Tc-MIBI, and ^{99m}Tc-tetrofosmin. *Annals of Nuclear Medicine* 18, 79–95.
- Furukawa, T., Kubota, T., Watanabe, M., Kuo, T.H., Nishibori, H., Kase, S., Saikawa, Y., Tanino, H., Teramoto, T., and Ishibiki, K. (1993). A metastatic model of human colon cancer constructed using cecal implantation of cancer tissue in nude mice. *Surgery Today* 23, 420–423.
- Gambhir, S.S. (2008). Molecular imaging of cancer: from molecules to humans. Introduction. *Journal of Nuclear Medicine* 49 Suppl 2, 1S–4S.
- Gervaz, P., Bucher, P., and Morel, P. (2004). Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. *Journal of Surgical Oncology* 88, 261–266.
- Giantonio, B.J., Catalano, P.J., Meropol, N.J., O'Dwyer, P.J., Mitchell, E.P., Alberts, S.R., Schwartz, M.A., and Benson, A.B. (2007). Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1539–1544.
- Gillen, C.D., Walmsley, R.S., Prior, P., Andrews, H.A., and Allan, R.N. (1994). Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 35, 1590–1592.
- Gillies, R.J., Robey, I., and Gatenby, R.A. (2008). Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *Journal of Nuclear Medicine* 49 Suppl 2, 24S–42S.

Gilroy, A.M., MacPherson, B.R., Ross, L.M., Schuenke, M., Schulte, E., and Schumacher, U. (2012). *Atlas of Anatomy* (Stuttgart: Thieme).

Giovannucci, E. (2002). Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterology Clinics of North America* 31, 925–943.

Glebov, O.K., Rodriguez, L.M., Nakahara, K., Jenkins, J., Cliatt, J., Humbyrd, C., DeNobile, J., Soballe, P., Simon, R., Wright, G., et al. (2003). Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 12, 755–762.

Goldberg, R.M., Sargent, D.J., Morton, R.F., Fuchs, C.S., Ramanathan, R.K., Williamson, S.K., Findlay, B.P., Pitot, H.C., and Alberts, S.R. (2004). A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 22, 23–30.

de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., et al. (2000). Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 18, 2938–2947.

Gregson, R.L., Davey, M.J., and Prentice, D.E. (1979). The response of rat bronchus-associated lymphoid tissue to local antigenic challenge. *British Journal of Experimental Pathology* 60, 471–482.

Grellner, W., Georg, T., and Wilske, J. (2000). Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds. *Forensic Science International* 113, 251–264.

Grever, M.R., Schepartz, S.A., and Chabner, B.A. (1992). The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program. *Seminars in Oncology* 19, 622–638.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.

Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H., and Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103–106.

Gura, T. (1997). *CANCER MODELS: Systems for Identifying New Drugs Are Often Faulty*. *Science* 278, 1041–1042.

Gusella, M., Frigo, A.C., Bolzonella, C., Marinelli, R., Barile, C., Bononi, A., Crepaldi, G., Menon, D., Stievano, L., Toso, S., et al. (2009). Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 100, 1549–1557.

Haberkorn, U., Ziegler, S.I., Oberdorfer, F., Trojan, H., Haag, D., Peschke, P., Berger, M.R., Altmann, A., and van Kaick, G. (1994). FDG uptake, tumor proliferation and expression of glycolysis associated genes in animal tumor models. *Nuclear Medicine and Biology* 21, 827–834.

Hakem, R., and Mak, T.W. (2001). Animal models of tumor-suppressor genes. *Annual Review of Genetics* 35, 209–241.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hashemi, S.M.S., Heitbrink, M.A., Jiwa, M., and Boersma, W.G. (2007). A patient with endobronchial BALT lymphoma successfully treated with radiotherapy. *Respiratory Medicine* 101, 2227–2229.
- Haubner, R. (2010). PET radiopharmaceuticals in radiation treatment planning - synthesis and biological characteristics. *Radiotherapy and Oncology* 96, 280–287.
- Heijstek, M.W., Kranenburg, O., and Borel Rinkes, I.H.M. (2005). Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Digestive Surgery* 22, 16–25.
- Heinemann, V., Stintzing, S., Kirchner, T., Boeck, S., and Jung, A. (2009). Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treatment Reviews* 35, 262–271.
- Herberman, R. (1978). Natural cell-mediated cytotoxicity in nude mice. In *The Nude Mice in Experimental and Clinical Research.*, J. Fogh, and B. Herberman, eds. (New York: Academic Press), p. p. 135.
- Herzig, M., and Christofori, G. (2002). Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1602, 97–113.
- Hodge-Dufour, J., Marino, M.W., Horton, M.R., Jungbluth, a, Burdick, M.D., Strieter, R.M., Noble, P.W., Hunter, C. a, and Puré, E. (1998). Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: a potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13806–13811.
- Hoffman, R. (2002). Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models. *The Lancet Oncology* 3, 546–556.
- Hoffman, R.M. (1994). Orthotopic is orthodox: why are orthotopic-transplant metastatic models different from all other models? *Journal of Cellular Biochemistry* 56, 1–3.
- Hoffman, R.M. (1999). Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Investigational New Drugs* 17, 343–359.
- Hol, L., van Leerdam, M.E., van Ballegooijen, M., van Vuuren, A.J., van Dekken, H., Reijerink, J.C.I.Y., van der Togt, A.C.M., Habbema, J.D.F., and Kuipers, E.J. (2010). Screening for colorectal cancer: randomised trial comparing guaiac-based and immunochemical faecal occult blood testing and flexible sigmoidoscopy. *Gut* 59, 62–68.
- Holbrook, N., and Udelsman, R. (1994). 22 Heat Shock Protein Gene Expression in Response to Physiologic Stress and Aging. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* 26,.
- Hollinger, E.F., Alibazoglu, H., Ali, A., Green, A., and Lamonica, G. (1998). Hematopoietic cytokine-mediated FDG uptake simulates the appearance of diffuse metastatic disease on whole-body PET imaging. *Clinical Nuclear Medicine* 23, 93–98.

van Horsen, R., Ten Hagen, T.L.M., and Eggermont, A.M.M. (2006). TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The Oncologist* 11, 397–408.

Hughes, R. (2005). Cancer: Principles and Practice of Oncology. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 294, 747–748.

Hunter, K. (2006). Host genetics influence tumour metastasis. *Nature Reviews. Cancer* 6, 141–146.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., et al. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 350, 2335–2342.

Husain, S.G., and Cataldo, T.E. (2008). Late stomal complications. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* 21, 31–40.

Iacopetta, B. (2002). Are there two sides to colorectal cancer? *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 101, 403–408.

Ingersoll, M.A., Platt, A.M., Potteaux, S., and Randolph, G.J. (2011). Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends in Immunology* 32, 470–477.

Ishimori, T., Saga, T., Mamede, M., Kobayashi, H., Higashi, T., Nakamoto, Y., Sato, N., and Konishi, J. (2002). Increased (18)F-FDG uptake in a model of inflammation: concanavalin A-mediated lymphocyte activation. *Journal of Nuclear Medicine* 43, 658–663.

Jacks, T. (1996). Tumor suppressor gene mutations in mice. *Annual Review of Genetics* 30, 603–636.

Jadvar, H., Alavi, A., and Gambhir, S.S. (2009). 18F-FDG uptake in lung, breast, and colon cancers: molecular biology correlates and disease characterization. *Journal of Nuclear Medicine* 50, 1820–1827.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 60, 277–300.

Jess, T., Rungoe, C., and Peyrin-Biroulet, L. (2012). Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-Analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*.

Jin, H., Liu, X., Li, V.K.M., Ding, Y., Yun, S., Liu, F., Zhou, S., Song, Y., and Ni, M. (2009). A simple colostomy implantation model for evaluating colon cancer. *International Journal of Colorectal Disease* 24, 41–47.

Johnson, J.I., Decker, S., Zaharevitz, D., Rubinstein, L.V., Venditti, J.M., Schepartz, S., Kalyandrug, S., Christian, M., Arbuck, S., Hollingshead, M., et al. (2001). Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *British Journal of Cancer* 84, 1424–1431.

Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., and Lowe, S.W. (2002). Apoptosis. *Cell* 108, 153–164.

- Jongen-Lavrencic, M., Peeters, H.R., Wognum, A., Vreugdenhil, G., Breedveld, F.C., and Swaak, A.J. (1997). Elevated levels of inflammatory cytokines in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis and anemia of chronic disease. *The Journal of Rheumatology* 24, 1504–1509.
- Jonkers, J., and Berns, A. (2002). Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nature Reviews. Cancer* 2, 251–265.
- Kamb, A. (2005). Opinion: What's wrong with our cancer models? *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 161–165.
- Kazama, T., Swanston, N., Podoloff, D.A., and Macapinlac, H.A. (2005). Effect of colony-stimulating factor and conventional- or high-dose chemotherapy on FDG uptake in bone marrow. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 32, 1406–1411.
- Kewenter, J., Brevinge, H., Engarås, B., and Haglind, E. (1995). The yield of flexible sigmoidoscopy and double-contrast barium enema in the diagnosis of neoplasms in the large bowel in patients with a positive Hemoccult test. *Endoscopy* 27, 159–163.
- Khanna, C., and Hunter, K. (2005). Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 26, 513–523.
- Killion, J.J., Radinsky, R., and Fidler, I.J. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Reviews* 17, 279–284.
- Kim, J.B., O'Hare, M.J., and Stein, R. (2004). Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? *Breast Cancer Research* 6, 22–30.
- Kim, O. (2010). The hemocytometer (counting chamber).
- Kinuya, S., Yokoyama, K., Li, X.-F., Bai, J., Watanabe, N., Shuke, N., Takayama, T., Bunko, H., Michigishi, T., and Tonami, N. (2002). Hypoxia-induced alteration of tracer accumulation in cultured cancer cells and xenografts in mice: implications for pre-therapeutic prediction of treatment outcomes with (99m)Tc-sestamibi, (201)Tl chloride and (99m)Tc-HL91. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 29, 1006–1011.
- Knopp, M.V., Bischoff, H., Rimac, A., Oberdorfer, F., and van Kaick, G. (1996). Bone marrow uptake of fluorine-18-fluorodeoxyglucose following treatment with hematopoietic growth factors: initial evaluation. *Nuclear Medicine and Biology* 23, 845–849.
- Kocks, J.R., Davalos-Misslitz, A.C.M., Hintzen, G., Ohl, L., and Förster, R. (2007). Regulatory T cells interfere with the development of bronchus-associated lymphoid tissue. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 723–734.
- Kola, I., and Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews. Drug Discovery* 3, 711–715.
- Koushik, A., Hunter, D.J., Spiegelman, D., Beeson, W.L., van den Brandt, P.A., Buring, J.E., Calle, E.E., Cho, E., Fraser, G.E., Freudenheim, J.L., et al. (2007). Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies. *Journal of the National Cancer Institute* 99, 1471–1483.
- Krohn, C.D., Reikerås, O., and Aasen, A.O. (1999). The cytokines IL-1beta and IL-1 receptor antagonist, IL-2 and IL-2 soluble receptor-alpha, IL-6 and IL-6 soluble receptor, TNF-alpha and

TNF soluble receptor I, and IL10 in drained and systemic blood after major orthopaedic surgery. *The European Journal of Surgery = Acta Chirurgica* 165, 101–109.

Kubota, T. (1994). Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. *Journal of Cellular Biochemistry* 56, 4–8.

Kuo, T.H., Kubota, T., Watanabe, M., Furukawa, T., Teramoto, T., Ishibiki, K., Kitajima, M., and Hoffman, R.M. (1993). Early resection of primary orthotopically-growing human colon tumor in nude mouse prevents liver metastasis: further evidence for patient-like hematogenous metastatic route. *Anticancer Research* 13, 293–297.

Kuriki, K., and Tajima, K. (2006). The increasing incidence of colorectal cancer and the preventive strategy in Japan. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 7, 495–501.

Kurschat, P., and Mauch, C. (2006). Cancer therapy – molecular targets in tumour–host interactions. *British Journal of Cancer* 94, 1086–1086.

Langley, R.R., and Fidler, I.J. (2011). The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *International Journal of Cancer*. 128, 2527–2535.

Larsson, S.C., Giovannucci, E., Bergkvist, L., and Wolk, A. (2005a). Whole grain consumption and risk of colorectal cancer: a population-based cohort of 60,000 women. *British Journal of Cancer* 92, 1803–1807.

Larsson, S.C., Orsini, N., and Wolk, A. (2005b). Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 1679–1687.

Larsson, S.C., and Wolk, A. (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer* 119, 2657–2664.

Lawrence, T. (2007). Inflammation and cancer: a failure of resolution? *Trends in Pharmacological Sciences* 28, 162–165.

Lawrence, T., Willoughby, D.A., and Gilroy, D.W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews. Immunology* 2, 787–795.

Leber, M.F., and Efferth, T. (2009). Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *International Journal of Oncology* 34, 881–895.

Levy, B.D., Clish, C.B., Schmidt, B., Gronert, K., and Serhan, C.N. (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunology* 2, 612–619.

Levy, R.L., Finch, E.A., Crowell, M.D., Talley, N.J., and Jeffery, R.W. (2007). Behavioral intervention for the treatment of obesity: strategies and effectiveness data. *The American Journal of Gastroenterology* 102, 2314–2321.

Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature Reviews. Genetics* 2, 743–755.

Li, F., and Lai, M. (2009). Colorectal cancer, one entity or three. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 10, 219–229.

- Lieberman, D.A. (2009). Clinical practice. Screening for colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 361, 1179–1187.
- Lin, E., Kotani, J.G., and Lowry, S.F. (1998). Nutritional modulation of immunity and the inflammatory response. *Nutrition* 14, 545–550.
- Lin, O.S. (2009). Acquired risk factors for colorectal cancer. *Methods in Molecular Biology* 472, 361–372.
- Lièvre, A., Bachet, J.-B., Boige, V., Cayre, A., Le Corre, D., Buc, E., Ychou, M., Bouché, O., Landi, B., Louvet, C., et al. (2008). KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of Clinical Oncology* 26, 374–379.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487–501.
- Love, C., Tomas, M.B., Tronco, G.G., and Palestro, C.J. (2005). FDG PET of infection and inflammation. *Radiographics* 25, 1357–1368.
- Lu, H., Ouyang, W., and Huang, C. (2006). Inflammation, a key event in cancer development. *Molecular Cancer Research* 4, 221–233.
- M. Treuting, P., and M. Dintzis, S. (2011). *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas* (Academic Press).
- Macarthur, M., Hold, G.L., and El-Omar, E.M. (2004). Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 286, G515–20.
- Maffioli, L., Steens, J., Pauwels, E., and Bombardieri, E. (1996). Applications of ^{99m}Tc-sestamibi in oncology. *Tumori* 82, 12–21.
- Maiuri, M.C., Tajana, G., Iuvone, T., De Stefano, D., Mele, G., Ribecco, M.T., Cinelli, M.P., Romano, M.F., Turco, M.C., and Carnuccio, R. (2004). Nuclear factor-kappaB regulates inflammatory cell apoptosis and phagocytosis in rat carrageenin-sponge implant model. *The American Journal of Pathology* 165, 115–126.
- Mandava, N., Kumar, S., Pizzi, W.F., and Aprile, I.J. (1996). Perforated colorectal carcinomas. *American Journal of Surgery* 172, 236–238.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25, 677–686.
- Matarese, G., La Cava, A., and Horvath, T.L. (2012). In vivo veritas, in vitro artificia. *Trends in Molecular Medicine* 18, 439–442.
- Matsushita, Y., Takahashi, Y., Mizoue, T., Inoue, M., Noda, M., and Tsugane, S. (2008). Overweight and obesity trends among Japanese adults: a 10-year follow-up of the JPHC Study. *International Journal of Obesity* 32, 1861–1867.

- McClatchey, A.I. (1999). Modeling metastasis in the mouse. *Oncogene* 18, 5334–5339.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435.
- Meguid, R. a, Slidell, M.B., Wolfgang, C.L., Chang, D.C., and Ahuja, N. (2008). Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Annals of Surgical Oncology* 15, 2388–2394.
- Michels, K.B., Giovannucci, E., Chan, A.T., Singhania, R., Fuchs, C.S., and Willett, W.C. (2006). Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study. *Cancer Research* 66, 3942–3953.
- Miles, K.A., and Williams, R.E. (2008). Warburg revisited: imaging tumour blood flow and metabolism. *Cancer Imaging* 8, 81–86.
- Milne, D. (1994). Right or left, right or wrong? Debate whirls over colorectal cancer distribution. *Journal of the National Cancer Institute* 86, 1442–1443.
- Minoo, P., Zlobec, I., Peterson, M., Terracciano, L., and Lugli, A. (2010). Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. *International Journal of Oncology* 37, 707–718.
- Mocellin, S., and Nitti, D. (2008). TNF and cancer: the two sides of the coin. *Frontiers in Bioscience* 13, 2774–2783.
- Mochizuki, T., Tsukamoto, E., Kuge, Y., Kanegae, K., Zhao, S., Hikosaka, K., Hosokawa, M., Kohanawa, M., and Tamaki, N. (2001). FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models. *Journal of Nuclear Medicine* 42, 1551–1555.
- Moore, R.J., Owens, D.M., Stamp, G., Arnott, C., Burke, F., East, N., Holdsworth, H., Turner, L., Rollins, B., Pasparakis, M., et al. (1999). Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nature Medicine* 5, 828–831.
- Morales, A., Eidinger, D., and Bruce, A.W. (1976). Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *The Journal of Urology* 116, 180–183.
- Moretti, J.-L., Hauet, N., Caglar, M., Rebillard, O., and Burak, Z. (2005). To use MIBI or not to use MIBI? That is the question when assessing tumour cells. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 32, 836–842.
- Munitz, A., and Levi-Schaffer, F. (2004). Eosinophils: “new” roles for “old” cells. *Allergy* 59, 268–275.
- Nabi, H.A., and Zubeldia, J.M. (2002). Clinical applications of (18)F-FDG in oncology. *Journal of Nuclear Medicine Technology* 30, 3–9.
- Nakamoto, Y., Saga, T., Ishimori, T., Higashi, T., Mamede, M., Okazaki, K., Imamura, M., Sakahara, H., and Konishi, J. (2000). FDG-PET of autoimmune-related pancreatitis: preliminary results. *European Journal of Nuclear Medicine* 27, 1835–1838.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846–852.

- Nathan, C., and Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell* 140, 871–882.
- Noguchi, P., Wallace, R., Johnson, J., Earley, E.M., O'Brien, S., Ferrone, S., Pellegrino, M.A., Milstien, J., Needy, C., Browne, W., et al. (1979). Characterization of WiDr: A human colon carcinoma cell line. *In Vitro* 15, 401–408.
- Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., Slimani, N., Jenab, M., Mazuir, M., Overvad, K., Olsen, A., Tjønneland, A., Clavel, F., et al. (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 906–916.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.
- Ono, I., Gunji, H., Zhang, J.Z., Maruyama, K., and Kaneko, F. (1995). Studies on cytokines related to wound healing in donor site wound fluid. *Journal of Dermatological Science* 10, 241–245.
- O'Connell, M.J., Mailliard, J.A., Kahn, M.J., Macdonald, J.S., Haller, D.G., Mayer, R.J., and Wieand, H.S. (1997). Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *Journal of Clinical Oncology* 15, 246–250.
- Pantelouris, E.M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217, 370–371.
- Pauwels, E.K., Ribeiro, M.J., Stoot, J.H., McCready, V.R., Bourguignon, M., and Mazière, B. (1998). FDG accumulation and tumor biology. *Nuclear Medicine and Biology* 25, 317–322.
- Pellegrino, D., Bonab, A.A., Dragotakes, S.C., Pitman, J.T., Mariani, G., and Carter, E.A. (2005). Inflammation and infection: imaging properties of 18F-FDG-labeled white blood cells versus 18F-FDG. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 46, 1522–1530.
- Peters, U., Sinha, R., Chatterjee, N., Subar, A.F., Ziegler, R.G., Kulldorff, M., Bresalier, R., Weissfeld, J.L., Flood, A., Schatzkin, A., et al. (2003). Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet* 361, 1491–1495.
- Peterson, J.K., and Houghton, P.J. (2004). Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. *European Journal of Cancer* (40, 837–844.
- Philip, M., Rowley, D. a, and Schreiber, H. (2004). Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in Cancer Biology* 14, 433–439.
- Pickhardt, P.J., Choi, J.R., Hwang, I., Butler, J.A., Puckett, M.L., Hildebrandt, H.A., Wong, R.K., Nugent, P.A., Mysliwiec, P.A., and Schindler, W.R. (2003). Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *The New England Journal of Medicine* 349, 2191–2200.
- Pinedo, H.M., and Peters, G.F. (1988). Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *Journal of Clinical Oncology* 6, 1653–1664.
- Piwnicka-Worms, D., Kronauge, J.F., and Chiu, M.L. (1990). Uptake and retention of hexakis (2-methoxyisobutyl isonitrile) technetium(I) in cultured chick myocardial cells. Mitochondrial and plasma membrane potential dependence. *Circulation* 82, 1826–1838.

- Piwnicka-worms, D., Chiu, M.L., Budding, M., Complex, O., Chiã, M.L., Kronauge, J.F., Kramer, R.A., and Croop, J.M. (1993). Functional Imaging of Multidrug-resistant P-Glycoprotein with an Organotechnetium Complex Functional Imaging of Multidrug-resistant P-Glycoprotein with an. 977–984.
- Plathow, C., and Weber, W.A. (2008). Tumor cell metabolism imaging. *Journal of Nuclear Medicine* 49 Suppl 2, 43S–63S.
- Pocard, M., Salmon, R.J., Muleris, M., Remvikos, Y., Bara, J., Dutrillaux, B., and Poupon, M.F. (1995). [Two colons--two cancers? Proximal or distal adenocarcinoma: arguments for a different carcinogenesis]. *Bulletin Du Cancer* 82, 10–21.
- Pollak, M. (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature Reviews. Cancer* 8, 915–928.
- Popkin, B.M. (1994). The nutrition transition in low-income countries: an emerging crisis. *Nutrition Reviews* 52, 285–298.
- Prasanna, S.J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S.R., and Vasandan, A.B. (2010). Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PloS One* 5, e9016.
- Raff, M.C., and Wortis, H.H. (1970). Thymus dependence of theta-bearing cells in the peripheral lymphoid tissues of mice. *Immunology* 18, 931–942.
- Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews. Cancer* 9, 57–63.
- Ramaswamy, S., Ross, K.N., Lander, E.S., and Golub, T.R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genetics* 33, 49–54.
- Rangarajan, A., and Weinberg, R.A. (2003). Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nature Reviews. Cancer* 3, 952–959.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology & Medicine* 49, 1603–1616.
- Rex, D.K., Lehman, G.A., Hawes, R.H., Ulbright, T.M., and Smith, J.J. (1991). Screening colonoscopy in asymptomatic average-risk persons with negative fecal occult blood tests. *Gastroenterology* 100, 64–67.
- Rini, J.N., and Palestro, C.J. (2006). Imaging of infection and inflammation with 18F-FDG-labeled leukocytes. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 50, 143–146.
- River, C. (2010). *Oncology Animal Models* | Charles River. 490,.
- Rodrigues, N.R., Rowan, A., Smith, M.E., Kerr, I.B., Bodmer, W.F., Gannon, J.V., and Lane, D.P. (1990). p53 mutations in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 7555–7559.

- Rognum, T.O., Thorud, E., Elgjo, K., Brandtzaeg, P., Orjasaeter, H., and Nygaard, K. (1982). Large-bowel carcinomas with different ploidy, related to secretory component, IgA, and CEA in epithelium and plasma. *British Journal of Cancer* 45, 921–934.
- De Roock, W., De Vriendt, V., Normanno, N., Ciardiello, F., and Tejpar, S. (2011). KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *The Lancet Oncology* 12, 594–603.
- Rudolph, K.L., Millard, M., Bosenberg, M.W., and DePinho, R.A. (2001). Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nature Genetics* 28, 155–159.
- Rudolph, U., Finegold, M.J., Rich, S.S., Harriman, G.R., Srinivasan, Y., Brabet, P., Boulay, G., Bradley, A., and Birnbaumer, L. (1995). Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. *Nature Genetics* 10, 143–150.
- Runkel, N.S., Schlag, P., Schwarz, V., and Herfarth, C. (1991). Outcome after emergency surgery for cancer of the large intestine. *The British Journal of Surgery* 78, 183–188.
- Ruoslahti, E. (1999). Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Advances in Cancer Research* 76, 1–20.
- Rygaard, J., and Povlsen, C.O. (1969). Heterotransplantation of a human malignant tumour to “Nude” mice. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica* 77, 758–760.
- Sadler, T.W. (2012). *Langman’s Medical Embryology* (Baltimore, USA: Lippincott Williams & Wilkins).
- Salles, V.J.A., Saad, S.S., Franco, M.F., Matos, D., and Martins, M.R. (2009). Influência da idade e da doença colorretal na imunocompetência cutânea peri-colostômica. *Revista Brasileira De Coloproctologia* 29, 479–484.
- Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J., Maroun, J.A., Ackland, S.P., Locker, P.K., Pirotta, N., et al. (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *The New England Journal of Medicine* 343, 905–914.
- Samad, A.K.A., Taylor, R.S., Marshall, T., and Chapman, M.A.S. (2005). A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. *Colorectal Disease* 7, 204–213.
- Sauer, R., Becker, H., Hohenberger, W., Rödel, C., Wittekind, C., Fietkau, R., Martus, P., Tschmelitsch, J., Hager, E., Hess, C.F., et al. (2004). Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 351, 1731–1740.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews. Immunology* 2, 965–975.
- Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784–788.
- Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M., and Haslett, C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the

neutrophil leads to its recognition by macrophages. *The Journal of Clinical Investigation* 83, 865–875.

Schneiders, F.L., de Bruin, R.C.G., Santegoets, S.J.A.M., Bonneville, M., Scotet, E., Scheper, R.J., Verheul, H.M.W., de Gruijl, T.D., and van der Vliet, H.J. (2012). Activated iNKT cells promote V γ 9V δ 2-T cell anti-tumor effector functions through the production of TNF- α . *Clinical Immunology* 142, 194–200.

Schutte, B., Reynders, M.M., Bosman, F.T., and Blijham, G.H. (1985). Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 6, 26–30.

Shreve, P.D. (1998). Focal fluorine-18 fluorodeoxyglucose accumulation in inflammatory pancreatic disease. *European Journal of Nuclear Medicine* 25, 259–264.

Sidhu, R.S., and Bollon, A.P. (1993). Tumor necrosis factor activities and cancer therapy — A perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 57, 79–128.

Sido, B., Teklote, J.-R., Hartel, M., Friess, H., and Büchler, M.W. (2004). Inflammatory response after abdominal surgery. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 18, 439–454.

Sikder, H., Huso, D.L., Zhang, H., Wang, B., Ryu, B., Hwang, S.T., Powell, J.D., and Alani, R.M. (2003). Disruption of Id1 reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors. *Cancer Cell* 4, 291–299.

Silver, S.C. (1984). *Streptococcus bovis* endocarditis and its association with colonic carcinoma. *Diseases of the Colon and Rectum* 27, 613–614.

Skjelbred, C.F., Saebø, M., Hjartåker, A., Grotmol, T., Hansteen, I.-L., Tveit, K.M., Hoff, G., and Kure, E.H. (2007). Meat, vegetables and genetic polymorphisms and the risk of colorectal carcinomas and adenomas. *BMC Cancer* 7, 228.

Slack, N.H., and Bross, I.D. (1975). The influence of site of metastasis on tumour growth and response to chemotherapy. *British Journal of Cancer* 32, 78–86.

Slattery, M.L., Anderson, K., Curtin, K., Ma, K., Schaffer, D., Edwards, S., and Samowitz, W. (2001). Lifestyle factors and Ki-ras mutations in colon cancer tumors. *Mutation Research* 483, 73–81.

Slattery, M.L., Curtin, K., Ma, K., Edwards, S., Schaffer, D., Anderson, K., and Samowitz, W. (2002). Diet activity, and lifestyle associations with p53 mutations in colon tumors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11, 541–548.

Slattery, M.L., Curtin, K., Wolff, R.K., Boucher, K.M., Sweeney, C., Edwards, S., Caan, B.J., and Samowitz, W. (2009). A comparison of colon and rectal somatic DNA alterations. *Diseases of the Colon and Rectum* 52, 1304–1311.

Slattery, M.L., Samowitz, W., Ma, K., Murtaugh, M., Sweeney, C., Levin, T.R., and Neuhausen, S. (2004). CYP1A1, cigarette smoking, and colon and rectal cancer. *American Journal of Epidemiology* 160, 842–852.

Sprent, J., and Miller, J.F. (1972). Thoracic duct lymphocytes from nude mice: migratory properties and life-span. *European Journal of Immunology* 2, 384–387.

- Stattin, P., Lukanova, A., Biessy, C., Söderberg, S., Palmqvist, R., Kaaks, R., Olsson, T., and Jellum, E. (2004). Obesity and colon cancer: does leptin provide a link? *International Journal of Cancer* 109, 149–152.
- Strauss, L.G. (1996). Fluorine-18 deoxyglucose and false-positive results: a major problem in the diagnostics of oncological patients. *European Journal of Nuclear Medicine* 23, 1409–1415.
- Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A., and Shepard, H.M. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230, 943–945.
- Sugawara, Y., Fisher, S.J., Zasadny, K.R., Kison, P.V., Baker, L.H., and Wahl, R.L. (1998). Preclinical and clinical studies of bone marrow uptake of fluorine-1-fluorodeoxyglucose with or without granulocyte colony-stimulating factor during chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 16, 173–180.
- Swartz, M.A., Iida, N., Roberts, E.W., Sangaletti, S., Wong, M.H., Yull, F.E., Coussens, L.M., and DeClerck, Y.A. (2012). Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Research* 72, 2473–2480.
- Takama, T., Sugaya, M., Kuroda, K., Orihashi, T., Machida, K., and Matsuo, M. (2010). A Case of Mucosa-associated Lymphoid Tissue Lymphoma of the Lung Associated with Pneumoconiosis Showing FDG Accumulation on Positron-emission Tomography. *Haigan* 50, 921–925.
- Taketo, M.M., and Edelman, W. (2009). Mouse Models of Colon Cancer. *Gastroenterology* 136, 780–798.
- Thygesen, L.C., Wu, K., Grønbaek, M., Fuchs, C.S., Willett, W.C., and Giovannucci, E. (2008). Alcohol intake and colorectal cancer: a comparison of approaches for including repeated measures of alcohol consumption. *Epidemiology* 19, 258–264.
- Tilg, H., and Moschen, A.R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews. Immunology* 6, 772–783.
- Tol, J., Koopman, M., Cats, A., Rodenburg, C.J., Creemers, G.J.M., Schrama, J.G., Erdkamp, F.L.G., Vos, A.H., van Groeningen, C.J., Sinnige, H.A.M., et al. (2009). Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 360, 563–572.
- Tournigand, C., André, T., Achille, E., Lledo, G., Flesh, M., Mery-Mignard, D., Quinaux, E., Couteau, C., Buyse, M., Ganem, G., et al. (2004). FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of Clinical Oncology* 22, 229–237.
- Tseng, W., Leong, X., and Engleman, E. (2007). Orthotopic mouse model of colorectal cancer. *Journal of Visualized Experiments* 484.
- Tsukada, K., Katoh, H., Shiojima, M., Suzuki, T., Takenoshita, S., and Nagamachi, Y. (1993). Concentrations of cytokines in peritoneal fluid after abdominal surgery. *The European Journal of Surgery = Acta Chirurgica* 159, 475–479.
- Tuveson, D.A., and Jacks, T. (2002). Technologically advanced cancer modeling in mice. *Current Opinion in Genetics & Development* 12, 105–110.

Del Vecchio, S., Ciarmiello, A., and Salvatore, M. (2000). Scintigraphic detection of multidrug resistance in cancer. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 15, 327–337.

de Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews. Cancer* 6, 24–37.

Wang, M., Vogel, I., and Kalthoff, H. (2003). Correlation between metastatic potential and variants from colorectal tumor cell line HT-29. *World Journal of Gastroenterology* 9, 2627–2631.

Watson, A.J.M., and Collins, P.D. (2011). Colon cancer: a civilization disorder. *Digestive Diseases* 29, 222–228.

De Wever, O., and Mareel, M. (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *The Journal of Pathology* 200, 429–447.

Whiteside, T.L., and Herberman, R.B. (1995). The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Current Opinion in Immunology* 7, 704–710.

Winawer, S.J., Zauber, A.G., Gerdes, H., O'Brien, M.J., Gottlieb, L.S., Sternberg, S.S., Bond, J.H., Waye, J.D., Schapiro, M., and Panish, J.F. (1996). Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *The New England Journal of Medicine* 334, 82–87.

Wolmark, N., Rockette, H., Fisher, B., Wickerham, D.L., Redmond, C., Fisher, E.R., Jones, J., Mamounas, E.P., Ore, L., and Petrelli, N.J. (1993). The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *Journal of Clinical Oncology* 11, 1879–1887.

Yamada, S., Kubota, K., Kubota, R., Ido, T., and Tamahashi, N. (1995). High accumulation of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in turpentine-induced inflammatory tissue. *Journal of Nuclear Medicine* 36, 1301–1306.

Yang, Y.-X., Hennessy, S., and Lewis, J.D. (2004). Insulin therapy and colorectal cancer risk among type 2 diabetes mellitus patients. *Gastroenterology* 127, 1044–1050.

Yao, W.J., Hoh, C.K., Hawkins, R.A., Glaspy, J.A., Weil, J.A., Lee, S.J., Maddahi, J., and Phelps, M.E. (1995). Quantitative PET imaging of bone marrow glucose metabolic response to hematopoietic cytokines. *Journal of Nuclear Medicine* 36, 794–799.

Zhang, J., and Lam, L.K. (1994). Colonoscopic colostomy model in rats for colon tumorigenesis studies. *Carcinogenesis* 15, 1571–1576.

Zhuang, H., and Alavi, A. (2002). 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomographic imaging in the detection and monitoring of infection and inflammation. *Seminars in Nuclear Medicine* 32, 47–59.

(1995). Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 345, 939–944.

(1997). Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. Swedish Rectal Cancer Trial. *The New England Journal of Medicine* 336, 980–987.

(2011). Adjuvant chemotherapy for localised colon cancer. Fluorouracil + folinic acid for node-positive, non-metastatic disease. *Prescrire International* 20, 46–49.

