



---

**MARCELO BENEDITO DA SILVA FLORES**

**O AUMENTO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL- $\alpha$  INDUZIDO  
PELA OBESIDADE LEVA AO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER  
DE CÓLON EM CAMUNDONGOS**

***“OBESITY-INDUCED INCREASE IN TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$   
LEADS TO DEVELOPMENT OF COLON CANCER IN MICE”***

**CAMPINAS**

**2012**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

---

**MARCELO BENEDITO DA SILVA FLORES**

**O AUMENTO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL- $\alpha$  INDUZIDO  
PELA OBESIDADE LEVA AO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE  
CÓLON EM CAMUNDONGOS**

**Orientador/Supervisor: PROF. DR. JOSÉ BARRETO CAMPELLO CARVALHEIRA**

***“OBESITY-INDUCED INCREASE IN TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$   
LEADS TO DEVELOPMENT OF COLON CANCER IN MICE”***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas

*Doctoral Thesis presented to the Internal Medicine Postgraduated Program of the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, for obtainment of the Ph.D. degree in Internal Medicine.*

ESTE exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno **MARCELO BENEDITO DA SILVA FLORES** e orientada pelo **Prof. Dr. JOSÉ BARRETO CAMPELLO CARVALHEIRA**.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "José Barreto Campello Carvalho".

---

Assinatura do Orientador

**Campinas**

**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

F663a Flores, Marcelo Benedito da Silva, 1969-  
O aumento do fator de necrose tumoral- $\alpha$  induzido  
pela obesidade leva ao desenvolvimento do câncer de  
cólon em camundongos / Marcelo Benedito da Silva  
Flores. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Jose Barreto Campello Carvalheira.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias do cólon. 2. Obesidade. 3. Inflamação.  
4. Resistência à insulina. I. Carvalheira, Jose Barreto  
Campello, 1971-. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Obesity-induced increase in tumor necrosis factor- $\alpha$  leads to development of colon cancer in mice.

**Palavras-chave em inglês:**

Colonic neoplasms

Obesity

Inflammation

Insulin resistance

**Área de concentração:** Ciências Básicas

**Titulação:** Doutor em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Laura Sterian Ward

Denise Vaz de Macedo

Patrícia de Oliveira Prada

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti

**Data da defesa:** 29-10-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

## Banca examinadora da tese de Doutorado

Marcelo Benedito da Silva Flores

---

---

Orientador: Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

---

---

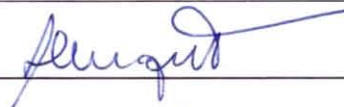
### Membros:

---

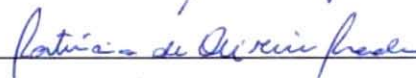
1. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Roberta de Oliveira Carvalho



2. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti



3. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia de Oliveira Prada



4. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Vaz de Macedo



5. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laura Sterian Ward



Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 29/10/2012

---



*Aos meus pais,  
Maria Benedita e José,  
Maria Aparecida e Manoel.*

*Aos meus irmãos  
Marcos, Adriana, Benedita Célia, Célia Regina,  
Inês, José Tadeu, Manoel,  
Maria Aparecida, Mário e César  
pelo estímulo e confiança.*

*Ao meu amigo Rogério, in memoriam.*





## AGRADECIMENTOS

---

Ao meu orientador José Barreto Campello Carvalheira, pela sua orientação competente e desafiadora, características que me levaram à autonomia nas formas de pensar e fazer ciência.

Ao Prof. Dr. Sigisfredo Brenelli, pelo incentivo ao meu ingresso na pós-graduação e sua amizade.

Ao Prof. Dr. Hernandes de Carvalho, pela sua relevante colaboração, amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Mário Saad, que nunca impôs obstáculos aos novos alunos que usufruíram do laboratório por ele conduzido e fez desse espaço um ambiente diferenciado de crescimento e desenvolvimento de todos os que ali estiveram.

Ao Prof. Dr. Lício Velloso, por sempre ser solícito aos pedidos de colaboração junto aos seus laboratórios.

Aos amigos que de forma especial estiveram ao meu lado durante esse período:

*Fabio Shikasho*

*Daniel Ivo de Oliveira*

*Daniela Manini e Denis Vicente Lopes*

*Sr. Luis Janieri*

*Juliana Alves Camargo*





# RESUMO



O câncer colorretal é um dos maiores problemas de saúde em todo o mundo acometendo 1 milhão de pessoas por ano. O índice de morte associado a essa doença é de aproximadamente 33% no mundo desenvolvido. A associação entre a obesidade e o risco para o desenvolvimento desse câncer é observada tanto em homens quanto em mulheres. A inflamação e a hiperinsulinemia, condições verificadas na obesidade podem contribuir, a princípio, para o risco de desenvolvimento do câncer colorretal. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é um dos mais importantes mediadores da resposta inflamatória e sua alta expressão pelo tecido adiposo é verificada nas condições de obesidade tanto em modelos animais quanto em humanos. O TNF- $\alpha$  contribui para a desregulação da via da sinalização insulínica através da fosforilação em serina dos substratos do receptor desse hormônio (IRS) mediada pela ativação de quinases como c-jun N terminal quinase (JNK) e da quinase inibidora do fator nuclear NF- $\kappa$ B (IKK). A ativação dessas quinases induz a fosforilação inibitória do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) através da serina 307 (Ser<sup>307</sup>). Esse mecanismo reduz a ativação da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt e da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) mediada pela insulina. TNF- $\alpha$  foi, a princípio, identificado como um agente anti-tumoral. Atualmente essa citocina é reconhecida como uma promotora da tumorigênese e que associa a inflamação ao câncer. A importância do TNF- $\alpha$  e de seus mediadores intracelulares, JNK e IKK, como promotores do câncer de cólon é corroborada por estudos farmacológicos que utilizaram o azoximetano (AOM) ou AOM associado ao dextran sulfato de sódio (DSS) como indutores do câncer colorretal. Ademais, o aumento das concentrações do TNF- $\alpha$  associado à obesidade é um mecanismo comprovado de aumento do câncer de fígado em modelos animais. Embora as evidências de que a inflamação e a hiperinsulinemia tenham um envolvimento em potencial na gênese tumoral mediada pela obesidade, a avaliação sistemática da contribuição independente desses fatores para o desenvolvimento do câncer colorretal ainda é inconsistente. Neste trabalho, foi avaliado se a obesidade modulou a sinalização insulínica e a inflamação em tecido colônico e nos tumores colorretais.

Foi mostrado que a resposta inflamatória anormal induzida pela obesidade promoveu de forma contundente o câncer colorretal.



# **ABSTRACT**





Colorectal cancer (CRC) remains a major health burden with more than 1 million cases worldwide and a disease-specific mortality of approximately 33% in the developed world. The association between obesity and the risk for CRC development is observed in both men and women. In addition to its association with obesity, inflammation and hyperinsulinemia also primarily may contribute to the risk for development of CRC. Among the major mediators of the inflammatory response is tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), whose overexpression in adipose tissue is a common feature in human and animal models of obesity. TNF- $\alpha$  contributes to the deregulation of the insulin-signaling pathway, including serine phosphorylation of insulin-receptor substrate (IRS) proteins by kinases such as c-jun N terminal kinase (JNK) and inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B kinase (IKK). JNK and IKK activation induce inhibitory serine 307(Ser<sup>307</sup>) phosphorylation of IRS-1, which decreases insulin-mediated phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway activation. TNF- $\alpha$ , first identified as an antitumor agent, now also is recognized as a tumor-promoting cytokine that links inflammation and cancer. The importance of TNF- $\alpha$  and its intracellular mediators, such as JNK and IKK, as colonic tumorigenic promoters is strengthened by knockout and pharmacologic studies, using azoxymethane (AOM) or AOM combined with dextran sulfate sodium (DSS) as inducers of colorectal carcinogenesis. Furthermore, the increased TNF- $\alpha$  levels associated with obesity are a potent liver tumor promoter in mice. Although the evidence for the potential involvement of inflammation and hyperinsulinemia in the development of obesity-mediated cancer is quite extensive, a systematic evaluation of the independent contribution of these factors to CRC development is lacking. Here, we examined whether obesity modulates insulin signaling and inflammation in the colon and CRC. We show that the obesity induced abnormal inflammatory response strongly promotes CRC.



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>Akt/PKB</b>	Proteína quinase B
<b>AMP</b>	Monofosfato de adenosina
<b>AMPK</b>	Proteína quinase dependente de AMP
<b>AOM</b>	Azoximetano
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>BAD</b>	Proteína pró-apoptótica
<b>cAMP</b>	Adenosina 3', 5'- monofosfato cíclico
<b>CRC</b>	<i>Colorectal cancer</i> (Câncer colorretal)
<b>DEN</b>	Dietilnitrosamina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DSS</b>	Dextran sulfato de sódio
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>E2</b>	Estradiol
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Receptor de estrógeno alfa
<b>ER<math>\beta</math></b>	Receptor de estrógeno beta
<b>ERK</b>	Quinase regulada por sinal extra-celular



<b>Gab-1</b>	Proteína associada ao Grb2
<b>GH</b>	Hormônio de crescimento
<b>GSK3</b>	Glicogênio sintase quinase
<b>HFD</b>	<i>High-fat diet</i> (Dieta hiperlipídica)
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento análogo à insulina 1
<b>IGFs</b>	Fatores de crescimento análogos à insulina
<b>IGF-1R</b>	Receptor do fator de crescimento análogo à insulina 1
<b>IGF-2R</b>	Receptor do fator de crescimento análogo à insulina 2
<b>IGFBP</b>	Proteína carreadora de IGF
<b>IGFBP-1</b>	Proteína carreadora do IGF-1
<b>IGFBP-2</b>	Proteína carreadora do IGF-2
<b>IGFBP-3</b>	Proteína carreadora do IGF-3
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inibidor do NF $\kappa$ B no citoplasma
<b>IKK</b>	<i>Inhibitor of I<math>\kappa</math>B Kinase</i> (Complexo de quinases que ativam o NF- $\kappa$ B)
<b>IP</b>	<i>Intraperitoneally</i> (Intra-peritoneal)



<b>IRS</b>	Substratos do receptor de insulina
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>IRS-1</b>	Substrato 1 do receptor de insulina
<b>IRS-2</b>	Substrato 2 do receptor de insulina
<b>JAK</b>	Janus quinase
<b>JNK</b>	Quinase da c-Jun
<b>Ki-67</b>	Anticorpo mouse monoclonal - clone MIB-1
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativadora de mitose
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática de monócitos 1
<b>mTOR</b>	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
<b>NF-κB</b>	Fator de transcrição <i>nuclear factor kappa B</i>
<b>NPEY</b>	Sequência tetramérica de aminoácidos do domínio justamembrana do receptor de insulina em humanos
<b>OBR</b>	Receptor de leptina
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PCOS</b>	Síndrome do ovário policístico
<b>PDK1</b>	Proteína quinase dependente de fosfoinosítideo 1
<b>PIO</b>	Pioglitazona
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinase





<b>PKC</b>	Proteína quinase dependente de cálcio
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetil sulfona
<b>PTB</b>	Domínio de ligação fosfotirosina
<b>PTEN</b>	Proteína fosfatase e homóloga tensina
<b>Rheb</b>	Proteína homóloga da Ras enriquecida no cérebro
<b>ROS</b>	Espécies reativas ao oxigênio
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SCID</b>	Imunodeficiência severa combinada
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
<b>S6k</b>	Quinase S6 ribossomal
<b>S6k1</b>	Proteína ribossomal S6 polipeptídeo
<b>Ser<sup>307</sup></b>	Serina <sup>307</sup>
<b>Shc</b>	Substrato do receptor de insulina homólogo a Src
<b>SHP-2</b>	Proteína tirosina fosfatase
<b>TSC1</b>	Complexo 1 da esclerose tuberosa
<b>TSC2</b>	Complexo 2 da esclerose tuberosa
<b>STAT3</b>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
<b>TLRs</b>	Receptores do tipo <i>toll like</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral-alfa



<b><i>Tnfr1</i></b>	Receptor do TNF- $\alpha$
<b>Tris</b>	Tri (hidroximetil)-aminometano
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-d UTP Nick End Labeling</i>



	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1</b> Sumário da tendência estimada para o risco relativo na incidência de câncer, por tipo.....	41



## LISTA DE FIGURAS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Vias de sinalização da insulina e do fator de crescimento 1 análogo à insulina.....	55
<b>Figura 2</b> Ativação da via de sinalização inflamatória pelo TNF- $\alpha$ .....	65





	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO.....</b>	xi
<b>ABSTRACT.....</b>	xv
<b>1- INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	35
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	71
<b>3- CAPÍTULO.....</b>	75
<b>Artigo 1- Obesity-Induced Increase in Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math>     Leads to Development of Colon Cancer in Mice.....</b>	77
<b>4- CONCLUSÃO GERAL.....</b>	117
<b>5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	121





# **1- INTRODUÇÃO GERAL**



A habilidade em estocar a energia excedente na forma de tecido adiposo foi uma estratégia adaptativa útil que permitiu aos nossos ancestrais sobreviverem em períodos de privação alimentar. Atualmente, esse traço evolutivo do metabolismo humano, quando associado à elevada ingestão calórica e à relativa falta de atividade física, resulta num fenótipo complexo que é a obesidade<sup>(1)</sup>.

Essa doença nutricional é atualmente considerada uma epidemia global. Em 2008, foi estimado que aproximadamente 1,5 bilhão de pessoas se encontravam em estado de sobrepeso e 500 milhões desse contingente foram considerados obesos<sup>(2)</sup>. Esse quadro levou à intensa investigação científica nessa área, porém, apesar disso, a tendência do aumento dessa epidemia continua. A Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê que aproximadamente 800 milhões de adultos serão obesos em 2015<sup>(2)</sup>. Esse quadro é compreendido atualmente como o maior problema de saúde pública em todo mundo, com uma série de comorbidades associadas ao sobrepeso e à obesidade, tais como doenças vasculares cerebrais, hipertensão, diabetes e doenças hepáticas<sup>(3)</sup>. Entretanto atualmente há evidências epidemiológicas consideráveis de que a obesidade tem efeitos fisiopatológicos que não se circunscrevem às bem estabelecidas comorbidades, nesse sentido incluem-se vários cânceres em órgão-específicos<sup>(4-5)</sup>. Particularmente a associação entre a obesidade e o câncer de cólon é atualmente uma questão bem estabelecida<sup>(4-8)</sup>.

As evidências epidemiológicas das ligações entre obesidade e câncer foram oficialmente endossadas pelo *World Cancer Research Fund* e pelo *American Institute for Cancer Research*. Esses órgãos em conjunto estabeleceram as bases que associaram a relação causal entre dieta e estilo de vida ao risco para o desenvolvimento de vários cânceres e sugeriram que a manutenção do peso corporal em padrões adequados, a adesão às práticas de atividade física e a redução na ingestão de alimentos com altos teores calóricos são comportamentos que diminuem o risco para vários cânceres. Interessantemente, essas três recomendações estão associadas também às medidas profiláticas em relação à

obesidade<sup>(9)</sup>. Mais recentemente, os mesmos órgãos supracitados, através de uma revisão sistemática da literatura confirmaram as associações entre os efeitos da dieta e do estilo de vida, como a adiposidade corporal e abdominal, ao aumento do risco para o desenvolvimento do câncer colorretal<sup>(10)</sup>.

A obesidade está fortemente associada às mudanças nas funções fisiológicas do tecido adiposo, levando à resistência insulínica, à inflamação crônica e a síntese alterada de adipocinas<sup>(11)</sup>. Além da função primária do tecido adiposo como um órgão de reserva energética, ele também é considerado um órgão endócrino, uma vez que o tecido adiposo sintetiza e secreta um conjunto de esteróides sexuais, peptídeos bioativos como as adipocinas, envolvidas na regulação fisiológica do metabolismo energético, na ingestão alimentar, na sensibilidade insulínica e na resposta do sistema imune, dentre outras funções<sup>(12)</sup>. De fato, o tecido adiposo disfuncional pode ter uma função essencial nas doenças associadas à obesidade como inflamação, resistência insulínica e alguns cânceres. Muitos desses fatores, como a resistência insulínica, a inflamação crônica, as concentrações reduzidas de adiponectina, as elevadas concentrações dos esteróides sexuais e da leptina, podem estar associados à carcinogênese e à progressão tumoral<sup>(11)</sup>.

O paradigma de que 90% de todos os cânceres estão associados a fatores relacionados ao estilo de vida e ao meio ambiente é atualmente bem compreendido<sup>(13-14)</sup>. Por exemplo, quase 30% de todos os cânceres são atribuídos ao fumo do tabaco, 35% à dieta, 14-20% à obesidade, 18% às infecções e 7% às radiações e aos poluentes ambientais<sup>(15)</sup>. Os mecanismos moleculares pelos quais esses fatores de risco causam câncer tornam-se cada vez mais evidentes e um dos mais importantes processos que se estabelece em comum entre todos esses fatores de risco é a inflamação. A inflamação crônica age como um fator de regulação da promoção e progressão tumoral através de vários mecanismos como: aceleração da proliferação celular, evasão da apoptose e aumento da angiogênese e da metástase<sup>(16)</sup>.

As comorbidades associadas à obesidade são, em grande parte, atribuídas à inflamação crônica, uma característica metabólica das condições de obesidade. Como consequência do aumento no tamanho dos adipócitos nessa condição fisiopatológica, há necrose dessas células e, subsequentemente, sinais gerados pela inflamação permitem a infiltração de macrófagos nos tecidos alvos<sup>(17)</sup>. Os adipócitos e as células do sistema imune agem em conjunto, produzindo uma série de mediadores pró-inflamatórios. Esse perfil inflamatório do tecido adiposo disfuncional é caracterizado pelo aumento da secreção das citocinas pró-inflamatórias, interleucina-6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e pela redução da expressão da adipocina anti-inflamatória adiponectina. Além disso, a liberação de ácidos graxos insaturados pelo tecido adiposo hipertrófico proporciona uma estimulação inflamatória adicional através de suas interações com receptores do tipo *toll like* (TLRs) e subsequente ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)<sup>(18)</sup>. De forma geral, o perfil de produção e secreção de adipocinas e de outras moléculas pelo tecido adiposo contribui para a tumorigênese associada à obesidade através do aumento do estresse oxidativo, da ativação de proto-oncogenes e da ativação de células do sistema imune, dentre outros mecanismos.

### **1.1- Aspectos epidemiológicos do câncer na obesidade**

As relações entre obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares têm sido amplamente investigadas e satisfatoriamente elucidadas. Entretanto, apenas mais recentemente, tornou-se evidente que a obesidade está associada ao aumento da frequência de muitos cânceres<sup>(19)</sup>. Dados epidemiológicos irrefutáveis, tanto da *Agency for Research on Cancer* (IARC)<sup>(20)</sup> quanto da *World Câncer Research Found* (WCRF)<sup>(21)</sup> concluíram que a associação acima mencionada é positiva para o adenocarcinoma de esôfago e para os cânceres de pâncreas, colorretal, mama na pós-menopausa, endométrio e

rim, além de haver evidências também no aumento do risco para o desenvolvimento do câncer de vesícula biliar.

A associação entre obesidade e os cânceres de maior prevalência, assim como para os menos frequentes, foi confirmada num trabalho de coorte britânico com um milhão de mulheres investigadas e, também, através de um estudo sistemático de meta-análise multiétnico (Tabela 1). É importante notar que essa análise multiétnica encontrou uma associação constante entre o aumento do índice de massa corporal (IMC) e câncer nas diversas populações avaliadas, com exceção para o câncer de mama na pós-menopausa, no qual a associação é positiva para as populações asiáticas do pacífico, porém há uma relação inversa nas outras regiões pesquisadas<sup>(19,22)</sup>. A influência do IMC sobre o risco de desenvolver câncer difere significativamente de acordo com os períodos pré e pós-menopausa; há um risco maior para o desenvolvimento dos cânceres colorretal e melanoma maligno para as mulheres na pré-menopausa, enquanto na pós-menopausa, verifica-se um maior risco para os cânceres de mama e endométrio<sup>(19,22)</sup>. No tocante às comparações entre os sexos, há diferenças nas associações para alguns locais de ocorrência do câncer, especialmente cólon, reto e rim<sup>(23)</sup>, conforme dados da tabela a seguir:



**Tabela 1** - Sumário da tendência estimada para o risco relativo na incidência de câncer, por tipo, adaptado de dois trabalhos abrangentes<sup>(22,23)</sup>. Os dados em itálico não tiveram significância. NA, não avaliado.

	<b>Cohort britânico</b>	<b>Meta-análise multi-étnico</b>	
Incidência de casos	45,037	282,137	
	Tendência no risco relativo para cada 10kg/m <sup>2</sup>	Tendência no risco relativo para cada 5kg/m <sup>2</sup>	
<b>Local do câncer</b>	<b>Mulher</b>	<b>Mulher</b>	<b>Homem</b>
Endométrio	2.89	1.59	NA
Adenocarcinoma de esôfago	2.38	1.51	1.52
Rim	1.53	1.34	1.24
Leucemia	1.50	1.17	1.08
Mieloma múltiplo	1.31	1.11	1.11
Linfoma não Hodgkin	1.17	<i>1.07</i>	1.06
Mama (pós-menopausa)	1.4	1.12	NA
Colorretal (pré-menopausa)	1.61	NA	NA
Cólon	NA	1.09	1.24
Reto	NA	<i>1.02</i>	1.09
Vesícula biliar	NA	1.59	<i>1.09</i>
Próstata	NA	NA	<i>1.03</i>
Pâncreas	1.24	1.12	<i>1.07</i>
Ovário	1.14	<i>1.03</i>	NA
Fígado	NA	<i>1.24</i>	<i>1.07</i>
Estômago	<i>0.90</i>	<i>1.04</i>	<i>0.97</i>

## 1.2- Obesidade e prognóstico para o câncer

Considerando-se que a obesidade é constantemente associada ao risco para o câncer em vários órgãos, o fato de que o aumento da adiposidade corporal tenha uma influência negativa no tratamento do câncer e na sobrevivência de pessoas acometidas por essa doença é uma questão clara. Dados de um amplo estudo de coorte americano publicado por Calle e colaboradores<sup>(24)</sup> ofereceram evidências iniciais de que a obesidade pode ser um fator prognóstico negativo em pacientes diagnosticados com essa doença. Os indivíduos com IMC  $\geq 40 \text{kg/m}^2$  tiveram taxas de mortalidade superiores àqueles com peso corporal adequado. Essas taxas foram 52% maiores entre os homens e 62% maiores entre as mulheres. Esses resultados foram posteriormente confirmados por Reeves e colaboradores<sup>(22)</sup> num outro trabalho de coorte britânico. Essas observações basearam-se em diferentes modelos de estudo do câncer, onde animais com obesidade induzida através de dieta específica tiveram um pior prognóstico para o câncer<sup>(25)</sup>, enquanto que a restrição calórica representou um melhor prognóstico nesses modelos<sup>(26)</sup>.

## 1.3- Obesidade e risco para o desenvolvimento do câncer de cólon

O câncer de cólon é a terceira forma de câncer mais prevalente no mundo ocidental, acometendo tanto homens quanto mulheres e responde por 10% de todos os novos casos de câncer e 10% das mortes relacionadas a essa neoplasia por ano <sup>(27-29)</sup>. Apesar das medidas e recomendações por parte dos órgãos públicos de saúde, a incidência dessa doença não demonstra sinais de declínio<sup>(27-29)</sup>. *The National Program of Cancer Registries* reportou mais de 800 mil novos casos de câncer de cólon nos Estados Unidos entre os anos de 1999 a 2004<sup>(30)</sup> e, apenas no ano de 2010, *The American Cancer Society* reportou, aproximadamente, 102.900 novos casos de câncer de cólon e 51.370 mortes relacionadas a essa neoplasia<sup>(31)</sup>. A obesidade está associada tanto ao aumento do risco para o câncer colorretal<sup>(32,33)</sup>, assim como à recorrência dessa neoplasia e mortalidade a ela associada<sup>(34)</sup>.

Fatores ambientais e determinados estados metabólicos estão associados às mudanças moleculares que alteram o risco para o desenvolvimento do câncer de cólon. Observações epidemiológicas sugerem que determinadas drogas anti-inflamatórias, assim como certas dietas alimentares, influenciam no risco, no desenvolvimento e no prognóstico desse câncer<sup>(35-38)</sup>. Por outro lado, o incremento no IMC de 20kg/m<sup>2</sup> para 25kg/m<sup>2</sup> pode aumentar o risco para o desenvolvimento desse câncer em 50% e o IMC ≥30kg/m<sup>2</sup> pode dobrar o risco para essa neoplasia<sup>(39)</sup>.

## **1.4- Cânceres relacionados à obesidade**

### 1.4.1- Câncer colorretal

A obesidade tem sido correlacionada ao elevado risco para o desenvolvimento do câncer colorretal. Porém há diferenças significativas relacionadas ao sexo e ao local da ocorrência dessa neoplasia. A associação entre o IMC e o risco para o câncer de cólon é positiva nos homens, (RR)=1.24, no entanto, no tocante às mulheres, essa associação é menos evidente, RR=1.09<sup>(23)</sup>. A associação entre a obesidade e o câncer de reto também é inconsistente e presente apenas nos homens, com risco relativo de 1.09.

Existem algumas hipóteses para essa diferença entre os sexos. Uma delas se refere à adiposidade central, bastante frequente nos homens e que pode ter um desempenho importante na fisiopatologia da associação entre a obesidade abdominal e o aumento do risco para essa neoplasia. Isso porque a obesidade abdominal tem sido, de forma mais contundente, associada às anormalidades metabólicas do que a obesidade gluteofemoral<sup>(40)</sup>. Essa hipótese tem sido sustentada através de evidências epidemiológicas que associaram o aumento do diâmetro da cintura ou o aumento da relação cintura-quadril ao risco para o câncer de cólon em homens e mulheres, embora as alterações do peso corporal e do IMC tenham sido associadas ao risco de câncer de cólon apenas

nos homens<sup>(41)</sup>. Entretanto tais resultados antropométricos não foram reproduzidos para o risco de câncer retal. Esses dados epidemiológicos foram embasados por resultados robustos que associaram a resistência à insulina e, subsequentemente, à hiperinsulinemia como fatores de risco para esse tipo de câncer<sup>(42)</sup>.

Os efeitos do fator de crescimento análogo à insulina 1 (IGF-1) na promoção de determinados cânceres são bem estabelecidos. O aumento na biodisponibilidade dessa proteína está relacionado à hiperinsulinemia. Além disso, a insulina interage nesse eixo fisiológico reduzindo a síntese de proteínas carreadoras de IGF (IGFBP)<sup>(43)</sup>. Dados epidemiológicos laboratoriais e clínicos são convergentes no que se refere às interações fisiológicas do IGF-1 à gênese do câncer colorretal<sup>(43-45)</sup>. Além disso, as altas concentrações plasmáticas do peptídeo C e as baixas concentrações plasmáticas das proteínas carreadoras do fator de crescimento análogo à insulina 1 (IGFBP-1) foram implicadas no aumento da mortalidade entre pacientes que passaram por ressecção cirúrgica do câncer de cólon<sup>(46)</sup>. Esse conjunto de dados levou à hipótese de que as concentrações circulantes de insulina e IGFBP-1 poderiam ser potenciais mediadores entre a associação dos efeitos da obesidade e a mortalidade verificada nos pacientes após ressecção do câncer de cólon.

No tocante às citocinas e hormônios sintetizados no tecido adiposo, coletivamente chamados de adipocinas, estudos recentes comprovaram suas participações nos processos oncogênicos. A leptina, cujas concentrações circulantes estão fortemente relacionadas ao montante de tecido adiposo corporal, assim como à resistência insulínica, foi relacionada à progressão do câncer de cólon em modelos experimentais<sup>(47-49)</sup>. Esse hormônio transmite informações ao cérebro sobre o *status* de energia corporal armazenada na forma de tecido adiposo e suas concentrações aumentam nos estados de excesso de alimentação<sup>(50)</sup>. Por outro lado, a restrição calórica, um mecanismo bem estabelecido de proteção carcinogênica<sup>(51)</sup>, diminui as concentrações de leptina<sup>(51,52)</sup>. Sob essas evidências, a leptina foi considerada como a provável ligação entre obesidade e o câncer de cólon. Estudos de caso-controle embasam

tal hipótese<sup>(49,53)</sup>, onde se verificaram associações significativas entre as concentrações de leptina e o aumento no risco para o câncer de cólon, porém essas associações não se comprovaram para o risco de câncer de reto. Em contrapartida, a adiponectina, uma adipocina que tem suas concentrações diminuídas na obesidade, é inversamente relacionada à resistência à insulina e tem função antiinflamatória bem estabelecida na literatura<sup>(54)</sup>. Há informações controversas a respeito das baixas concentrações plasmáticas de adiponectina associadas ao aumento no risco para o câncer colorretal em homens e novos estudos prospectivos são necessários na investigação de tal associação<sup>(55)</sup>.

#### 1.4.2- Câncer de mama

A associação entre obesidade e o risco para o desenvolvimento do câncer de mama é dependente dos períodos pré e pós-menopausa. Há uma evidência consistente para essa associação em mulheres na pós-menopausa, porém não se verifica o mesmo naquelas em período pré-menopausa. De fato, há alguns registros de redução modesta do risco para esse câncer entre mulheres com IMC elevados, a qual se explica pela tendência dessas mulheres terem ciclos menstruais anovulatórios e reduzidas concentrações de hormônios esteróides, principalmente progesterona e estradiol.

Além disso, estudos que avaliaram ambos os fatores verificaram que o ganho de peso na idade adulta está mais associado ao aumento do risco do câncer de mama na pós-menopausa do que o IMC<sup>(56)</sup>; isso poderia também ser um efeito dos ciclos menstruais anovulatórios verificados nas mulheres obesas jovens. O IMC  $\geq 40\text{kg/m}^2$  está associado às elevadas taxas de mortalidade para o câncer de mama, representando um risco relativo de 2.12<sup>(24)</sup>. Esse prognóstico negativo pode ser explicado pelo efeito biológico da adiposidade na sobrevida pós-diagnóstico da doença ou pelo diagnóstico tardio observado em mulheres obesas.

Com relação aos esteróides sexuais, a alta expressão de aromatases, as quais convertem estrogênio através de precursores androgênicos, pode ter um papel importante na fisiopatologia da associação entre o câncer de mama na pós-menopausa e o risco de se desenvolver este câncer entre as mulheres obesas<sup>(23)</sup>. Existe uma evidência considerável de que o risco para o câncer de mama na pós-menopausa relacionado ao IMC seja, em parte, explicado pelas concentrações sanguíneas elevadas de estradiol<sup>(57)</sup>. Essas análises também demonstram que as altas concentrações sanguíneas de hormônios androgênicos estão associadas ao elevado risco para o desenvolvimento do câncer de mama em mulheres na pré e pós-menopausa, e esses hormônios poderiam ser elementos em potencial para a conexão entre obesidade e essa neoplasia. Em oposição aos homens, as concentrações sanguíneas de testosterona são positivamente relacionadas à obesidade nas mulheres<sup>(57)</sup>.

Além da influência dos hormônios esteróides, vários estudos associaram a hiperinsulinemia, mensurada através das elevadas concentrações séricas do peptídeo C, com o risco aumentado para o câncer de mama na pós-menopausa<sup>(58-60)</sup>, embora essas associações tenham sido inconsistentes para o câncer de mama na pré-menopausa<sup>(59-61)</sup>. Dados de coorte e meta-análise apontam para as concentrações aumentadas do IGF-1, um efeito indireto da hiperinsulinemia, como um risco para o câncer de mama na pós-menopausa<sup>(44,62)</sup>. Além disso, a resistência à insulina é um fator negativo no prognóstico do câncer de mama<sup>(63)</sup>.

Em relação às adipocinas, um recente trabalho de revisão de Vona-Davis & Rose<sup>(64)</sup> encontrou resultados inconsistentes relacionados à leptina como um fator de risco para o câncer de mama. Por outro lado, dois estudos de caso-controle simultaneamente encontraram uma associação inversa entre adipocinas e câncer de mama; significativa para pré e pós-menopausa num estudo<sup>(65)</sup> e apenas para mulheres na pós-menopausa em outro<sup>(66)</sup>. Seguramente, estudos prospectivos serão necessários para se investigar as funções dos marcadores biológicos no desenvolvimento do câncer de mama.

### 1.4.3- Carcinoma endometrial

A forte associação entre a obesidade e o carcinoma endometrial é denotada pelo aumento de até três vezes no risco para a ocorrência dessa anomalia<sup>(22,23)</sup>. Os mecanismos fisiopatológicos que sustentam essa associação estão relacionados à exposição aos estrogênios. Essa hipótese se baseia em estudos epidemiológicos que relacionaram as altas concentrações plasmáticas de estrona e estradiol ao risco para o câncer de cólon em mulheres na pós-menopausa. Além disso, o hiperandrogenismo pode exercer um papel central na associação entre a obesidade e o risco para o câncer endometrial na pré-menopausa; esse fator fisiopatológico leva à diminuição das concentrações de progesterona e a períodos anovulatórios longos. A hipótese em questão coloca a falta de progesterona como um fator de exposição contínua e sem oposição ao estrogênio e este, por conseguinte, exerce um estímulo proliferativo constante nas células endometriais, levando ao aumento do risco para o câncer em questão. O excesso de peso na pós-menopausa pode exercer um aumento no risco para o câncer de endométrio, primeiramente através das concentrações plasmáticas elevadas de estrogênio biodisponível e, posteriormente, pela alta expressão de aromatases, na ausência da síntese ovariana de progesterona<sup>(67)</sup>. Num estudo prospectivo multicêntrico com mulheres na pós-menopausa<sup>(68)</sup>, concentrações circulantes de estrogênio e androgênio foram positivamente relacionadas ao risco para o câncer endometrial e uma relação inversa foi verificada para o carreador dos hormônios sexuais (SHBG).

Especula-se que as altas concentrações de estrógenos e as baixas concentrações de progesterona estão relacionadas ao aumento da bioatividade do IGF-1 no tecido endometrial, resultante da síntese de estrogênio induzida pelo IGF-1 e das reduções de IGFBP-1, levando ao desenvolvimento e ao aumento dos tumores endometriais<sup>(67)</sup>. No que se refere à resistência à insulina, biomarcadores da hiperinsulinemia, como o peptídeo C, têm sido associados ao risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de endométrio<sup>(69)</sup>.

#### 1.4.4- Câncer renal

Existem evidências que colocam a obesidade como um fator de risco para o desenvolvimento do câncer renal<sup>(40,70)</sup>. Algumas delas encontraram uma relação de dose-resposta com o aumento do peso ou IMC<sup>(71)</sup>. Com relação ao sexo, a associação entre a obesidade e o câncer renal é muito mais evidente em mulheres, o que não se observa nos homens<sup>(71)</sup>.

Hipertensão e diabetes, ambas as patologias são fatores de risco para essa neoplasia e também estão associadas à obesidade<sup>(40,72)</sup>. Porém algumas evidências sugerem que a obesidade aumenta o risco para o desenvolvimento do câncer de rim de forma independente das variações da pressão arterial, indicando que a hipertensão e a obesidade devem influenciar no desencadeamento desse tipo de câncer através de mecanismos diferentes<sup>(40)</sup>.

A fisiopatologia que fundamenta a associação entre a obesidade e o câncer renal ainda é controversa. Estudos relativamente recentes verificaram que baixas concentrações de adiponectina foram encontradas em indivíduos com essa neoplasia, quando comparados aos controles saudáveis<sup>(73)</sup>. Fica evidente a necessidade de estudos adicionais sobre esse assunto, através de um número considerável de pacientes.

#### 1.4.5- Carcinoma de pâncreas

Por algum tempo a ligação entre a obesidade e o carcinoma pancreático foi um assunto controverso na literatura. Estudos pioneiros de caso-controle apontaram uma fraca associação entre obesidade e esse tipo de neoplasia; os resultados apresentaram-se tendenciosos pelo alto índice de mortalidade nos grupos estudados<sup>(74)</sup>. Um número considerável de estudos prospectivos e de meta-análise examinou tal relação<sup>(24,75)</sup> e foram encontrados resultados positivos<sup>(76)</sup>. Recentemente, esses resultados foram reforçados pelo *The Women's Health Initiative in The United States*, o qual encontrou um aumento



de 70% no risco de se desenvolver o câncer pancreático em mulheres no quintil mais alto da relação cintura quadril quando comparadas às mulheres no quintil mais baixo dessa relação<sup>(77)</sup>.

Um número considerável de evidências mostrou que a hiperinsulinemia e a hiperglicemia constituem elementos importantes na fisiopatologia do câncer pancreático<sup>(78)</sup>. Entretanto, no que se refere ao eixo do IGF, um estudo de caso-controle alocado em outros quatro grandes estudos de coorte não encontrou associações entre as concentrações pré-diagnosticadas de IGF-1, de fatores de crescimento 2 análogos à insulina (IGF-2) e de proteínas carreadoras de fatores de crescimento 3 análogos à insulina (IGFBP-3) com o risco para o desenvolvimento do câncer pancreático<sup>(79)</sup>.

O exato mecanismo pelo qual a obesidade e a resistência à insulina atuam na gênese dessa anomalia ainda é indefinido.

#### 1.4.6- Carcinoma de esôfago e gástrico

Houve uma mudança significativa na epidemiologia dos cânceres gástrico e de esôfago verificada em trabalhos científicos recentes, os quais demonstraram um aumento considerável nos índices de adenocarcinoma esofágico e da porção do cárdia do estômago, uma estabilidade do carcinoma das células escamosas do esôfago e um declínio acentuado do adenocarcinoma da porção não cárdia do estômago<sup>(80)</sup>. Esse aumento na incidência dos cânceres supracitados foi, em parte, atribuído ao aumento da prevalência da obesidade. Algumas evidências de estudos de coorte e meta-análise confirmaram tal associação<sup>(19,22,81)</sup>. Esses resultados foram reforçados por um amplo estudo norte-americano de coorte, no qual foi encontrado aumento no risco para o adenocarcinoma da porção do cárdia do estômago para indivíduos com IMC  $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ . Em contrapartida, não se verificou nenhuma associação entre as variações do IMC e o adenocarcinoma da porção pós cárdia do estômago<sup>(82)</sup>.

Por conseguinte, há uma inquestionável evidência para a associação entre a obesidade e o risco para o desenvolvimento dos cânceres de esôfago e da porção do cárdia do estômago. No entanto, o IMC não explica as variações entre os sexos no que se refere à incidência desses cânceres, que são mais frequentes nos homens do que nas mulheres. Uma hipótese plausível para tal evidência foi proposta através dos resultados de um estudo de caso-controle, no qual a distribuição da gordura corporal foi entendida como um fator de risco para os cânceres em questão. De fato, o excesso de gordura abdominal foi associado ao aumento do risco para o desenvolvimento do câncer de esôfago. Entretanto, essa associação não se confirmou para o aumento do risco no desenvolvimento do adenocarcinoma da porção do cárdia do estômago<sup>(83)</sup>.

O esôfago de Barrett é caracterizado pela substituição do epitélio escamoso pelo epitélio colunar, esse mecanismo é bem estabelecido na causa do adenocarcinoma de esôfago. A fisiopatologia do esôfago de Barrett envolve o refluxo gastroesofágico e a esofagite<sup>(84)</sup>. Além disso, a obesidade está relacionada à esofagite e essa associação não está presente apenas nos indivíduos com refluxo gastroesofágico sintomático. O mecanismo exato pelo qual a obesidade participa desse processo não é claro.

#### 1.4.7- Câncer de próstata

As evidências epidemiológicas são conflitantes e falham quando tentam mostrar uma significância abrangente entre a obesidade e o risco para o desenvolvimento do câncer de próstata<sup>(20)</sup>, embora um estudo de meta-análise tenha sugerido uma fraca associação positiva entre IMC e o aumento estimado do risco para esse câncer de 1.05 para cada 5kg/m<sup>2</sup><sup>(85)</sup>. Porém evidências convincentes mostraram que homens obesos com câncer de próstata são mais suscetíveis a terem uma recorrência mais agressiva da doença depois de uma prostatectomia radical, se comparados aos homens não obesos<sup>(85)</sup>.

Alguns estudos associaram de forma positiva as altas concentrações circulantes de IGF-1 ao risco para o câncer de próstata, enquanto que as concentrações totais de IGFBP-3 foram negativamente associadas<sup>(86)</sup>. Há uma evidente necessidade de pesquisas adicionais sobre esse assunto, com um número considerável de pacientes, para se comprovarem os possíveis efeitos da obesidade e da resistência à insulina sobre a fisiopatologia do câncer de próstata.

#### 1.4.8- Câncer hepatocelular e de vesícula biliar

A associação entre a obesidade e o risco para o câncer de vesícula biliar foi reportada em estudos relativamente recentes de coorte e meta-análise<sup>(19,22,87)</sup>. Muitos deles encontraram uma relação dose-resposta com aumento do peso ou IMC, com RR=1.15 nos indivíduos com sobrepeso e RR=1.66 nos obesos. O risco foi maior entre as mulheres, RR=1.88, quando comparadas aos homens, RR=1.35. O mecanismo pelo qual a obesidade se constitui num fator de risco para o câncer de vesícula biliar não é claro. Por outro lado, a obesidade é um dos fatores que aumenta a formação de pedras na vesícula biliar e esse fato está intimamente relacionado ao aumento do risco para esse tipo de câncer.

A obesidade, assim como o diabetes tipo 2, são considerados fatores de risco para o câncer hepatocelular<sup>(88)</sup>. O excesso de tecido adiposo associado ao fígado tem ligação direta com o aumento das doenças hepáticas não alcoólicas como esteatose e cirrose, as quais, por sua vez, são fatores de risco para o câncer hepatocelular.

#### 1.4.9- Câncer de pulmão

Alguns estudos reportaram uma associação inversa entre a obesidade e o câncer de pulmão, no entanto esses dados podem estar distorcidos pelos efeitos do fumo nas populações pesquisadas. Por outro lado, nas populações não

fumantes, nenhuma relação foi encontrada entre a obesidade e o risco no desenvolvimento dessa neoplasia<sup>(24,89)</sup>.

#### 1.4.10- Câncer de ovário

Uma revisão sistemática da literatura não encontrou uma associação significativa entre a obesidade e o aumento do risco para o câncer de ovário<sup>(90)</sup>. Especulou-se que a obesidade poderia estar associada a apenas alguns subtipos de cânceres ovarianos, porém essa hipótese não se confirmou através de um estudo australiano de caso-controle, no qual não se evidenciou nenhuma associação entre o IMC ou o ganho de peso e os subtipos dessa neoplasia<sup>(91)</sup>.

#### 1.4.11- Neoplasias hematopoiéticas

Muitas evidências de estudos de meta-análise e de coorte encontraram uma associação inconsistente entre a obesidade e os cânceres hematopoiéticos, incluindo linfomas, leucemia aguda e crônica<sup>(92)</sup> e mieloma múltiplo<sup>(19,22,93)</sup>. Estudos prospectivos são necessários para uma abordagem segura sobre tal associação.

### **1.5- Mecanismos moleculares de desenvolvimento do câncer na obesidade**

#### 1.5.1- Insulina e fatores de crescimento análogos à insulina

No início dos anos de 1990, McKeown-Eyssen<sup>(94)</sup> e Giovannucci<sup>(95)</sup> notaram que os fatores de risco para os cânceres nas populações ocidentais eram notavelmente similares àqueles para a resistência à insulina e sugeriram que a hiperinsulinemia poderia contribuir para o desenvolvimento do câncer através dos efeitos das altas concentrações da insulina na promoção e desenvolvimento tumoral.

O excesso de peso sob a forma de tecido adiposo, as concentrações plasmáticas elevadas de triglicérides, a frequência reduzida de atividade física e determinados padrões alimentares, todos esses fatores podem favorecer o aumento nas concentrações circulantes de insulina. De forma crônica, o aumento nas concentrações circulantes desse hormônio reduz a síntese de IGFBP-1 e 2, resultando no aumento das concentrações de IGF-1 livre e, concomitantemente, levando à modificações no ambiente celular que favorecem o desenvolvimento tumoral<sup>(96)</sup>. Também se sugeriu que o IGF-1 possa interagir com outros fatores de crescimento, promovendo, dessa forma, efeitos mitogênicos aumentados, podendo operar também de forma endócrina, parácrina ou autócrina na regulação do crescimento, sobrevivência, transformação e diferenciação celulares.

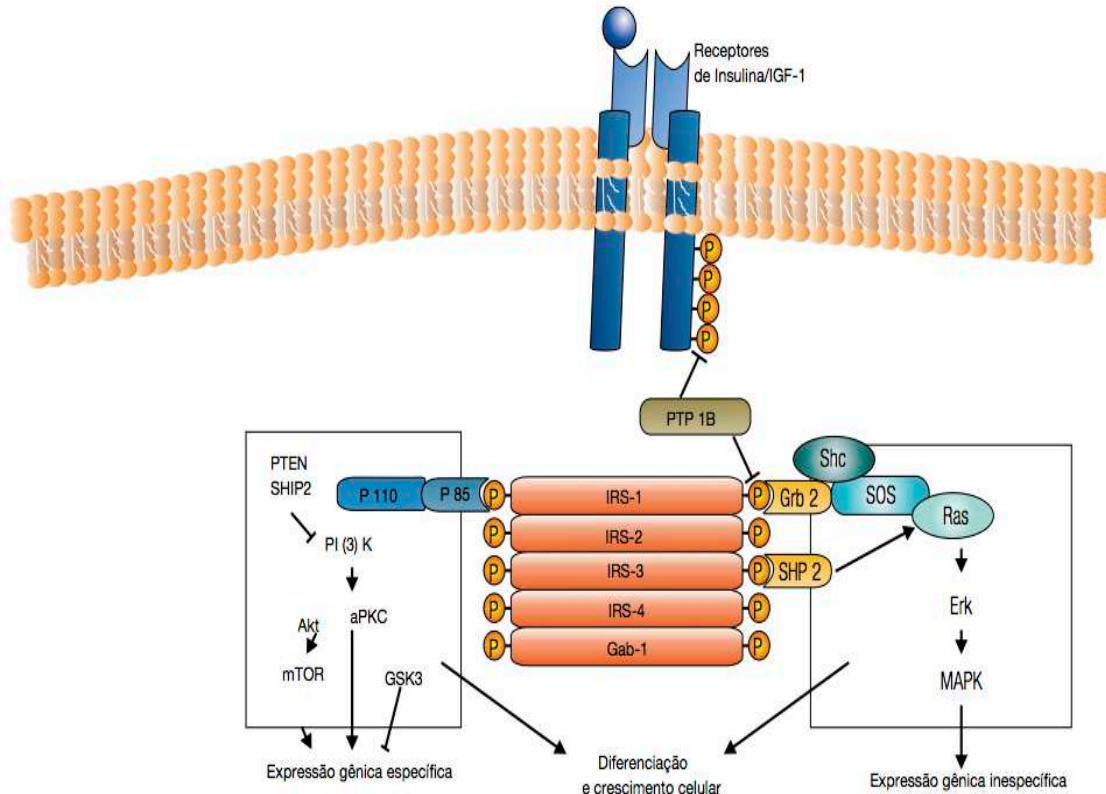
O hormônio de crescimento (GH) é o maior fator de estimulação da síntese de IGF-1 no fígado, o qual é a fonte de mais de 80% de IGF-1 circulante. Além disso, o balanço energético nutricional exerce um significativo e complexo efeito na síntese e na atividade biológica do IGF-1. Nos pacientes com diabetes do tipo 1 ou em pessoas em jejum prolongado, a menor produção de insulina está relacionada às reduções hepáticas dos receptores de GH. Em ambas as populações, verificaram-se resistência ao GH e redução tanto da síntese quanto nas concentrações de IGF-1 circulantes. A biodisponibilidade do IGF-1 para os receptores teciduais também se encontra reduzida frente às concentrações elevadas de IGFBP-1 e (IGFBP-2). Por outro lado, pacientes com diabetes tipo 2 ou em estados de alta ingestão alimentar têm elevadas concentrações de insulina endógena e de receptores hepáticos de GH, levando à síntese aumentada de IGF-1<sup>(4)</sup>. Porém, de forma paradoxal, pessoas obesas têm baixas concentrações sanguíneas de IGF-1, se comparadas àquelas com peso ideal<sup>(48)</sup>. Estudos recentes têm mostrado a relação não linear entre as concentrações de IGF-1 e os índices antropométricos da adiposidade corporal; para o IMC entre 24-27kg/m<sup>2</sup> encontraram-se as maiores concentrações de IGF-1<sup>(97,98)</sup>.

Muitos modelos *in vitro* e *in vivo* forneceram evidências irrefutáveis da função do receptor do fator de crescimento análogo à insulina 1 (IGF-1R) em diferentes tipos de câncer. Experimentos *in vitro* demonstraram que o aumento

nas concentrações de IGF-1 induziu, de forma dose-dependente, o aumento na proliferação celular de câncer de mama de linhagem humana<sup>(99)</sup>. Modelos *in vivo* foram usados através de mutações associadas a concentrações reduzidas de IGF-1, onde se observou que o crescimento tumoral, *in vivo*, é influenciado pela função fisiológica do IGF-1 no hospedeiro<sup>(100,101)</sup>. O trabalho conduzido por Creighton e colaboradores<sup>(102)</sup> mostrou que o padrão de expressão gênica induzida pelo IGF-1 representa vias de aumento da agressividade e, possivelmente, de independência hormonal nos cânceres de mama investigados.

Como mostrado na figura 1, ambos, insulina e IGF-1, ativam o receptor tirosina quinase da via de crescimento. O receptor de insulina (IR) e IGF-1R, respectivamente, assim como o receptor híbrido de IGF-1/IR, são expressos em altas concentrações em células tumorais e são, também, resistentes aos efeitos do *feedback* negativo exercido pelas altas concentrações hormonais, o que não se verifica nos receptores de células não neoplásicas expostos à insulina<sup>(103,104)</sup>. A ativação desses receptores resulta na maior atividade do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e, subsequentemente, há a ativação das vias da proteína quinase ativadora de mitose (MAPK), assim como da via da PI3K/Akt, duas das mais importantes vias de sinalização intracelular que se encontram alteradas em muitos tipos de câncer. Além disso, há um número considerável de evidências de que essas vias cooperam na promoção e sobrevivência de células neoplásicas<sup>(105)</sup>.

A PI3K é recrutada até a membrana plasmática onde é ativada após estímulo de fatores de crescimento e citocinas e, nas proximidades de seu substrato lipídico, fosfatidilinositol 4,5 bifosfato [Ptlns (4,5) P<sub>2</sub>] gera fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato [Ptlns (3,4,5) P<sub>3</sub>]<sup>(106)</sup>. A proteína fosfatase e homóloga à tensina (PTEN) age revertendo a ação da PI3K, desfosforilando o Ptlns (3,4,5) P<sub>3</sub> e, dessa forma, é um dos mais importantes supressores da sinalização da PI3K. Essa função da PTEN é perdida em vários cânceres em estágios avançados.



**Figura 1-** Vias de sinalização da insulina e do fator de crescimento 1 análogo à insulina.

Proteínas efetoras com domínios de homologia *pleckstrin* (PH), como Akt/PKB e a proteína quinase dependente de fosfoinosítídeo 1 (PDK1), utilizam o  $P_{3,4,5}$  como suas ancoradouras. A PKB fosforila vários substratos envolvidos em diversos processos como sobrevivência celular, através da inativação da proteína pró-apoptótica (BAD), síntese de glicogênio, através da regulação da glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) e da transcrição gênica, através das proteínas da família *Forkhead* de fatores de transcrição (FOXO)<sup>(106)</sup>. Entretanto a PKB também exerce suas funções de crescimento celular através da sua interação com a PI3K. O mecanismo que mostrou como a via PI3K/PKB, estimulada pela insulina, leva ao crescimento celular foi elucidado pela recente descoberta de que a PKB fosforila e inativa a proteína tuberina<sup>(107)</sup>,

também denominada complexo 2 da esclerose tuberosa (TSC2), um inibidor do crescimento celular, inativando, assim, a função do complexo do supressor tumoral (TSC1/TSC2). Este complexo formado pelas proteínas hamartina (TSC1) e tuberina age inibindo a atividade da proteína ativada por GTPase e homóloga de Ras enriquecida no cérebro (Rheb)<sup>(108)</sup>.

A ativação da PI3K através da insulina tem sido mostrada como um fator de atenuação dessa atividade inibitória<sup>(108)</sup>, resultando na ativação da Rheb. Uma vez ativada, essa proteína leva à ativação da via da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e também da quinase S6 ribossomal (S6K).

A sinalização intracelular através da via da mTOR é importante na biogênese ribossomal e no crescimento celular<sup>(109)</sup>; sua indução após a ativação da PI3K e inativação do TSC1/TSC2 pela PKB pode explicar as ativações sequenciais da PKB e S6K pela insulina<sup>(110)</sup>. Dados recentes mostraram que a fosforilação da tuberina pela p90 S6 quinase 1 (Rsk1)<sup>(111)</sup> tem um efeito inibitório semelhante a aquele da PKB sobre o complexo TSC1/TSC2, promovendo a sinalização da mTOR. Entretanto, a fosforilação da tuberina pela proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) em resposta à diminuição do *status* energético celular pode agir de maneira oposta, regulando positivamente o complexo TSC1/TSC2<sup>(112)</sup>.

O crescimento celular é controlado, em parte, pela mTOR-raptor, a qual fosforila a porção hidrofóbica da proteína ribossomal S6, polipeptídeo 1 (S6K1), ativando esta quinase. A mTOR-raptor também fosforila e inibe as proteínas repressoras de tradução (4E-BPs). Essas proteínas inibem a tradução de RNA mensageiros (mRNAs) dependentes da subunidade *cap* (eIF4E)<sup>(109)</sup>. Evidências consistentes sugerem a existência de uma “alça” contra-regulatória da via da mTOR-raptor, sensível às variações nutricionais, através da S6K1, que possibilita a dessensibilização da sinalização insulínica<sup>(113)</sup>. A proteína S6K1 exerce essa contra-regulação através da fosforilação e inativação do IRS-1.



A cascata de sinalização MAP quinase-(Ras)-(Raf) tem uma função considerável na dinâmica proliferativa das células tumorais. A cascata Ras/Raf/MEK/ERK conecta sinais oriundos de receptores da membrana celular a fatores transcricionais, os quais regulam a expressão gênica. Além disso, essa cascata regula a atividade de várias proteínas envolvidas no processo de apoptose celular.

O gene *Raf* codifica a família de proteínas denominadas A-Raf, B-Raf e Raf-1 (C-Raf). Raf é uma serina/treonina quinase que é ativada através de uma série complexa de eventos: interação com a Ras e subsequente recrutamento para a membrana plasmática; dimerização de proteínas Raf; fosforilação e/ou desfosforilação em diferentes domínios; dissociação da proteína quinase inibitória Raf (RKIP) e associação com o supressor da quinase da Ras, (KSR)<sup>(114)</sup>.

Quando ativada, Raf fosforila o resíduo em serina da Mek, ativando-a (MAPKK)<sup>(115)</sup>. Uma vez ativada, Mek1/2 fosforila a proteína MAPK, ERK, nos resíduos treonina e tirosina adjacentes. Esta última, por sua vez fosforila várias proteínas citoplasmáticas e do citoesqueleto <sup>(116)</sup>, incluindo proteínas quinases ativadas por MAPK e a família das proteínas quinases ribossomais S6 (Rsk). Adicionalmente, ERK e Rsk1/2 ativadas se translocam ao núcleo, onde ERK fosforila e ativa vários fatores de transcrição como Sp1, E2F, Elk-1, e AP-1<sup>(117)</sup>. AP-1 é composta por duas proteínas de curta meia vida, Jun e Fos, que são produtos de *immediate early genes* (IEGs). Essa via participa do controle de vários processos celulares como proliferação, migração e diferenciação.

### 1.5.2- Esteróides sexuais

Com relação aos esteróides sexuais, a adiposidade influencia na síntese e na biodisponibilidade dos hormônios através de ao menos três mecanismos. Primeiramente, o tecido adiposo expressa uma variedade de enzimas metabolizadoras dos esteróides sexuais como as aromatases,

que promovem a formação de estrogênios através de precursores androgênicos, os quais são secretados pelas gônadas ou glândulas adrenais. O tecido adiposo é o local mais importante de síntese de estrogênio no homem e na mulher na pós-menopausa, sendo que em ambos, as concentrações de aromatase, estrona e estradiol estão fortemente associados ao IMC<sup>(118)</sup>.

A segunda hipótese refere-se ao aumento das concentrações de insulina e da bioatividade do IGF-1, frente à obesidade. Ambos, insulina e IGF-1, inibem a síntese de globulina carreadora de hormônios sexuais SHBG, as mais importantes proteínas plasmáticas carreadoras de testosterona e estradiol; esse mecanismo pode estar associado ao aumento das concentrações de esteróides sexuais biodisponíveis<sup>(119)</sup>. Verificou-se através de estudos científicos que mulheres obesas ( $IMC > 30\text{kg/m}^2$ ) têm em média metade das concentrações de SHBG quando comparadas às concentrações de SHBG em mulheres com IMC menor que  $22\text{kg/m}^2$ <sup>(120)</sup>.

SHBG pode agir diretamente em células de câncer de mama inibindo a proliferação celular induzida pelo estradiol. A ligação dessa proteína à membrana celular induz a produção de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP). Essas moléculas agem como segundos mensageiros em linhagens de células de câncer de mama MCF-7<sup>(121)</sup> e levam à completa inibição da proliferação celular estimulada pelo estradiol<sup>(122)</sup>. Além disso, a pré-incubação de células MCF-7 com SHBG, antes do tratamento com estradiol, neutraliza os efeitos anti-apoptóticos desse hormônio<sup>(123)</sup>. Dessa forma, a SHBG previne a ação do estradiol em células de câncer de mama, agindo como fator anti-proliferativo. Além disso, a diminuição nas concentrações dessa proteína pode contribuir na gênese tumoral em mulheres obesas.

Estradiol (E2) e os fatores de crescimento análogos à insulina (IGFs) também agem como mitógenos em células de câncer de mama através da ativação da atividade transcricional do receptor de estrogênio alfa (ER $\alpha$ ) essa ação se dá de forma recíproca e concomitante. Além disso, a insulina,

em doses supra-fisiológicas pode reproduzir os efeitos do IGF-1 nas células de mama. Essa dinâmica foi verificada em linhagem de células de câncer de mama onde o E2 interagiu com as vias de transdução da sinalização do IGF<sup>(124)</sup>. Os IGFs agem através de dois receptores de membrana: IGF-1R e (IGF-2R). Embora muito dos efeitos dos IGFs sejam mediados pelo IGF-1R. A ligação a suas proteínas alvo leva o IGF-1R à autofosforilação e, subsequentemente, a sua ligação às proteínas adaptadoras como IRS-1 e (Shc), as quais ativam as vias de sinalização da ERK e PI3K.

Finalmente, as altas concentrações de insulina podem levar ao aumento da síntese de andrógenos no ovário e, possivelmente, nas glândulas supra-renais. Esse fato relaciona-se ao desenvolvimento da síndrome do ovário policístico (PCOS) em mulheres geneticamente suscetíveis e na pré-menopausa<sup>(125)</sup>. A síndrome do ovário policístico é caracterizada pelo hiperandrogenismo ovariano e pela anovulação crônica, fatores que levam à contínua estimulação do endométrio pelo estrogênio, sem a oposição da progesterona<sup>(126)</sup>. Mulheres na pré-menopausa e com PCOS têm um risco aumentado para o câncer endometrial pelo fato do ovário hiperandrogênico diminuir a síntese de IGFBP-1 no útero. Tal diminuição leva ao aumento da biodisponibilidade do IGF-1, favorecendo a formação tumoral<sup>(127)</sup>.

O risco para o câncer de mama e os riscos já estabelecidos para o câncer de endométrio, como a menarca precoce, a menopausa tardia e a obesidade, provavelmente agem por vias que refletem um grande período de exposição aos estrogênios. No nível molecular, a ação do estrogênio é efetivada por seus receptores ER $\alpha$  ou (ER $\beta$ ). As ações genômicas do receptor de estrogênio envolvem a sua função como um fator de transcrição através da sua ligação direta ao DNA após estímulo estrogênico ou direcionando suas funções ao DNA através da interação com outras proteínas. Entretanto o estrogênio pode também ter efeitos pleiotrópicos através de interações não genômicas com as vias de sinalização de fatores de crescimento, incluindo a via da PI3K/Akt e MAPK<sup>(128)</sup>.

### 1.5.3- Adipocinas

#### 1.5.3.1- Leptina

A leptina é um hormônio secretado pelo adipócito e é um mediador central do controle do apetite e da homeostasia energética<sup>(129)</sup>. O alvo fisiológico mais importante para a ação desse hormônio é o sistema nervoso central, porém o receptor de leptina (OBR) também é expresso em tecidos periféricos, em concentrações reduzidas<sup>(130)</sup>. Muitos estudos relataram à expressão do OBR em células de câncer de mama, próstata e cólon<sup>(131-133)</sup>. As concentrações de leptina estão correlacionadas à adiposidade em humanos<sup>(134)</sup>, e vários estudos reportaram a associação desse hormônio ao aumento da incidência de vários cânceres na obesidade. Um número considerável de estudos epidemiológicos investigou a relação entre as variações nas concentrações da leptina e alguns cânceres, como: próstata, mama e colorretal, porém os resultados foram controversos<sup>(135-138)</sup>.

A leptina exerce seus efeitos através da ligação ao receptor transmembrana OBR, que contem sítios de fosforilação em tirosina, os quais propagam a sinalização intracelular através das vias do fator de transdução do sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) e ERK<sup>(139)</sup>. Essas vias permitem que a leptina tenha funções análogas aos fatores de crescimento, contribuindo para a iniciação e/ou progressão de determinados cânceres<sup>(132)</sup>. A leptina tem sido relacionada ao crescimento de células epiteliais do cólon e, também, de células de câncer de ovário, mama e próstata<sup>(140-143)</sup>. Interessantemente, células de câncer de cólon, quando incubadas com adipócitos maduros de camundongos controles, tiveram taxas de proliferação significativas, porém o mesmo não se observou quando as células foram incubadas com adipócitos de camundongos (*ob/ob*)<sup>(144)</sup>. Vários mecanismos têm sido sugeridos para a elucidação dos processos pelos quais a leptina contribui na carcinogênese. Em células de câncer de próstata não dependentes de fatores androgênicos, foi demonstrada a ativação da (JNK) e o bloqueio dessa quinase foi capaz de interromper os efeitos da leptina na proliferação celular<sup>(142)</sup>.

Essa adipocina também está relacionada à maior expressão e atividade das aromatasas, assim como na ativação dos receptores alfa de estrogênios em células de câncer de mama, ambos os eventos levaram ao crescimento tumoral deste câncer<sup>(145)</sup>.

Estudos em modelos animais também associaram a leptina a processos carcinogênicos, embora os dados tenham sido, em parte, contraditórios. Camundongos obesos com concentrações elevadas de leptina mostraram uma suscetibilidade maior em desenvolver câncer colorretal após tratamento com AOM<sup>(146)</sup>. Entretanto a administração de leptina inibiu a formação de lesões pré-tumorais em ratos tratados com AOM<sup>(147)</sup>. Em outro estudo, camundongos que tiveram a sinalização central da leptina preservada, enquanto a sinalização periférica foi bloqueada no nível dos receptores de leptina, apresentaram regressão da progressão e metástase dos tumores. Os tumores que não expressavam OBR e que foram transplantados em animais controles tiveram crescimento menor se comparados a tumores que expressavam o OBR<sup>(148)</sup>. Assim, a sinalização da leptina pode ter uma função importante na promoção do crescimento tumoral *in vivo*.

#### 1.5.3.2- Adiponectina

Adiponectina é um hormônio secretado principalmente pelo tecido adiposo e, em menor proporção, também é secretado pelos miócitos cardíacos, células do tecido muscular e do endotélio<sup>(149)</sup>. As funções mais importantes identificadas da adiponectina foram relacionadas aos seus efeitos anti-inflamatórios, anti-aterogênicos e de aumento da sensibilidade insulínica. Em contraste a outras adipocinas, as concentrações da adiponectina são inversamente associadas à obesidade, ao IMC, à adiposidade visceral e à resistência insulínica<sup>(150)</sup>. Vários estudos de caso-controle relataram concentrações séricas de adiponectina significativamente reduzidas em pacientes com câncer de mama<sup>(151)</sup>. Num desses estudos, observaram-se concentrações

reduzidas de adiponectina em mulheres na pós-menopausa e com câncer de mama, porém em mulheres na pré-menopausa e também com essa neoplasia, essa relação não foi constatada<sup>(66)</sup>. Por outro lado, estudos observaram concentrações reduzidas de adiponectina tanto em mulheres na pré e pós-menopausa com câncer de mama e verificaram que pacientes com as menores concentrações de adiponectina apresentaram os maiores e mais agressivos tumores<sup>(65)</sup>. Estudos *in vitro* demonstraram que o tratamento com adiponectina suprimiu a proliferação celular e aumentou a apoptose em células de câncer de mama<sup>(152)</sup>. O trabalho conduzido por Brakenhielm et al<sup>(153)</sup> mostrou a associação da adiponectina na redução da angiogênese e da progressão tumoral através de processos apoptóticos com o envolvimento da caspase em células endoteliais. A função da adiponectina na etiologia do câncer não é totalmente compreendida. Especula-se que a ação dessa adipocina na proteção indireta para alguns cânceres esteja relacionada às alterações na sensibilidade insulínica e, de forma direta, através de modificações das condições inflamatórias. A via de sinalização da adiponectina que se inicia através da sua ligação aos seus receptores AdipoR1 e AdipoR2 media a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Uma vez ativada, AMPK exerce funções importantes no controle do crescimento celular e da apoptose através da ativação de genes como *p53* e *p21*<sup>(154)</sup>. De forma independente da ativação da AMPK, a adiponectina diminui a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), reduzindo a ativação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e, dessa forma, inibindo a proliferação celular<sup>(11,151)</sup>.

As propriedades anti-inflamatórias e de modulação da resposta imune da adiponectina podem contribuir também para seus efeitos anti-carcinogênicos. De fato, essa molécula foi associada à inibição da sinalização do NF-κB em células endoteliais e à redução da produção de TNF-α em culturas de macrófagos. Além disso, a adiponectina induziu a produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1 em culturas de leucócitos humanos<sup>(155)</sup>.

A redução das concentrações plasmáticas da adiponectina verificada na obesidade pode ter associação ao aumento no risco para determinados cânceres nessa condição. Porém, a manipulação dessa adipocina com intenções terapêuticas na prevenção e tratamento de determinados cânceres ainda necessita de investigações.

#### 1.5.4- Citocinas inflamatórias

Os primeiros polipeptídios funcionais secretados pelo tecido adiposo e que foram identificados por terem função sistêmica na homeostasia do metabolismo foram as citocinas inflamatórias. A princípio, observou-se a expressão aumentada do TNF- $\alpha$  pelo tecido adiposo em modelos animais de obesidade<sup>(156)</sup>. Posteriormente, esse mecanismo também foi observado em humanos<sup>(157)</sup> e com o envolvimento da expressão de outras citocinas como a interleucina-6<sup>(158)</sup>.

Num trabalho subsequente, foi demonstrado que a produção dessas citocinas pelo tecido adiposo era, em grande parte, advinda de monócitos<sup>(159)</sup> e de outras células do sistema imune que, em condições de obesidade, infiltravam-se no tecido adiposo<sup>(160)</sup>. A causa pela qual a obesidade desencadeia tal mecanismo não é clara. Entretanto é cada vez mais evidente que o aumento da secreção dessas citocinas está associado à inflamação crônica que, por sua vez, afeta a função de outros tecidos. Ademais, um número crescente de evidências sugere que o meio inflamatório causado pela obesidade está intimamente associado ao desenvolvimento do câncer através de vários mecanismos<sup>(161)</sup>.

A infecção crônica e a subsequente inflamação podem afetar as células de tecidos preservados, transformando-as, e podem também ter ações sobre as células tumorais através da interação com o nicho celular ao redor. Aproximadamente 15% a 20% das mortes por câncer podem estar associadas à inflamação e à infecção. Por exemplo, os maiores fatores de risco para o

carcinoma hepatocelular são as infecções crônicas por hepatites virais B e C e muitos cânceres gástricos estão associados às infecções pela *Helicobacter pylori*<sup>(162)</sup>. A colite ulcerativa e outras doenças intestinais inflamatórias estão relacionadas ao aumento do risco do câncer colorretal<sup>(163)</sup>, assim como a irritação e a inflamação causadas pela inalação da fumaça do cigarro e de partículas de poluição estão envolvidas na promoção do câncer de pulmão<sup>(164)</sup>.

#### 1.5.4.1- O fator de necrose tumoral- $\alpha$

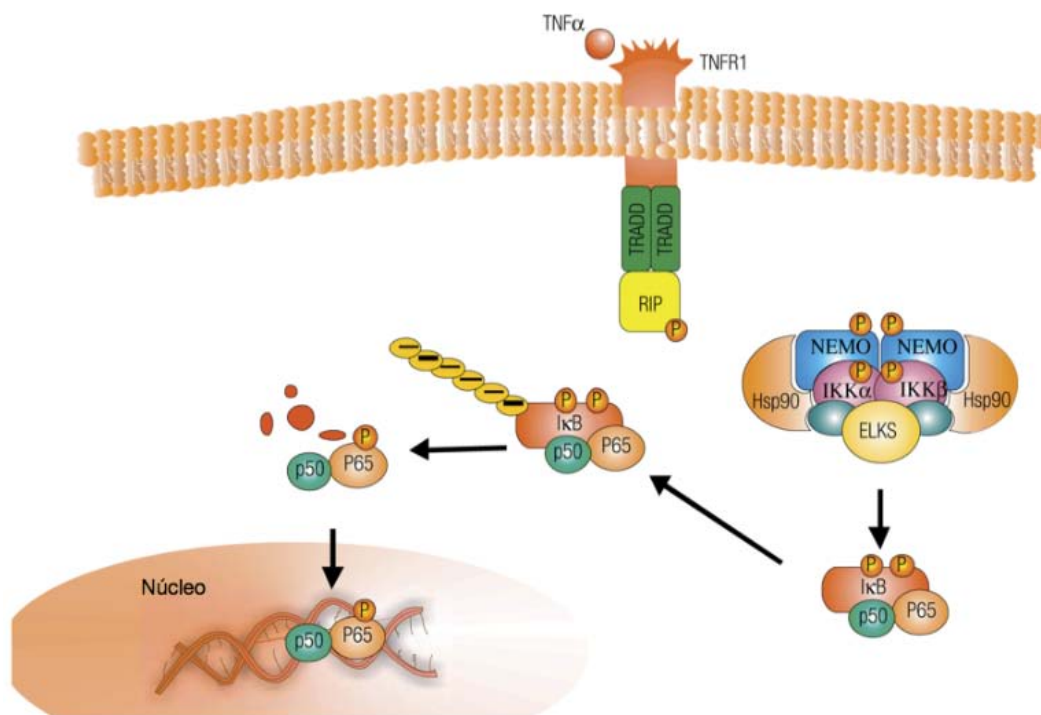
TNF- $\alpha$  é uma citocina que foi originalmente identificada como uma endotoxina que induzia a necrose em tumores<sup>(165)</sup>. Em pesquisas recentes, essa molécula tem sido associada ao desenvolvimento de vários cânceres através da promoção da angiogênese<sup>(166)</sup> e metástase<sup>(167)</sup>. Por exemplo, trabalhos reportaram a intermediação do TNF- $\alpha$  no câncer de cólon induzido por AOM<sup>(168)</sup>, assim como a intermediação dos receptores do TNF- $\alpha$  para os cânceres de pele<sup>(169)</sup> e de fígado<sup>(170)</sup> induzidos quimicamente.

As concentrações elevadas do TNF- $\alpha$  detectadas tanto em roedores obesos<sup>(171)</sup> quanto em humanos obesos<sup>(172)</sup> sugerem uma ligação plausível entre obesidade e tumorigênese. Em modelos animais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, a interrupção da sinalização do TNF- $\alpha$ , através da deleção do gene que codifica o receptor do TNF- $\alpha$  (*Tnfr1*), bloqueou os efeitos carcinogênicos induzidos pela dietilnitrosamina (DEN)<sup>(173)</sup>. Curiosamente, a deleção do *Tnfr1* não teve efeito protetor no desenvolvimento do câncer de fígado induzido pelo DEN em camundongos magros. Esses dados sugerem que o TNF- $\alpha$  tenha uma função mais proeminente no câncer de fígado, em estados de obesidade do que em condições de peso adequado dos animais<sup>(174)</sup>.

Um mecanismo em potencial na promoção tumoral através da inflamação induzida pela obesidade se dá através da ativação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B é ativado por sinalizadores como TNF- $\alpha$ ,



TLRs e outras citocinas inflamatórias (FIG.2). A ativação do NF- $\kappa$ B tem sido associada ao desenvolvimento de vários cânceres como: glioblastoma<sup>(175)</sup>, linfoma<sup>(176)</sup> e câncer pancreático<sup>(177)</sup>. A ativação do NF- $\kappa$ B foi tida como determinante no câncer de fígado induzido pela colestase; essa via é uma referência do estudo do câncer induzido pelo TNF- $\alpha$ <sup>(178)</sup>. Entretanto a inativação específica da sinalização do NF- $\kappa$ B em células hepáticas resultou no aumento da tumorigênese em animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica<sup>(179)</sup>, esse efeito pode estar relacionado ao aumento da apoptose no fígado, resultando na proliferação compensatória dos hepatócitos, assim como na ativação de outras vias inflamatórias estimuladas por citocinas.



**Figura 2-** Ativação da via de sinalização inflamatória pelo TNF- $\alpha$

#### 1.5.4.2- Interleucina-6

Uma das principais moléculas pró-inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo é a IL-6. As concentrações circulantes dessa citocina se correlacionam com o IMC<sup>(172)</sup> e acredita-se que o tecido adiposo seja responsável pela secreção de mais de 35% da IL-6 circulante em pessoas saudáveis<sup>(180)</sup>. A interleucina-6 direciona sua sinalização ao núcleo celular através da STAT3, uma oncoproteína que se encontra ativada em vários cânceres<sup>(181)</sup>. Em modelos de obesidade genéticos e induzidos por dieta, a ativação da STAT3 encontra-se aumentada nos tumores que se desenvolveram nesses animais<sup>(173)</sup>.

A ativação da STAT3 pela leptina<sup>(182)</sup> tem sido considerada um mecanismo da tumorigênese induzida por essa adipocina. Além disso, o efeito da obesidade na promoção tumoral do carcinoma hepatocelular induzido quimicamente é drasticamente reduzido em camundongos que não expressam a IL-6 endógena. Ainda não é claro se a IL-6 secretada pelo tecido adiposo é crucial nesse processo ou se é secundária aos efeitos das células inflamatórias circulantes<sup>(173)</sup>.

#### 1.5.5- Inflamação e resistência à insulina

A secreção de citocinas, como o TNF- $\alpha$ , também contribui para a resistência à insulina associada à obesidade. Há um número substancial de evidências que demonstram o envolvimento da inflamação causada pela obesidade na gênese da resistência insulínica.

No tecido adiposo, em condições de obesidade, verifica-se o recrutamento de macrófagos que, em última instância, acarretam condições pró-inflamatórias. Macrófagos que se encontram infiltrados em outros tecidos são responsáveis pela secreção de altas concentrações de TNF- $\alpha$ , levando ao estado de inflamação crônica acompanhado do metabolismo alterado de triglicérides e do aumento da lipólise. O excesso de triglicérides e de ácidos graxos circulantes

resulta na disfunção do metabolismo, assim como na fosforilação oxidativa mitocondrial e no transporte de glicose estimulado pela insulina, desencadeando, dessa forma, a resistência à insulina<sup>(156,183)</sup>.

A fosforilação em serina dos receptores de insulina é um dos mecanismos mais importantes de supressão da sinalização intracelular desse hormônio, tendo como consequência a resistência à insulina<sup>(184)</sup>. Nesse sentido, JNK, uma quinase pertencente à classe das proteínas quinase ativadas por mitógenos, MAP, e que é estimulada pelo TNF- $\alpha$ , tem sua função estabelecida no mecanismo de *feedback* de inibição do IRS-1 durante a estimulação da insulina. A ativação da JNK induz a fosforilação inibitória do IRS-1 através da serina 307. Essa serina localiza-se próxima ao domínio PTB (*phosphotyrosine-binding*) do IRS-1 e essa fosforilação inibe a interação do domínio PTB com a sequência fosforilada de aminoácidos (NPEY) da porção justamembrana do IR após sua ativação, levando à resistência insulínica<sup>(185)</sup>. Estudos prévios mostraram que além da JNK, a fosforilação da quinase inibidora do fator nuclear  $\kappa$ B (IKK $\beta$ ) também aumenta a fosforilação em serina do IRS-1. Dessa forma, o complexo enzimático IKK estabelece mais um mecanismo de fosforilação do IRS-1 e de regulação da sensibilidade à insulina.

## **1.6- Obesidade, inflamação e câncer de cólon**

A inflamação crônica tem sido associada à indução de displasia em células epiteliais do intestino através da alteração do DNA. De fato, a acumulação crônica de células do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas em tecidos específicos, é acompanhada pela liberação de espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio, as quais são bem estabelecidas na mutação genômica<sup>(186,187)</sup>. Ademais, a inflamação crônica é associada à metilação do DNA e à modificação de histonas<sup>(188-190)</sup>. Todos esses processos têm sido relacionados à expressão alterada de genes envolvidos na carcinogênese como *p53*, *APC*, *K-ras* e *Bcl*<sup>(191)</sup>. Uma vez iniciado o processo celular displásico, tais células são

submetidas aos efeitos de citocinas e fatores de crescimento que contribuem para o crescimento tumoral. Entretanto, algumas linhas de investigação têm proposto que, sob certas condições, alguns grupos celulares do sistema imune e certas citocinas agem no controle supressor das células displásicas prevenindo, dessa forma, a progressão tumoral. Mudanças na resposta imune e/ou adaptações às pressões seletivas do sistema imune podem agir na seleção de clones celulares displásicos capazes de crescer em meio a fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias presentes no micro ambiente que circunda tais células. O sistema imune age, assim, na promoção tumoral<sup>(192)</sup>. Embora muitos dados epidemiológicos tenham mostrado que os mecanismos acima relatados provêm de modelos esporádicos de câncer, a alteração no balanço entre o sistema imune e células displásicas tem sido concisamente observada nas doenças inflamatórias crônicas e em certas comorbidades associadas à obesidade, como o câncer de cólon.

De acordo com um grande número de dados epidemiológicos, a inflamação crônica presente em doenças do intestino, como a colite e a doença de Crohn, predispõe tanto modelos animais dessas doenças quanto humanos à maior suscetibilidade ao câncer de cólon<sup>(193,194)</sup>. Nesse sentido, o uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidais, como a aspirina, tem demonstrado certa eficácia na prevenção do desenvolvimento de adenomas colorretais<sup>(195)</sup>.

Na condição de obesidade, verifica-se o aumento na expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  pelo tecido adiposo e, além dos efeitos autócrinos e parácrinos dessas citocinas no próprio tecido adiposo, IL-6 e TNF- $\alpha$  nessas condições, sinalizam de forma endócrina para a ativação do NF- $\kappa$ B em células tumorais. Essas células, por sua vez, aumentam a síntese de citocinas e quemoquinas, contribuindo para a propagação de estímulos constantes de proliferação e crescimento das células tumorais<sup>(196)</sup>.

Essa associação foi verificada em indivíduos obesos que se submeteram a programas para perda de peso através de dietas específicas<sup>(197)</sup>.

A perda de peso aproximada de 10% do peso inicial resultou em redução da expressão da proteína quimiotática de macrófagos 1 (MCP-1), do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ , uma diminuição significativa no número de macrófagos e a redução da sinalização da STAT3 e do NF- $\kappa$ B. Verificou-se em modelos animais que a interleucina-6, particularmente, conduz as células do cólon à proliferação<sup>(198)</sup> e também à infiltração de células do sistema imune nos tecidos colônicos<sup>(199)</sup>. A importância do TNF- $\alpha$  na gênese do câncer de cólon foi demonstrada através de mecanismos de bloqueios específicos na via de sinalização dessa citocina. O anticorpo contra o TNF- $\alpha$  bloqueou a ativação do NF- $\kappa$ B em células epiteliais<sup>(200)</sup>. Além disso, em camundongos tratados com AOM e DSS, que não expressavam receptores de TNF- $\alpha$ , não se verificou infiltração de células do sistema imune nos tecidos colônicos, assim como não se observou tumorigênese no cólon desses animais quando comparados aos controles<sup>(168)</sup>.

Vários mecanismos têm sido propostos para a elucidação da relação entre obesidade e o câncer colorretal, como a síntese alterada de hormônios e moléculas sinalizadoras. Nesse sentido, a inflamação crônica imposta pelas alterações do tecido adiposo disfuncional emerge como um elo em potencial entre a obesidade e o risco para o câncer de cólon. Neste trabalho descreveremos que a inflamação causada pela obesidade é de grande relevância para gênese do câncer de cólon.





## **2- OBJETIVOS**





## 1- Objetivo geral

Investigar os efeitos da obesidade induzida por dieta hiperlipídica e pela obesidade determinada por fatores genéticos sobre o desenvolvimento do câncer de cólon em camundongos, tendo como alvo o estudo das vias moleculares de sinalização insulínica e inflamatória.

## 2- Objetivos específicos

Avaliar os padrões histológicos macroscópicos de número e tamanho dos tumores colorretais em camundongos geneticamente obesos e com obesidade induzida por dieta, assim como em seus respectivos controles, após tratamento com AOM e DSS.

Avaliar o padrão de crescimento das células HT-29 implantadas em camundongos *scid* com obesidade induzida por dieta e em seus respectivos controles.

Caracterizar as vias de sinalização insulínica e inflamatória em tumores de camundongos geneticamente obesos e com obesidade induzida por dieta, assim como nos tumores de seus respectivos controles. Verificar também as mesmas vias de sinalização nos tumores dos camundongos *scid* obesos e seus respectivos controles.

Avaliar os efeitos da administração do anticorpo anti-TNF- $\alpha$  sobre os padrões histológicos macroscópicos de número e tamanho dos tumores de camundongos geneticamente obesos e com obesidade induzida por dieta, assim como nos tumores de seus respectivos controles. Avaliar também o padrão de crescimento das células HT-29 implantadas em camundongos *scid* obesos e seus respectivos controles tratados com o anticorpo anti-TNF- $\alpha$ .

Caracterizar as vias de sinalização insulínica e inflamatória nos tumores dos camundongos *scid* obesos tratados com anticorpo anti-TNF- $\alpha$ .





## **3- CAPÍTULO**



# **Obesity-Induced Increase in Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Leads to Development of Colon Cancer in Mice**

**Short Title:** Obesity-mediated colon cancer.

Marcelo B. S. Flores<sup>1\*</sup>, Guilherme Z. Rocha<sup>1\*</sup>, Danilo Damas<sup>2</sup>, Felipe O. Costa<sup>1</sup>, Marília M. Dias<sup>1</sup>, Eduardo R. Ropelle<sup>1</sup>, Juliana A. Camargo<sup>1</sup>, Rita B. de Carvalho<sup>1</sup>, Hernandes F. Carvalho<sup>2</sup>, Mario J. A. Saad<sup>1</sup>, José B. C. Carvalheira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Anatomy, Cell Biology, Physiology and Biophysics, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil.

**Grant Support:** This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq)

**Please address correspondence to:**

José B. C. Carvalheira, MD.

Department of Internal Medicine

FCM - State University of Campinas (Unicamp)

13083-970 - Campinas, SP, Brazil.

Fax: + 55 19 3521-8950

e-mail: [carvalheirajbc@uol.com.br](mailto:carvalheirajbc@uol.com.br)

**Disclosures:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Writing Assistance:** We thank Dr. Nicola Conran and Sherian Bowyer for English language editing.

### **Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: **MBSF, GZR, JBCC.**

Performed the experiments: **MBSF, GZR, DD, FOC, MMD, JAC, RBC, HFC.**

Analyzed the data: **MBSF, GZR, FOC, ERR, HFC, MJAS, JBCC.**

Wrote the paper: **MBSF, GZR, FOC, JBCC.**

### **Abbreviations used in this paper**

AOM, azoxymethane; CRC, colorectal cancer; DSS, dextran sulfate sodium; IKK, inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B kinase; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; JNK, c-jun N terminal kinase;  $K_{itt}$ , rate constant for glucose disappearance in the insulin tolerance test; mTOR, mammalian target of rapamycin; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; SVF, stromal vascular fraction; TNF, tumor necrosis factor.

## ABSTRACT

**Background & Aims:** Epidemiological studies have shown that obesity is associated with an increased risk of colorectal cancer (CRC). Herein, we investigate the contribution of obesity-induced increases the tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  levels and hyperinsulinemia in the development of CRC.

**Methods:** Lean and obese mice were treated with a combination of azoxymethane with dextran sulfate sodium, which led to the development of CRC; lean and obese SCID mice were inoculated with HT-29 cells. Western blotting, immunohistochemistry and TUNEL assays were combined to evaluate the role of TNF- $\alpha$  and insulin in the development of obesity-mediated CRC.

**Results:** Genetic and diet induced obesity exhibited increased tumor incidence and size in comparing lean mice. Obese mice presented a faster growth of HT-29 xenografts. TNF- $\alpha$  neutralization, beyond decreasing JNK and IKK activation, also reduced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway activation and attenuated the growth and development of obesity-mediated CRC in the three animal models. Whereas, reducing insulin levels had no effect on the development of obesity-mediated CRC.

**Conclusions:** Our findings establish a role of TNF- $\alpha$  in obesity-mediated colon carcinogenesis, suggesting TNF- $\alpha$  blockers to be attractive chemopreventive agents against CRC in obese individuals.

## KEYWORDS

Colon cancer; obesity; inflammation; insulin resistance.

## INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) remains a major health burden with more than one million cases worldwide and a disease-specific mortality of approximately 33% in the developed world<sup>1,2</sup>. The association between obesity and the risk for CRC development is observed in both men and women (relative risk: 1.2-2.0)<sup>3,4</sup>. In addition to its association with obesity, inflammation and hyperinsulinemia may also primarily contribute to the risk for development of CRC<sup>5-8</sup>.

Among the major mediators of the inflammatory response is tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  whose over expression in adipose tissue is a common feature in human and animal models of obesity<sup>9,10</sup>. TNF- $\alpha$  contributes to the deregulation of the insulin-signaling pathway, including serine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS) proteins by kinases such as c-jun N terminal kinase (JNK)<sup>11</sup> and IKK<sup>12</sup>. JNK and IKK activation induce inhibitory serine 307 (Ser<sup>307</sup>) phosphorylation of IRS-1<sup>11,13,14</sup> which decreases insulin-mediated phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway activation<sup>13</sup>.

TNF- $\alpha$  first identified as an antitumor agent, is now also recognized as a tumor-promoting cytokine that links inflammation and cancer<sup>15</sup>. The importance of TNF- $\alpha$  and its intracellular mediators, such as JNK and IKK, as colonic tumorigenic promoters is strengthened by knockout and pharmacologic studies, using azoxymethane (AOM) or AOM combined with dextran sulfate sodium (DSS) as inducers of colorectal carcinogenesis<sup>16-18</sup>. Furthermore, the increased TNF- $\alpha$  levels associated with obesity are a potent liver tumor promoter in mice<sup>19</sup>.

Although the evidence for the potential involvement of inflammation and hyperinsulinemia in the development of obesity-mediated cancer is quite extensive, a systematic evaluation of the independent contribution of these factors to CRC development is lacking. Here, we examined whether obesity modulates insulin signaling and inflammation in the colon and CRC. We show that the obesity-induced abnormal inflammatory response strongly promotes CRC.



## **METHODS**

### **Antibodies, chemicals and buffers**

All the reagents were from Sigma-Aldrich, unless otherwise specified. Octreotide was from Novartis PharmaStein AG (Stein, Switzerland), pioglitazone was from Takeda pharmaceutical (Osaka, Japan), infliximab was from Centocor (Horsham, PA, USA), and DSS was from MP Biochemicals (Solon, OH, USA). Anti-phospho-mTOR, anti-mTOR, anti-phospho-p70S6K, anti-p70S6K, anti-phospho-Akt, anti-Akt, anti- $\beta$ -tubulin antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-phospho-IR, anti-IR, anti-phospho-IRS-1 Tyr971, anti-phospho-IRS-1 Ser307, anti-IRS-1, anti-phospho-IKK $\beta$  anti-IKK $\beta$  anti-IkBa, anti-phospho-JNK, anti-JNK, anti-phospho-c-jun, anti-c-jun, anti-TNF- $\alpha$  and anti-TNF receptor 1 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

### **Animals**

The Ethics Committee of the State University of Campinas approved all experiments. Mice were provided from Central Breeding Center of the State University of Campinas and randomly divided into two groups, control and high-fat diet (HFD). The diet composition is described in the Supplemental Table 1.

### **Insulin tolerance test, serum insulin, leptin, and TNF- $\alpha$ quantification**

The mice were given an insulin tolerance test (ITT; 1.5 IU insulin/kg body weight) as described previously<sup>20</sup>. Plasma was separated by centrifugation (1,100xg) for 15 min at 4°C and stored at -80°C until the assay. Serum insulin and leptin were measured by using a mouse ELISA kit (Linco, St. Charles, MO, USA). Serum TNF- $\alpha$  was measured using a mouse ELISA kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

## **Tumor induction and analysis**

Four-week-old male mice (C57BL6/J Unib and *ob/ob*) were placed on standard chow or on a high-fat diet for one week and then injected intraperitoneally (i.p.) with 12.5 mg/kg AOM. After five days, 2.5% DSS (MW 36-50 kDa) was given in the drinking water for five days, followed by 14 days of regular water. This cycle was repeated twice and mice were sacrificed ten days after the last cycle, at 16 weeks of age. Colons were removed, flushed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde and paraffin-embedded. Sections (5 $\mu$ m) were cut and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Tumor counts were performed in a blinded fashion. Tumor sizes were measured with calipers. Assessment of colitis disease scores was performed as previously described<sup>21</sup>.

## **Cell culture**

The human colon cancer cell line, HT-29, was purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank and cells were cultured in McCoy's medium containing 10% fetal bovine serum with the addition of antibiotics and fungicides. Cells were maintained at 37°C in a humid atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>.

## **Human tumor xenograft models**

Four-week-old male SCID mice (n=10 per group) were inoculated subcutaneously in the dorsal region with 1x10<sup>6</sup> HT-29 cells. Tumor volume (V) was calculated daily by measuring length (L) and width (W) of the tumor with calipers and using the formula  $V = \{W \times L \times [(W+L)/2]\} \times 0.52$ .

Treatments with octreotide, pioglitazone or infliximab began with cells inoculation. Octreotide was given subcutaneously twice a day for a total dosage of 0.01mg/animal/day. Pioglitazone was given orally for a total dosage of 50mg/kg per day. Infliximab was given daily i.p. for a total dosage of 5mg/kg body weight.

## **Tissue extracts**

Mice were anesthetized with sodium amobarbital (15mg/kg body weight, i.p.). Tumors were removed, minced coarsely, and homogenized in extraction buffer (1% Triton-X 100, 100mM Tris, pH 7.4, containing 100mM sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 10mM EDTA, 10mM sodium vanadate, 2mM PMSF, and 0.1mg of aprotinin/ml). The extracts were centrifuged at 11,000rpm and 4°C, and the supernatants of these tissues used.

## **Isolation of the stromal vascular fraction and adipocyte of adipose tissue**

Epididymal fat pads from mice were excised and minced in PBS with calcium chloride and 0.5% BSA. Collagenase type II was added at 1mg/ml and incubated at 37°C for 20 minutes with shaking. The cell suspension was filtered through a 100- $\mu$ m filter and then centrifuged at 300x g for 5 minutes to separate floating adipocytes from the stromal vascular fraction (SVF) pellet. Samples were digested until adipocyte fractions were free of adherent cells by these two quality control methods to ensure recovery of the majority of the SVF population. Afterward, the two fractions were used for protein analysis by immunoblotting.

## **Colonic macrophage isolation**

The colons of mice were removed and washed in PBS. The intestines were opened longitudinally, washed in HBSS and cut into 0.5-cm sections. Tissue was placed in 10ml fresh calcium/magnesium-free HBSS containing 1mM EDTA and 1mM DTT, the tube was placed in a shaking water bath for 15 min at 37°C and shaken vigorously, and the supernatant separated. The remaining tissue was digested with 0.02% collagenase V and 0.05% DNase (Roche Diagnostic Systems) in complete RPMI 1640 for 30 min at 37°C in a shaking water bath until complete digestion of the tissue. At the start of and every

5-10 min during the incubation, the tube was shaken vigorously, and the final supernatant was passed through 100- $\mu$ m filter. Afterward, the fraction was used for protein analysis by immunoblotting.

### **Protein analysis by immunoblotting**

Whole tissue extracts were homogenized in extraction buffer, treated with Laemmli sample buffer containing 100mM DTT, and heated in a boiling water bath. For total extracts, similar-sized aliquots (50 $\mu$ g protein) were subjected to SDS-PAGE. Proteins were resolved in 8-15% SDS gels and blotted onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Band intensities were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs using Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

### **Immunohistochemistry and TUNEL assay**

Ki67 staining was performed as described previously<sup>22</sup>. TUNEL staining was performed using a commercial apoptosis detection kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), according to the recommendations of the manufacturer. Analysis and documentation of results were performed as described previously<sup>22</sup>.

### **Statistical analysis**

Data are presented as means  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed by employing the ANOVA test with the *Bonferroni post test*. Significance was established at the  $p < 0.05$  level.

## RESULTS

### Diet-induced obesity engenders colonic inflammation and insulin signaling impairment

Four-week-old male mice received a single dose of AOM and three cycles of DSS (AOM+DSS), as described in the Methods section. Mice exposed to HFD presented increased body weight, epididymal fat, serum insulin, leptin, and TNF- $\alpha$ , compared to the controls (Supplemental Table 2). We observed decreased insulin sensitivity in the obese animals, as measured with the ITT (Supplemental Table 2).

Colon sections from the obese mice exhibited higher amounts of macrophages and leukocytes associated with epithelial cell damage and adenoma formation, leading to an inflammatory state in the colon (Figure 1A). To verify the source of the increased TNF- $\alpha$  leading to the inflammatory state observed in the colon we evaluated the adipose tissue, with its two major components (the adipocytes and the stromal vascular fractions), or the colonic tissue. As evidenced by the dosage of serum and tissue TNF- $\alpha$  we observed that the majority of the TNF- $\alpha$  is derived from the adipocytes and from the macrophages present in the adipose tissue (Figure 1B). The alterations in colon tissue were accompanied by an increase in Ki67 staining and diminished apoptosis (Figure 1C) when compared to control animals. In agreement with these results, we observed an increase in the activation of proinflammatory proteins in the obese mice. As shown in Figure 1D, HFD increases TNF- $\alpha$  expression, IKK $\beta$  phosphorylation, decreases I $\kappa$ B $\alpha$  expression, and also increases JNK and c-jun phosphorylation in colonic tissues.

We observed a slightly higher activation of insulin receptor  $\beta$  and IRS-1 with increased tyrosine phosphorylation, accompanied by increased IRS-1 Ser<sup>307</sup> phosphorylation as well as higher levels of phosphorylated Akt, mTOR, and p70S6K in the colons of the obese mice, as compared with control mice (Figure 1E). Next, we examined the response of colonic tissue to insulin in control

mice. Insulin increased Akt phosphorylation in a time-dependent manner, with maximum phosphorylation at 10 minutes (Supplemental Figure 1A). The HFD impaired insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR $\beta$  and IRS-1 (Figure 1F). As observed in Figure 1F, phosphorylated Akt levels are similar in the insulin-stimulated and non-stimulated colon of obese (HFD-fed) mice.

### **The diet-induced obesity-mediated inflammatory microenvironment promotes colon cancer**

Mice kept on HFD exhibited increased tumor incidence and size compared with control mice (Figures 2A, B). Similar to the colonic tissues, colon tumors show increased TNF- $\alpha$  expression, IKK $\beta$  phosphorylation, decreased I $\kappa$ B $\alpha$  expression, and increased levels of phosphorylated JNK and c-jun (Figure 2C).

Next, we examined the effects of obesity on several kinases involved in insulin signaling in carcinomas. We observed a slightly higher activation of IR $\beta$  and IRS-1 with increased tyrosine phosphorylation, accompanied by increased IRS-1 Ser<sup>307</sup> phosphorylation as well as higher levels of phosphorylated Akt, mTOR, and p70S6K on the tumors in the obese mice, when compared to the control mice (Figure 2D). The HFD impaired insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR $\beta$  and IRS-1 (Figure 2E). As observed in Figure 2E, phosphorylated Akt levels are similar in insulin-stimulated and non-stimulated colon tumors from HFD-fed obese mice.

To rule out the effect of the inflammation caused by DSS in the colon, we performed an experiment in which mice were placed on a HFD or in a control diet, and a single dose of AOM (12.5mg/kg) was given IP. Twenty weeks after the AOM treatment mice were sacrificed, and the colon was examined for the presence of tumors. As observed previously, obese mice presented a higher inflammatory state in the colon (Supplemental Figure 2A) with increased tumor incidence and size compared with control mice (Supplemental Figure 2B).

## Genetic obesity promotes colonic inflammation and insulin signaling impairment

We submitted four-week-old male *ob/ob* and WT mice to the same AOM+DSS protocol. As expected, *ob/ob* mice presented increased body weight, epididymal fat, serum insulin, and leptin when compared with controls (Supplemental Table 2). We observed decreased insulin sensitivity in the obese animals, measured with the ITT (Supplemental Table 2).

During the protocol, *ob/ob* mice exhibited significantly more clinical signs of inflammatory response than CTL, including rectal bleeding and prolapse (Figure 3A). Consistent with these signs, we observed a significantly higher level of histological damage (Figure 3A). These alterations were accompanied by an increase in Ki67 staining and diminished apoptosis (Figure 3B) when compared to lean animals.

We next examined proinflammatory protein expression and observed increased TNF- $\alpha$  expression, IKK $\beta$  phosphorylation and decreased I $\kappa$ B $\alpha$  expression, associated with increased levels of phosphorylated JNK and c-jun in the *ob/ob* colon, when compared with control mice (Figure 3C). We examined the effects of obesity on several kinases involved in insulin signaling in the *ob/ob* colon. A slightly higher activation of IR $\beta$  and IRS-1 was observed with increased tyrosine phosphorylation, accompanied by increased IRS-1 Ser<sup>307</sup> phosphorylation as well as higher levels of phosphorylated Akt, mTOR, and p70S6K on the colons of obese mice compared to the colons of control mice (Figure 3D). Colons from *ob/ob* mice presented insulin resistance, with a lower activation of IR $\beta$  and IRS-1 after insulin stimulation (Figure 3E). As observed in Figure 3E, phosphorylated Akt levels are similar in insulin-stimulated and non-stimulated colons in *ob/ob* mice.

## **Genetic obesity promotes colon carcinogenicity associated with inflammation and colonic insulin signaling impairment**

After the AOM+DSS protocol we found that *ob/ob* mice also exhibited enhanced tumor incidence and size compared with control mice (Figure 4A, B). Next, we examined the inflammatory pathway in tumor tissue of control and *ob/ob* mice. As shown in Figure 4C, *ob/ob* mice presents increased TNF- $\alpha$  expression and IKK $\beta$  phosphorylation, decreased I $\kappa$ B $\alpha$  expression, and elevated levels of phosphorylated JNK and c-jun. These results indicate that *ob/ob* mice present a higher inflammatory state than control mice. Additionally, we also examined the insulin signaling pathway in the tumors from control and *ob/ob* mice. As shown in Figure 4D, *ob/ob* mice present a slightly higher activation of IR $\beta$  and IRS-1 with increased tyrosine phosphorylation and increased IRS-1 Ser<sup>307</sup> phosphorylation. The *ob/ob* mice also presented higher levels of phosphorylated Akt, mTOR, and p70S6K, when compared with control animals.

Next, we examined the response of tumor tissue to insulin in control and *ob/ob* mice. Tumors from *ob/ob* mice presented lower activation of IR $\beta$  and IRS-1 after insulin stimulation (Figure 4E). As observed in Figure 4E, phosphorylated Akt levels are similar in insulin-stimulated and non-stimulated colon tumors from *ob/ob* mice.

## **High-fat diet enhances HT-29 xenograft tumor growth in SCID mice**

The SCID mice submitted to HFD demonstrated increased body weight, epididymal fat, serum insulin, leptin, and TNF- $\alpha$ , as well as decreased insulin sensitivity (Supplemental Table 2), compared to the controls. The greater the degree of host obesity, the faster the HT-29 xenografts grew, which reached the largest size in the HFD mice (Figure 5A).

As previously observed in the AOM+DSS induced colonic tumors, the xenografts also presented increased TNF- $\alpha$  expression, IKK $\beta$  phosphorylation and decreased I $\kappa$ B $\alpha$  expression, with higher phosphorylation of JNK and c-jun,



when compared to control mice (Figure 5B). When we analyzed the insulin signaling pathway of these tumors, we observed the discrete activation of IR $\beta$  and IRS-1, represented by tyrosine phosphorylation and the higher activation of Akt, mTOR, and p70S6K, we also observed an increase in IRS-1Ser<sup>307</sup> phosphorylation (Figure 5C).

Next, we examined the phosphorylation of IR $\beta$ , IRS-1 and Akt of the control and obese SCID mice after insulin stimulation (Figure 5D). As observed, IR $\beta$  and IRS-1 lead to impaired insulin signaling in the HFD mice, whereas despite increased steady-state Akt serine phosphorylation, Akt also presents impaired activation after insulin stimulus.

The enhanced tumor growth in the HFD mice was due to the increased proliferation of tumor cells, as demonstrated by Ki67 staining (Figure 5E), and diminished apoptosis (Figure 5F) relative to the control animals. Thus, the effect of obesity on HT-29 xenografts is characterized by enhanced cell proliferation and decreased cell death.

### **Neutralization of TNF- $\alpha$ reverses obesity-induced effects on tumor growth**

Infliximab treatment exerted a stronger inhibitory effect on tumor growth in HFD mice when compared with non-treated mice, nearly restoring tumor growth to the levels observed in lean animals (Figure 6A). The reduced tumor growth of the infliximab treated mice, when compared to the HFD mice, is due to decreased proliferation, demonstrated by Ki67 staining (Figure 6B), and enhanced apoptosis of tumor cells (Figure 6C). Thus, TNF- $\alpha$  plays a significant role in the proliferation of tumor cells in obese mice, and its ablation is capable of reducing tumor growth to levels observed in the control group.

We observed that infliximab treatment induced a decrease in IRS-1 Ser<sup>307</sup> phosphorylation and, interestingly a decrease in the phosphorylation of Akt, mTOR, and p70S6K (Figure 6D). Infliximab was effective in reducing the increased

proinflammatory effect mediated by obesity. Thus, infliximab treatment decreased the IKK $\beta$  phosphorylation, increased I $\kappa$ B $\alpha$  expression and reduced the phosphorylation of JNK and c-jun, when compared to HFD mice (Figure 6E).

The octreotide treatment was effective in reducing insulin levels in HFD mice (Supplemental Figure 3A), in improving insulin resistance in peripheral tissues (Supplemental Figure 3B), but was not effective in altering tumor growth (Supplemental Figure 3C), or decreasing Akt phosphorylation (Supplemental Figure 3D), proliferation or apoptosis (Supplemental Figure 3C and D) when compared to untreated HFD mice. The pioglitazone treatment was also effective in improving insulin sensitivity, although it was not effective in altering tumor growth, Akt phosphorylation, proliferation or apoptosis when compared to untreated mice (Supplemental Figure 4).

### **TNF- $\alpha$ neutralization protects from the effects of obesity on tumor formation**

We designed a pharmacological approach to determine the effects of TNF- $\alpha$  on tumor formation during obesity. Concomitantly to the AOM+DSS protocol with the *ob/ob* mice, we started treatment with infliximab and observed that the infliximab treatment resulted in decreased levels of histological damage in the colon sections (Figure 7A). Consistent with these signs, we observed that infliximab treatment decreased colon tumor incidence and size in *ob/ob* mice (Figure 7B), an effect that was not observed with pioglitazone (data not shown). Additionally, infliximab treatment exerted an inhibitory effect on tumor growth in the *ob/ob* mice, reducing proliferation, demonstrated by Ki67 staining (Figure 7C), and enhancing apoptosis (Figure 7D). Furthermore, consistent with our previous studies infliximab treatment, besides neutralizing TNF- $\alpha$ , increased insulin sensitivity as measured by  $K_{itt}^{9,23}$  (Supplemental Table 3).

## DISCUSSION

The results of this study show that HFD-induced and genetic obesity markedly increased the development of CRC. Our data indicate that obesity-induced colonic inflammation increases JNK and IKK $\beta$  expression and activity in the colon of AOM+DSS-treated mice. In addition, the HFD-fed and *ob/ob* mice also presented a significant increase in host insulin levels and an impairment in insulin activation of the IR/IRS-1/Akt pathway in the colon of these animals. Moreover, octreotide and thiazolidinedione treatments do not influence HT-29 xenograft growth in HFD fed SCID mice. The administration of infliximab, a TNF- $\alpha$  inhibitor, reduced the magnitude of carcinogenesis in HFD-fed and in *ob/ob* mice, as well as inhibited the HT-29 xenograft growth in obese SCID mice, suggesting that TNF- $\alpha$  is a major modulator of the effects of obesity-induced CRC.

Epidemiologic studies suggest that hyperinsulinemia is an important mechanism by which obesity can confer an increased risk of colon cancer, and insulin levels may also influence CRC recurrence<sup>6,24</sup>. However, we observed a blunted insulin-stimulated IR, IRS-1 and Akt phosphorylation in the colons of HFD-fed and *ob/ob* mice providing a biochemical correlation for decreased colonic *in vivo* insulin sensitivity. Consistent with these results, octreotide and pioglitazone treatments were unable to decrease the tumor growth rate, suggesting that hyperinsulinemia is not a major mediator of obesity-mediated colon cancer, at least in the animal models presented herein. It is interesting to note that octreotide, beyond reducing insulin secretion, also decreases the synthesis of several intestinal peptides, such as glucose-dependent insulin tropic polypeptide (GIP)<sup>25</sup>. GIP is a hormone that can activate the PI3K/Akt/mTOR pathway in gastrointestinal tract<sup>26</sup>; nevertheless, we did not observe decreased tumor growth or Akt phosphorylation with octreotide treatment.

Tumor-promoting inflammation is one of the enabling characteristics of carcinogenesis and reducing inflammation during tumor promotion is pivotal for chemoprevention<sup>27</sup>. TNF- $\alpha$  and its mediators, JNK and IKK, are critical in colon

carcinogenesis induced by the treatment of AOM<sup>16-18</sup>. Our data show that obesity induced a great increase in the colonic inflammatory index, accompanied by an increase in IKK and JNK phosphorylation in diet-induced and genetic obesity, as well as the treatment using the TNF- $\alpha$  blocker, infliximab, showed a consistent decrease in tumor growth in the HT-29 xenograft and in colitis-associated cancer development. Thus, the low grade inflammatory state observed in obesity increased plasma TNF- $\alpha$  levels and created “fertile soil” in the colonic epithelium that increases DSS and AOM action.

TNF- $\alpha$  is an important component of the cancer network of inflammatory mediators, such as cytokines and VEGF<sup>15</sup>. This network then acts by modulating the cancer microenvironment and allowing cancer growth<sup>28</sup>. It has also been shown that the PI3K/Akt pathway can be activated by TNF- $\alpha$ <sup>29,30</sup>. Moreover, the PI3K/Akt pathway is activated in patients with ulcerative colitis<sup>31</sup> and induces proinflammatory cytokine production<sup>32</sup>. Our findings showing a reduction in the Akt/mTOR pathway, which is known to be an important regulator of CRC growth<sup>33,34</sup>, after infliximab treatment of obese mice bearing colon cancer xenografts suggests a major role of this pathway in obesity-mediated colon cancer growth.

Currently, infliximab is recommended for the treatment of complicated Crohn’s disease and was approved for the treatment ulcerative colitis that fails to respond to the standard therapies, such as corticosteroids and immunosuppressors<sup>35-37</sup>. In accordance with our study neutralization of TNF- $\alpha$  is also an effective therapy in various animal models of T-cell mediated colitis<sup>38,39</sup>. However, TNF- $\alpha$  neutralization in the DSS-induced colitis, an epithelial damage model, is still controversial<sup>40-42</sup>. These different results may be related to the environment that the animals were bred in or to the differences in the inflammatory levels obtained with the different protocols. It is interesting to note that despite the contradictory results related to colitis, the effect of TNF- $\alpha$  neutralization or inhibition of IKK $\beta$  was effective in reducing CRC in all studies<sup>16,18,42</sup>. The results presented herein extend these data, demonstrating that infliximab also prevents

obesity-mediated CRC. Altogether, these results suggest that the use of anti-TNF- $\alpha$  therapy is an interesting approach to the treatment of type 2 diabetes patients since it could decrease both insulin resistance and colon cancer risk; although the possible contribution of anti-TNF- $\alpha$  therapy to improve insulin sensitivity in human is still controversial and deserves further investigation<sup>35,43-45</sup>. Along this line, chemoprevention of CRC in obese individuals with TNF- $\alpha$  neutralization should be evaluated.

In summary, our findings establish a role for TNF- $\alpha$  in obesity-mediated colon carcinogenesis and point to TNF- $\alpha$  blockers as attractive players in colon cancer chemoprevention for obese individuals.

## REFERENCES

- 1- Center MM, Jemal A, Smith RA, et al. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 2009;59:366-78.
- 2- Walther A, Johnstone E, Swanton C, et al. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9:489-99.
- 3- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625-38.
- 4- Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:925-43.
- 5- Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, et al. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* 2004;363:1346-53.
- 6- Sandhu MS, Dunger DB, Giovannucci EL. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:972-80.
- 7- Sinicrope FA, Foster NR, Sargent DJ, et al. Obesity is an independent prognostic variable in colon cancer survivors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:1884-93.
- 8- Osorio-Costa F, Rocha GZ, Dias MM, et al. Epidemiological and molecular mechanisms aspects linking obesity and cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53:213-26.
- 9- Araujo EP, De Souza CT, Ueno M, et al. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology* 2007;148:5991-7.

- 10- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-8.
- 11- Lee YH, Giraud J, Davis RJ, et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 2003; 278:2896-902.
- 12- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; 109 Suppl:S81-96.
- 13- Aguirre V, Werner ED, Giraud J, et al. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 2002;277:1531-7.
- 14- Gao Z, Hwang D, Bataille F, et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 2002;277:48115-21.
- 15- Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:361-71.
- 16- Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 2008;118:560-70.
- 17- Endo H, Hosono K, Fujisawa T, et al. Involvement of JNK pathway in the promotion of the early stage of colorectal carcinogenesis under high-fat dietary conditions. *Gut* 2009;58:1637-43.
- 18- Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118:285-96.
- 19- Park EJ, Lee JH, Yu GY, et al. Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. *Cell*;140:197-208.

- 20- Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *The Journal of physiology* 2006;577:997-1007.
- 21- Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, et al. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clinical and experimental immunology* 1997;107:353-8.
- 22- Rocha GZ, Dias MM, Ropelle ER, et al. Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:3993-4005.
- 23- Barbuio R, Milanski M, Bertolo MB, et al. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol* 2007;194:539-50.
- 24- Ma J, Giovannucci E, Pollak M, et al. A prospective study of plasma C-peptide and colorectal cancer risk in men. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:546-53.
- 25- Ranganath LR, Beety JM, Morgan LM. Inhibition of insulin, glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion by octreotide has no effect on post-heparin plasma lipoprotein lipase activity. *Horm Metab Res* 1999;31:262-6.
- 26- Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007;132:2131-57.
- 27- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
- 28- Li B, Vincent A, Cates J, et al. Low levels of tumor necrosis factor alpha increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site. *Cancer research* 2009;69:338-48.



- 29- Chen Q, Casali B, Pattacini L, et al. Tumor necrosis factor-alpha protects synovial cells from nitric oxide induced apoptosis through phosphoinositide 3-kinase Akt signal transduction. *J Rheumatol* 2006;33:1061-8.
- 30- Xu H, He Y, Yang X, et al. Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF-alpha-induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF-kappaB and PI3 kinase/Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:920-6.
- 31- Huang XL, Xu J, Zhang XH, et al. PI3K/Akt signaling pathway is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society...[et al.]* 2011.
- 32- Reddy SA, Huang JH, Liao WS. Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF-kappa B activation. *J Immunol* 2000;164:1355-63.
- 33- Stathopoulos GT, Kollintza A, Moschos C, et al. Tumor necrosis factor-alpha promotes malignant pleural effusion. *Cancer research* 2007;67:9825-34.
- 34- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2011; 12:21-35.
- 35- Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462-76.
- 36- Luger A, Schmidt M, Luger N, et al. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* 2001;121:1145-57.
- 37- Kim YJ, Hong KS, Chung JW, et al. Prevention of colitis-associated carcinogenesis with infliximab. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010;3:1314-33.
- 38- Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, et al. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997; 27:1743-50.

- 39- Powrie F, Leach MW, Mauze S, et al. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1994;1:553-62.
- 40- Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, et al. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1997;107:353-8.
- 41- Naito Y, Takagi T, Handa O, et al. Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor-alpha deficient mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:560-9.
- 42- Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, et al. Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G850-9.
- 43- Bernstein LE, Berry J, Kim S, et al. Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome. *Arch Intern Med* 2006;166:902-8.
- 44- Kiortsis DN, Mavridis AK, Vasakos S, et al. Effects of infliximab treatment on insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:765-6.
- 45- Paquot N, Castillo MJ, Lefebvre PJ, et al. No increased insulin sensitivity after a single intravenous administration of a recombinant human tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein in obese insulin-resistant patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1316-9.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1- Diet-induced obesity promotes colonic inflammation and insulin signaling impairment.** (A) Macroscopical changes in epithelial tissues, hematoxylin and eosin (H&E) staining of histologic sections and inflammatory index of colons from control (CTL) and high-fat diet (HFD)-fed mice. Results are means  $\pm$  SEM ( $n=8$ ). (B) TNF- $\alpha$  dosage of serum, isolated adipocytes, adipose tissue stromal vascular fraction (SVF), enterocytes and colonic SVF from CTL and HFD fed (C) Representative microphotographs and quantification of Ki67 and apoptotic (TUNEL) staining on colonic tissue sections of CTL and HFD mice, four fields per tumor section, mean  $\pm$  SEM; Western blots showing colonic tumor lysates from C57BL6 mice (D) Colonic TNF- $\alpha$ , IKK $\beta$ , JNK and c-Jun expression and phosphorylation, and colonic expression of I $\kappa$ B $\alpha$  TNFR1 and  $\beta$ -tubulin, (E) Colonic IR $\beta$ , IRS-1, IRS-1 Ser<sup>307</sup>, Akt, mTOR and p70S6K expression and phosphorylation, (F) Insulin-induced IR $\beta$ , IRS-1, and Akt phosphorylation in the colon. Data are the means  $\pm$  SEM. \* $p<0.05$  versus respective lean group. CTL (white bars) and HFD (black bars).

**Figure 2- Diet-induced obesity promotes colon carcinogenesis.** (A) Macroscopical changes in colonic tissues (scale bars: 5mm). (B) Tumor incidence and size of colons removed at the end of protocol from CTL and HFD-fed mice. Results are means  $\pm$  SEM ( $n=8$ ). Western blots showing colonic tumor lysates from C57BL6/J control and HFD-fed mice; (C) Colonic tumor TNF- $\alpha$ , TNFR1, IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK and c-Jun expression and phosphorylation. (D) Colonic tumor IR $\beta$ , IRS-1, IRS-1 Ser<sup>307</sup>, Akt, mTOR, and p70S6K expression and phosphorylation. (E) Insulin-induced IR $\beta$ , IRS-1, and Akt phosphorylation in colon tumors. Data are the means  $\pm$  SEM. \* $p<0.05$  versus respective control group. CTL (white bars) and HFD (black bars).

**Figure 3- Genetic obesity promotes colonic inflammation and insulin signaling impairment.** (A) Rectal prolapse presented in *ob/ob* mice during protocol treatment, H&E staining histologic sections and inflammatory index of colons from CTL and *ob/ob* mice. Results are means  $\pm$  SEM ( $n=10$ ). (B) Representative microphotographs and quantification of Ki67 and apoptotic (TUNEL) staining on colonic tissue sections of CTL and *ob/ob* mice, four fields per tumor section, mean  $\pm$  SEM. Western blots of six independent experiments showing colonic lysates from control or *ob/ob* mice; (C) Colonic TNF- $\alpha$ , TNFR1, IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK and c-Jun expression and phosphorylation. (D) Colonic IR $\beta$ , IRS-1, IRS-1 Ser<sup>307</sup>, Akt, mTOR, and p70S6K expression and phosphorylation (E) Insulin-induced IR $\beta$ , IRS-1 and Akt phosphorylation in the colon. Data are the means  $\pm$  SEM. \* $p<0.05$  versus respective control group. CTL (white bars) and *ob/ob* (black bars).

**Figure 4- Genetic obesity enhances tumor formation.** (A) Macroscopical changes in epithelial tissues (scale bars: 5mm). (B) Tumor incidence and size from colons removed at the end of protocol from CTL and *ob/ob* mice. Results are means  $\pm$  SEM ( $n=8$ ). Western blots of five independent experiments showing colonic tumor lysates from control and *ob/ob* mice. (C) Colonic tumor TNF- $\alpha$ , TNFR1, IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK and c-Jun expression and phosphorylation. (D) Colonic tumor IR $\beta$ , IRS-1, IRS-1 Ser<sup>307</sup>, Akt, mTOR, and p70S6K expression and phosphorylation; (E) Insulin-induced IR $\beta$ , IRS-1, and Akt phosphorylation in the colon tumor. Data are the means  $\pm$  SEM. \* $p<0.05$  versus respective control group. CTL (white bars) and *ob/ob* (black bars).

**Figure 5- High-fat diet enhances HT-29 xenograft tumor growth in SCID mice.**

(A) HT-29 tumor xenografts from normal chow and HFD-fed SCID mice and tumor growth measured for 30 days. The results are means  $\pm$  SD of 5-8 mice per group. Western blots of six independent experiments showing xenografts lysates from control and high-fat diet fed mice. (B) HT-29 Xenograft TNF- $\alpha$ , TNFR1, IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK and c-Jun expression and phosphorylation. (C) HT-29 Xenograft IR $\beta$ , IRS-1, IRS-1 Ser<sup>307</sup>, Akt, mTOR, and p70S6K expression and phosphorylation. (D) Insulin-induced IR $\beta$ , IRS-1, and Akt phosphorylation in the xenograft tumor. Data are the means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus respective lean group. Representative microphotographs and quantification of Ki67 (E) and apoptotic (F) staining on HT-29 xenografts sections of control and HFD mice, four fields per tumor section, mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus control. CTL (white bars) and HFD (black bars).

**Figure 6- Neutralization of TNF- $\alpha$  reverses obesity-induced effects on tumor growth.**

(A) Tumor growth measured for 30 days in SCID mice maintained on normal chow or HFD for 8 weeks prior to tumor inoculation with HT-29 cells ( $1 \times 10^6$  cells/mouse) and kept on normal chow or HFD for 30 days after inoculation and with the indicated treatment. The results are means  $\pm$  SD from 5-8 mice per group. (B and C) Representative microphotographs and quantification of Ki67 (B) and apoptotic (C) staining on HT-29 xenografts sections, four fields per tumor section, mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus control. Western blots showing HT-29 xenograft lysates from tumor-bearing SCID mice. (D) HT-29 xenograft IRS-1, IRS-1 Ser<sup>307</sup>, Akt, mTOR, and p70S6K expression and phosphorylation, (E) HT-29 xenograft TNF- $\alpha$ , TNFR1, IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK and c-Jun expression and phosphorylation. INFLIX, infliximab. CTL (white bars) and HFD (black bars).

**Figure 7- Absence of TNF- $\alpha$  protects from obesity effects on tumor formation.** (A) H&E staining histologic section and inflammatory index and (B) macroscopical changes (scale bars: 5mm), tumor incidence, and size of colons removed at the end of protocol from *ob/ob* mice treated or not with infliximab. Representative microphotographs and quantification of Ki67 (C) and apoptotic (D) staining of HT-29 xenografts sections, four fields per tumor section, mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus control.

**Supplemental Figure 1-** (A) Western blot of colonic time course of insulin-induced Akt phosphorylation in lean mice.

**Supplemental Figure 2-** Diet induced obesity promotes colon carcinogenesis in mice treated with AOM alone. (A) Macroscopical changes in colonic tissues (scale bars: 5mm), (B) Tumor incidence and size of colons removed at the end of protocol from CTL and HFD fed mice. Results are means  $\pm$  SEM ( $n=8$ ).

**Supplemental Figure 3-** Octreotide reduces insulin levels with no effects on tumor growth, proliferation and apoptosis. (A) Dosage of insulin from the serum of CTL, HFD, and HFD and octreotide treated (OCT) mice. (B) Western blots showing muscle lysates from HFD-fed mice, treated or not with OCT. Immunoblotted with pIR $\beta$ , IR, pIRS-1, IRS-1, pAkt, Akt and  $\beta$ -tubulin. (C) Tumor growth measured for 30 days in SCID mice maintained on normal chow or HFD for 8-weeks prior to tumor inoculation with HT-29 cells ( $1 \times 10^6$  cells/mouse) and kept on normal chow or HFD for 30 days after inoculation and with the indicated treatment. (D) Western blots showing HT-29 xenografts lysates from CTL, HFD-fed mice, treated or not with OCT. Immunoblotted with pAkt, and Akt. (E and F) Representative microphotographs and quantification of Ki67 (E) and apoptotic (F) staining on HT-29 xenografts sections, four fields per tumor section, mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus control.

**Supplemental Figure 4-** Pioglitazone reduces insulin levels with no effects on tumor growth, proliferation or apoptosis. (A) Dosage of insulin from the serum of CTL, HFD, and HFD and pioglitazone treated (PIO) mice. (B) Western blots showing muscle lysates from HFD-fed mice, treated or not with PIO. Immunoblotted with pIR $\beta$ , IR, pIRS-1, IRS-1, pAkt, Akt and  $\beta$ -tubulin. (C) Tumor growth measured for 30 days in SCID mice maintained on normal chow or HFD for 8-weeks prior to tumor inoculation with HT-29 cells ( $1 \times 10^6$  cells/mouse) and kept on normal chow or HFD for 30 days after inoculation and with the indicated treatment. The results are means  $\pm$  SD from 5-8 mice per group. (D) Western blots showing HT-29 xenografts lysates from CTL, HFD-fed mice, treated or not with PIO. Immunoblotted with pAkt, and Akt. (E and F) Representative microphotographs and quantification of Ki67 (E) and apoptotic (F) staining on HT-29 xenografts sections, four fields per tumor section, mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus control.

**Supplemental Table1-** Components of Standard Chow and High-fat Diet

<b>Ingredients</b>	<b>Standard Chow (g)</b>	<b>High Fat Diet (g)</b>
Casein	202	200
Sucrose	100	100
Cornstarch	397	115.5
Dextrinated starch	130.5	132
Lard	-	312
Soybean oil	70	40
Cellulose	50	50
Mineral mix American Institute of Nutrition (AIN)-93	35	35
Vitamin mix AIN-93	10	10
L-Cystine	3	3
Choline	2.5	2.5



**Supplemental Table 2-** Characteristics of Chow-(CTL-) fed and high-fat diet-(HFD-) fed C57BL6/J and SCID mice and chow- fed C57BL6/J and ob/ob mice

	SCID					
	CTL	HFD	C57	ob/ob	CTL	HFD
<b>Body weight (g)</b>	24.3 ± 2.8	33.2 ± 4.1 <sup>A</sup>	22.3 ± 2.2	55.2 ± 3.5 <sup>A</sup>	19.6 ± 1.6	28.5 ± 2.5 <sup>A</sup>
<b>Epididymal fat (g)</b>	4.0 ± 0.1	8.0 ± 0.5 <sup>A</sup>	3.0 ± 0.1	11.0 ± 0.5 <sup>A</sup>	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.02 <sup>A</sup>
<b>Insulin (ng/mL)</b>	3.8 ± 0.2	7.4 ± 0.5 <sup>A</sup>	0.4 ± 0.1	12.46 ± 0.5 <sup>A</sup>	0.53 ± 0.05	1.0 ± 0.15 <sup>A</sup>
<b>Leptin (ng/mL)</b>	2.1 ± 0.4	3.7 ± 0.5 <sup>A</sup>	1.2 ± 0.4	ND	0.6 ± 0.01	1.5 ± 0.4 <sup>A</sup>
<b>TNF-α (pg/mL)</b>	53.2 ± 7.8	104 ± 9.6 <sup>A</sup>	63.4 ± 0.6	169.6 ± 9.1 <sup>A</sup>	2.57 ± 1.1	10.8 ± 5.4 <sup>A</sup>
<b>Kitt (%/min)</b>	5.1 ± 0.1	2.8 ± 0.4 <sup>A</sup>	4.2 ± 0.1	3.3 ± 0.1 <sup>A</sup>	6.0 ± 1.2	3.5 ± 1.1 <sup>A</sup>

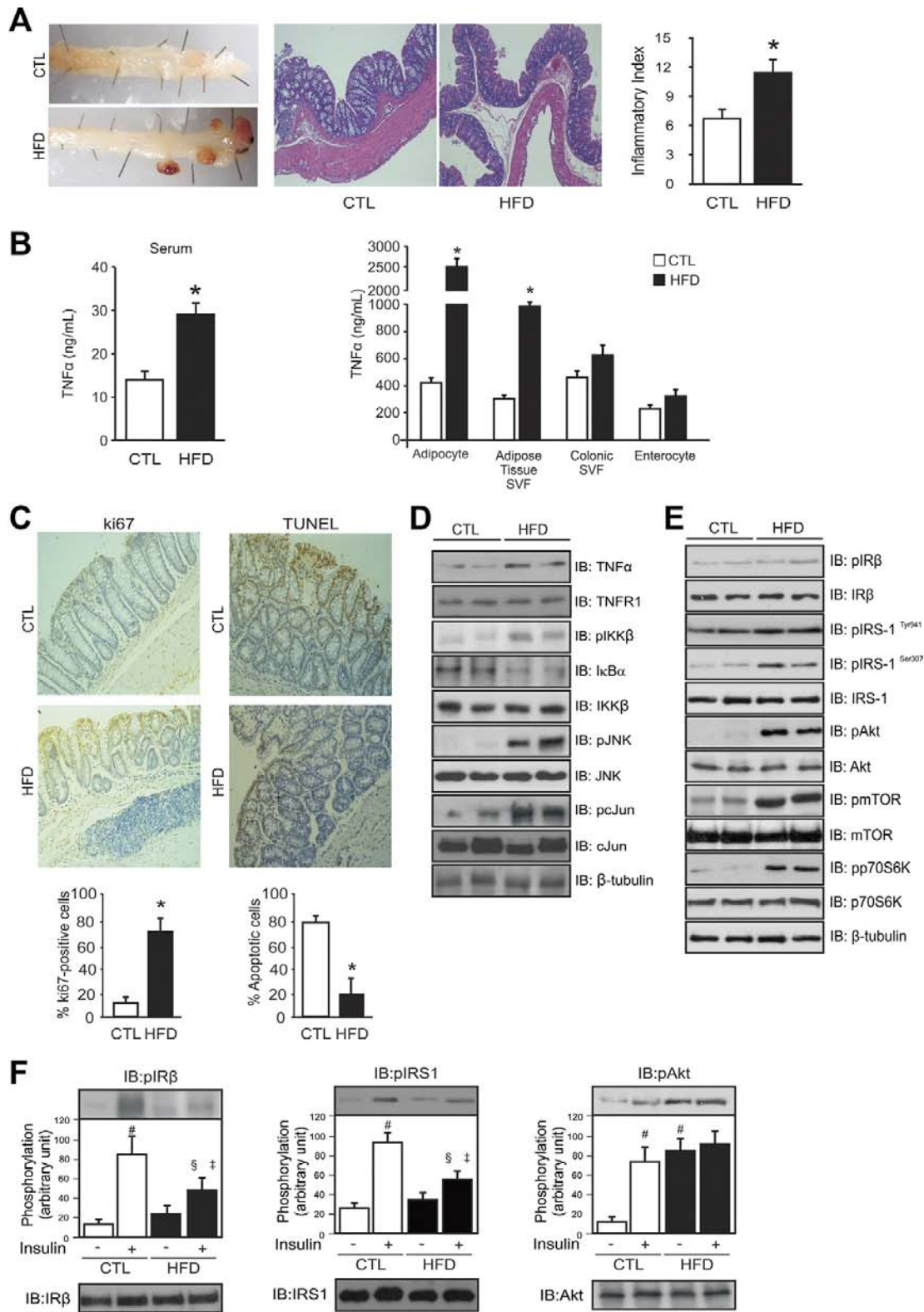
*n*=8 in each group. <sup>A</sup>*P*< 0.01 versus respective control group. Kitt, rate constant for glucose disappearance in the insulin tolerance test.

Values are presented as mean ± standard deviation.

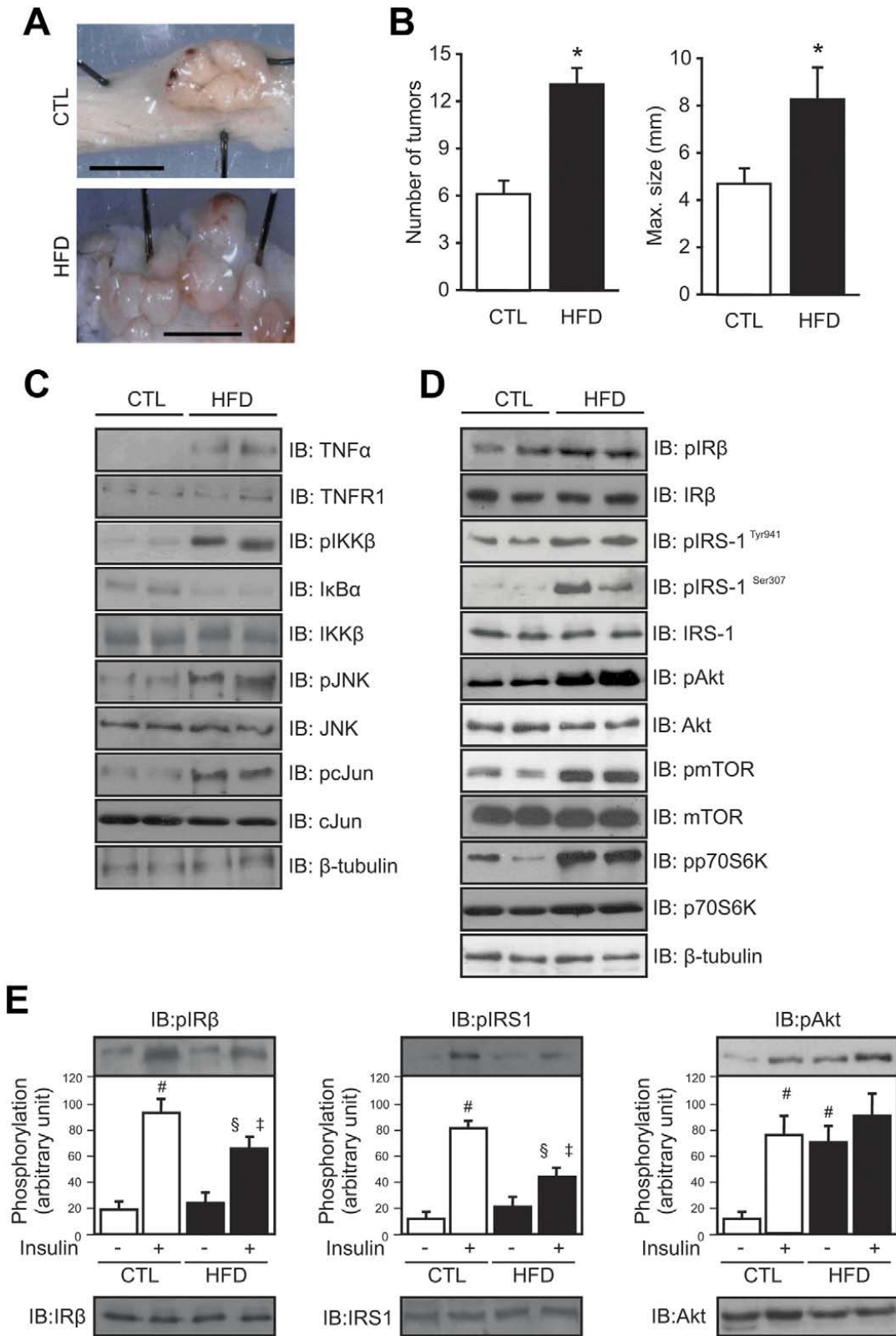
**Supplemental table 3-** Characteristics of HFD fed mice treated with vehicle or infliximab

	HFD + Vehicle	HFD + Infliximab
<b>TNF-α (pg/mL)</b>	133.4 ± 31.9	38.5 ± 23.4 <sup>A</sup>
<b>Leptin (ng/mL)</b>	1.95 ± 0.18	1.67 ± 0.43
<b>Kitt (%/min)</b>	1.9 ± 0.6	5.1 ± 0.7 <sup>A</sup>

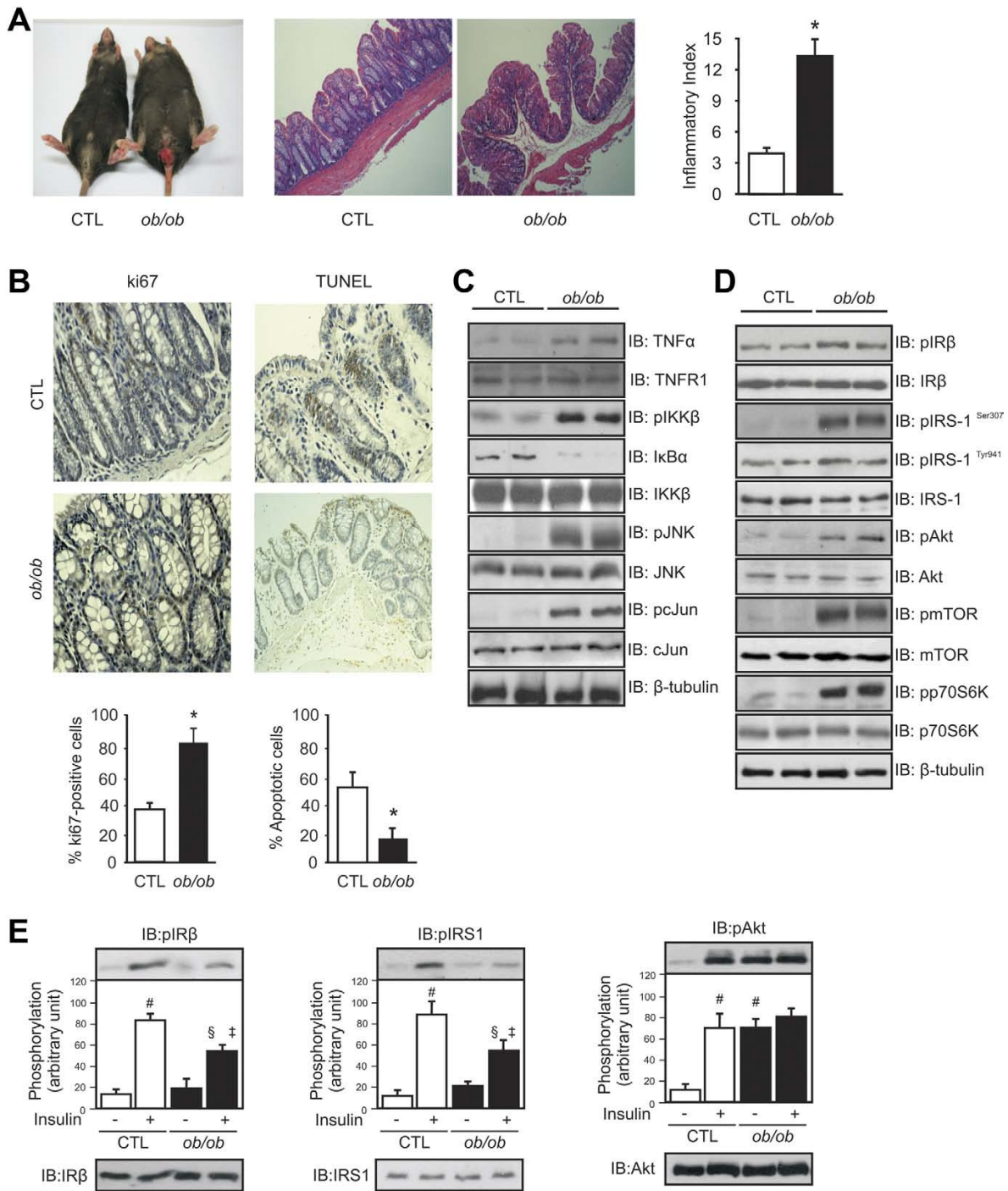
*n*=4-5 in each group. <sup>A</sup>*P*<0.05 versus vehicle treated group. Kitt, rate constant for glucose disappearance in the insulin tolerance test. Values are presented as mean ± standard deviation



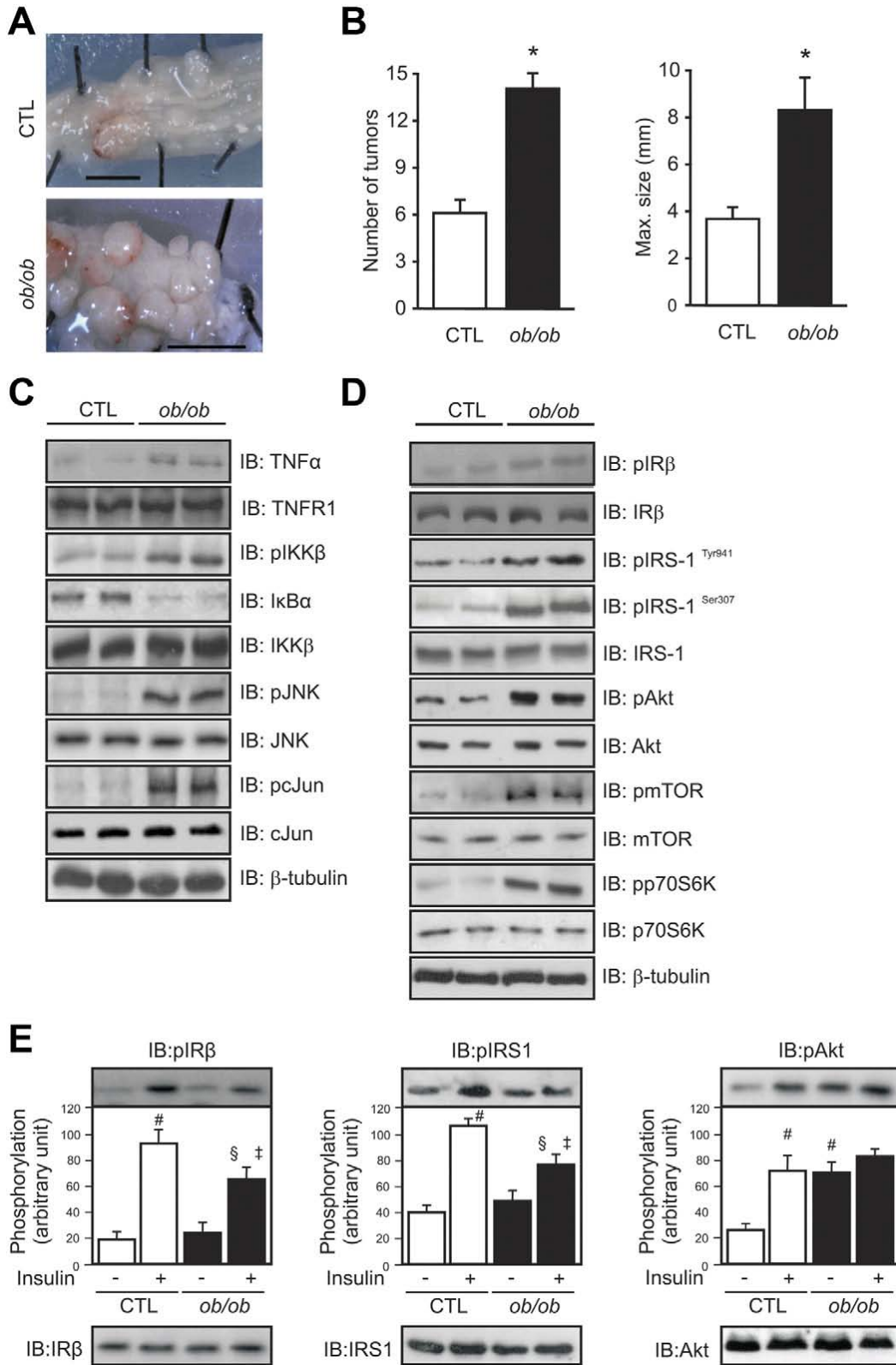
**Fig.1**



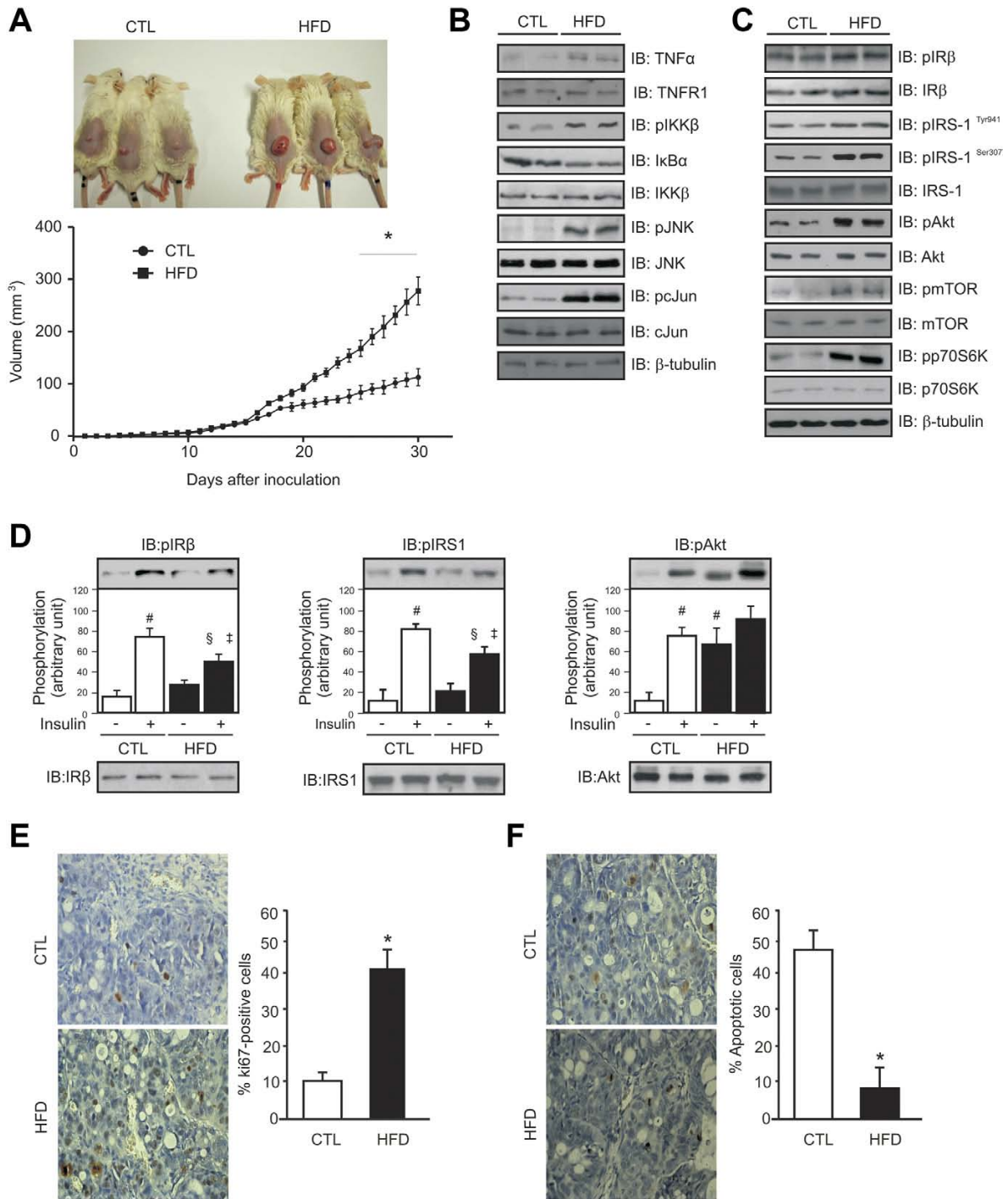
**Fig. 2**



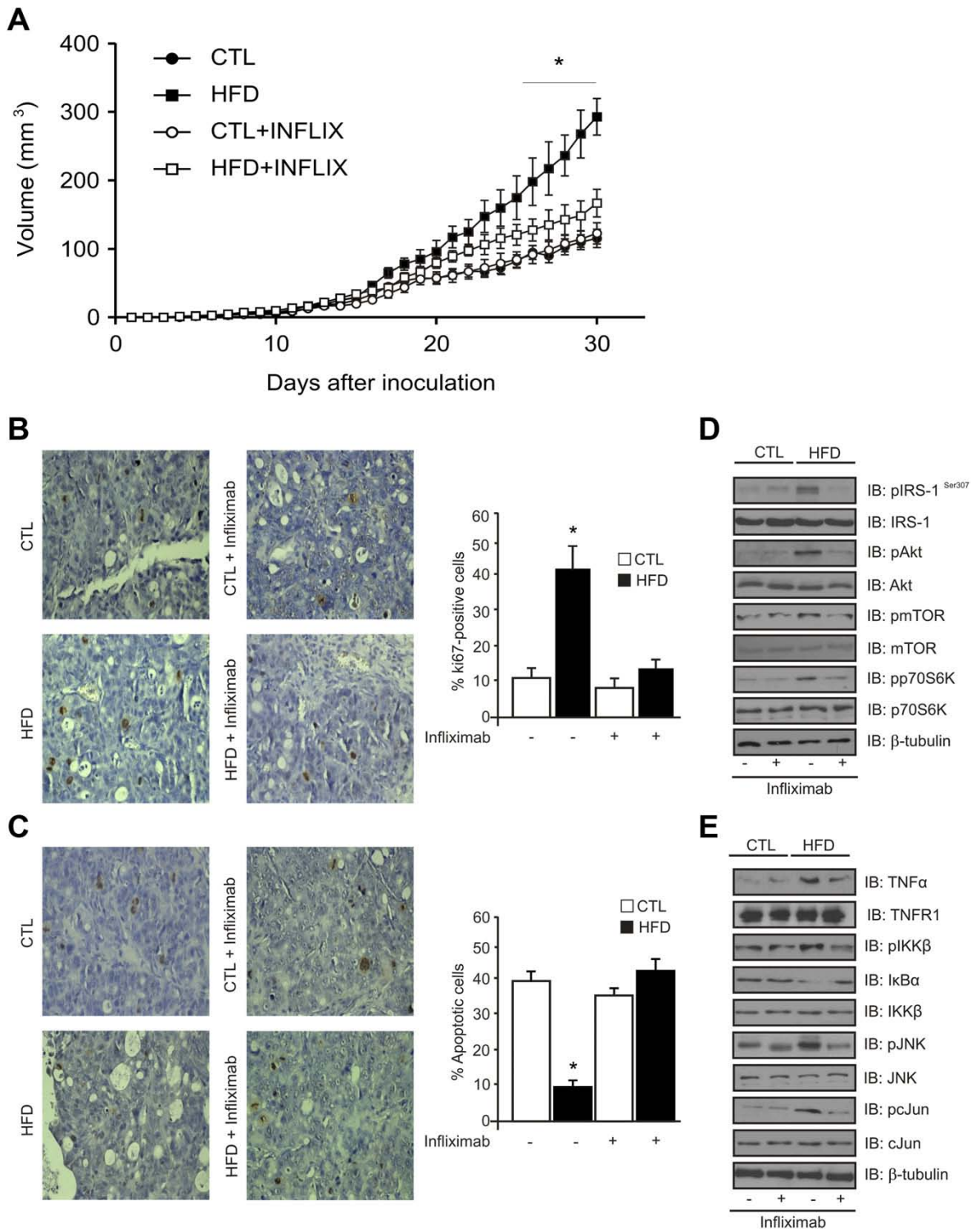
**Fig. 3**



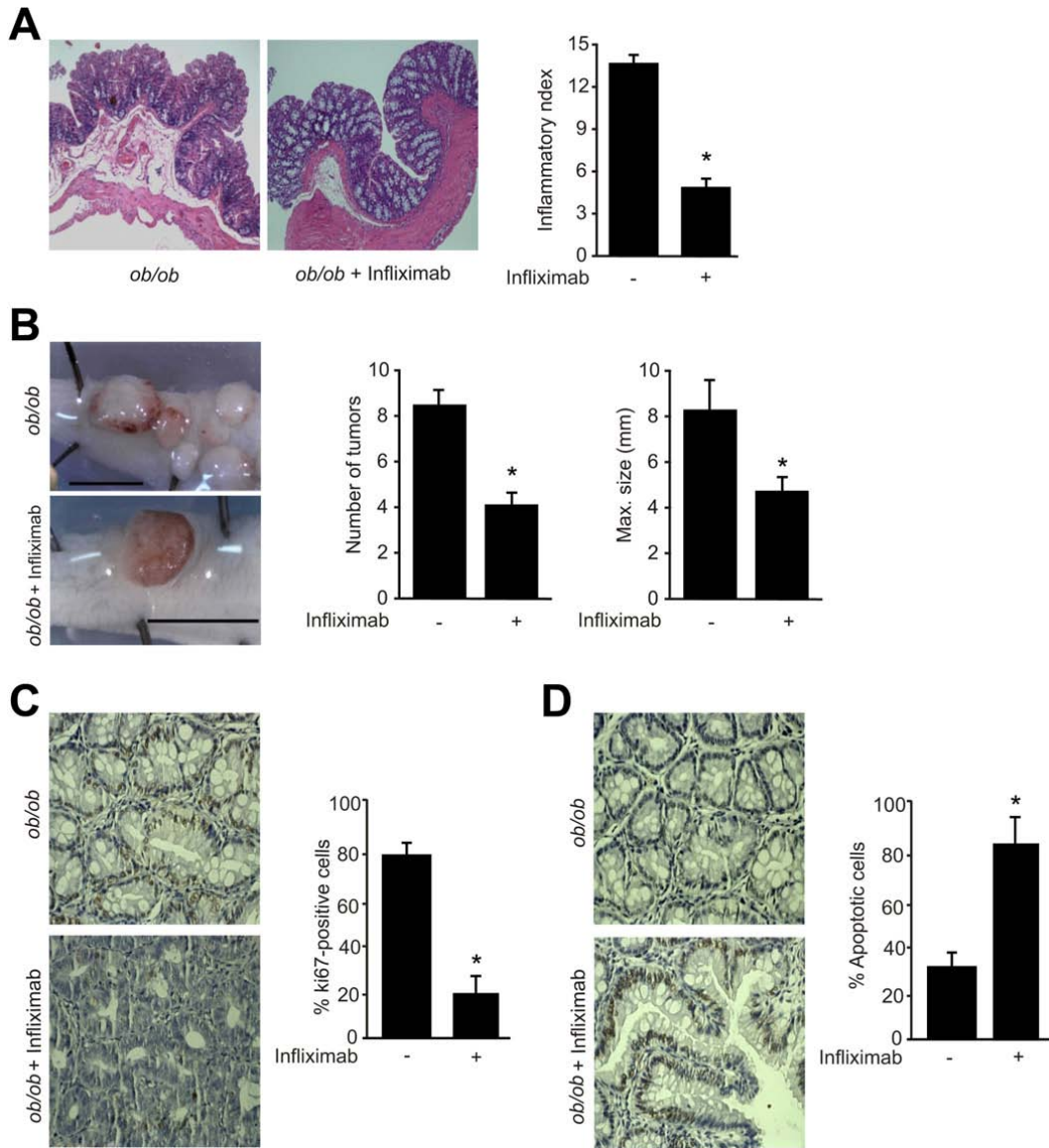
**Fig. 4**



**Fig. 5**

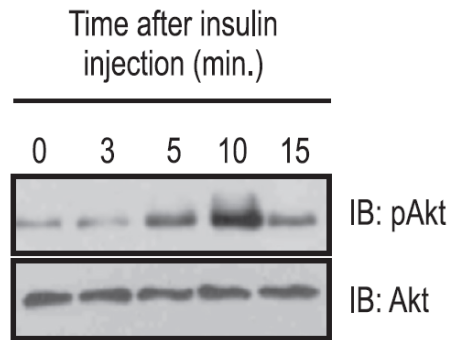


**Fig. 6**

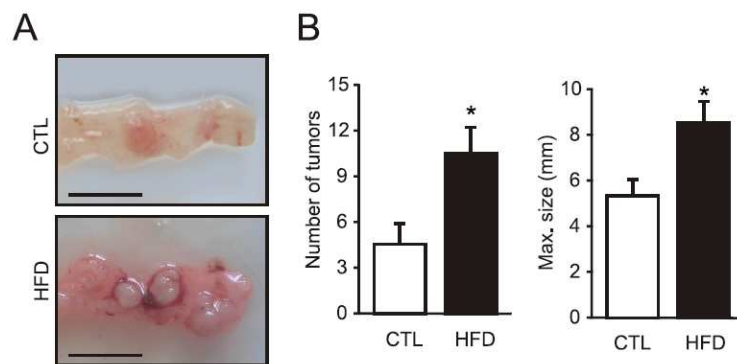


**Fig. 7**

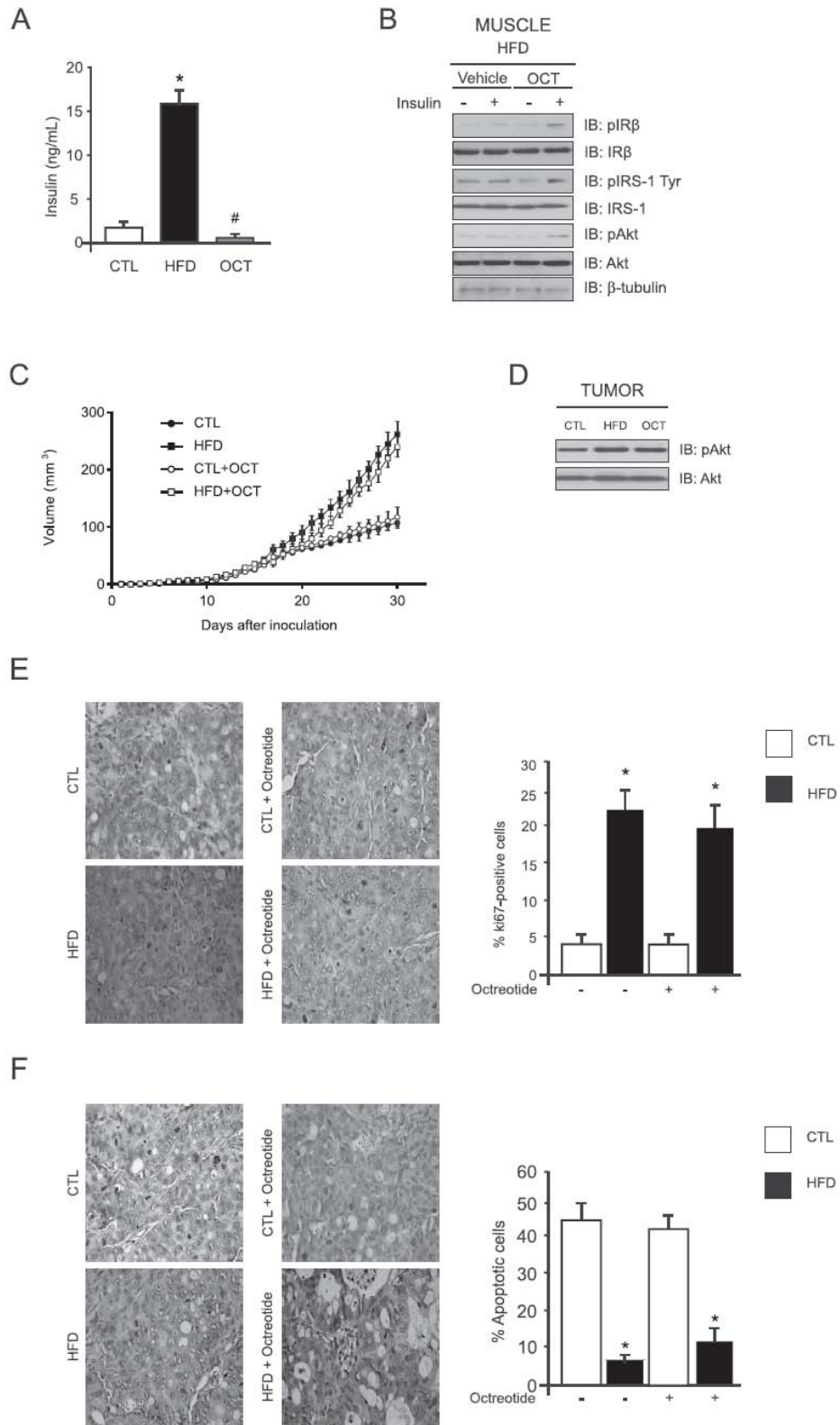




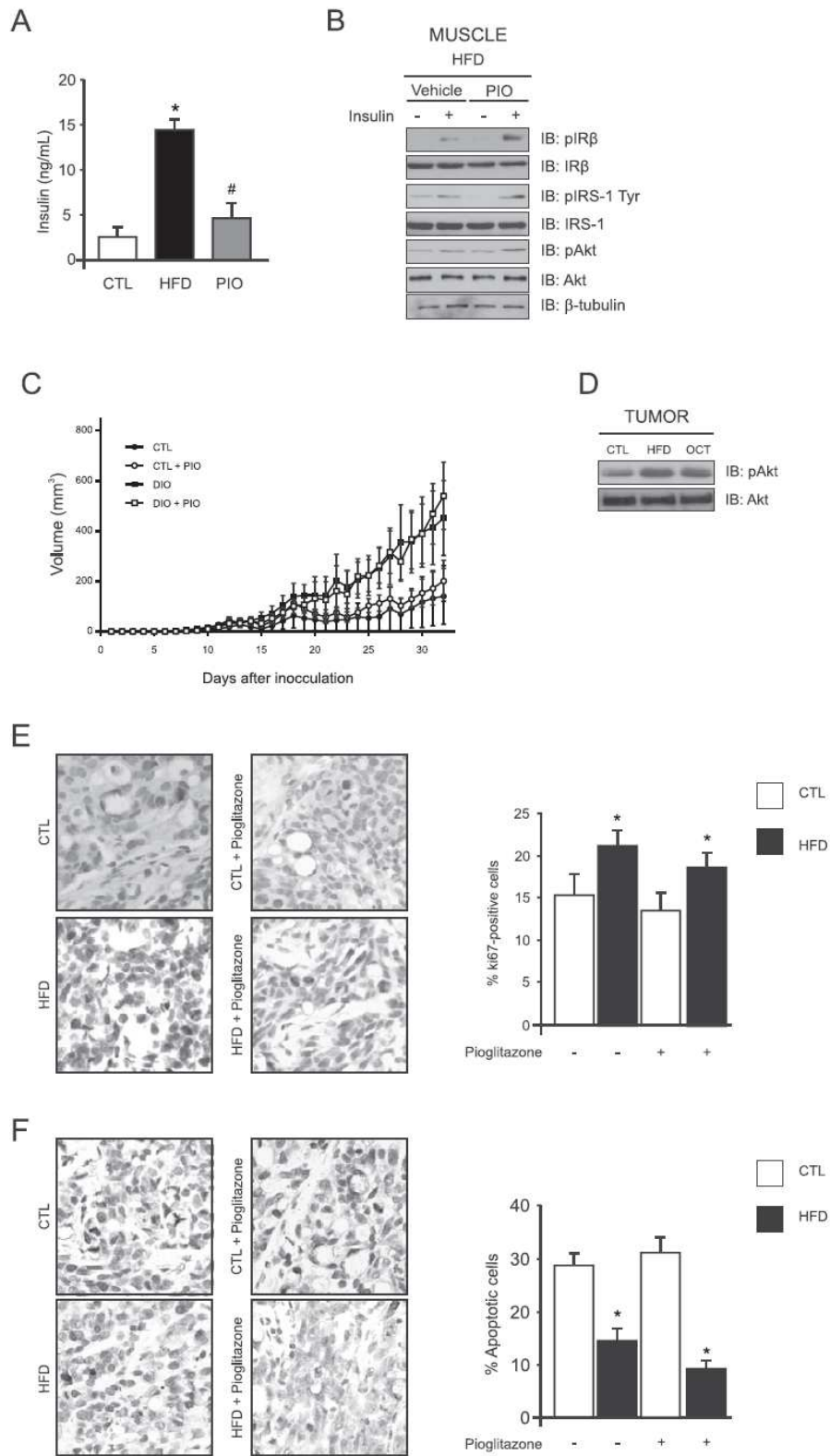
**Fig. Suplementar 1**



**Fig. Suplementar 2**



**Fig. Suplementar 3**



**Fig. Suplementar 4**





## **4- CONCLUSÃO GERAL**



Nossos dados mostraram que nos animais nos quais a obesidade foi induzida por dieta específica, assim como nos animais geneticamente obesos, os padrões de número e tamanho dos tumores colorretais foram concisamente maiores quando comparados aos tumores dos animais controle.

Também comprovamos que, nos animais imunossuprimidos e obesos, os padrões de crescimento das células de linhagem de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foram muito superiores quando comparados aos padrões de crescimento das células HT-29 nos animais imunossuprimidos e magros.

Nossos resultados também forneceram provas de que as vias de sinalização inflamatória e metabólica em tecidos colônicos preservados e em tecidos colônicos tumorais de animais obesos encontravam-se em padrões de ativação muito superiores quando comparadas às mesmas vias de sinalização em tecidos colônicos preservados e tumorais extraídos de animais magros.

Nossos dados também comprovaram a eficácia do anticorpo anti-TNF- $\alpha$  em conter o crescimento dos tumores nos animais com obesidade induzida por dieta específica e geneticamente obesos, assim como o mesmo anticorpo se mostrou muito eficaz na contenção do crescimento dos tumores HT-29 em animais imunossuprimidos e obesos.

De forma abrangente, nossos dados estabeleceram as funções do fator de necrose tumoral- $\alpha$  no câncer de cólon induzido pelo agente carcinogênico AOM em modelos experimentais de obesidade e colocaram essa molécula inflamatória como alvo para possíveis agentes farmacológicos bloqueadores dessa citocina.

A investigação de novas drogas menos tóxicas que o *infliximab* para bloqueio do TNF- $\alpha$  abriria caminho para mais um mecanismo de prevenção e tratamento do câncer de cólon em humanos obesos.







## **5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- 1- Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA*. 2010 Jan 20;303(3):235-41.
- 2- WHO (2008) Obesity and Overweight. WHO Fact Sheet No. 311. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
- 3- Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2009;9:88.
- 4- Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2004 Aug;4(8):579-91.
- 5- Harriss DJ, Atkinson G, Batterham A, George K, Cable NT, Reilly T, et al. Lifestyle factors and colorectal cancer risk (2): a systematic review and meta-analysis of associations with leisure-time physical activity. *Colorectal Dis*. 2009 Sep;11(7):689-701.
- 6- Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med*. 1995 Mar 1;122(5):327-34.
- 7- Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Hankin JH, Lyu LC. Associations of sedentary lifestyle, obesity, smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 1997 Nov 1;57(21):4787-94.
- 8- Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut*. 2006 Feb;55(2):285-91.
- 9- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2007) Food Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: AICR.
- 10- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research WCRF/AICR (2010) Systematic Literature Review Continuous Update Project Report. The Associations between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Colorectal Cancer.

- 11- van Kruijsdijk RC, van der Wall E, Visseren FL. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Oct;18(10):2569-78.
- 12- Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes.* 2006 Jun;55(6):1537-45.
- 13- Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res.* 2009 Jan 15;15(2):425-30.
- 14- Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):823-35.
- 15- Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res.* 2008 Sep;25(9):2097-116.
- 16- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol.* 2006 Nov 30;72(11):1605-21.
- 17- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005 Nov;46(11):2347-55.
- 18- Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. The c-Jun N-terminal kinase mediates the induction of oxidative stress and insulin resistance by palmitate and toll-like receptor 2 and 4 ligands in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res.* 2009 Jul;41(7):523-30.
- 19- Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008 Feb 16;371(9612):569-78.

- 20- IARC - International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Cancer-Preventive Strategies. Weight control and physical activity. Lyon, France: IARC Press; 2002.
- 21- WCRF - World Cancer Research Fund. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington: American Institute for Cancer Research; 2007.
- 22- Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ*. 2007 Dec 1;335(7630):1134.
- 23- Renehan AG, Roberts DL, Dive C. Obesity and cancer: pathophysiological and biological mechanisms. *Arch Physiol Biochem*. 2008 Feb;114(1):71-83.
- 24- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003 Apr 24;348(17):1625-38.
- 25- Yakar S, Nunez NP, Pennisi P, Brodt P, Sun H, Fallavollita L, et al. Increased tumor growth in mice with diet-induced obesity: impact of ovarian hormones. *Endocrinology*. 2006 Dec;147(12):5826-34.
- 26- Dirx MJ, Zeegers MP, Dagnelie PC, van den Bogaard T, van den Brandt PA. Energy restriction and the risk of spontaneous mammary tumors in mice: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2003 Sep 20;106(5):766-70.
- 27- World Health Organization official website.
- 28- National Cancer Institute official website.
- 29- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005 Jan-Feb;55(1):10-30.
- 30- Rim SH, Seeff L, Ahmed F, King JB, Coughlin SS. Colorectal cancer incidence in the United States, 1999-2004: an updated analysis of data from the National Program of Cancer Registries and the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*. 2009 May 1;115(9):1967-76.

- 31- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
- 32- Campbell PT, Jacobs ET, Ulrich CM, Figueiredo JC, Poynter JN, McLaughlin JR, et al. Case-control study of overweight, obesity, and colorectal cancer risk, overall and by tumor microsatellite instability status. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Mar 17;102(6):391-400.
- 33- Kang HW, Kim D, Kim HJ, Kim CH, Kim YS, Park MJ, et al. Visceral obesity and insulin resistance as risk factors for colorectal adenoma: a cross-sectional, case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2010 Jan;105(1):178-87.
- 34- Vrieling A, Kampman E. The role of body mass index, physical activity, and diet in colorectal cancer recurrence and survival: a review of the literature. *Am J Clin Nutr.* 2010 Sep;92(3):471-90.
- 35- Lanas A, Ferrandez A. NSAIDs and the colon. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009 Jan;25(1):44-9.
- 36- Yang CS, Lambert JD, Ju J, Lu G, Sang S. Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 Nov 1;224(3):265-73.
- 37- Holt PR. New insights into calcium, dairy and colon cancer. *World J Gastroenterol.* 2008 Jul 28;14(28):4429-33.
- 38- Franco A, Sikalidis AK, Solis Herruzo JA. Colorectal cancer: influence of diet and lifestyle factors. *Rev Esp Enferm Dig.* 2005 Jun;97(6):432-48.
- 39- Dietz AT, Newcomb PA, Marcus PM, Storer BE. The association of body size and large bowel cancer risk in Wisconsin (United States) women. *Cancer Causes Control.* 1995 Jan;6(1):30-6.
- 40- Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF Jr, Jarvholm B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med.* 2000 Nov 2;343(18):1305-11.

- 41- Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Friedenreich C, Norat T, Tjonneland A, et al. Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst.* 2006 Jul 5;98(13):920-31.
- 42- Jenab M, Riboli E, Cleveland RJ, Norat T, Rinaldi S, Nieters A, et al. Serum C-peptide, IGFBP-1 and IGFBP-2 and risk of colon and rectal cancers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer.* 2007 Jul 15;121(2):368-76.
- 43- Sandhu MS, Dunger DB, Giovannucci EL. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jul 3;94(13):972-80.
- 44- Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet.* 2004 Apr 24;363(9418):1346-53.
- 45- Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, et al. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Apr 7;91(7):620-5.
- 46- Wolpin BM, Meyerhardt JA, Chan AT, Ng K, Chan JA, Wu K, et al. Insulin, the insulin-like growth factor axis, and mortality in patients with nonmetastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 10;27(2):176-85.
- 47- Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science.* 1991 Nov 22;254(5035):1146-
- 48- Kaaks R, Lukanova A. Energy balance and cancer: the role of insulin and insulin-like growth factor-I. *Proc Nutr Soc.* 2001 Feb;60(1):91-106.
- 49- Stattin P, Lukanova A, Biessy C, Soderberg S, Palmqvist R, Kaaks R, et al. Obesity and colon cancer: does leptin provide a link? *Int J Cancer.* 2004 Mar;109(1):149-52.

- 50- Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, et al. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett.* 2001 Jul 6;500(3):119-24.
- 51- Bjorntorp P. Obesity. *Lancet.* 1997 Aug 9;350(9075):423-6.
- 52- Giovannucci E, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Physical activity, obesity, and risk of colorectal adenoma in women (United States). *Cancer Causes Control.* 1996 Mar;7(2):253-63.
- 53- Stattin P, Palmqvist R, Soderberg S, Biessy C, Ardnor B, Hallmans G, et al. Plasma leptin and colorectal cancer risk: a prospective study in Northern Sweden. *Oncol Rep.* 2003 Nov-Dec;10(6):2015-21.
- 54- Wei EK, Giovannucci E, Fuchs CS, Willett WC, Mantzoros CS. Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Nov 16;97(22):1688-94.
- 55- Lukanova A, Soderberg S, Kaaks R, Jellum E, Stattin P. Serum adiponectin is not associated with risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Feb;15(2):401-2.
- 56- Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Manson JE, et al. Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA.* 1997 Nov 5;278(17):1407-11.
- 57- Travis RC, Key TJ. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 2003;5(5):239-47.
- 58- Schairer C, Hill D, Sturgeon SR, Fears T, Pollak M, Mies C, et al. Serum concentrations of IGF-I, IGFBP-3 and c-peptide and risk of hyperplasia and cancer of the breast in postmenopausal women. *Int J Cancer.* 2004 Feb 20;108(5):773-9.
- 59- Toniolo P, Bruning PF, Akhmedkhanov A, Bonfrer JM, Koenig KL, Lukanova A, et al. Serum insulin-like growth factor-I and breast cancer. *Int J Cancer.* 2000 Dec 1;88(5):828-32.



- 60- Yang G, Lu G, Jin F, Dai Q, Best R, Shu XO, et al. Population-based, case-control study of blood C-peptide level and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Nov;10(11):1207-11.
- 61- Hirose K, Toyama T, Iwata H, Takezaki T, Hamajima N, Tajima K. Insulin, insulin-like growth factor-I and breast cancer risk in Japanese women. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2003 Jul-Sep;4(3):239-46.
- 62- Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, et al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet.* 1998 May 9;351(9113):1393-6.
- 63- Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau ME, Koo J, Hartwick W, et al. Insulin-like growth factor binding proteins 1 and 3 and breast cancer outcomes. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Jul;74(1):65-76.
- 64- Vona-Davis L, Rose DP. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer.* 2007 Jun;14(2):189-206.
- 65- Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, Taguchi T, Tamaki Y, Matsuzawa Y, et al. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2003 Nov 15;9(15):5699-704.
- 66- Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, Chavelas C, Dalamaga M, Alexe DM, et al. Adiponectin and breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Mar;89(3):1102-7.
- 67- Kaaks R, Lukanova A, Kurzer MS. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Dec;11(12):1531-43.
- 68- Lukanova A, Lundin E, Micheli A, Arslan A, Ferrari P, Rinaldi S, et al. Circulating levels of sex steroid hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women. *Int J Cancer.* 2004 Jan 20;108(3):425-32.

- 69- Lukanova A, Zeleniuch-Jacquotte A, Lundin E, Micheli A, Arslan AA, Rinaldi S, et al. Prediagnostic levels of C-peptide, IGF-I, IGFBP -1, -2 and -3 and risk of endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2004 Jan 10;108(2):262-8.
- 70- Nicodemus KK, Sweeney C, Folsom AR. Evaluation of dietary, medical and lifestyle risk factors for incident kidney cancer in postmenopausal women. *Int J Cancer*. 2004 Jan 1;108(1):115-21.
- 71- Bergstrom A, Hsieh CC, Lindblad P, Lu CM, Cook NR, Wolk A. Obesity and renal cell cancer--a quantitative review. *Br J Cancer*. 2001 Sep 28;85(7):984-90.
- 72- Lindblad P, Chow WH, Chan J, Bergstrom A, Wolk A, Gridley G, et al. The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia*. 1999 Jan;42(1):107-12.
- 73- Spyridopoulos TN, Petridou ET, Skalkidou A, Dessypris N, Chrousos GP, Mantzoros CS. Low adiponectin levels are associated with renal cell carcinoma: a case-control study. *Int J Cancer*. 2007 Apr 1;120(7):1573-8.
- 74- Giovannucci E, Michaud D. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2208-25.
- 75- Samanic C, Gridley G, Chow WH, Lubin J, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. Obesity and cancer risk among white and black United States veterans. *Cancer Causes Control*. 2004 Feb;15(1):35-43.
- 76- Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Body mass index and pancreatic cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer*. 2007 May 1;120(9):1993-8.
- 77- Luo J, Margolis KL, Adami HO, LaCroix A, Ye W. Obesity and risk of pancreatic cancer among postmenopausal women: the Women's Health Initiative (United States). *Br J Cancer*. 2008 Aug 5;99(3):527-31.

- 78- Gapstur SM, Gann PH, Lowe W, Liu K, Colangelo L, Dyer A. Abnormal glucose metabolism and pancreatic cancer mortality. *JAMA*. 2000 May 17;283(19):2552-8.
- 79- Wolpin BM, Michaud DS, Giovannucci EL, Schernhammer ES, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Circulating insulin-like growth factor axis and the risk of pancreatic cancer in four prospective cohorts. *Br J Cancer*. 2007 Jul 2; 97(1):98-104.
- 80- Pera M, Manterola C, Vidal O, Grande L. Epidemiology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol*. 2005 Dec 1;92(3):151-9.
- 81- Kubo A, Corley DA. Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 May;15(5):872-8.
- 82- Abnet CC, Freedman ND, Hollenbeck AR, Fraumeni JF Jr, Leitzmann M, Schatzkin A. A prospective study of BMI and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 2008 Feb;44(3):465-71.
- 83- Corley DA, Kubo A, Zhao W. Abdominal obesity and the risk of esophageal and gastric cardia carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Feb;17(2):352-8.
- 84- Hampel H, Abraham NS, El-Serag HB. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med*. 2005 Aug 2;143(3):199-211.
- 85- MacInnis RJ, English DR. Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Cancer Causes Control*. 2006 Oct;17(8):989-1003.
- 86- Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):563-6.

- 87- Larsson SC, Wolk A. Obesity and the risk of gallbladder cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2007 May 7;96(9):1457-61.
- 88- Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AM. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S97-103.
- 89- Pan SY, Johnson KC, Ugnat AM, Wen SW, Mao Y. Association of obesity and cancer risk in Canada. *Am J Epidemiol*. 2004 Feb 1;159(3):259-68.
- 90- Olsen CM, Green AC, Whiteman DC, Sadeghi S, Kolaheer F, Webb PM. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2007 Mar;43(4):690-709.
- 91- Olsen CM, Nagle CM, Whiteman DC, Purdie DM, Green AC, Webb PM. Body size and risk of epithelial ovarian and related cancers: a population-based case-control study. *Int J Cancer*. 2008 Jul 15;123(2):450-6.
- 92- Engeland A, Tretli S, Hansen S, Bjorge T. Height and body mass index and risk of lymphohematopoietic malignancies in two million Norwegian men and women. *Am J Epidemiol*. 2007 Jan 1;165(1):44-52.
- 93- Larsson SC, Wolk A. Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007 Dec 1;121(11):2512-6.
- 94- McKeown-Eyssen G. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994 Dec;3(8):687-95.
- 95- Giovannucci E. Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control*. 1995 Mar;6(2):164-79.
- 96- Giovannucci E. Nutrition, insulin, insulin-like growth factors and cancer. *Horm Metab Res*. 2003 Nov-Dec;35(11-12):694-704.
- 97- Allen NE, Appleby PN, Kaaks R, Rinaldi S, Davey GK, Key TJ. Lifestyle determinants of serum insulin-like growth-factor-I (IGF-I), C-peptide and hormone binding protein levels in British women. *Cancer Causes Control*. 2003 Feb;14(1):65-74.

- 98- Holmes MD, Pollak MN, Hankinson SE. Lifestyle correlates of plasma insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 concentrations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Sep;11(9):862-7.
- 99- Myal Y, Shiu RP, Bhaumick B, Bala M. Receptor binding and growth-promoting activity of insulin-like growth factors in human breast cancer cells (T-47D) in culture. *Cancer Res.* 1984 Dec;44(12 Pt 1):5486-90.
- 100- Wu Y, Cui K, Miyoshi K, Hennighausen L, Green JE, Setser J, et al. Reduced circulating insulin-like growth factor I levels delay the onset of chemically and genetically induced mammary tumors. *Cancer Res.* 2003 Aug 1; 63(15):4384-8.
- 101- Pollak M, Blouin MJ, Zhang JC, Kopchick JJ. Reduced mammary gland carcinogenesis in transgenic mice expressing a growth hormone antagonist. *Br J Cancer.* 2001 Aug 3;85(3):428-30.
- 102- Creighton CJ, Casa A, Lazard Z, Huang S, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, et al. Insulin-like growth factor-I activates gene transcription programs strongly associated with poor breast cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2008 Sep 1;26(25):4078-85.
- 103- Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer.* 2009 Aug;9(8):550-62.
- 104- Schubert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr;7(4):295-308.
- 105- Moore T, Beltran L, Carbajal S, Strom S, Traag J, Hursting SD, et al. Dietary energy balance modulates signaling through the Akt/mammalian target of rapamycin pathways in multiple epithelial tissues. *Cancer Prev Res (Phila).* 2008 Jun;1(1):65-76.
- 106- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002 May 31;296(5573):1655-7.

- 107- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):648-57.
- 108- Garami A, Zwartkuis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Stocker H, et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell.* 2003 Jun;11(6):1457-66.
- 109- Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004 Aug 15;18(16):1926-45.
- 110- McManus EJ, Alessi DR. TSC1-TSC2: a complex tale of PKB-mediated S6K regulation. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):E214-6.
- 111- Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 14;101(37):13489-94.
- 112- Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 2003 Nov 26;115(5):577-90.
- 113- Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci.* 2005 Jan;30(1):35-42.
- 114- Fantl WJ, Muslin AJ, Kikuchi A, Martin JA, MacNicol AM, Gross RW, et al. Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature.* 1994 Oct 13;371(6498):612-4.
- 115- Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, et al. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature.* 1992 Jul 30;358(6385):417-21.
- 116- Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 2006 Mar;24(1):21-44.
- 117- Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci.* 2006 May;31(5):268-75.

- 118- Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam A, Dorgan JF, Longcope C, et al. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Aug 20;95(16):1218-26.
- 119- Pugeat M, Crave JC, Elmidani M, Nicolas MH, Garoscio-Cholet M, Lejeune H, et al. Pathophysiology of sex hormone binding globulin (SHBG): relation to insulin. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991;40(4-6):841-9.
- 120- McTiernan A, Rajan KB, Tworoger SS, Irwin M, Bernstein L, Baumgartner R, et al. Adiposity and sex hormones in postmenopausal breast cancer survivors. *J Clin Oncol.* 2003 May 15;21(10):1961-6.
- 121- Fortunati N, Fissore F, Fazzari A, Piovano F, Catalano MG, Becchis M, et al. Estradiol induction of cAMP in breast cancer cells is mediated by foetal calf serum (FCS) and sex hormone-binding globulin (SHBG). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999 Jul-Aug;70(1-3):73-80.
- 122- Fortunati N, Fissore F, Fazzari A, Becchis M, Comba A, Catalano MG, et al. Sex steroid binding protein exerts a negative control on estradiol action in MCF-7 cells (human breast cancer) through cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase A. *Endocrinology.* 1996 Feb;137(2):686-92.
- 123- Catalano MG, Frairia R, Boccuzzi G, Fortunati N. Sex hormone-binding globulin antagonizes the anti-apoptotic effect of estradiol in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Jan 31;230(1-2):31-7.
- 124- Lee AV, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado-Heinsohn E, Osborne CK, et al. Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol.* 1999 May;13(5):787-96.
- 125- Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 1997 Dec; 18(6):774-800.

- 126- Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocr Rev.* 1995 Jun;16(3):322-53.
- 127- Druckmann R, Rohr UD. IGF-1 in gynaecology and obstetrics: update 2002. *Maturitas.* 2002 Apr 15;41 Suppl 1:S65-83.
- 128- Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 1; 10(1 Pt 2):331S-6S.
- 129- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
- 130- Cohen P, Zhao C, Cai X, Montez JM, Rohani SC, Feinstein P, et al. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(8):1113-21.
- 131- Snoussi K, Strosberg AD, Bouaouina N, Ben Ahmed S, Helal AN, Chouchane L. Leptin and leptin receptor polymorphisms are associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *BMC Cancer.* 2006;6:38.
- 132- Howard JM, Pidgeon GP, Reynolds JV. Leptin and gastro-intestinal malignancies. *Obes Rev.* 2010 Dec;11(12):863-74.
- 133- Jarde T, Perrier S, Vasson MP, Caldefie-Chezet F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *Eur J Cancer.* 2011 Jan;47(1):33-43.
- 134- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1995 Nov;1(11):1155-61.



- 135- Ligiou P, Signorello LB, Trichopoulos D, Tzonou A, Trichopoulou A, Mantzoros CS. Leptin in relation to prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Cancer*. 1998 Mar 30;76(1):25-8.
- 136- Stattin P, Soderberg S, Hallmans G, Bylund A, Kaaks R, Stenman UH, et al. Leptin is associated with increased prostate cancer risk: a nested case-referent study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Mar;86(3):1341-5.
- 137- Mantzoros CS, Bolhke K, Moschos S, Cramer DW. Leptin in relation to carcinoma in situ of the breast: a study of pre-menopausal cases and controls. *Int J Cancer*. 1999 Feb 9;80(4):523-6.
- 138- Tamakoshi K, Toyoshima H, Wakai K, Kojima M, Suzuki K, Watanabe Y, et al. Leptin is associated with an increased female colorectal cancer risk: a nested case-control study in Japan. *Oncology*. 2005;68(4-6):454-61.
- 139- Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MGJr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem*. 2000 May 12;275(19):14563-72.
- 140- Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology*. 2001 Jul;121(1):79-90.
- 141- Dieudonne MN, Machinal-Quelin F, Serazin-Leroy V, Leneveu MC, Pecquery R, Giudicelli Y. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Apr 26;293(1):622-8.
- 142- Onuma M, Bub JD, Rummel TL, Iwamoto Y. Prostate cancer cell-adipocyte interaction: leptin mediates androgen-independent prostate cancer cell proliferation through c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem*. 2003 Oct 24;278(43):42660-7.
- 143- Choi JH, Park SH, Leung PC, Choi KC. Expression of leptin receptors and potential effects of leptin on the cell growth and activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jan;90(1):207-10.

- 144- Amemori S, Ootani A, Aoki S, Fujise T, Shimoda R, Kakimoto T, et al. Adipocytes and preadipocytes promote the proliferation of colon cancer cells in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Mar;292(3):G923-9.
- 145- Catalano S, Mauro L, Marsico S, Giordano C, Rizza P, Rago V, et al. Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells. *J Biol Chem*. 2004 May 7;279(19):19908-15.
- 146- Teraoka N, Mutoh M, Takasu S, Ueno T, Nakano K, Takahashi M, et al. High susceptibility to azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis in obese KK-Ay mice. *Int J Cancer*. 2011 Aug 1;129(3):528-35.
- 147- Aparicio T, Guilmeau S, Goiot H, Tsocas A, Laigneau JP, Bado A, et al. Leptin reduces the development of the initial precancerous lesions induced by azoxymethane in the rat colonic mucosa. *Gastroenterology*. 2004 Feb;126(2):499-510.
- 148- Park J, Kusminski CM, Chua SC, Scherer PE. Leptin receptor signaling supports cancer cell metabolism through suppression of mitochondrial respiration in vivo. *Am J Pathol*. 2010 Dec;177(6):3133-44.
- 149- Moreno-Aliaga MJ, Lorente-Cebrian S, Martinez JA. Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids. *Proc Nutr Soc*. 2010 Aug;69(3):324-32.
- 150- Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005 May;26(3):439-51.
- 151- Schaffler A, Scholmerich J, Buechler C. Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007 Apr;3(4):345-54.
- 152- Kang JH, Lee YY, Yu BY, Yang BS, Cho KH, Yoon DK, et al. Adiponectin induces growth arrest and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cell. *Arch Pharm Res*. 2005 Nov;28(11):1263-9.

- 153- Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhiotovskiy B, et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 24;101(8):2476-81.
- 154- Luo Z, Zang M, Guo W. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncol*. 2010 Mar;6(3):457-70.
- 155- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):772-83.
- 156- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87-91.
- 157- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995 May;95(5):2409-15.
- 158- Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Mar;83(3):847-50.
- 159- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1796-808.
- 160- Ruan H, Zarnowski MJ, Cushman SW, Lodish HF. Standard isolation of primary adipose cells from mouse epididymal fat pads induces inflammatory mediators and down-regulates adipocyte genes. *J Biol Chem*. 2003 Nov 28;278(48):47585-93.
- 161- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):883-99.

- 162- Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2002; 5 Suppl 1:5-11.
- 163- Ekblom A. Risk of cancer in ulcerative colitis. *J Gastrointest Surg*. 1998 Jul-Aug;2(4):312-3.
- 164- Dhala A, Pinsker K, Prezant DJ. Respiratory health consequences of environmental tobacco smoke. *Med Clin North Am*. 2004 Nov;88(6):1535-52, xi.
- 165- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Sep;72(9):3666-70.
- 166- Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*. 1987 Oct 15-21;329(6140):630-2.
- 167- Orosz P, Echtenacher B, Falk W, Ruschoff J, Weber D, Mannel DN. Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1993 May 1;177(5):1391-8.
- 168- Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):560-70.
- 169- Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med*. 1999 Jul;5(7):828-31.
- 170- Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, et al. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J Exp Med*. 2000 Dec 18;192(12):1809-18.
- 171- Jain SS, Bird RP. Elevated expression of tumor necrosis factor-alpha signaling molecules in colonic tumors of Zucker obese (fa/fa) rats. *Int J Cancer*. 2010 Nov 1;127(9):2042-50.

- 172- Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 May;280(5):E745-51.
- 173- Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell.* 2010 Jan 22;140(2):197-208.
- 174- Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science.* 2007 Jul 6;317(5834):121-4.
- 175- Bredel M, Scholtens DM, Yadav AK, Alvarez AA, Renfrow JJ, Chandler JP, et al. NFKBIA deletion in glioblastomas. *N Engl J Med.* 2011 Feb 17;364(7):627-37.
- 176- Calado DP, Zhang B, Srinivasan L, Sasaki Y, Seagal J, Unitt C, et al. Constitutive canonical NF-kappaB activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2010 Dec 14;18(6):580-9.
- 177- Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 1999 Jan;5(1):119-27.
- 178- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 2004 Sep 23;431(7007):461-6.
- 179- Wunderlich FT, Luedde T, Singer S, Schmidt-Supprian M, Baumgartl J, Schirmacher P, et al. Hepatic NF-kappa B essential modulator deficiency prevents obesity-induced insulin resistance but synergizes with high-fat feeding in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jan 29;105(4):1297-302.

- 180- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Dec;82(12):4196-200.
- 181- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Dvigan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 1999 Aug 6;98(3):295-303.
- 182- Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet.* 1996 Sep;14(1):95-7.
- 183- Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007 Aug;56(8):1986-98.
- 184- Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA. Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2003 Mar 7;278(10):8199-211.
- 185- Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem.* 2002 Jan 11;277(2):1531-7.
- 186- Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2008 Jul;118(7):2516-25.
- 187- Westbrook AM, Wei B, Braun J, Schiestl RH. Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice. *Cancer Res.* 2009 Jun 1;69(11):4827-34.
- 188- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 2009 Jul;30(7):1073-81.

- 189- Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1079-99.
- 190- Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*. 2007 Oct 15;21(20):2525-38.
- 191- Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 21;14(3):378-89.
- 192- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006 Nov;6(11):836-48.
- 193- Dalglish AG, O'Byrne K. Inflammation and cancer: the role of the immune response and angiogenesis. *Cancer Treat Res*. 2006;130:1-38.
- 194- Poullis A, Foster R, Shetty A, Fagerhol MK, Mendall MA. Bowel inflammation as measured by fecal calprotectin: a link between lifestyle factors and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Feb;13(2):279-84.
- 195- Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003 Mar 6;348(10):883-90.
- 196- Prasad S, Ravindran J, Aggarwal BB. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem*. 2010 Mar;336(1-2):25-37.
- 197- Pendyala S, Neff LM, Suarez-Farinas M, Holt PR. Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2011 Feb;93(2):234-42.
- 198- Fenton JI, Hursting SD, Perkins SN, Hord NG. Interleukin-6 production induced by leptin treatment promotes cell proliferation in an Apc (Min/+) colon epithelial cell line. *Carcinogenesis*. 2006 Jul;27(7):1507-15.

199- Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med*. 2008 Mar;14(3):109-19.

200- Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, Nagano K, Oshima S, Nemoto Y, et al. Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Apr;296(4):G850-9.