



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

THIAGO HENRIQUE DANIEL DO NASCIMENTO

**CORRELAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS E  
INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM CÂNCER  
COLORRETAL EM DIFERENTES ESTÁGIOS CLÍNICOS**

---

Londrina  
2020

THIAGO HENRIQUE DANIEL DO NASCIMENTO

**CORRELAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS E  
INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM CÂNCER  
COLORRETAL EM DIFERENTES ESTÁGIOS CLÍNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz.

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

N244c Nascimento, Thiago Henrique Daniel do.  
Correlação de parâmetros oxidativos e inflamatórios em pacientes com câncer colorretal em diferentes estágios clínicos / Thiago Henrique Daniel do Nascimento. - Londrina, 2020.  
68 f. : il.

Orientador: Rodrigo Cabral Luiz.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Câncer colorretal - Tese. 2. Neoplasia - Tese. 3. Citocinas pró-inflamatórias - Tese. 4. Citocinas antiinflamatórias - Tese. I. Luiz, Rodrigo Cabral. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

THIAGO HENRIQUE DANIEL DO NASCIMENTO

**CORRELAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS E  
INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM CÂNCER  
COLORRETAL EM DIFERENTES ESTÁGIOS CLÍNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini  
Armani  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Poliana Camila Marinello  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de abril de 2020.

*“Acreditar é a força que nos  
permite subir os maiores degraus na  
escada da vida” Aooow*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida que me foi concedida, pelas oportunidades diárias que tenho ao acordar bem, com saúde e disposto a ser uma pessoa melhor. Foram tempos bons e também tempos muito difíceis, ambos, importantes para meu crescimento e amadurecimento como profissional e cientista, a gratidão se dá pelo aprendizado nestes últimos dois anos.

Dedico todo meu trabalho, aos meus familiares que tanto fizeram por mim, dedico de uma maneira exclusiva todo meu esforço a meus pais, o “seu Luciano” e a “dona Cleuza”, pessoas honrosas e batalhadoras, que deixaram de lado o tempo, o sono e o cansaço para poderem me proporcionar o melhor, sempre acreditaram em meus sonhos e em minhas maiores loucuras.

Agradeço aqui de maneira especial à minha namorada, a Juliana Mondek, que esteve comigo em todos os momentos desta pós-graduação, me apoiando e me incentivando a manter o foco no objetivo e a ser uma pessoa cada vez melhor, obrigado por tudo e por tanto, te amo.

O meu maior agradecimento é ao aprendizado que tive nos últimos dois anos, percebi que tudo vai além de um artigo publicado, além de um número, de um trabalho apresentado ou um resumo enviado para algum congresso. O meu maior aprendizado foi perceber a quão majestosa é a ciência, o quanto podemos tocar e impactar vidas através do nosso trabalho, a quantidade de pessoas que conheci, que estabeleci relações, que ajudei e que me ajudaram, para mim essa é a essência da ciência. Não posso deixar de agradecer aos meus seguidores nas redes sociais em minha página @biodepressina, bioguerreiros e bioguerreiras que acompanham a rotina, as conquistas e também as angústias e aflições, vocês fazem parte da minha trajetória científica.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Rodrigo Cabral Luiz, pela oportunidade e paciência durante todo o meu período no laboratório, além da importante ajuda para desenvolver esta pesquisa. Agradeço pelo suporte prestado pela professora Dra Alessandra Lourenço Cecchini e por tantas oportunidades que me foram concedidas.

Ao Dr Jorge Mario Liberati por nos permitir desenvolver a pesquisa no Hospital Universitário de Londrina e autorizar o acesso aos pacientes. Agradeço aos pacientes pela ajuda voluntária, sem vocês este trabalho não seria possível.

À Dr<sup>a</sup> Poliana Marinello, pela humildade imensurável, pela paixão que ela sente em ajudar, isso é um talento para poucos. Agradeço às alunas de iniciação científica, Maria Beatriz, Rafaella Basso e Thaynara Andrade por toda a ajuda. Aos técnicos Jesus

(Zui) e Pedro (Pedrinho) pelo tanto que fizeram por mim, sempre muito solícitos e dispostos a me ajudar, aos meus colegas de laboratório, Isabela, Walisson, Julya Karen, Lucas Andrade, Liara Cavalcante, Dr<sup>a</sup> Fernanda Paschoal e Dr<sup>a</sup> Larissa pelo apoio e parceria na realização dos experimentos e Gabriela Melo e Rajesh Kumar pelo ótimo período de pesquisas adicionais no laboratório.

Agradeço à CAPES pelo fomento que me foi concedido e a todos os demais colaboradores que de alguma maneira, fizeram parte desta história.

*“Lembre da minha ordem: Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o Senhor, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!”* **Josué 1:9**

NASCIMENTO, Thiago Henrique Daniel; BORDINI, Heloisa Paranzini; SILVA, Isabela Chagas; BRITO, Walison Augusto da Silva; SANCHES, Larissa Juliani; LIBERATI, Mario; MARINELLO, Poliana Camila; CECCHINI, Alessandra Lourenço; LUIZ, Rodrigo Cabral. **Correlação de parâmetros oxidativos e inflamatórios em pacientes com câncer colorretal em diferentes estágios clínicos.** 2020. 68 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna que ocorre no intestino grosso, mais frequentemente nas regiões do cólon e do reto. É o terceiro tipo de câncer com maior incidência entre homens e o segundo entre mulheres. O tipo mais comum de CCR é o adenocarcinoma, responsável por 96% dos tipos de câncer colorretal. O adenocarcinoma é geralmente estabelecido a partir de pólipos adenomatosos que sofrem alterações displásicas, resultando em células malignas. Quando se tem metástase, o prognóstico é pior, pois é a principal causa de morte, neste caso a neoplasia é classificada como estágio IV, de uma classificação que vai de I a IV, de acordo com as características estabelecidas para o diagnóstico. Embora a literatura correlacione fortemente o CCR com a inflamação, ainda é escassa a relação do estresse oxidativo (EO) sistêmico desencadeado pelo processo inflamatório crônico nos pacientes com a doença, bem como a relação com o estágio clínico. Nosso trabalho tem como objetivo avaliar o perfil de estresse oxidativo e perfil inflamatório sistêmico de pacientes com câncer colorretal, correlacionando com parâmetros clínicos e com o estadiamento da doença. Foram avaliadas amostras de 36 pacientes com CCR em fase de quimioterapia e 24 pacientes saudáveis. Para os parâmetros de EO foram avaliados antioxidantes enzimáticos como catalase, superóxido dismutase e não enzimáticos como glutathione e outros marcadores de EO como malondialdeído, produto de proteínas oxidadas e lipoperoxidação de membrana. Além dos parâmetros pró e anti-inflamatórios (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  e INF- $\gamma$ ). Fizemos uma correlação entre os parâmetros inflamatórios e de EO a fim de elucidar melhor a relação. Nossos resultados indicam que com menos agentes de oxidação (malondialdeído) e mais antioxidantes (catalase), além de um aumento na citocina imunossupressora (IL-10), a carcinogênese colorretal pode estabelecer um ambiente sistêmico propício à sua progressão e, conseqüentemente, favorecimento de metástase.

**Palavras-chave:** câncer colorretal, citocinas pró-inflamatórias, citocinas anti-inflamatórias, estresse oxidativo sistêmico.

NASCIMENTO, Thiago Henrique Daniel; BORDINI, Heloisa Paranzini; SILVA, Isabela Chagas; BRITO, Walison Augusto da Silva; SANCHES, Larissa Juliani; LIBERATI, Mario; MARINELLO, Poliana Camila; CECCHINI, Alessandra Lourenço; LUIZ, Rodrigo Cabral. **Correlation of oxidative and inflammatory parameters in patients with colorectal cancer in different clinical stages.** 2020. 68 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a malignant neoplasm that occurs in the large intestine, most often in the colon and rectum regions. It is the third type of cancer with the highest incidence among men and the second among women. The most common type of CRC is adenocarcinoma, responsible for 96% of the types of colorectal cancer. Adenocarcinoma is generally established from adenomatous polyps that undergo dysplastic changes, resulting in malignant cells. When there is metastasis, the prognosis is worse, as it is the main cause of death, in this case the neoplasm is classified as stage IV, from a classification ranging from I to IV, according to the characteristics established for the diagnosis. Although the literature strongly correlates CRC with inflammation, the relationship between systemic oxidative stress (OS) triggered by the chronic inflammatory process in patients with the disease is still scarce, as well as the relationship with the clinical stage. Our work aims to evaluate the oxidative stress profile and systemic inflammatory profile of patients with colorectal cancer, correlating with clinical parameters and disease staging. Samples from 36 patients with CRC undergoing chemotherapy and 24 healthy patients were evaluated. For OS parameters, enzymatic antioxidants such as catalase, superoxide dismutase and non-enzymatic antioxidants such as glutathione and other OS markers such as malondialdehyde, product of oxidized proteins and membrane lipoperoxidation were evaluated. In addition to the pro and anti-inflammatory parameters (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  and INF- $\gamma$ ). We made a correlation between inflammatory and OS parameters in order to better elucidate the relationship. Our results indicate that with less oxidizing agents (malondialdehyde) and more antioxidants (catalase), in addition to an increase in immunosuppressive cytokine (IL-10), colorectal carcinogenesis can establish a systemic environment conducive to its progression and, consequently, favoring metastasis.

**Key words:** colorectal cancer, pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, systemic oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Progressão do câncer colorretal.....	17
<b>Figura 2</b> - Redes de citocinas na patogênese do câncer colorretal(microambiente).....	19
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática de vários ativadores e inibidores da produção de espécies reativas de oxigênio.....	22

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação TNM para estadiamento do câncer colorretal .....	15
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCR	Câncer colorretal
INCA	Instituto Nacional de Câncer
CTC	Colonografia tomográfica computadorizada
5-FU	5-fluorouracil
APC	Polipose adenomatosa coli
FCT	Fator de células T
FPL	Fator potencializador linfóide
K-ras	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ER	Espécie reativa
EO	Estresse oxidativo
DII	Doença inflamatória intestinal
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
TNF	Fator de Necrose Tumoral
IFN $\gamma$	Interferon Gama
OH•	Radical superóxido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
MDA	Malondialdeído
SOD	Superóxido dismutase
GSH-pxs	Glutaciona peroxidase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	CÂNCER COLORRETAL.....	12
1.2	CARCINOGENESE COLORRETAL.....	14
1.3	INFLAMAÇÃO NO CÂNCER COLORRETAL.....	17
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO E O CÂNCER COLORRETAL.....	20
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
3.1	OBJETIVO GERAL.....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>4</b>	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	26
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	27
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
	<b>ANEXO</b> .....	35
<b>1</b>	<b>Introducion</b> .....	38
<b>2</b>	<b>Methodology</b> .....	39
2.1	<b>Experimenal Design</b> .....	39
2.2	<b>Sample collection</b> .....	39
2.3	<b>Systemic oxidative stress</b> .....	40
2.3.1	<b>Analysis of antioxidants</b> .....	40
2.3.2	<b>Determination of membrane lipoperoxidation</b> .....	40
2.3.3	<b>Determination of malondialdehyde (MDA) levels</b> .....	41
2.3.4	<b>Determination of advanced oxidation protein products (AOPP)</b> .....	41
2.4	<b>Inflammatory profile</b> .....	41
2.5	<b>Statistical analysis</b> .....	41
<b>3</b>	<b>Results</b> .....	42
<b>4</b>	<b>Discussion</b> .....	44

<b>5</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>References .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Figures and tables .....</b>	<b>54</b>
	<b>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>64</b>

# INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer colorretal

1 O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna que ocorre  
2 no intestino grosso, atingindo com maior frequência as regiões de colo e reto. No  
3 Brasil para o ano de 2020 são estimados mais de 40 mil novos casos de CCR,  
4 sendo este o terceiro tipo de câncer com maior incidência entre os homens e o  
5 segundo entre as mulheres (INCA, 2020). Para os Estados Unidos em 2015  
6 foram estimados 1.332.085 casos de CCR (CSF, 2015) além disso, dados  
7 epidemiológicos têm revelado um aumento significativo de casos de CCR em  
8 jovens com menos de 30 anos, podendo estar relacionado com histórico familiar  
9 e fatores alimentares (WOLF et al., 2018; ARAGHI et al., 2019).

10 Aproximadamente 30% dos tipos de CCR são de origem familiar,  
11 ou seja, herdados geneticamente (JASPERSON., et al 2010), e cerca de 70-75%  
12 dos casos são esporádicos (MIGLIORE et al., 2011; JASPERSON., et al 2010).  
13 Para os casos esporádicos os principais fatores de risco para os casos  
14 esporádicos de CCR são: (i) consumo de carne vermelha e alimentos  
15 processados (ALEXANDER et al., 2015); (ii) sobrepeso (JOICHEM et al., 2016);  
16 (iii) alimentação pobre em fibras (SONG et al., 2015).

17 O tipo de CCR mais comum é o adenocarcinoma, responsável  
18 por 96% dos casos (ACS, 2020; SEGEV et al., 2020), o termo adenocarcinoma  
19 denota uma lesão em que as células epiteliais neoplásicas crescem em padrões  
20 glandulares. O adenocarcinoma geralmente se estabelece a partir de pólipos  
21 adenomatosos que sofrem alterações displásicas dando origem a células  
22 malignas (THRUMURTHY et al., 2016).

23 A suspeita de CCR ocorre a partir de sinais e sintomas como:  
24 mudança nos hábitos intestinais (constipação e estreitamento das fezes), além  
25 disso o sangramento retal, fezes com sangue e cólicas (ACS, 2020). Para  
26 confirmar a suspeita de CCR pode ser necessária a realização de mais de um  
27 exame. A colonoscopia é o exame mais frequentemente utilizado (POSTON et  
28 al., 2011). Durante a colonoscopia podem ser obtidas amostras teciduais de  
29 pólipos para a realização da histopatologia, essencial para o diagnóstico e na

1 classificação do tumor. Outros exames utilizados no diagnóstico são a  
2 colonografia tomográfica computadorizada (CTC) e a sigmoidoscopia  
3 (Mohammad & Mohammad, 2015; HOND & PARK., 2014).

4 O prognóstico depende de inúmeros fatores, especialmente pela  
5 presença de metástases, que pode ser identificada em até 20% dos pacientes e  
6 determinar um pior prognóstico (FLORIANI et al., 2010). Para o prognóstico é  
7 importante levar em consideração o estágio da doença com base na  
8 classificação TNM (Tabela 1). Para o estágio I e II não se observa a presença de  
9 metástases, sendo os mesmos determinados pelo tamanho do tumor em relação  
10 a invasão histológica local. O estágio III é caracterizado pelo escape das células  
11 tumorais para os linfonodos regionais. Já o estágio IV é caracterizado pela  
12 presença de metástases em outros tecidos (*AMERICAN CANCER SOCIETY,*  
13 *2018*).

14 A identificação da presença de metástase pode reduzir a  
15 sobrevida para aproximadamente 30 meses após o diagnóstico (CUTSEM et al.,  
16 2016). A metástase pode ser a causa da morte de pacientes com CCR e os locais  
17 mais comuns de implantação são o fígado e o peritônio (PRETZSCH et al.,  
18 2019). Desta forma o diagnóstico precoce, antes que ocorra a metástase, é  
19 essencial para garantir a sobrevida dos pacientes (WAALS et al., 2018;  
20 *AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018*).

21 A remoção cirúrgica do tumor é a forma de tratamento mais  
22 eficaz, podendo ser associada com a quimioterapia e radioterapia. O principal  
23 quimioterápico utilizado é o 5-fluorouracil (5-FU), um antimetabólito que  
24 interrompe a síntese e o reparo de DNA e RNA, levando à morte celular  
25 (BRADFORD & ZAFAR., 2011). O tratamento dos sintomas e uma readequação  
26 alimentar também podem fazer parte do processo terapêutico (WAALS et al.,  
27 *2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018*).

**Tabela 1: Classificação TNM para estadiamento do câncer colorretal.**

		<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Estágio 0		Tis	N0	M0
Estágio I		T1 ou T2	N0	M0
	II A	T3	N0	M0
Estágio II	II B	T4a	N0	M0
	II C	T4b	N0	M0
		T1 ou T2	N1/N1c	M0
	III A	T1	N2a	M0
		T3 ou T4A	N1/N1c	M0
Estágio III	III B	T2 ou T3	N2a	M0
		T1 ou T2	N2a	M0
		T4a	N2a	M0
	III C	T3 ou T4a	N2b	M0
		T4b	N1 ou N2	M0
	IV A	Qualquer T	Qualquer N	M1a
Estágio IV	IV B	Qualquer T	Qualquer N	M1b
	IV C	Qualquer T	Qualquer N	M1c

T = tumor, N = comprometimento de linfonodo e M = presença de metástase): **T**. Indica o tamanho do tumor primário e até qual região ele disseminou na parede do cólon ou do reto. **N**. É a análise para dizer se existe disseminação da doença para os linfonodos próximo ou se há evidência de metástases para surgir. **M**. Indica se existe presença de metástase em outras partes do corpo.

Fonte: Adaptado de *American Cancer Society*, 2018.

## 1.2 Carcinogênese colorretal

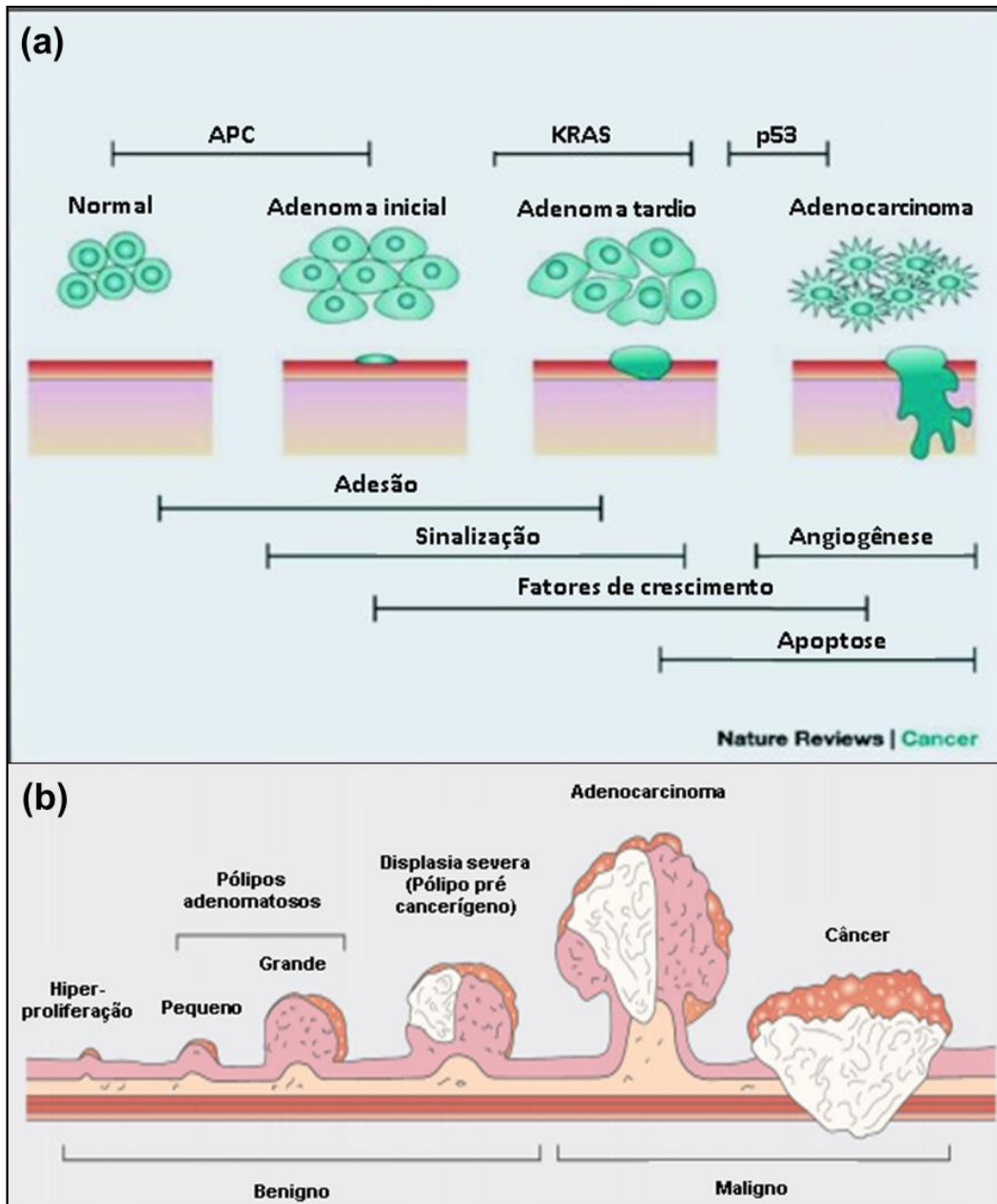
- 1 Para os casos esporádicos de CCR, isto é para casos onde a
- 2 pessoa não herdou mutações e as mesmas ocorrem em células somáticas. Em
- 3 cerca de 60% dos casos a carcinogênese obedece ao modelo proposto por

1 Vogelstein que sugere o acúmulo sucessivo de modificações genéticas  
2 relacionadas ao controle do ciclo celular levando a uma alteração do tecido  
3 normal até o surgimento do câncer (FEARON & VOGELSTEIN., 1990). O  
4 surgimento do CCR ocorre pela combinação de diferentes eventos genéticos,  
5 tais como instabilidade cromossômica, mutações gênicas, metilação aberrante  
6 de genes supressores tumorais e instabilidade de microssatélite. Dentro do  
7 processo de evolução da doença é comum observar a sequência adenoma-  
8 carcinoma, quando pólipos de tumor benigno passam a apresentar displasia  
9 (promovida por instabilidade cromossômica) e progride para um adenoma tardio  
10 e para o adenocarcinoma (Figura 1a) (THRUMURTH et al., 2016).

11 Das alterações iniciais, um dos eventos essenciais é a mutação  
12 em genes da via canônica de sinalização WNT/  $\beta$ -catenina. Um dos principais  
13 genes mutados é o gene da polipose adenomatosa colônica (APC) que é um  
14 supressor tumoral (AOKI et al., 2007). A maior parte das mutações ocorre em  
15 uma região específica chamada de “região de agrupamento de mutações”,  
16 responsável pelo reconhecimento da  $\beta$ -catenina para que seja encaminhada  
17 para destruição proteossomal (ZHANGE & SHAY., 2017; AOKI et al., 2007). A  
18 perda da capacidade de interação leva ao acúmulo intracelular de  $\beta$ -catenina  
19 permitindo que a mesma chegue até o núcleo da célula e ative fatores de  
20 transcrição gênica como o fator de células T (FCT) e do fator potencializador  
21 linfóide (FPL) que irão se acoplar a genes específicos que darão início ao ciclo  
22 celular (WETERING et al., 2002). As alterações no gene APC são seguidas de  
23 mutações no gene KRAS e Tp53 (TARIC & GHIAS 2016; ARMAGHANY et al.,  
24 2012).

25 Independente da via de sinalização comprometida, o CCR se  
26 origina a partir de células epiteliais do revestimento do cólon e reto  
27 (PANDURANGAN et al., 2018). Este epitélio é altamente sensível a mutações  
28 devido à sua alta taxa de proliferação celular (MUTO et al., 1975). Isso favorece  
29 o aparecimento de células anormais no cólon e reto, inicialmente forma-se  
30 alterações benignas como pólipos, que são caracterizados pela proliferação  
31 descontrolada das células epiteliais do cólon, a próxima etapa desta hiperplasia  
32 é a formação de um pólipo pré cancerígeno que apresenta displasia e  
33 proliferação aumentada, lesão precursora que pode evoluir para

1 adenocarcinoma (Figura 1b), esta evolução conta com diversas mutações que  
 2 vão se acumulando devido à instabilidade cromossômica que foi estabelecida e  
 3 alterações epigenéticas, que resultam em danos no DNA e perda de genes  
 4 supressores de tumores (SUBRAMANIAM et al., 2016).



**Figura 1: Progressão do câncer colorretal. (a)** Sequência adenoma-carcinoma. Adaptado de ARMAGHANY et al., 2012. **(b)** Progressão do câncer colorretal em ordem de eventos. Adaptado de THRUMURTH et al., 2016.

1 Os fatores de risco para CCR esporádico são inúmeros, dentre  
2 eles podemos destacar o consumo excessivo de carne vermelha. Durante o  
3 cozimento da carne pode haver a formação de compostos mutagênicos a partir  
4 da reação da creatinina muscular com aminoácidos e também pode ocorrer a  
5 formação de compostos N-nitrosos (PERICLEOUS et al., 2013). O grupamento  
6 heme da mioglobina da carne vermelha também pode se comportar como um  
7 agente oxidante capaz de facilitar o surgimento de compostos carcinogênicos,  
8 gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) e promover a inflamação da mucosa  
9 intestinal (ASHMORE et al., 2015).

10 O consumo de alimentos processados também pode ser um  
11 fator importante para o desenvolvimento do CCR (MAGALHAES et al., 2012;  
12 MONTEIRO et al., 2018). Apesar das qualidades como tempo de viabilidade e  
13 sabor, os alimentos processados podem trazer malefícios para o organismo,  
14 uma vez que possuem na maioria das vezes altas concentrações de gorduras  
15 saturadas, sódio e baixo teor de fibras (LOUZADA et al., 2015). Alguns agentes  
16 carcinogênicos estão presentes em alimentos processados, como a acrilamida  
17 e hidrocarbonetos aromáticos presentes em alimentos processados  
18 termicamente, por exemplo (FIOLET et al., 2018). Além disso, os alimentos  
19 processados também podem receber aditivos autorizados, como o carcinógeno  
20 nitrito de sódio (FIOLET et al., 2018; OEHHA, 2016).

21 Como observado, a alimentação é o fator mais importante para  
22 o desenvolvimento do CCR, desde a década de 70 pesquisadores já  
23 relacionavam a neoplasia maligna de colón e reto com fatores alimentares  
24 (BURKITT., 1971) como por exemplo o baixo consumo de fibras (KUNZMANN  
25 et al., 2015). Todos os fatores de risco mencionados têm como parte de sua ação  
26 agressora a ativação de resposta inflamatória local que tem forte correlação com  
27 o CCR (DENG et al., 2016).

## **1.2 Inflamação no câncer colorretal**

28 Pacientes com doenças inflamatórias crônicas como a doença  
29 inflamatória intestinal (DII), como a colite ulcerosa e a doença de Crohn, podem  
30 apresentar maior chance de desenvolver CCR (MUNKHOLM., 2003 GILLEN et

1 al., 1994). Atualmente, a inflamação é considerada um importante fator envolvido  
2 não apenas no surgimento, como na progressão do CCR (TERZIĆ et al., 2010).  
3 Durante a inflamação a ativação de leucócitos que são recrutados, o que resulta  
4 em aumento da produção, liberação e acúmulo de espécies reativas de oxigênio  
5 (ERO) (JANAKIRAM., et al 2014). Em estágios avançados e detectáveis, o CCR  
6 apresenta um aumento expressivo de citocinas pró-inflamatórias no plasma e no  
7 tecido (TERZIĆ et al., 2010; NAGASAKI et al., 2014; ZENG et al., 2017).

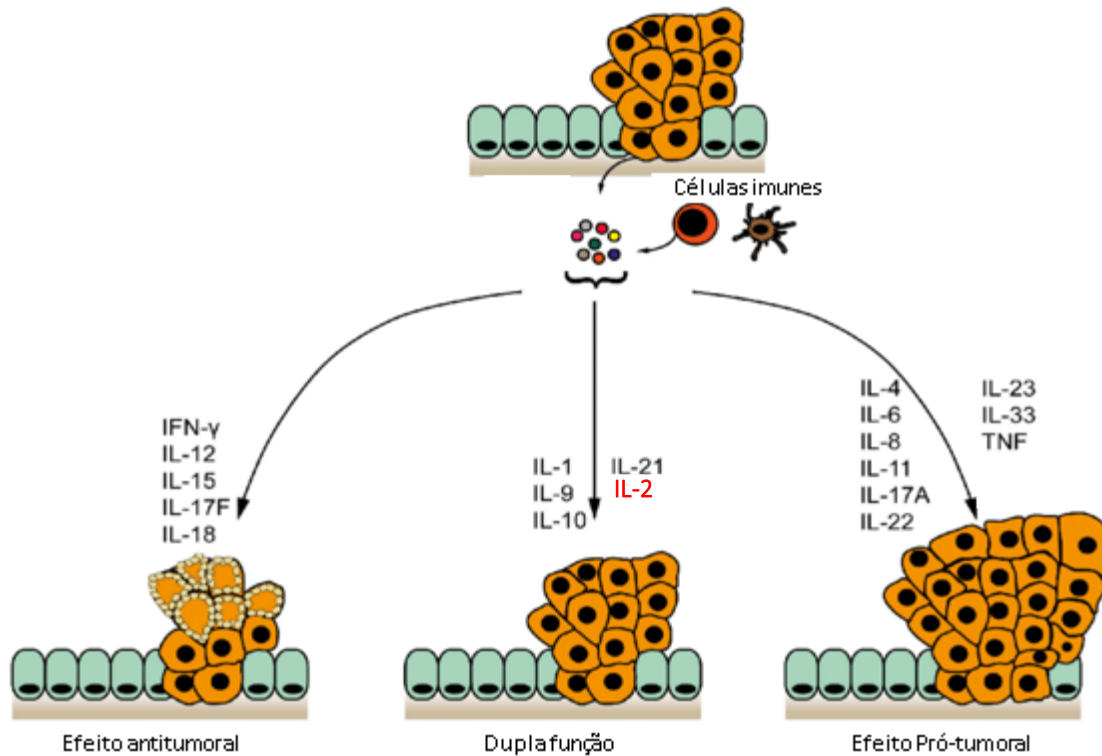
8                 Dentre as citocinas pró-inflamatórias envolvidas com o CCR,  
9 destacam-se a interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF $\alpha$ )  
10 e interferon gama (IFN $\gamma$ ) (MA et al., 2019). A literatura não apresenta análise dos  
11 parâmetros de IL-6 em plasma de pacientes com CCR. Sabe-se que o tecido  
12 tumoral apresenta níveis elevados de IL-6 e essa expressão é correlacionada ao  
13 estágio TNM do tumor (ZENG et al., 2017). Estudos *in vitro* com outros tipos de  
14 cânceres como o de pâncreas demonstraram que IL-6 também está relacionada  
15 ao aumento de mobilidade celular, diminuição da adesão e proliferação no CCR,  
16 o que favorece a metástase (SANTER at al., 2010). Além disso, NAGAZAKI et  
17 al., 2014 e colaboradores avaliaram amostras de tecido e demonstraram em sua  
18 pesquisa que IL-6 está presente também no microambiente tumoral.

19                 O TNF $\alpha$  pertence a uma família de citocinas multifuncionais,  
20 desempenham papéis na proliferação, diferenciação celular, resposta imune,  
21 hematopoese e tumorigênese (WANG et al., 2009). O TNF $\alpha$  é frequentemente  
22 considerado como um promotor tumoral que estimula proliferação, invasão e  
23 metástase de células tumorais. Através da ativação de vias de sinalização como  
24 fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que é um complexo proteico que desempenha papel  
25 como fator de transcrição além de ser um importante sinal de sobrevivência  
26 celular (anti-apoptótico) (WANG et al., 2015). Através da ativação de NF- $\kappa$ B o  
27 TNF $\alpha$  induz a expressão de genes relacionados à metástase, moléculas de  
28 adesão e fator de crescimento endotelial (BALKWILL, 2006). Ainda não há um  
29 perfil de TNF $\alpha$  a níveis séricos para pacientes com CCR. Apesar disso, em  
30 pesquisas com outros modelos de câncer como Leucemia Mielóide Aguda, os  
31 pacientes do grupo câncer apresentam níveis elevados de TNF $\alpha$  quando  
32 comparado ao grupo saudável (FERRAJOLI et al.,2002).

1 Outra citocina frequentemente correlacionada em processos  
2 inflamatórios é o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que possui características no  
3 microambiente tumoral relacionadas a mecanismos anti-proliferativos, pró-  
4 apoptóticos e antitumorais (CASTRO et al., 2018) apesar destas funções, não  
5 apresenta níveis elevados no plasma de pacientes com CCR (YAMAGUCHI et  
6 al., 2019). Algumas citocinas anti-inflamatórias também parecem estar  
7 relacionadas ao CCR, dentre elas, interleucina-4 (IL-4) que pode ser classificada  
8 no grupo das citocinas anti-inflamatórias, Szyllberg et al., 2016 mostrou em seu  
9 estudo que os níveis de IL-4 estavam significativamente elevados no tecido  
10 tumoral de adenoma, Sharp et al., 2017 evidenciou as mesmas características  
11 em plasma, outra citocina relacionada é a interleucina-10 (IL-10). Sugere-se que  
12 a IL-10 possui o papel de limitar a inflamação e a promoção neoplásica (WANG  
13 et al., 2015; SZYLBERG et al., 2016; SHARP et al., 2017). São poucos os  
14 estudos envolvendo a análise de IL-10 a nível plasmático, JUNIOR., 2009  
15 demonstrou que pacientes com CCR não apresentavam elevações significativas  
16 de IL-10 no plasma dos pacientes.

17 No microambiente tumoral, existe uma grande variedade de  
18 citocinas com um importante papel na eliminação das células neoplásicas, efeito  
19 pró-tumoral ou ainda um papel ambíguo que é subjetivo para cada tipo de  
20 câncer, no CCR uma citocina que ainda não está clara na literatura quanto ao  
21 seu principal papel, é a IL-2 que desempenha efeito antitumoral e também pró-  
22 tumoral (Figura 2). A interleucina 2 (IL-2) pode apresentar um importante papel  
23 antitumoral (WANG et al., 2016). Estudos *in vivo* mostraram que a transfecção  
24 do gene de IL-2 para células cancerígenas foi capaz de reduzir o tamanho do  
25 tumor (SOBOL et al., 1999) e aumentar a taxa de sobrevivência (GUNJI et al.,  
26 1998). Além disso, aumenta a sensibilidade das células tumorais aos linfócitos  
27 NK e TCD8+ (WANG et al., 2016). Apesar do efeito antitumoral, BERGHELLA et  
28 al., 1993 demonstraram que a nível tecidual ocorre um aumento de IL-2 de  
29 acordo com o avanço do estágio clínico, pacientes em estágio IV de CCR  
30 apresentaram níveis elevados de IL-2 e isso está relacionado com atividade  
31 proliferativa, o que favorece metástase. Níveis elevados crônicos de IL-2 estão  
32 associados a uma influência predominante na ativação de células Treg  
33 (BOYMAN et al., 2012).

1 Apesar da literatura correlacionar fortemente o CCR com  
2 inflamação, ainda é escassa quanto à relação do estresse oxidativo (EO)  
3 desencadeado pelo processo inflamatório crônico em pacientes com a doença,  
4 bem como a sua relação com o estágio clínico.



**Figura 2: Redes de citocinas na patogênese do câncer colorretal (microambiente).**  
Adaptado de MAGER et al. 2016.

## 1.2 Estresse oxidativo e o câncer colorretal

5 Dentre os fatores relacionados a inflamação, tem-se o EO, cuja  
6 situação ocorre um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas, os  
7 chamados agentes oxidantes, e sua neutralização por mecanismos protetores,  
8 denominados antioxidantes. Este desequilíbrio leva ao dano de importantes  
9 biomoléculas e células, com potencial impacto em todo o organismo (REUTER  
10 et al., 2010).

1 O grupo de espécies reativas de oxigênio são produtos de um  
2 metabolismo celular normal e desempenham papéis vitais na estimulação a nível  
3 celular de vias de sinalização, na resposta a mudanças das condições intra e  
4 extracelulares, na eliminação de patógenos, por exemplo. A maioria das ERO  
5 são geradas em células através da cadeia respiratória mitocondrial (UNG et al.,  
6 2017). Diversos fatores podem levar a condição de estresse como mostrado na  
7 Figura 3, como a quimioterapia ou o processo inflamatório (AQUILANI et al.,  
8 2019; REUTER et al., 2010). Nestas situações as ERO são produzidas e podem  
9 causar danos significativos na estrutura e funções celulares podendo induzir  
10 mutações somáticas e transformação neoplásica. De fato, a progressão do  
11 câncer pode ser associada ao estresse oxidativo pelo aumento das mutações no  
12 DNA ou pela indução de danos no DNA (PANDURANGAN et al., 2018).

13 Dentre as condições que sucedem na formação de ERO, temos  
14 a alta produção de radicais livres que são espécies químicas que possuem um  
15 ou mais elétrons não emparelhados, sendo um elétron não emparelhado aquele  
16 que está sozinho em um orbital (SHARMA et al., 2018). São produzidos em  
17 diversas situações, como no exercício físico, exposição excessiva ao sol,  
18 tabagismo entre outros (ABDOULI et al., 2018).

19 As ERO podem ser divididas em dois grupos: espécies  
20 radiculares e não radiculares (BIRBEN et al., 2012). Moléculas que possuam um  
21 ou mais elétrons desemparelhados, possuem reatividade e são denominados  
22 radicais livres, um exemplo é o radical superóxido ( $O_2^-$ ). Quando duas moléculas  
23 com radicais livres compartilham seus elétrons desemparelhados, forma-se  
24 espécies não-radicalares, como por exemplo o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )  
25 (KESHARI et al., 2015). Os radicais livres podem desencadear reações em  
26 cadeia da peroxidação lipídica, retirando um átomo de hidrogênio de um  
27 carbono. O radical pode reagir com o oxigênio para produzir o radical peroxil. O  
28 radical peroxil por sua vez, irá iniciar uma reação em cadeia que transforma  
29 ácidos graxos poliinsaturados em hidroperóxidos lipídicos. Os hidroperóxidos  
30 lipídicos são muito instáveis e se decompõem facilmente em produtos  
31 secundários, como aldeídos (como 4-hidroxi-2,3-nonenal) e malondialdeídos  
32 (MDAs) (KESHARI et al., 2015; SMRITI et al., 2016).

1 Para que haja um equilíbrio na produção das ER e sua  
2 eliminação, o organismo está equipado com um sistema antioxidante capaz de  
3 neutralizar espécies altamente deletérias (Figura 3). Os antioxidantes possuem  
4 um papel importante no balanço do efeito dos oxidantes e podem ser divididos  
5 em dois grandes grupos, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (GUPTA  
6 et al., 2014). Dos antioxidantes enzimáticos destaca-se a superóxido dismutase  
7 (SOD), enzima capaz de acelerar e dismutar a conversão do  $\text{OH}\cdot$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$   
8 (ČOLAK et al., 2017). Uma vez produzido, este  $\text{H}_2\text{O}_2$  precisa ser eliminado, este  
9 é o papel da catalase, um tetrâmero composto por quatro monômeros contendo  
10 um grupamento heme, esta enzima é capaz de reduzir o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a oxigênio e água.  
11 Outra enzima capaz de reduzir o peróxido é a glutathiona peroxidase (GSH-pxs),  
12 família de enzimas que contém cisteína que usam de tióis de baixo peso  
13 molecular como GSH para reduzir o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (GLORIEUX et al., 2017).

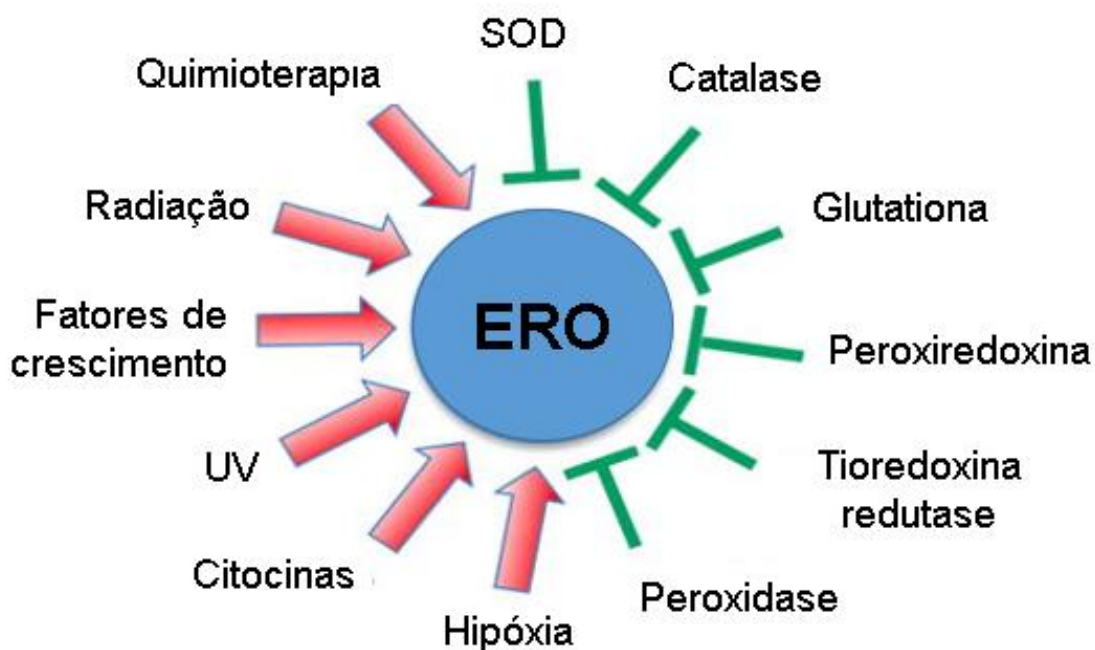


Figura 3. Representação esquemática de vários ativadores e inibidores da produção de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de REUTER et al., 2010.

14 O dano oxidativo tem sido relacionado com a patogênese de  
15 diversos tipos de cânceres, dentre eles, câncer de mama (DEVI et al., 2014;  
16 PIRES & PANIS et al., 2019), de pulmão (AHMED., 2019), de tireoide (XING.,

1 2012), entretanto, ainda não há um marcador específico que possa correlacionar  
2 o CCR ao EO. *SKRZYDLEWSKA* et al., 2005 e colaboradores, correlacionaram  
3 em seu estudo o estresse oxidativo e o estadiamento de pacientes com CCR.  
4 Observaram alguns indicadores de EO como catalase são baixos em pacientes  
5 com CCR e malondialdeído (MDA) tecidual se elevam no tecido de acordo com  
6 o avanço do estágio clínico da doença. *HENDRICKSE* et al., 1994 evidenciaram  
7 o aumento de MDA no plasma, porém, sem correlacionar com o estágio clínico  
8 (*SKRZYDLEWSKA* et al., 2005; *HENDRICKSE* et al., 1994). *MENDONCA* et al.,  
9 2014 observou que as concentrações plasmáticas de MDA eram maiores em  
10 pacientes com CCR do que em pacientes saudáveis. Apesar das diversas  
11 pesquisas envolvendo o MDA como marcador de estresse no CCR, o seu  
12 envolvimento com a inflamação não é claro.

13 Já é bem estabelecido na literatura a relação de EO, CCR e os  
14 estágios da doença em análises teciduais, porém as informações sobre os níveis  
15 sistêmicos destes marcadores oxidativos ainda é escassa e não elucidada,  
16 tornando necessária a busca por marcadores de EO e citocinas que possam ser  
17 correlacionadas ao estágio do tumor.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O câncer colorretal é uma das neoplasias malignas mais comuns no mundo todo, a literatura já é clara quanto a relação do câncer colorretal com a inflamação, sabendo do envolvimento do estresse oxidativo com esse ambiente pró-inflamatório, destaca-se a necessidade de estudos que possam elucidar melhor a relação e interação entre citocinas inflamatórias, EO e o estadiamento do CCR, com a intenção de estabelecer um possível marcador de prognóstico utilizando amostra de fácil obtenção, como amostras de sangue periférico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o perfil de estresse oxidativo e perfil inflamatório de pacientes com câncer colorretal, correlacionando com parâmetros clínicos e com o estadiamento da doença.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Caracterizar os pacientes com CCR em diferentes estágios da doença com relação a hábitos alimentares e de vida.

Avaliar parâmetros dos níveis de estresse oxidativo de acordo com o estadiamento do câncer colorretal.

Avaliar níveis de marcadores de perfil inflamatório em amostras de soro de acordo com o estadiamento do câncer colorretal.

Comparar os resultados obtidos de pacientes com CCR com os pacientes saudáveis.

Correlacionar os níveis de marcadores de perfil inflamatório e estresse oxidativo em pacientes com CCR.

#### **4. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

O presente trabalho originou um artigo científico que aqui está anexo (Página 35). Ele foi realizado na Universidade Estadual de Londrina, nos laboratórios de Patologia Molecular e no laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livre.

O trabalho será submetido para publicação na revista “Clinical colorectal cancer Journal” e intitula-se “Correlation of oxidative and inflammatory parameters in patients with colorectal cancer at different clinical stages “.

ISSN: 1533-0028; Qualis A2; Fator de impacto: 3.176;

Endereço eletrônico: <https://www.clinical-colorectal-cancer.com/>.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstrados no presente estudo apontam para uma diminuição de lipoperoxidação de membrana e aumento da enzima catalase de acordo com o avanço do estágio clínico do câncer colorretal. Para os marcadores de perfil inflamatório, os resultados demonstraram um aumento de IL-10 em estágios mais avançados do CCR, juntos, estes resultados sugerem um padrão anti-inflamatório sistêmico e uma defesa antioxidante, ambiente propício para que ocorra metástase. Além disso, foi possível concluir que alguns marcadores de estresse oxidativo e inflamação não são bons parâmetros associados aos diferentes estágios clínicos CCR.

## 6. REFERÊNCIAS

- Ahmed, A. M. (2019). The Dual Role of Oxidative Stress in Lung Cancer. In *Oxidative Stress in Lung Diseases* (pp. 99–113). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8413-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8413-4_5)
- Al Abdouli, L., Dalmook, H., Abdo, M. A., Carrick, F. R., & Rahman, M. A. (2018). Colorectal cancer risk awareness and screening uptake among adults in the United Arab Emirates. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *19*(8), 2343–2349. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.8.2343>
- Alexander, D. D., Weed, D. L., Miller, P. E., & Mohamed, M. A. (2015). Red Meat and Colorectal Cancer: A Quantitative Update on the State of the Epidemiologic Science. *Journal of the American College of Nutrition*, *34*(6), 521–543. <https://doi.org/10.1080/07315724.2014.992553>
- Aquilani, R., Brugnatelli, S., Dossena, M., Maestri, R., Delfanti, S., Buonocore, D., Boschi, F., Simeti, E., Condino, A. M., & Verri, M. (2019). Oxaliplatin-Fluoropyrimidine Combination (XELOX) Therapy Does Not Affect Plasma Amino Acid Levels and Plasma Markers of Oxidative Stress in Colorectal Cancer Surgery Patients: A Pilot Study. *Nutrients*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/nu11112667>
- Araghi, M., Soerjomataram, I., Bardot, A., Ferlay, J., Cabaçag, C. J., Morrison, D. S., De, P., Tervonen, H., Walsh, P. M., Bucher, O., Engholm, G., Jackson, C., McClure, C., Woods, R. R., Saint-Jacques, N., Morgan, E., Ransom, D., Thursfield, V., Møller, B., ... Arnold, M. (2019). Changes in colorectal cancer incidence in seven high-income countries: a population-based study. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, *4*(7), 511–518. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30147-5](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30147-5)
- Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q., & Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. In *Gastrointestinal Cancer Research* (Vol. 5, Issue 1, pp. 19–27).
- Ashmore, J. H., Rogers, C. J., Kelleher, S. L., Lesko, S. M., & Hartman, T. J. (2016). Dietary Iron and Colorectal Cancer Risk: A Review of Human Population Studies. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 56, Issue 6, pp. 1012–1020). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.749208>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. In *World Allergy Organization Journal* (Vol. 5, Issue 1, pp. 9–19). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Burkitt, D. P. (1971). Possible relationships between bowel cancer and dietary habits. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, *64*(9), 964–965. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5114307>

- Cai, L., Bennedsen, A. L. B., Qvortrup, C., & Gögenur, I. (2019). [Increasing incidence of colorectal cancer in young patients]. *Ugeskrift for Laeger*, 182(1). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31928624>
- Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>
- Colorectal Cancer - Cancer Stat Facts*. (n.d.). Retrieved January 17, 2020, from <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>
- Colorectal Cancer Signs and Symptoms*. (n.d.). Retrieved January 23, 2020, from <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-and-symptoms.html>
- Colorectal Cancer Stages*. (n.d.). Retrieved January 15, 2020, from <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>
- Cytokine networks in the pathogenesis of colorectal cancer. Cytokines. Download Scientific Diagram*. (n.d.). Retrieved January 23, 2020, from [https://www.researchgate.net/figure/Cytokine-networks-in-the-pathogenesis-of-colorectal-cancer-Cytokines-expressed-by\\_fig1\\_301947312](https://www.researchgate.net/figure/Cytokine-networks-in-the-pathogenesis-of-colorectal-cancer-Cytokines-expressed-by_fig1_301947312)
- Deng, T., Lyon, C. J., Bergin, S., Caligiuri, M. A., & Hsueh, W. A. (2016). Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11(1), 421–449. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044359>
- Devi, G. R., Allensworth, J. L., Evans, M. K., & Sauer, S. J. (2014). The Role of Oxidative Stress in Breast Cancer. In *Cancer: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* (pp. 3–14). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405205-5.00001-5>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. In *Cell* (Vol. 61, Issue 5, pp. 759–767). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-l](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-l)
- Fiolet, T., Srour, B., Sellem, L., Kesse-Guyot, E., Allès, B., Méjean, C., Deschasaux, M., Fassier, P., Latino-Martel, P., Beslay, M., Hercberg, S., Lavalette, C., Monteiro, C. A., Julia, C., & Touvier, M. (2018). Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: Results from NutriNet-Santé prospective cohort. *BMJ (Online)*, 360. <https://doi.org/10.1136/bmj.k322>
- Floriani, I., Torri, V., Rulli, E., Garavaglia, D., Compagnoni, A., Salvolini, L., & Giovagnoni, A. (2010, January). Performance of imaging modalities in diagnosis of liver metastases from colorectal cancer: A systematic review

- and meta-analysis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*.  
<https://doi.org/10.1002/jmri.22010>
- Gillen, C. D., Andrews, H. A., Prior, P., Allan, R. N., & Hospital, Q. E. (1994). Crohn's disease and colorectal cancer. In *Gut* (Vol. 35).
- Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. In *Biological Chemistry* (Vol. 398, Issue 10, pp. 1095–1108). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>
- Gunji, Y., Tasaki, K., Tagawa, M., Matsubara, H., Takenaga, K., Suzuki, T., Asano, T., Ochiai, T., Isono, K., & Sakiyama, S. (n.d.). Inhibition of peritoneal dissemination of murine colon carcinoma cells by administrating retrovirus harboring IL-2 gene. *Cancer Gene Therapy*, 5(6), 339–343. Retrieved January 23, 2020, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9917087>
- Gunter, M. J., & Leitzmann, M. F. (2006). Obesity and colorectal cancer: Epidemiology, mechanisms and candidate genes. In *Journal of Nutritional Biochemistry* (Vol. 17, Issue 3, pp. 145–156). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.06.011>
- Hendrickse, C. W., Kelly, R. W., Radley, S., Donovan, I. A., Keighley, M. R. B., & Neoptolemos, J. P. (1994). Lipid peroxidation and prostaglandins in colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, 81(8), 1219–1223. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800810849>
- Hirsch, B. R., & Yousuf Zafar, S. (2011). Capecitabine in the management of colorectal cancer. In *Cancer Management and Research* (Vol. 3, Issue 1, pp. 79–89). <https://doi.org/10.2147/CMR.S11250>
- Hong, N., & Park, S. H. (2014). CT colonography in the diagnosis and management of colorectal cancer: Emphasis on pre- and post-surgical evaluation. *World Journal of Gastroenterology*, 20(8), 2014–2022. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i8.2014>
- INCA - Instituto Nacional de Câncer <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>> Accessed: 2020-02-28
- Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044–2058. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>
- Jochem, C., & Leitzmann, M. (2016). Obesity and colorectal cancer. In *Recent Results in Cancer Research* (Vol. 208, pp. 17–41). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42542-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42542-9_2)
- JUNIOR, L. P; (2009) AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA COMO MARCADOR DE ATIVIDADE TUMORAL EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL | Revista Interdisciplinar de

Estudos Experimentais - Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies. (n.d.). Retrieved April 23, 2020, from <https://periodicos.ufjf.br/index.php/riee/article/view/23927>

Kane, A. M., Fennell, L. J., Liu, C., Borowsky, J., McKeone, D. M., Bond, C. E., Kazakoff, S., Patch, A.-M., Koufariotis, L. T., Pearson, J., Waddell, N., Leggett, B. A., & Whitehall, V. L. J. (2020). Alterations in signaling pathways that accompany spontaneous transition to malignancy in a mouse model of BRAF mutant microsatellite stable colorectal cancer. *Neoplasia*, 22(2), 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2019.12.002>

Keshari, A. K., Verma, A. K., Kumar, T., Srivastava. R., (2015) *Oxidative Stress: A Review*. (n.d.). Retrieved January 20, 2020, from [https://www.researchgate.net/publication/282652803\\_Oxidative\\_Stress\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/282652803_Oxidative_Stress_A_Review)

Kunzmann, A. T., Coleman, H. G., Huang, W. Y., Kitahara, C. M., Cantwell, M. M., & Berndt, S. I. (2015). Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer and incident and recurrent adenoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 102(4), 881–890. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.113282>

Lin, W. W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 117, Issue 5, pp. 1175–1183). <https://doi.org/10.1172/JCI31537>

Louzada, M. L. da C., Martins, A. P. B., Canella, D. S., Baraldi, L. G., Levy, R. B., Claro, R. M., Moubarac, J. C., Cannon, G., & Monteiro, C. A. (2015). Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil. *Revista de Saude Publica*, 49. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2015049006132>

Ma, S., Long, T., & Huang, W. J. M. (2019). Noncoding RNAs in inflammation and colorectal cancer. In *RNA Biology*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1705610>

Magalhães, B., Peleteiro, B., & Lunet, N. (2012). Dietary patterns and colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. In *European Journal of Cancer Prevention* (Vol. 21, Issue 1, pp. 15–23). <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e3283472241>

Mager, L. F., Wasmer, M. H., Rau, T. T., & Krebs, P. (2016). Cytokine-induced modulation of colorectal cancer. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 6, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00096>

Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., & Copped, F. (2011). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.1155/2011/792362>

Monteiro, C. A., Cannon, G., Moubarac, J. C., Levy, R. B., Louzada, M. L. C., & Jaime, P. C. (2018). The un Decade of Nutrition, the NOVA food

classification and the trouble with ultra-processing. In *Public Health Nutrition* (Vol. 21, Issue 1, pp. 5–17). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S1368980017000234>

Munkholm, P. (2003). Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 18(s2), 1–5. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.18.s2.2.x>

Muto, T., Bussey, H. J. R., & Morson, B. C. (1975). The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, 36(6), 2251–2270. <https://doi.org/10.1002/cncr.2820360944>

Nagasaki, T., Hara, M., Nakanishi, H., Takahashi, H., Sato, M., & Takeyama, H. (2014). Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: Anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *British Journal of Cancer*, 110(2), 469–478. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.748>

Oehha. (2016). *Evidence on the Carcinogenicity of Nitrite in Combination with Amines or Amides Proposition 65*. <http://oehha.ca.gov/proposition-65/cnr/notice-intent-list-nitrite-combination-amines-or>

Pericleous, M., Mandair, D., & Caplin, M. E. (2013). Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 4(4), 409–423. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2013.003>

Poston, G. J., Tait, D., O'Connell, S., Bennett, A., & Berendse, S. (2011). Diagnosis and management of colorectal cancer: Summary of NICE guidance. In *BMJ (Online)* (Vol. 343, Issue 7831, pp. 1010–1012). <https://doi.org/10.1136/bmj.d6751>

Pretzsch, E., Bösch, F., Neumann, J., Ganschow, P., Bazhin, A., Guba, M., Werner, J., & Angele, M. (2019). Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. In *Journal of Oncology* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/7407190>

*Reactive Oxygen Species (ROS)*. (n.d.). <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.11.4405>

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 49, Issue 11, pp. 1603–1616). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 49, Issue 11, pp. 1603–1616). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>

- Segev, L., Kalady, M. F., Plesec, T., Mor, E., Schtrechman, G., Nissan, A., & Church, J. M. (2020). The location of premalignant colorectal polyps under age 50: a further rationale for screening sigmoidoscopy. *International Journal of Colorectal Disease*. <https://doi.org/10.1007/s00384-020-03504-2>
- Sharp, S. P., Avram, D., Stain, S. C., & Lee, E. C. (2017). Local and systemic Th17 immune response associated with advanced stage colon cancer. *Journal of Surgical Research*, 208, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.09.038>
- Skrzydłowska, E., Sulkowski, S., Koda, M., Zalewski, B., Kanczuga-Koda, L., & Sulkowska, M. (2005). Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 11(3), 403–406. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i3.403>
- Smriti, K., Pai, K. M., Ravindranath, V., & Pentapati, K. C. (2016). Role of salivary malondialdehyde in assessment of oxidative stress among diabetics. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(1), 42–45. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.004>
- Snover, D. C. (2011). Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Human Pathology*, 42(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.06.002>
- Sobol, R. E., Shawler, D. L., Carson, C., Van Beveren, C., Mercola, D., Fakhrai, H., Garrett, M. A., Barone, R., Goldfarb, P., Bartholomew, R. M., Brostoff, S., Carlo, D. J., Royston, I., & Gold, D. P. (1999). Interleukin 2 gene therapy of colorectal carcinoma with autologous irradiated tumor cells and genetically engineered fibroblasts: a Phase I study. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 5(9), 2359–2365. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499605>
- Song, Y., Liu, M., Yang, F. G., Cui, L. H., Lu, X. Y., & Chen, C. (2015). Dietary fibre and the risk of colorectal cancer: a case- control study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(9), 3747–3752. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.9.3747>
- Subramaniam, R., Mizoguchi, A., & Mizoguchi, E. (2016). Mechanistic roles of epithelial and immune cell signaling during the development of colitis-associated cancer. *Cancer Research Frontiers*, 2(1), 1–21. <https://doi.org/10.17980/2016.1>
- Szylberg, Ł., Janiczek, M., Popiel, A., & Marszałek, A. (2016). Expression of COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-4 in epithelium of serrated adenoma, adenoma and hyperplastic polyp. *Archives of Medical Science*, 12(1), 172–178. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.57594>
- Tariq, K., & Ghias, K. (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. In *Cancer Biology and Medicine* (Vol. 13, Issue 1, pp. 120–

- 135). *Cancer Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103>
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- Thrumurthy, S. G., Thrumurthy, S. S. D., Gilbert, C. E., Ross, P., & Haji, A. (2016). Colorectal adenocarcinoma: Risks, prevention and diagnosis. *BMJ (Online)*, 354. <https://doi.org/10.1136/bmj.i3590>
- Ung, L., Pattamatta, U., Carnt, N., Wilkinson-Berka, J. L., Liew, G., & White, A. J. R. (2017). Oxidative stress and reactive oxygen species: A review of their role in ocular disease. In *Clinical Science* (Vol. 131, Issue 24, pp. 2865–2883). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/CS20171246>
- van der Waals, L. M., Jongen, J. M. J., Elias, S. G., Veremiyenko, K., Trumpi, K., Trinh, A., Laoukili, J., Ubink, I., Schenning-van Schelven, S. J., van Diest, P. J., Borel Rinkes, I. H. M., & Kranenburg, O. (2018). Increased Levels of Oxidative Damage in Liver Metastases Compared with Corresponding Primary Colorectal Tumors: Association with Molecular Subtype and Prior Treatment. *American Journal of Pathology*, 188(10), 2369–2377. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.06.008>
- Wang, K., & Karin, M. (2015). Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 128, pp. 173–196). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.04.014>
- Wang, Y., Wang, M., & Li, Y. (2016). Anti-colorectal cancer effect of interleukin-2 and interferon- $\beta$  fusion gene driven by carcinoembryonic antigen promoter. *OncoTargets and Therapy*, 9, 3259–3267. <https://doi.org/10.2147/OTT.S97444>
- Xing, M. (2012). Oxidative stress: A new risk factor for thyroid cancer. In *Endocrine-Related Cancer* (Vol. 19, Issue 1). <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0360>
- Yamaguchi, M., Okamura, S., Yamaji, T., Iwasaki, M., Tsugane, S., Shetty, V., & Koizumi, T. (2019). Plasma cytokine levels and the presence of colorectal cancer. *PLOS ONE*, 14(3), e0213602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213602>
- Zeng, J., Tang, Z. H., Liu, S., & Guo, S. S. (2017). Clinicopathological significance of overexpression of interleukin-6 in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 23(10), 1780–1786. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i10.1780>

## **ANEXO**

**Title:** Correlation of oxidative and inflammatory parameters in patients with colorectal cancer in different clinical stages

Thiago Henrique Daniel do Nascimento<sup>ab</sup>, Heloisa Paranzini Bornidi<sup>ab</sup> Isabela Chagas Silva<sup>ab</sup>, Walisson Augusto da Silva Brito<sup>ab</sup>, Mario Liberatti, Jorge Mali Junior<sup>c</sup> Larissa Juliani Sanches<sup>ab</sup>, Poliana Camila Marinello<sup>ab</sup>, Alessandra Lourenço Cecchini<sup>ab</sup>, Rodrigo Cabral Luiz<sup>ab\*</sup>.

- a. Laboratory of Molecular Pathology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.
- b. Laboratory of Pathophysiology and Free radicals, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.
- c. Medical clinic department of Hospital Universitario de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

\*Corresponding author:

Rodrigo Cabral Luiz,  
Laboratory of Molecular Pathology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.  
E-mail: rc.luiz@yahoo.com.br,  
Fax: +55 (43) 3371-4267, phone: +55 (43) 3371-4529.

### **Micro Abstract**

Colorectal cancer (CRC) is the third type of cancer with the highest incidence in the world, when diagnosed at an advanced stage, has a high mortality rate. The results of the present study point to a decrease in oxidative stress according to the advancement of the clinical stage of colorectal cancer that may occur due to the possible production of anti-inflammatory cytokines, increased antioxidant defense that leads to a decrease in oxidative stress.

## **ABSTRACT**

Colorectal cancer (CRC) is a malignant neoplasm that occurs in the large intestine, most often in the colon and rectum regions. It is the third type of cancer with the highest incidence among men and the second among women. The most common type of CRC is adenocarcinoma, responsible for 96% of the types of colorectal cancer. Adenocarcinoma is generally established from adenomatous polyps that undergo dysplastic changes, resulting in malignant cells. When there is metastasis, the prognosis is worse, as it is the main cause of death, in this case the neoplasm is classified as stage IV, from a classification ranging from I to IV, according to the characteristics established for the diagnosis. Although the literature strongly correlates CRC with inflammation, the relationship between systemic oxidative stress (OS) triggered by the chronic inflammatory process in patients with the disease is still scarce, as well as the relationship with the clinical stage. Our work aims to evaluate the oxidative stress profile and systemic inflammatory profile of patients with colorectal cancer, correlating with clinical parameters and disease staging. Samples from 36 patients with CRC undergoing chemotherapy and 24 healthy patients were evaluated. For OS parameters, enzymatic antioxidants such as catalase, superoxide dismutase and non-enzymatic antioxidants such as glutathione and other OS markers such as malondialdehyde, product of oxidized proteins and membrane lipoperoxidation were evaluated. In addition to the pro and anti-inflammatory parameters (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  and INF- $\gamma$ ). We made a correlation between inflammatory and OS parameters in order to better elucidate the relationship. Our results indicate that with less oxidizing agents (malondialdehyde) and more antioxidants (catalase), in addition to an increase in immunosuppressive cytokine (IL-10), colorectal carcinogenesis can establish a systemic environment conducive to its progression and, consequently, favoring metastasis.

**Key words:** Colorectal cancer, pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, systemic oxidative stress.

## **Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## 1. Introduction

1           Colorectal cancer (CRC) is a malignant neoplasm that occurs in the  
2 large intestine, most often in the colon and rectum regions. In Brazil, about 40,990 new  
3 cases of CRC are estimated for the year of 2020, this being the third type of cancer with  
4 the highest incidence among men and the second among women<sup>1</sup>. The main risk factors  
5 for sporadic cases of CRC are the consumption of red meat and processed foods<sup>2</sup>,  
6 overweight<sup>3</sup> and low fiber diet<sup>4</sup>. Approximately 30% of the types of CRC are of family  
7 origin, that is, genetically inherited<sup>5</sup> and about 70-75% of the cases are sporadic<sup>5,6</sup>. The  
8 most common type of CRC is adenocarcinoma, responsible for 96% of the types of  
9 colorectal cancer<sup>7,8</sup>. Adenocarcinoma is usually established from adenomatous polyps  
10 that undergo dysplastic changes resulting in malignant cells<sup>9</sup>.

11           The prognosis depends on numerous factors, especially due to the  
12 presence of metastases, which can be identified in up to 20% of patients and determine a  
13 worse prognosis<sup>10</sup>. For the prognosis, it is important to consider the stage of the disease  
14 based on the TNM classification. For stages I and II, no metastases are observed, which  
15 are determined by the size of the tumor in relation to local histological invasion. Stage III  
16 is characterized by the escape of tumor cells to regional lymph nodes. Stage IV is  
17 characterized by the presence of metastases in other tissues<sup>11,12</sup>.

18           For sporadic cases of CRC, this is for cases where the person has not  
19 inherited mutations and they occur in somatic cells. In about 60% of cases, carcinogenesis  
20 follows the model proposed by Vogelstein, which suggests the successive accumulation  
21 of genetic modifications related to the control of the cell cycle leading to an alteration of  
22 normal tissue until the appearance of cancer<sup>13</sup>. The appearance of CRC occurs through  
23 the combination of different genetic events, such as chromosomal instability, gene  
24 mutations, aberrant methylation of tumor suppressor genes and microsatellite  
25 instability<sup>14</sup>. Within the disease evolution process, it is common to observe the adenoma-  
26 carcinoma sequence, when benign tumor polyps start to present dysplasia (promoted by  
27 chromosomal instability) and progress to a late adenoma and adenocarcinoma<sup>14</sup>.

28           Although the literature strongly correlates CRC with inflammation,  
29 there is still little relationship between systemic OS triggered by the chronic inflammatory  
30 process in patients with CRC, as well as its relationship with the clinical stage<sup>15, 16, 17</sup>.  
31 Among the pro-inflammatory cytokines involved with CRC, interleukin-6 (IL-6), tumor

1 necrosis factor of the alpha type (TNF $\alpha$ ) and gamma interferon (IFN $\gamma$ )<sup>18</sup> stand out. In  
2 addition, some anti-inflammatory cytokines also appear to be related to CCR, including  
3 interleukin-4 (IL-4) and interleukin-6 (IL-6)<sup>19</sup>.

4 Information on the systemic levels of these oxidative markers is also  
5 not fully understood, making it necessary to search for inflammatory parameters and  
6 oxidative stress that can be correlated with the tumor stage. With this, the present work  
7 aims to evaluate the oxidative stress profile and inflammatory profile of patients with  
8 colorectal cancer, correlating with clinical parameters and disease staging.

## 2. Methodology

### 2.1 Experimental Design

9 The work was approved by the ethics and research committee of the  
10 Universidade Estadual de Londrina under the number CAAE: 56874216.0.0000.5231.  
11 For the study, 36 patients diagnosed with CRC at Hospital Universitário de Londrina  
12 and Instituto do Câncer de Londrina, Paraná, and 24 healthy individuals were selected.  
13 For three groups, volunteers aged 40 years or older were included and individuals with  
14 liver dysfunction, cardiac dysfunction, renal dysfunction and age less than 40 years  
15 were excluded. The volunteers answered a questionnaire to obtain sociodemographic  
16 information, family history of cancer, food history. Subsequently, peripheral blood  
17 samples were obtained from the volunteers.

18 The patients were divided into three groups, being control (n = 24),  
19 patients diagnosed with colorectal cancer and separated into groups according to the  
20 clinical stage, group I-II (n = 25) and group III-IV (n = 11).

### 2.2 Sample collection

21 Peripheral blood samples from patients undergoing chemotherapy  
22 were collected for analysis. A 5ml tube with heparin and a 5ml tube without  
23 anticoagulants were collected from each volunteer. The samples were centrifuged to  
24 obtain serum, plasma and a pool of red blood cells. The initial centrifugation was done  
25 at 3500g for 5 minutes to separate serum and plasma from the tubes, then the pool of  
26 red blood cells was washed three times with 0.9% saline also at 3500g for 5 minutes,  
27 then the samples of plasma and serum were stored in a -20°C freezer for up to 6 months  
28 for further analysis and the pool of red blood cells was stored at 4°C for analysis up  
29 to 7 days.

## 2.3 Systemic oxidative stress

### 2.3.1 Analysis of antioxidants

1                   To evaluate oxidative stress parameters, we analyze in the pool of  
2 red blood cells some enzymatic markers such as the antioxidant enzyme catalase, for  
3 this, we used the technique described by AEBI (1984)<sup>20</sup>, which is based on the  
4 decomposition of hydrogen peroxide directly related to its absorption at 240 nm (UV-  
5 1650 PC® UV-vis spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). Superoxide (SOD)  
6 activity its determined according to the method of MARKLUND & MARKLUND.,  
7 1974<sup>21</sup> using different contents of diluted erythrocytes at a ratio of 1:20 in deionized  
8 water. The samples its incubated in 1 M TRIS buffer and 0.15 mM pyrogallol, and  
9 autoxidation inhibition its measur at 420 nm in a UV-1650 PC® UV-vis  
10 spectrophotometer.

11                   As a non-enzymatic antioxidant, we determined erythrocyte levels  
12 of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione according to LOCATELLI et al.,  
13 2009 which consists of GSH's ability to reduce 5,5'-dithiobis- (2- nitrobenzoic acid)  
14 DTNB for 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) forming a yellow color, measured  
15 spectrophotometrically at 412 nm. GSSG was calculated by measuring total  
16 glutathione (GT) followed by the decrease in GSH and the result was divided by two,  
17 respecting the stoichiometry of the reaction, since two GSH molecules are needed to  
18 originate a GSSG. The GT was calculated by adding the reaction in addition to DTNB,  
19 the enzyme glutathione reductase and its cofactor, NADPH.

20                   The stress index was calculated using GSSG divided by the  
21 difference of GT-GSSG, the result was multiplied by 100, and express in percentage.

### 2.3.2 Determination of membrane lipoperoxidation

22                   Lipoperoxidation was determined according to Gonzalez-Flecha et al.,  
23 1991, based on the oxidation induced by Terti butyl of phospholipids present in the  
24 erythrocyte membrane, the reaction is evaluated in real time by chemiluminescence for  
25 40 minutes. They were analyzed in the luminometer (Berthols Technologies; Lumat 3;  
26 LB 9508) and the results were expressed in unit relative light (URL). Other parameters  
27 were obtained from the chemiluminescence reaction in real time, curve inclination and  
28 area under the curve.

### 2.3.3 Determination of malondialdehyde (MDA) levels

1                   The plasma MDA levels (product of lipid peroxidation) were  
2 determined following the technique described by VICTORINO et al. (2012)<sup>22</sup> in a high  
3 performance liquid chromatograph (HPLC- Shimadzu 20AT), equipped with an LC20AT  
4 pump and SPDM20A diode-array UV absorbance detector, using a C18 reverse phase  
5 column, without using a pre-column. The readings were taken at 535 nm, during an 11-  
6 minute run, with a flow rate of 0.8 mL / minute, and the results were expressed in nM of  
7 MDA.

### 8                   2.3.4 Determination of advanced oxidation protein products (AOPP)

9                   To evaluate oxidized protein formation by inflammatory response, the  
10 advanced oxidation protein products (AOPP) levels it is measured. AOPP levels it is  
11 measured as described by Descamps-Latscha et al., 2004<sup>23</sup> in a microplate reader. Plasma  
12 it is diluted 1:5 in phosphate-buffered saline (PBS). Supernatant samples or chloramine  
13 T standard solutions (200 µL) it is place in the appropriate wells of a 96- well microtiter  
14 plate, 10 µL of 1.16 mol/L KI its add to each well and 20 µL of acetic acid its add 2 min  
15 later. The absorbance of the reaction mixture its immediately read at 340 nm against a  
16 blank containing 200 µL of PBS, 10 µL of KI, and 20 µL of acetic acid. AOPP levels  
17 were calculated using a chloramine-T calibration curve.

## 2.4 Inflammatory profile

18                   Serum samples were used for the analysis of the inflammatory profile  
19 markers, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF and INF-γ were analyzed by flow cytometry, using  
20 the BD™ Cytometric Bead Array assay (CBA) Human Th1 / Th2 II cytokine kit. The  
21 cytometer used for the analyzes was the ACCURI C6 BD™.

## 2.5 Statistical analysis

22                   The normality of data distribution was assessed using Shapiro-Wilk  
23 test, and when the variables were not normally distributed, the natural logarithmic (ln) of  
24 continuous data were used. Univariate analyses of continuous data were performed by  
25 ANOVA (one-way or two-way) with Tukey's post-hoc test and were expressed as mean  
26 ± standard error of mean (SEM), or by Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc test and  
27 were expressed as median with interquartile range, when appropriate. Pearson's  
28 coefficient was correlated, p <0.05 was considered significant. For analysed two groups

1 we used T student test. The results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .  
2 The statistical analyses were performed using SPSS version 24.0 (SPSS, Chicago, IL,  
3 USA) and GraphPad Prism (version 8; San Diego, CA, USA).

### 3. Results

4 Table 1 shows the qualitative analyzes of the study, the classification  
5 and categorization of the participating volunteers, it is possible to notice a difference  
6 between the age of the patients in the search ( $p = 0.016$ ), we saw that the significant  
7 difference is between the control groups and group III-IV ( $p = 0.014$ ). Assessing the  
8 gender of the study group, although the literature points to a higher incidence in men than  
9 in women, in our research there was no significant difference for gender ( $p = 0.551$ ), the  
10 same characteristic is observed for ethnicity, with no statistical difference ( $p = 0.269$ ).

11 Still in Table 1, the analysis shows a family characteristic when it comes  
12 to the development of CRC ( $p = 0.019$ ) where group III-IV is different from control and  
13 this family history, apparently, is not specifically related to a degree of kinship ( $p =$   
14  $0,233$ ). Table 2 shows the risk factors related to CRC, from the analyzes performed,  
15 alcohol intake is different between the group control and III-IV ( $p = 0.018$ ), while other  
16 analyzes carried out, showing that the absence or light and moderate presence of physical  
17 exercise, smoking, hypertension and diabetes, as well as consumption of fiber, red meat  
18 and processed foods not have no significant difference between groups.

19 Serum concentrations of some inflammatory and anti-inflammatory  
20 cytokines were analyzed by flow cytometry. For this analysis, two ways were compared,  
21 first, only between the control groups and individuals diagnosed with CRC, and between  
22 the control group and patients diagnosed with CRC divided into subgroups by clinical  
23 stage I-II and III-IV. According to Figure 1 (a, b and c), for the measurement of the  
24 cytokines IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6, IL-2, IL-10 and IL-4, there was a significant increase ( $p =$   
25  $0.0318$ ) of IL-6 in the CRC group. The same result is reflected in Figure 1 (d, e and f),  
26 where the analysis was made from the division between clinical stages, showing a  
27 significant increase in IL-10 ( $p = 0.0004$ ) where with the pos test it was possible to  
28 observe that the difference is in groups I-II ( $p = 0.0024$ ) and III-IV ( $p = 0.0001$ ) in relation  
29 to control, it was not possible to evaluate the parameters of IFN- $\gamma$ , TNF and IL-4 because  
30 the detection limit of the device is  $0.005 \text{ pg / mL}$  and the results obtained were lower,  
31 making the statistical calculation unfeasible. There was a difference between the groups

1 regarding the level of IL-6 (**p = 0.0318**). There was an increase in IL-6 in group III-IV  
2 than in the control group (**p = 0.0337**). Despite demonstrating a tendency towards  
3 elevation in group I-II in relation to control and in relation to group III-IV, there was no  
4 statistical difference.

5 For the analysis of oxidative stress, the erythrocyte levels of total and  
6 reduced glutathione were measured, as shown in Figure 2, there were no significant  
7 changes in the analyzes between the healthy group and the CRC for GSH ( $p = 0.5710$ ),  
8 GSSG ( $p = 0.8934$ ) and stress index ( $p = 0.7706$ ). There was also no statistically  
9 significant change when we separated the CRC group in clinical stages I-II and III-IV,  
10 resulting in GSH ( $p = 0.4769$ ), GSSG ( $p = 0.2277$ ) and stress index ( $p = 0, 7896$ ). The  
11 activity of the catalase enzyme was also evaluated, as shown in Figure 3 a,b, it was  
12 possible to observe a significant difference between the healthy group and CRC (**p =**  
13 **0.0024**), when we seared in clinical stages, it was noted that the statistical difference is  
14 between the control group and I-II (**p = 0.0048**) and between group III-IV and the control  
15 group (**p = 0.0188**). The activity of the SOD enzyme was also evaluated and shown in  
16 Figure 3 c, d, it was possible to observe that there was no statistical difference between  
17 the healthy group and the CRC group ( $p = 0.1041$ ) and also when it was divided into  
18 clinical stages, observed a difference ( $p = 0.3927$ ).

19 We also evaluated the sensitivity of erythrocytes to the induction of  
20 membrane lipoperoxidation from chemiluminescence (Figure 4), obtaining the  
21 parameters of the curve area between the healthy group and the CRC group ( $p = 0.2309$ )  
22 and ( $p = 0,6756$ ) in clinical stages. For the slope of the curve, there was no difference  
23 between the control and CRC groups ( $p = 0.2099$ ) or between the clinical stages ( $p =$   
24  $0.2933$ ).

25 Significant results were observed for the analysis of malondialdehyde  
26 (MDA) as shown in Figure 5 a,b (**p = 0.0016**), where a difference was noted between the  
27 healthy group and with CRC (**p = 0.0002**) and when we divided the CRC group by clinical  
28 stage, it was possible to observe a difference in group I-II (**p = 0.0015**) and in group III-  
29 IV (**p = 0.0248**) in relation to the control. For the analysis of protein oxidation products  
30 it was not possible to observe a statistical difference between the groups ( $p = 0,4325$ ) and  
31 clinical stages ( $0,3819$ ). To evaluate oxidized protein formation by inflammatory  
32 response, the advanced oxidation protein products (AOPP) levels were measured and no

1 significant difference was observed between the control and CRC groups ( $p = 0.4325$ )  
2 and between the groups divided into clinical stages ( $p = 0.3819$ ).

3 Table 3 shows Pearson's correlation only for results that were  
4 significant, IL-6 x IL-10 ( $p = 0.001$ ) with correlation coefficient ( $r = 0.457$ ) and IL-6 x  
5 Catalase ( $p = 0.001$ ) with correlation coefficient ( $r = 0.332$ ).

6 Figure 6 shows a didactic summary of the completed study, in order to  
7 expose the changes found due to the clinical stage.

#### 4. Discussion

8 Colorectal cancer is the third most common type of cancer in men and  
9 the second in women<sup>1</sup>, although it is still prevalent in elderly individuals, studies have  
10 shown an increased incidence of this type of cancer in people under 50<sup>24,25</sup>. Despite  
11 effective treatment when diagnosed early, in advanced and metastatic stages that occur in  
12 20% of patients<sup>10</sup>, CRC can have a worse prognosis and patient survival can be reduced  
13 to approximately 30 months after diagnosis<sup>26</sup>. For this reason, it is important to understand  
14 the disease profile and all the factors involved in it.

15 In this study, it was observed that the average age of the CRC group  
16 indicates the diagnostic age range from 50 years old, as already described by JAIN et al.,  
17 2019<sup>27</sup> and according to the guidelines of *American Cancer Society* and with other  
18 research in the literature such as Singh et al., 2014<sup>28</sup> who evaluated more than 200  
19 thousand patients and observed that the incidence is still maintained in individuals over  
20 50 years.

21 The most incident type of CRC is the sporadic (70-75%) MIGLIORE  
22 et al., 2011<sup>29</sup>, among the risk factors involved, the consumption of red meat and processed  
23 foods<sup>2</sup>, overweight<sup>3</sup> and low fiber diet<sup>4</sup> stand out. Our results demonstrate that it is not  
24 possible to observe a difference between the groups evaluated regarding the main risk  
25 factors, however, one of our results suggests that individuals with advanced clinical stage  
26 report a lower consumption of alcohol, despite the fact that there are few studies in the  
27 literature associating the alcohol use and development of CRC such as that of Fedirko et  
28 al., 2011<sup>30</sup> which demonstrated in its meta-analysis that there is strong evidence of the  
29 association between alcohol consumption and CRC risk, we believe that our results for  
30 this analysis are not associated with development and clinical stage of the CRC. Our

1 results also indicate that there seems to be a predisposition to cancer, either due to family  
2 genetic problems or lifestyle habits in the family environment.

3           Colorectal cancer is a chronic disease and its development and  
4 progression are related to inflammation<sup>31,32</sup>. The literature is very clear regarding the  
5 levels of cytokines in the tumor microenvironment and *in vitro*, however, there are few  
6 reports of plasma levels of inflammatory parameters in CRC, some studies indicate that  
7 advanced stages of CRC significantly increase plasma proinflammatory cytokines<sup>32,33</sup>, an  
8 important cytokine for colorectal cancer is interleukin 6, it is a cytokine pleiotropic that  
9 exerts biological activity in several types of cells, including neoplastic cells<sup>34</sup>. Schneider  
10 et al., 2000<sup>35</sup>, demonstrated in their *in vitro* study that IL-6 has the ability to promote the  
11 growth of colon cancer cells and also that it may be related to tumor promotion, since in  
12 their study, it was shown that treatment with IL-6 was able to influence the formation of  
13 colonies of neoplastic cells.

14           Hsu et al., 2006<sup>36</sup> also demonstrated the relationship of IL-6 with CRC,  
15 where it evaluated its role in tumor progression, the study pointed out that the tumor  
16 invasion depends on the concentration of exogenous IL-6, that is, outside the tumor  
17 microenvironment, which is in agreement with our systemic results of IL-6, where it was  
18 possible to evidence a significant increase in IL-6 in the cancer group, when we divided  
19 the groups by clinical stages (I-II) and (III-IV), we can notice that the group with the most  
20 advanced clinical stage presented high levels of IL-6 in relation to the control, elevated  
21 levels of IL-6 in more advanced stages of CRC have also been reported by other studies<sup>37</sup>.  
22 Despite the literature reporting changes in serum levels of other cytokines such as TNF<sup>38</sup>,  
23 IFN- $\gamma$ <sup>39</sup>, IL-4<sup>40</sup>, IL-10<sup>38,41,42</sup> and IL-2<sup>38</sup>, when we analyzed the control group and patients  
24 with colorectal cancer it was not possible to observe a significant change.

25           When the groups were separated by clinical stage, it was possible to  
26 observe a significant increase in IL-10. The cytokine IL-10 is considered an immune  
27 modulating cytokine, has an ambiguous role, presenting pro and anti-tumor  
28 characteristics, despite its importance, the role of IL-10 in cancer is still controversial,  
29 studies associate several types of cancer with elevated levels of IL-10, both in serum and  
30 in the tumor microenvironment<sup>41,42</sup>. Vahl et al., 2017<sup>43</sup> showed in their study that IL-10  
31 has an anti-inflammatory role in lung cancer, which facilitates tumor promotion, in breast  
32 cancer as described by Hamidullah et al., 2012<sup>44</sup> IL-10 has action predominantly  
33 inhibiting breast tumor, however, in some cases it may be related to tumor promotion<sup>45</sup>.

1 Abtahi et al., 2017<sup>45</sup> presented the double action of IL-10 in the CRC, associating the  
2 serum levels of IL-10 in tumor progression, demonstrating that high levels of IL-10 are  
3 associated with the worst prognosis due to immunosuppression, which favors the tumor  
4 progression.

5 In our study, we observed that serum levels of IL-10 increased  
6 according to the clinical progress of the disease, presenting a greater significance in the  
7 metastatic stage. It is then suggested that in CRC, IL-10 may have a predominantly  
8 immunosuppressive role, which favors the progression of CRC, in addition, it may also  
9 be related to a decrease in patient survival as described by Miteva et al., 2014<sup>46</sup>.

10 Among the factors related to inflammatory markers, there is oxidative  
11 stress (OS), characterized by the imbalance between the generation of reactive species,  
12 called oxidizing agents, and their neutralization by protective mechanisms, called  
13 antioxidants. This imbalance leads to the damage of important biomolecules and cells,  
14 with a potential impact on the whole organism<sup>47</sup>. The redox imbalance has been related  
15 to the pathogenesis of several chronic diseases, including the CRC<sup>48</sup>. By evaluating some  
16 OS markers it is possible to better understand this close relationship.

17 One of the important markers of oxidative stress is MDA, a product of  
18 membrane lipoperoxidation. Hendrickse et al., 1994<sup>49</sup> suggest in their study that MDA  
19 levels are elevated in the plasma of patients with CRC, but without evidence of correlation  
20 with the clinical stage, Mendonça et al., 2014<sup>50</sup> report in their study an increase in MDA  
21 in the plasma of patients with CRC, but also without correlation with the metastatic stage  
22 of the disease. Our results point to a significant decrease in MDA levels in the CRC group,  
23 when we separate these groups into clinical stages, it is possible to show a decrease in  
24 MDA levels according to the clinical evolution of the disease. Some factors may be  
25 associated with results that differ from the literature, such as the techniques employed  
26 and the study group. Low levels of MDA are related to less oxidative stress, since MDA  
27 is one of the end products of lipoperoxidation.

28 Another marker of oxidative stress is the advanced oxidation proteins  
29 (AOPP), which are proteins damaged by oxidative stress, mainly albumin<sup>51</sup>. AOPPs are  
30 formed mainly by chlorinated oxidants, including hypochloric acid and chloramines,  
31 which result from the activity of myeloperoxidase, are frequently evaluated in chronic  
32 processes related to OS<sup>51</sup>. There are few studies in the literature that correlate the levels

1 of oxidized proteins with the CRC, CHANG et al., 2008<sup>52</sup> points to the increase in AOPP  
2 in patients with CRC, however without dividing the patients into clinical stages, despite  
3 the report in the literature, our results did not give significant for AOPP levels.

4           The relationship between inflammation and the immune system in the  
5 face of carcinogenesis still presents itself as a paradox, which is known, in the early stages  
6 of cancer, stimulation of the immune system due to inflammation may occur, there is the  
7 recognition of tumor antigens through maturation of dendritic cells for the presentation  
8 of antigens<sup>53</sup> which would lead to the attack of tumor cells by the immune system.  
9 Probably, colorectal cancer behaves differently, since it seems to be silent as it progresses,  
10 a milder picture is noted in the more advanced stages, that is, a lesser amount of MDA,  
11 which indicates less lipid peroxidation, consequently less oxidative stress.

12           The activity of the antioxidant enzyme catalase was also evaluated.  
13 Catalase is a molecule that has the ability to reduce hydrogen peroxide, which is a reactive  
14 species, in water and oxygen, contributing to the redox balance<sup>54</sup>, observed that systemic  
15 levels of catalase are low in patients with CRC, however, the results presented in this  
16 work demonstrate another pattern regarding the quantification of the catalase enzyme,  
17 there is a significant increase in catalase in the CRC group and this increase, when the  
18 groups were separated, it is noted that the increase is characteristic in group I-II, for group  
19 III-IV, there was no statistical difference. SOD was also evaluated, another enzymatic  
20 marker of OS, an important enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide into  
21 oxygen and hydrogen peroxide. For the analysis of the systemic parameters of SOD in  
22 the CRC it was not possible to observe statistical difference between the groups,  
23 demonstrating that for this type of cancer SOD may not be a good marker<sup>55</sup>.

24           Other parameters were evaluated in the study, which is part of the  
25 family of enzymes that contain chemicals that use low molecular weight levels like GSH  
26 to reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>56</sup>, reduced and oxidized glutathione and the stress index were analyzed.  
27 In one of the few studies that attempt to assess serum glutathione levels in patients with  
28 CRC, Chang et al., 2008<sup>57</sup> points out in their study, reduced levels of glutathione  
29 parameters in patients with CRC, this characteristic was not observed in the present study,  
30 a there was no significant difference between groups. The erythrocyte lipoperoxidation  
31 by chemiluminescence was also evaluated, which are the area of the curve and the speed.  
32 Lauschke et al., 2002<sup>58</sup> observed that shortly after surgery to remove the tumor, patients  
33 had high systemic levels of serum lipid peroxidation, the acute postoperative stress may

1 have influenced these results, however, the results of the analysis of lipid peroxidation  
2 presented in the present study have no statistical difference.

3                   A new data for the literature is the correlation between the significant  
4 results, it was demonstrated that the cytokines IL-6 and IL-10 are negatively correlated,  
5 that is, if IL-6 increases, IL-10 decreases, which makes sense, once that IL-6 has a pro-  
6 inflammatory and anti-inflammatory IL-10 behavior. In addition, there is a positive  
7 correlation between the levels of catalase and IL-6, which can also be understood, since  
8 IL-6 is involved with inflammation and the inflammatory process is related to the  
9 production of reactive species, such as In order to neutralize this, it is suggested that there  
10 is an increase in the antioxidant defense, in this case, an increase in one of the markers,  
11 the catalase.

## 5. Conclusion

12                   The results demonstrated in the present study point to a decrease in  
13 membrane lipoperoxidation and an increase in the enzyme catalase according to the  
14 advancement of the clinical stage of colorectal cancer. For the markers of inflammatory  
15 profile, the results demonstrate an increase in IL-10 in more advanced stages of the CRC,  
16 together the results suggest a systemic anti-inflammatory pattern and an antioxidant  
17 defense, a favorable environment for metastasis to occur. In addition, it was possible to  
18 conclude that some markers of oxidative stress and inflammation are not good parameters  
19 associated with different clinical stages of CRC.

## 6. References

1. INCA - Instituto Nacional de Câncer <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>> Accessed: 2020-02-28
2. Alexander, D. D., Weed, D. L., Miller, P. E., & Mohamed, M. A. (2015). Red Meat and Colorectal Cancer: A Quantitative Update on the State of the Epidemiologic Science. *Journal of the American College of Nutrition*, 34(6), 521–543. <https://doi.org/10.1080/07315724.2014.992553>.
3. Jochem, C., & Leitzmann, M. (2016). Obesity and colorectal cancer. In *Recent Results in Cancer Research* (Vol. 208, pp. 17–41). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42542-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42542-9_2).
4. Song, Y., Liu, M., Yang, F. G., Cui, L. H., Lu, X. Y., & Chen, C. (2015). Dietary fibre and the risk of colorectal cancer: a case- control study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 16(9), 3747–3752. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.9.3747>.
5. Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044–2058. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>
6. Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., & Copped, F. (2011). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.1155/2011/792362>.
7. American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin <<https://www.cancer.org/>> Accessed: 2020-02-28.
8. Segev, L., Kalady, M. F., Plesec, T., Mor, E., Schtrechman, G., Nissan, A., & Church, J. M. (2020). The location of premalignant colorectal polyps under age 50: a further rationale for screening sigmoidoscopy. *International Journal of Colorectal Disease*. <https://doi.org/10.1007/s00384-020-03504-2>
9. Thrumurthy, S. G., Thrumurthy, S. S. D., Gilbert, C. E., Ross, P., & Haji, A. (2016). Colorectal adenocarcinoma: Risks, prevention and diagnosis. *BMJ (Online)*, 354. <https://doi.org/10.1136/bmj.i3590>
10. Floriani, I., Torri, V., Rulli, E., Garavaglia, D., Compagnoni, A., Salvolini, L., & Giovagnoni, A. (2010, January). Performance of imaging modalities in diagnosis of liver metastases from colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. <https://doi.org/10.1002/jmri.22010>
11. American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin <<https://www.cancer.org/>> Accessed: 2020-02-28.
12. van der Waals, L. M., Jongen, J. M. J., Elias, S. G., Veremiyenko, K., Trumpi, K., Trinh, A., Laoukili, J., Ubink, I., Schenning-van Schelven, S. J., van Diest, P. J., Borel Rinkes, I. H. M., & Kranenburg, O. (2018). Increased Levels of Oxidative Damage in Liver Metastases Compared with Corresponding Primary Colorectal Tumors: Association with Molecular Subtype and Prior Treatment. *American Journal of Pathology*, 188(10), 2369–2377. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.06.008>
13. Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. In *Cell* (Vol. 61, Issue 5, pp. 759–767). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
14. Thrumurthy, S. G., Thrumurthy, S. S. D., Gilbert, C. E., Ross, P., & Haji, A. (2016). Colorectal adenocarcinoma: Risks, prevention and diagnosis. *BMJ (Online)*, 354. <https://doi.org/10.1136/bmj.i3590>

15. Munkholm, P. (2003). Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 18(s2), 1–5. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.18.s2.2.x>
16. Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
17. Gillen, C. D., Andrews, H. A., Prior, P., Allan, R. N., & Hospital, Q. E. (1994). Crohn's disease and colorectal cancer. In *Gut* (Vol. 35).
18. Ma, S., Long, T., & Huang, W. J. M. (2019). Noncoding RNAs in inflammation and colorectal cancer. In *RNA Biology*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1705610>
19. Szyłberg, Ł., Janiczek, M., Popiel, A., & Marszałek, A. (2016). Expression of COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-4 in epithelium of serrated adenoma, adenoma and hyperplastic polyp. *Archives of Medical Science*, 12(1), 172–178. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.57594>
20. Chang, D., Wang, F., Zhao, Y. S., & Pan, H. Z. (2008). Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21(4), 286–289. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(08\)60043-4](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(08)60043-4)
21. MARKLUND, S., & MARKLUND, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
22. Victorino VJ, Panis C, Campos FC, Cayres RC, Colado-Simão AN, Oliveira SR, et al. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women.
23. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Gausson V, Mothu N, et al. Early prediction of IgA nephropathy progression: proteinuria and AOPP are strong prognostic markers. *Kidney Int.* 2004;66:1606–12.
24. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G. S., Barzi, A., & Jemal, A. (2017). Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(3), 177–193. <https://doi.org/10.3322/caac.21395>
25. American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin. (n.d.). Retrieved February 28, 2020, from <https://www.cancer.org/>
26. Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J. H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., Ciardiello, F., D'hoore, A., Diaz-Rubio, E., Douillard, J.-Y., Ducreux, M., Falcone, A., Grothey, A., Gruenberger, T., Haustermans, K., ... Arnold, & D. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer special articles *Annals of Oncology*. *Annals of Oncology*, 27, 1386–1422. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235>
27. Jain, A., & Jain, S. (2019). Rising Incidence of Colorectal Cancer in Patients Younger than Age 50 in Hawai'i. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health: A Journal of Asia Pacific Medicine & Public Health*, 78(6), 195–199. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31205814>
28. Singh, K. E., Taylor, T. H., Pan, C.-J. G., Stamos, M. J., & Zell, J. A. (2014). Colorectal Cancer Incidence Among Young Adults in California. *Journal of Adolescent and Young Adult Oncology*, 3(4), 176–184. <https://doi.org/10.1089/jayao.2014.0006>

29. Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., & Copped, F. (2011). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.1155/2011/792362>
30. Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., ... Jenab, M. (2011, September). Alcohol drinking and colorectal cancer risk: An overall and dose-Response meta-analysis of published studies. *Annals of Oncology*, Vol. 22, pp. 1958–1972. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq653>
31. Gillen, C. D., Andrews, H. A., Prior, P., Allan, R. N., & Hospital, Q. E. (1994). Crohn's disease and colorectal cancer. In *Gut* (Vol. 35).
32. Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
33. Nagasaki, T., Hara, M., Nakanishi, H., Takahashi, H., Sato, M., & Takeyama, H. (2014). Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: Anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *British Journal of Cancer*, 110(2), 469–478. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.748>
34. Knüpfer, H., & Preiss, R. (2010, February 7). Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients-a summary of published results. *International Journal of Colorectal Disease*, Vol. 25, pp. 135–140. <https://doi.org/10.1007/s00384-009-0818-8>
35. Schneider, M. R., Hoefflich, A., Fischer, J. R., Wolf, E., Sordat, B., & Lahm, H. (2000). Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Letters*, 151(1), 31–38. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(99\)00401-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(99)00401-2)
36. Knüpfer, H., & Preiss, R. (2010, February 7). Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients-a summary of published results. *International Journal of Colorectal Disease*, Vol. 25, pp. 135–140. <https://doi.org/10.1007/s00384-009-0818-8>
37. Esfandi, F., Mohammadzadeh Ghobadloo, S., & Basati, G. (2006). Interleukin-6 level in patients with colorectal cancer. *Cancer Letters*, 244(1), 76–78. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.12.003>
38. Wang, K., & Karin, M. (2015). Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 128, pp. 173–196). <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.04.014>
39. Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018, May 4). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Frontiers in Immunology*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>
40. Szyłberg, Ł., Janiczek, M., Popiel, A., & Marszałek, A. (2016). Expression of COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-4 in epithelium of serrated adenoma, adenoma and hyperplastic polyp. *Archives of Medical Science*, 12(1), 172–178. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.57594>
41. Sharp, S. P., Avram, D., Stain, S. C., & Lee, E. C. (2017). Local and systemic Th17 immune response associated with advanced stage colon cancer. *Journal of Surgical Research*, 208, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.09.038>
42. Kozłowski, L., Zakrzewska, I., Tokajuk, P., & Wojtukiewicz, M. Z. (2003). Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku* (1995), 48, 82–84.

43. Vahl, J. M., Friedrich, J., Mittler, S., Trump, S., Heim, L., Kachler, K., ... Finotto, S. (2017). Interleukin-10-regulated tumour tolerance in non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, *117*(11), 1644–1655. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.336>
44. Hamidullah, Changkija, B., & Konwar, R. (2012, May). Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, Vol. 133, pp. 11–21. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1855-x>
45. Abtahi, S., Davani, F., Mojtahedi, Z., Hosseini, S. V., Bananzadeh, A., & Ghaderi, A. (2017). Dual association of serum interleukin-10 levels with colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *13*(2), 252–256. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.199448>
46. Miteva, L. D., Stanilov, N. S., Deliysky, T. S., & Stanilova, S. A. (2014). Significance of –1082A/G polymorphism of IL10 gene for progression of colorectal cancer and IL-10 expression. *Tumor Biology*, *35*(12), 12655–12664. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2589-2>
47. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010, December 1). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 49, pp. 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
48. Devi, G. R., Allensworth, J. L., Evans, M. K., & Sauer, S. J. (2014). The Role of Oxidative Stress in Breast Cancer. In *Cancer: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* (pp. 3–14). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405205-5.00001-5>
49. Hendrickse, C. W., Kelly, R. W., Radley, S., Donovan, I. A., Keighley, M. R. B., & Neoptolemos, J. P. (1994). Lipid peroxidation and prostaglandins in colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, *81*(8), 1219–1223. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800810849>
50. Brasileira, R. (2014). *Mendonça PS, Carioca AAF, Maia FMM* (Vol. 60).
51. Korkmaz, G. G., Altinoglu, E., Civelek, S., Sozer, V., Erdenen, F., Tabak, O., & Uzun, H. (2013). The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *62*(6), 828–835. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.01.002>
52. Chang, D., Wang, F., Zhao, Y. S., & Pan, H. Z. (2008). Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. *Biomedical and Environmental Sciences*, *21*(4), 286–289. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(08\)60043-4](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(08)60043-4)
53. Shalapour, S., Karin, M., Shalapour, S., & Karin, M. (2015). Immunity , inflammation , and cancer : an eternal fight between good and evil Find the latest version : Immunity , inflammation , and cancer : an eternal fight between good and evil. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(9), 3347–3355. <https://doi.org/10.1172/JCI80007>.The
54. Skrzydlewska, E., Sulkowski, S., Koda, M., Zalewski, B., Kanczuga-Koda, L., & Sulkowska, M. (2005). Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *11*(3), 403–406. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i3.403>
55. Campos-Shimada, L. B., Hideo Gilgioni, E., Fernandes Garcia, R., Rizato Martins-Maciel, E., Luiza Ishii-Iwamoto, E., & Luzia Salgueiro-Pagadigorria, C. (2018, October 29). Superoxide dismutase: a review and a modified protocol for activities measurements in rat livers. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1520891>
56. Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017, September 26). Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, Vol. 398, pp. 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>

57. Chang, D., Wang, F., Zhao, Y. S., & Pan, H. Z. (2008). Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21(4), 286–289. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(08\)60043-4](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(08)60043-4)
58. Lauschke, H., Tolba, R., Burger, B., Minor, T., & Hirner, A. (2002). Lipid peroxidation as additional marker in patients with colorectal cancer: Results of a preliminary study. *European Surgical Research*, 34(5), 346–350. <https://doi.org/10.1159/000064002>

## 7. Figures and tables

**Table 1.** Characteristics of participants with colorectal cancer subdivided by clinical stages and control of participants without cancer.

Characteristics	Control (n=24)	CRC (n=36)	p value	Clinical Stages		p value
				I-II (n=25)	III-IV (n=11)	
<b>Age</b>						
Median (25%-75%)	53.25 <sup>a</sup>	60.45 <sup>#</sup>	<b>0.019*</b>	61.36 <sup>ab</sup>	59.55 <sup>b</sup>	<b>0.016*</b>
<b>Gender</b>			0.598			0.551
Male	11 (18.3%)	20 (33.3%)		15 (25%)	5 (8.3%)	
Female	13 (21.7%)	16 (26.7%)		10 (16.7)	6 (10%)	
<b>Ethnicity</b>			0.298			0.269
Caucasian	19 (31.7%)	28 (36%)		18 (30%)	10 (6%)	
Black	5 (8.3%)	5 (8.4%)		4 (6.7%)	1 (1.7%)	
Brown	0 (0.0%)	3 (5.0%)		3 (5.0%)	0 (0.0%)	
<b>Family History Cancer</b>			<b>0.018*</b>			<b>0.019*</b>
Yes	10 (16.7%) <sup>a</sup>	26 (32.7%) <sup>#</sup>		16 (26.7%) <sup>ab</sup>	10 (6.0%) <sup>b</sup>	
No	14 (23.3%) <sup>a</sup>	10 (16.70%) <sup>#</sup>		9 (15.0%) <sup>ab</sup>	1 (1.7%) <sup>b</sup>	
<b>Degree of kinship</b>			<b>0.015*</b>			0.233
Father, Mother or Brother	5 (8.3%) <sup>a</sup>	21 (56.7%) <sup>b</sup>		13 (21.7%)	8 (35%)	
Cousins	4 (6.7%) <sup>a</sup>	2 (5.0%) <sup>b</sup>		1 (1.7%)	1 (3.3%)	
Grandparents	1 (1.7%) <sup>a</sup>	3 (6.6%) <sup>a</sup>		2 (3.3)	1 (3.3%)	

Qualitative data were evaluated by using a chi-square and z test for proportion comparison, and quantitative data were evaluated by using Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test. Different letters and symbol were considered statistically different between groups and  $p < 0.05$  was considered significant.

**Table 2.** Risk factors for the development of colorectal cancer.

Factors	Control (n=24)	CRC (n=36)	p value	Clinical Stages		p value
				I-II (n=25)	III-IV (n=11)	
<b>Physical exercise</b>			0.067			0.075
No	4 (6.7%)	18 (30.0%)		12 (20.0%)	6 (10.0%)	
Light	10 (16.7%)	6 (10.0%)		5 (8.3%)	1 (1.7%)	
Moderate	10 (16.6%)	12 (20.0%)		8 (13.3%)	4 (6.7%)	
<b>Alcohol intake</b>			0.108			<b>0.018*</b>
No	10 (16.7%) <sup>a</sup>	13 (21.6%)		11 (18.3%) <sup>a</sup>	2 (3.3%) <sup>a</sup>	
Rarely	0 (0.0%) <sup>a</sup>	6 (10.0%)		2 (3.3%) <sup>a</sup>	4 (6.7%) <sup>b</sup>	
Consumes	14 (23.3%) <sup>a</sup>	17 (28.3%)		12 (20.0%) <sup>a</sup>	5 (8.3%) <sup>a</sup>	
<b>Smoking</b>			0.105			0.101
Yes	3 (5.0%)	11 (18.3%)		6 (10.0%)	5 (8.3%)	
No	21 (35.0%)	25 (41.7%)		19 (31.7%)	6 (10.0%)	
<b>Hypertension</b>			0.325			0.560
Yes	7 (11.7%)	15 (25.0%)		11 (18.3%)	4 (6.7%)	

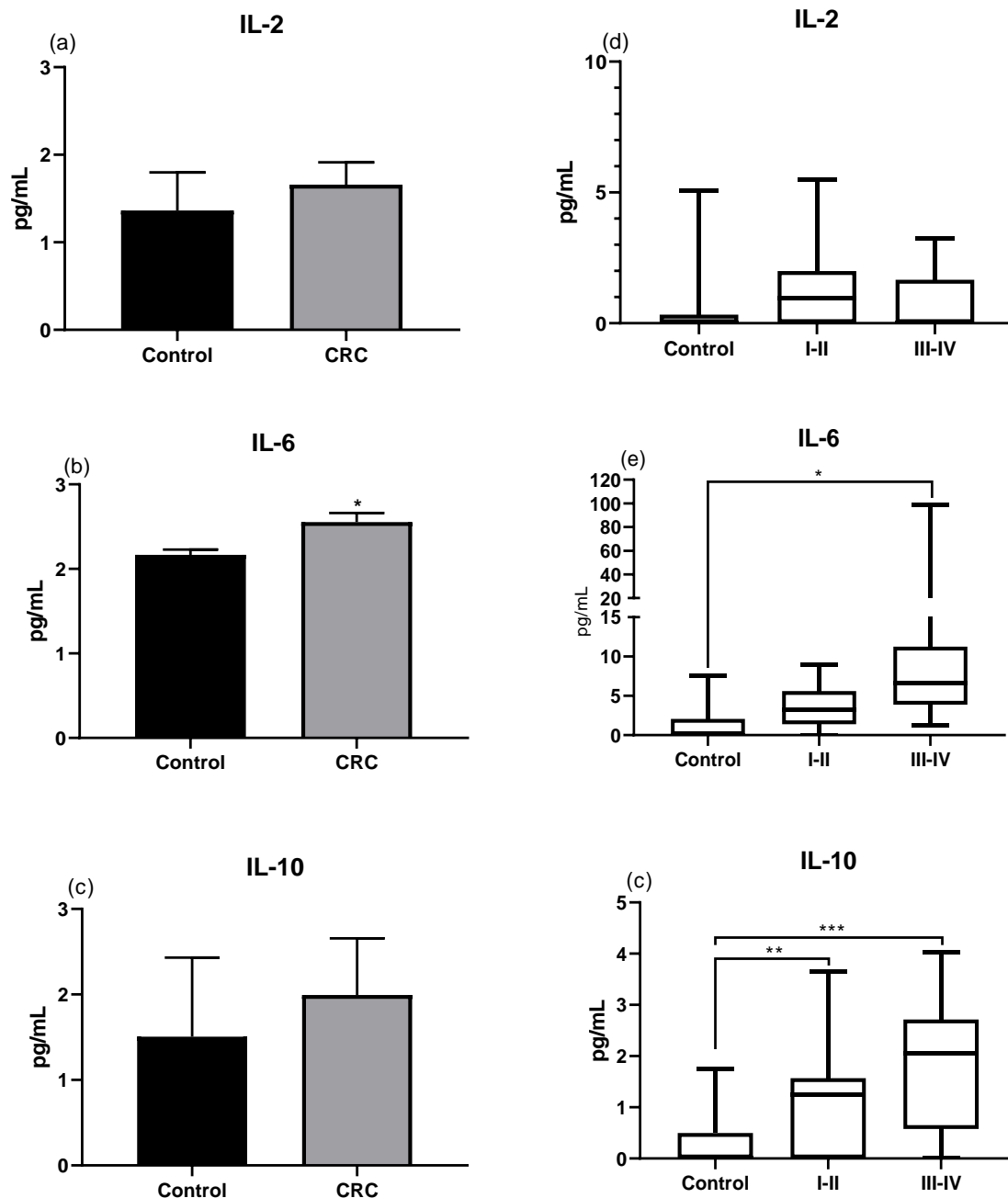
No	17 (28.3%)	21 (35.0%)		14 (23.3%)	7 (11.7%)	
<b>Diabetes</b>			0.999			0.822
Yes	6 (10.0%)	9 (15.0%)		7 (11.7%)	2 (3.3%)	
No	18 (30.0%)	27 (45.0%)		18 (30.0%)	9 (15.0%)	
<b>Fiber consumption/week</b>			0.204			0.511
No	2 (3.3%)	1 (1.7%)		0 (0.00%)	1 (1.7%)	
1-3 times	4 (6.7%)	6 (10.0%)		4 (6.7%)	2 (3.3%)	
4-7 times	18 (30.0%)	29 (48.3%)		21 (35.0%)	8 (13.3%)	
<b>Red meat</b>			0.498			0.406
No	1 (1.7%)	0 (0.00%)		0 (0.00%)	0 (0.0%)	
1-3 times	10 (16.7%)	12 (20.0%)		10 (16.7%)	2 (3.3%)	
4-7 times	13 (21.7%)	24 (35.0%)		15 (25.0%)	9 (15.0%)	
<b>Processed food</b>			0.722			0.480
No	10 (16.7%)	12 (20.0%)		9 (15.0%)	3 (5.0%)	
1-3 times	11 (18.3%)	18 (30.0%)		12 (20.0%)	6 (10.0%)	
4-7 times	3 (5.0%)	6 (10.0%)		4 (6.7%)	2 (3.3%)	

Qualitative data were evaluated by using a chi-square and z test for proportion comparison. Different letters and symbol were considered statistically different between groups and  $p < 0.05$  was considered significant.

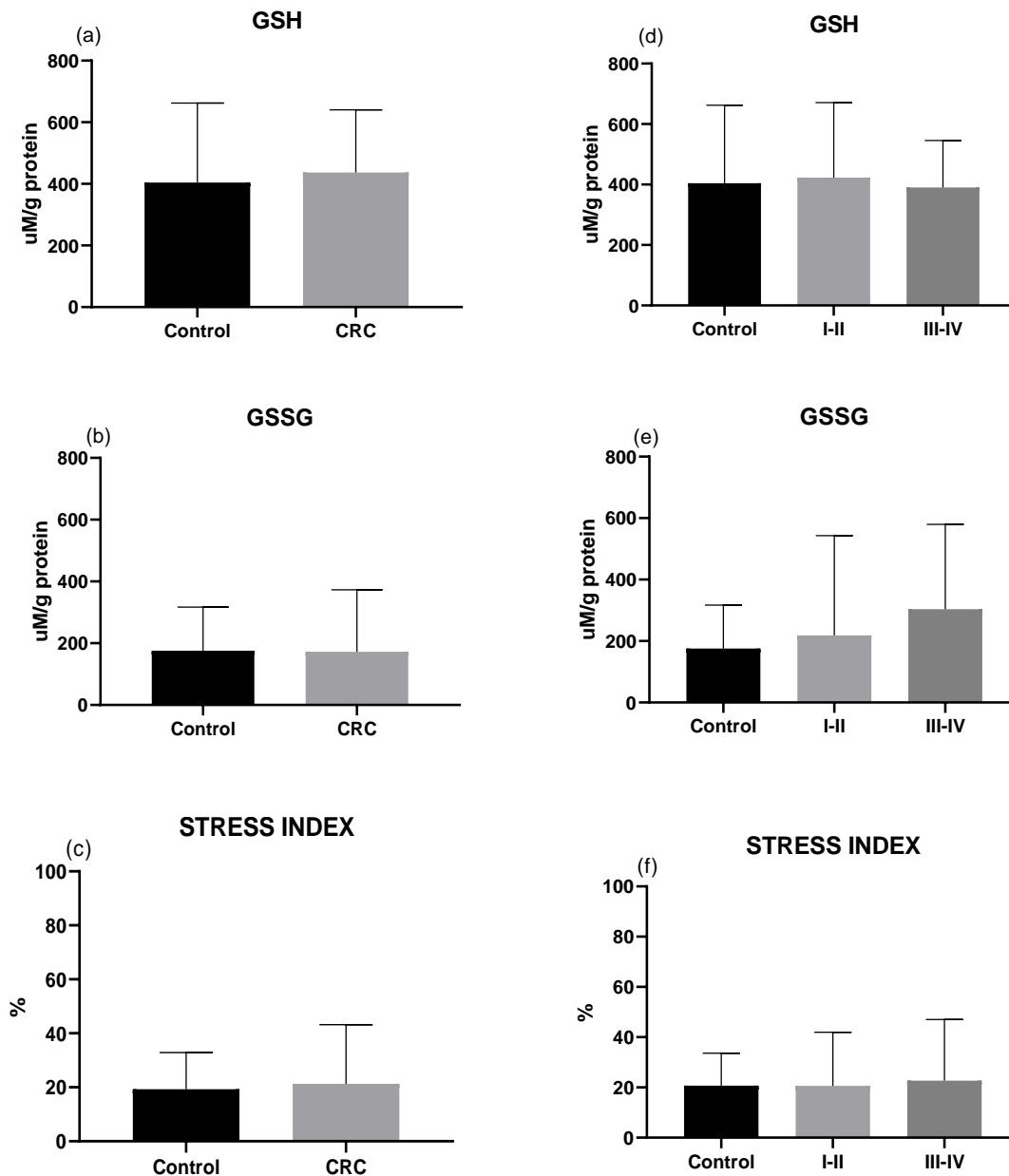
**Table 3.** Correlation between oxidative and inflammatory parameters.

<b>Parameters</b>	<b><i>r</i> value</b>	<b>p value</b>
<b>IL-6 x IL-10</b>	0.457	<b>0.001</b>
<b>CAT x IL-6</b>	0.332	<b>0.001</b>

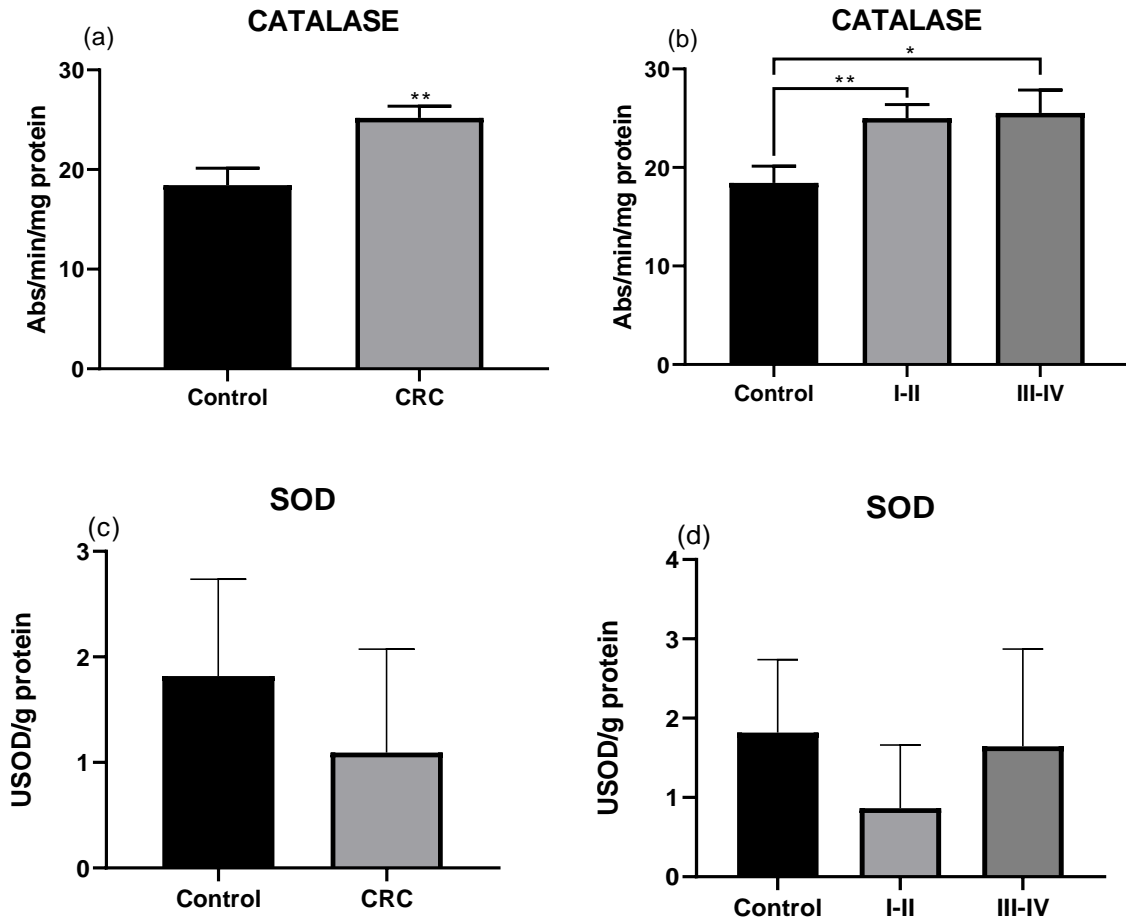
Pearson's correlation coefficient, CAT: Catalase; MDA: Malondialdehyde;  $p < 0.05$  was considered significant.



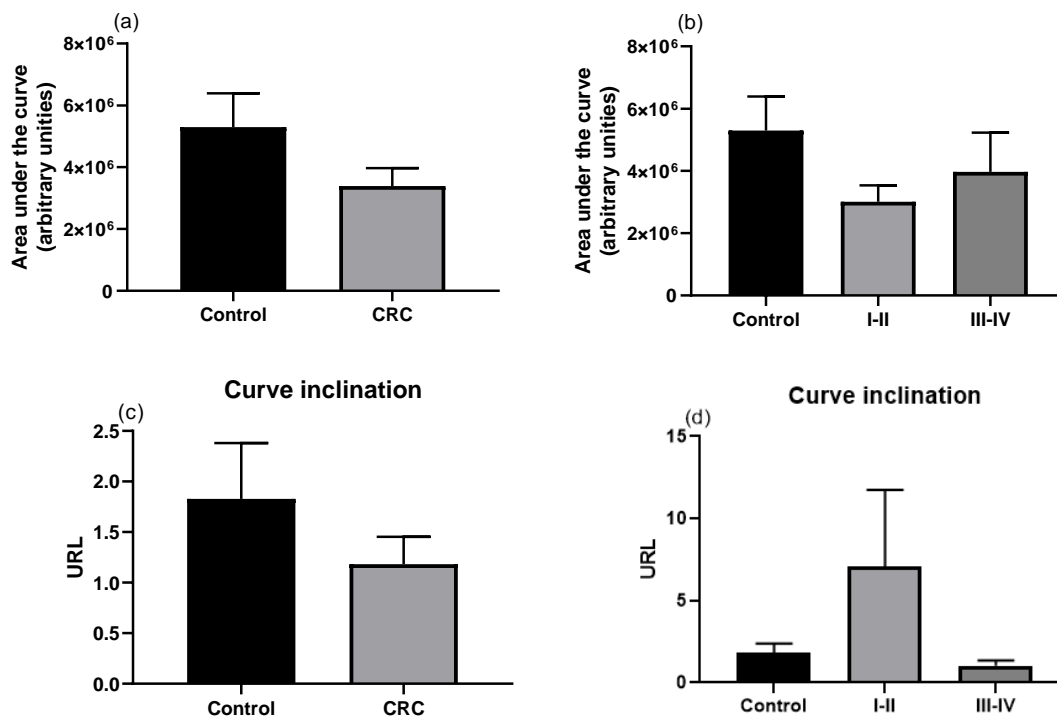
**Figure 1. Analysis of the cytokine profile in healthy patients and patients with CRC and analysis of the cytokine profile in patients divided by clinical stage of the disease. Control:** Control group; **CRC:** Colorectal cancer group; **A** - IL-2 concentration (pg / ml)  $p= 0,2646$ . **B** - IL-6 concentration (pg / ml)  $p= 0,0318$ . **C** - IL-10 concentration (pg / ml)  $p= 0,4139$ ; I-II: group with patients diagnosed with CRC in the clinical stage from I to II; III-IV: group with patients diagnosed with CRC in the clinical stage III to IV. **D** - IL-2 concentration (pg/ml). **E**- IL-6 concentration (pg/ml)  $p = 0.028$  and  $*p=0,0337$ . **F** - IL-10 concentration (pg/ml)  $p = 0.0004$  and  $**p=0,0024$ ,  $***p=0,0001$ . Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean. Student t test and One-way ANOVA was used for analyze.  $p<0.05$  was considered significant. Kit detection limit:  $<0.005$  pg/mL. The Kruskal-Wallis post-hoc and Mann-Whitney tests were used.



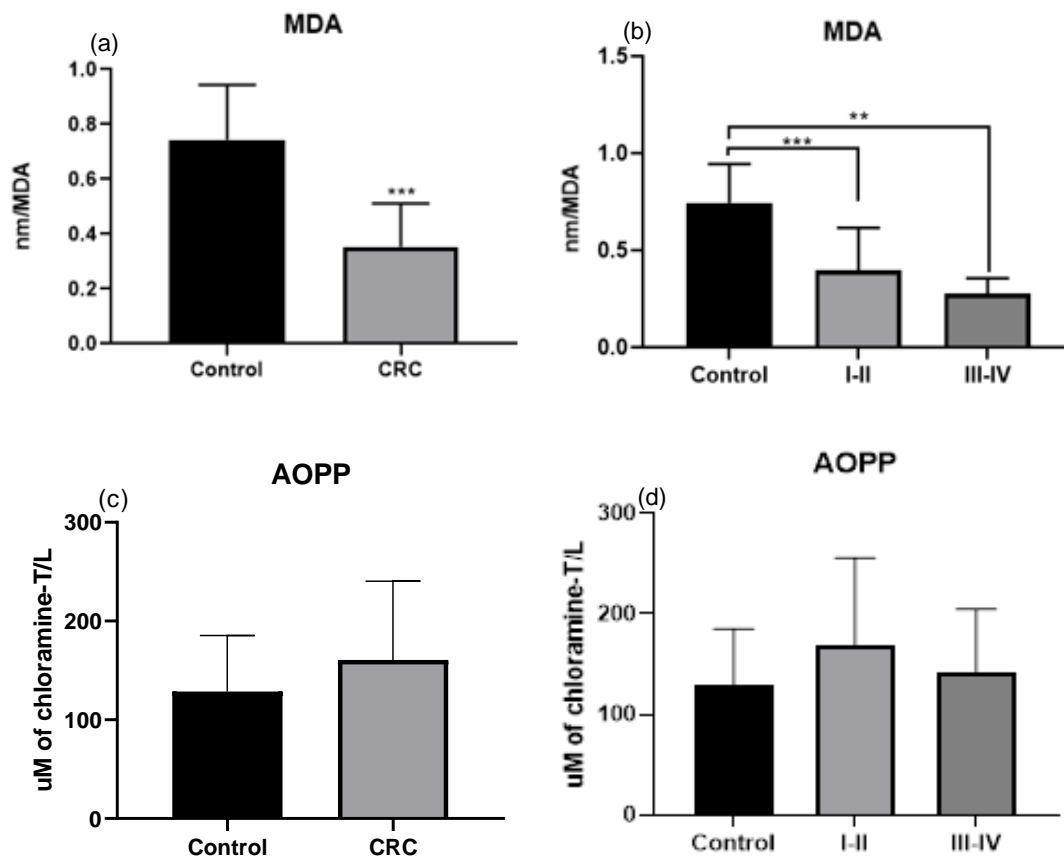
**Figure 2. Analysis of reduced, oxidized glutathione and stress index.** Control: control group; CRC: Colorectal cancer group; I-II: group with patients diagnosed with CRC in the clinical stage from I to II; III-IV: group with patients diagnosed with CRC in the clinical stage III to IV. (a,d) GSH – reduced glutathione (uM/g protein). (b,e) GSSG oxidized glutathione (uM/g protein). (c,f) Stress Index (%). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean. T test and One-way ANOVA was used for the analysis and p value less than or equal to 0.05 was considered.



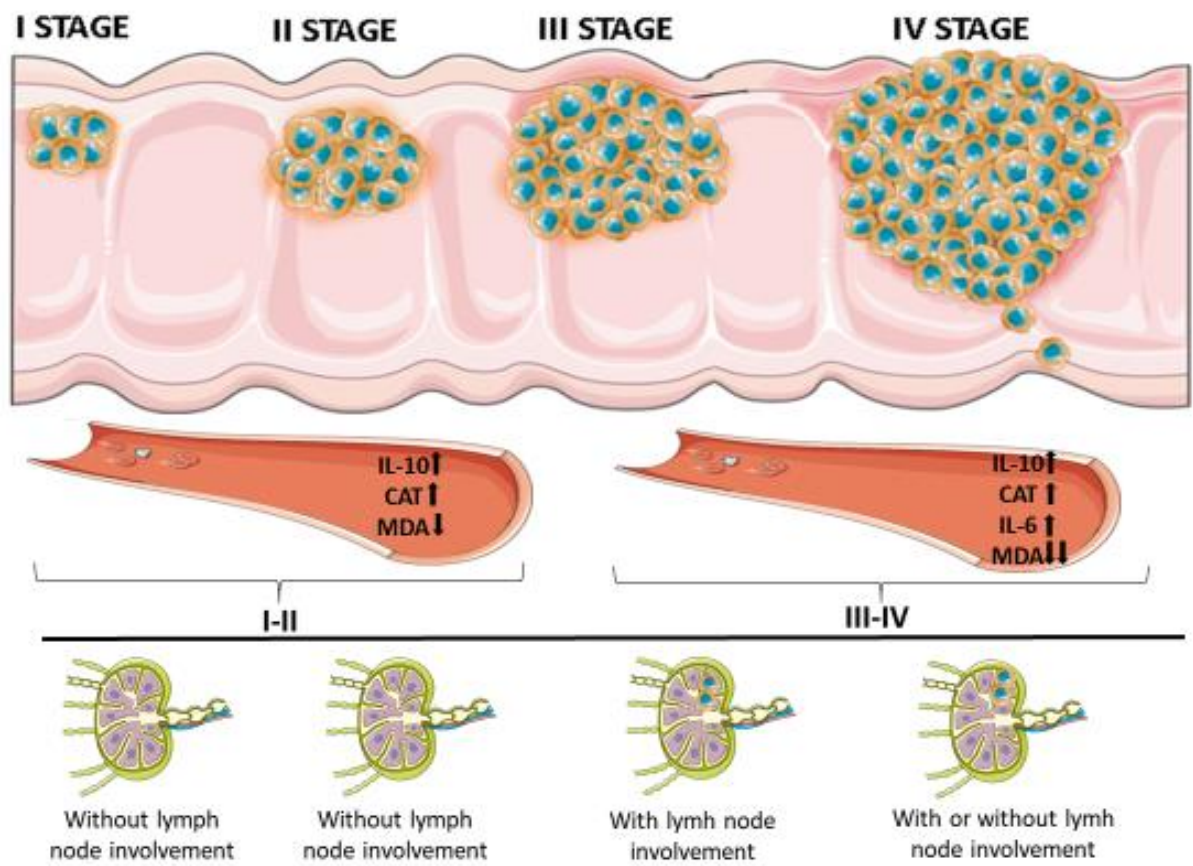
**Figure 3. Analysis of catalase activity and SOD activity.** Control: control group; CRC: Colorectal cancer group; I-II: group with patients diagnosed with CRC in the clinical stage from I to II; III-IV: group with patients diagnosed with CRC in the clinical stage III to IV. Analysis of catalase activity (Abs/min/mg protein) and SOD (USOD/g protein). **A** - Comparison between healthy group and group with CRC ( $p = 0.0024$ ), **B** - Comparison between healthy group and group with CRC divided into clinical stages, the difference is between group I-II and the control group ( $p = 0.0048$ ) and between group III-IV and the control group ( $p = 0.0188$ ); **C** - Comparison between healthy group and group with CRC for SOD ( $p = 0,1041$ ); **D** - Comparison between healthy group and group with CRC divided into clinical stages ( $p = 0,3927$ ). T-test and One-way ANOVA was used for the analysis and Tukey's post hoc, p value less than or equal to 0.05 was considered.



**Figure 4. Analysis of membrane lipoperoxidation.** Test tert-butyl hydroperoxide-induced chemiluminescence. Control: control group; CRC: Colorectal cancer group I-II: group with patients diagnosed with CRC in the clinical stage from I to II; III-IV: group with patients diagnosed with CRC in the clinical stage III to IV. **A** – curve area ( $p = 0,2309$ ); **B** – curve area in clinical stages ( $p = 0,6756$ ); **C** - curve inclination ( $p = 0,2099$ ); **D** – curve inclination in clinical stages ( $p = 0,2933$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean. Student t test and One-way ANOVA was used for analyze.  $p < 0.05$  was considered significant.



**Figure 5. Analysis of malondialdehyde and protein oxidation products.** Control: control group; CRC: Colorectal cancer group I-II: group with patients diagnosed with CRC in the clinical stage from I to II; III-IV: group with patients diagnosed with CRC in the clinical stage III to IV. Analysis of malondialdehyde (nm/MDA) and analysis AOPP (uM of chloramine-T/L) **A** - Comparison between healthy group and group with CRC ( $p = 0.0016$ ), **B** - Comparison between healthy group and group with CRC divided into clinical stages ( $p = 0.0002$ ). **C** - Comparison AOPP between healthy group and group with CRC ( $p = 0.4325$ ). **D** - Comparison between healthy group and group with CRC divided into clinical stages ( $p = 0.3819$ ). One-way ANOVA was used for the analysis and Tukey's post hoc,  $p$  value less than or equal to 0.05 was considered.



**Figure 6.** Systemic markers of OS and inflammation in the different stages of CRC

**“AVALIAÇÃO SISTÊMICA DE ESTRESSE OXIDATIVO E PERFIL INFLAMATÓRIO EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO SISTÊMICA DE ESTRESSE OXIDATIVO E PERFIL INFLAMATÓRIO EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL”**, a ser realizada no Hospital Universitário de Londrina. O objetivo da pesquisa é avaliar o perfil de estresse oxidativo e o perfil inflamatório em amostras de sangue periférico de pacientes com câncer colorretal antes do início do tratamento e correlacionar estes marcadores com o estadiamento. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: Responder um questionário simples, sobre consumo de álcool, tabagismo e exercício físico. Ceder duas amostras de sangue (apenas dois tubos com aproximadamente 5ml), não se preocupe, o sangue será coletado por um profissional capacitado.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Cerca de 20% da amostra coletada será armazenada para posterior análise em caso de repetição do experimento, lembrando que o acesso é restrito e confidencial.

Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Os benefícios esperados são: correlacionar um maior nível de estresse oxidativo com os diferentes estádios do câncer colorretal, esperamos também que haja uma alteração do perfil inflamatório nestes pacientes.

Quanto aos riscos, pode-se haver a formação de hematomas na região da coleta.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar no telefone (43) 996864065, Thiago Nascimento, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br).

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

Londrina, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

### **Pesquisador Responsável**

RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_



CONSELHO DE ÉTICA EM  
PESQUISA ENVOLVENDO  
SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL

**Pesquisador:** RODRIGO CABRAL LUIZ

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 56874216.0.0000.5231

**Instituição Proponente:** Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DA NOTIFICAÇÃO

**Tipo de Notificação:** Outros

**Detalhe:** Solicitação de adequação do parecer consubstanciado

**Justificativa:** Durante o preenchimento dos formulários, foi mantido o uso do termo "amostras em

**Data do Envio:** 15/06/2016

**Situação da Notificação:** Parecer Consubstanciado Emitido

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.611.383

#### **Apresentação da Notificação:**

Trata-se de solicitação, por parte da Instituição Co-participante, de correção de termos textuais utilizados no parágrafo 2 desta apresentação e no último parágrafo do item referente aos Riscos e benefícios, logo abaixo. Sendo assim, o texto será:

Este projeto de pesquisa que pretende estudar a correlação entre estresse oxidativo e câncer colorretal (CCR). Será realizado em 2 etapas independentes, necessitando aprovação de fomento pela Fundação Araucária / edital PPSUS. Uma etapa envolve a identificação de pacientes com CCR que serão submetidos a cirurgia no Hospital do Câncer de Londrina. Serão excluídos aqueles que fazem uso de álcool ou tabaco, bem como portadores de doenças crônicas renais, cardíacas ou hepáticas. Antes da cirurgia, tendo sido apresentado o TCLE, será coletado sangue desses

**Endereço:** LABESC - Sala 14  
**Bairro:** Campus Universitário  
**UF:** PR **Município:** LONDRINA  
**Telefone:** (43)3371-5455

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep268@uel.br



COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA ENVOLVENDO  
SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.611.383

pacientes (n= 120) para dosagens de vários marcadores de estresse oxidativo. Essa coleta será feita pelo anestesista, no momento da punção venosa para realização da anestesia, não havendo, portanto, risco aumentado para o participante.

Os dados de estresse oxidativo serão correlacionados com variáveis como sexo, idade, estadiamento da neoplasia, entre outros.

A segunda etapa utilizará dados secundários, ou seja, sem contato direto com os participantes do estudo e envolverá:

- amostras de tecido neoplásico de CCR embocado em parafina (30 a 50 amostras);
- dados dos prontuários, coletados retrospectivamente, de forma anônima, junto ao setor de Patologia Clínica do Hospital do Câncer de Londrina.

Serão utilizados marcadores para o nível de nitrosação de proteínas (Nitrotirosina), para as enzimas responsáveis pela produção do óxido nítrico (cNOS, eNOS, iNOS) e angiogênese (VEGF).

#### **Objetivo da Notificação:**

Sem alteração:

Avaliar o perfil de estresse oxidativo de pacientes com câncer colorretal, correlacionando com diversos parâmetros clínicos.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Para o sangue periférico será obtida uma pequena amostra de no máximo 11ml. Esta coleta será realizada pelo médico anestesista sob a supervisão do médico colaborador da pesquisa Dr. Jorge Mali Jr. durante o procedimento pré-anestésico da cirurgia. Como o médico anestesista fará o acesso venoso para aplicar a anestesia, já coletará o sangue, não sendo necessário fazer punção somente para a coleta de sangue. O único risco inerente é surgimento de pequena mancha roxa no local da punção. Para os demais dados secundários a serem utilizados, o risco previsto seria a identificação dos participantes da pesquisa por terceiros, o que não ocorrerá por meio da garantia do anonimato de todos os dados relativos aos mesmos.

Benefícios:

Não há benefícios imediatos para os pacientes, mas a contribuição para o conhecimento sobre o envolvimento do estresse oxidativo no CCR é de importância para o diagnóstico, prognóstico e até mesmo o tratamento de paciente no futuro.

Endereço: LABESC - Sala 14  
Bairro: Campus Universitário  
UF: PR Município: LONDRINA  
Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br

**FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS.**

Paciente n° \_\_\_\_\_  
Número do prontuário: \_\_\_\_\_

1. Idade (no diagnóstico): \_\_\_\_\_
2. Sexo: ( ) FEM ( ) MASC
3. Há histórico de câncer na família?  
( ) SIM ( ) NÃO  
Qual tipo de câncer? Qual o grau de parentesco?

4. Exercício físico ao longo da vida:  
AUSENTE ( ) LEVE ( ) MODERADO ( )  
INTENSO ( )

Leve: caminhadas por até 30min  
Moderador: caminhadas por até 60min, esporte  
Intenso: corridas, treinos para esporte, musculação  
Freq.: \_\_\_\_\_ x/semana

5. Ocupação: \_\_\_\_\_  
Entra em contato com substância química? ( ) S ( ) N  
Qual (s)? \_\_\_\_\_

6. Tabagismo: ( ) SIM ( ) NÃO  
Média cigarro/dia: \_\_\_\_\_

- Desde de que idade? \_\_\_\_\_
7. Alcoolismo: ( ) SIM ( ) NÃO ( ) CONSUME  
BEBIDA ALCOÓLICA COM POUCA FREQUENCIA
  8. É hipertenso? ( ) SIM ( ) NÃO
  9. É diabético? ( ) SIM ( ) NÃO
  10. Faz uso de medicamento de uso diário?  
( ) SIM ( ) NÃO
- Medicamentos de uso diário: \_\_\_\_\_

11. Hábitos alimentares  
( ) Consumo de fibras (legumes, vegetais, cereais)  
Freq.: \_\_\_\_\_ x/semana

- ( ) Carne vermelha  
Freq.: \_\_\_\_\_ x/semana
- ( ) Embutidos  
Freq.: \_\_\_\_\_ x/semana
- ( ) Bebida com cafeína (Café, chá, refrigerantes tipo cola)  
Freq.: \_\_\_\_\_ x/semana  
Quantidade diária aproximada: \_\_\_\_\_

12. Histórico do trânsito intestinal (antes do diagnóstico)  
( ) Regular ( ) Irregular  
Freq.: \_\_\_\_\_ x/dia \_\_\_\_\_ x/semana

13. Histórico do sistema imunológico  
Facilidade em ficar gripado ou com virose: \_\_\_\_\_  
Facilidade de ter verrugas: \_\_\_\_\_  
Transplante/Imunossupressor: \_\_\_\_\_  
Outras observações relacionadas: \_\_\_\_\_

DADOS OBSERVACIONAIS:

Etnia: \_\_\_\_\_  
Obesidade: ( ) SIM ( ) NÃO

DADO DO PRONTUÁRIO:  
Tipo de CA colorrectal: \_\_\_\_\_  
Estadiamento: \_\_\_\_\_

Resp. pela coleta de dados: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Observação: O formulário deverá ser aplicado somente se o paciente aceitar participar da pesquisa, após a assinatura do TCLE. Utilize o verso da folha, caso necessário.