



• U • C •

FCTUC

FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sofia Margarida Monteiro Fernandes

Impacto dos polimorfismos de citocinas no desenvolvimento do Adenocarcinoma Colo-Retal

Dissertação de Mestrado em Antropologia Médica

2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Antropologia Médica realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Manuela Alvarez (Universidade de Coimbra) e da Professora Sandra Balseiro (Instituto Politécnico de Lisboa)

Sofia Margarida Monteiro Fernandes

Impacto dos polimorfismos de citocinas no desenvolvimento do Adenocarcinoma Colo-Retal

Dissertação de Mestrado em Antropologia Médica

2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado foi possível graças ao apoio de várias pessoas imprescindíveis, as quais gostaria de deixar o meu agradecimento.

Gostaria de começar por agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Manuela Alvarez, por todo o incentivo, interesse e disponibilidade demonstrados desde o primeiro momento.

À minha coorientadora, Professora Sandra Balseiro, pela colaboração, amizade, paciência, partilha de conhecimento científico ao longo de todo o processo de realização da dissertação

À Diretora do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pela oportunidade de realizar a minha tese de mestrado neste serviço.

Agradeço também às minhas colegas de trabalho Raquel Pandeirada e Patrícia Jegundo pela cooperação dentro e fora do laboratório e pela amizade e bom ambiente proporcionado.

À equipa do serviço do IAP-FMUC, nomeadamente, à Maria Silva, à Maria João e à Natália pela aceitação e disponibilidade imediata demonstrada e pelo bom ambiente proporcionado.

Ao meu namorado, Jorge, pelo apoio incondicional que sempre demonstrou nos momentos em que foi necessário tomar algumas decisões, e por todo o carinho, companheirismo, compreensão e auxílio demonstrados em momentos de maior inquietação.

A todos os meus amigos que me apoiaram e me mantiveram motiva ao longo de todo o ano. Um particular agradecimento a minha grande amiga de infância, Sara, que sempre me acompanhou ao longo da vida e a quem recorro sempre que as incertezas e ansiedades aumentam.

Acima de tudo, aos meus pais, que são a minha família, o meu aconchego e o meu refúgio. Que me conhecem melhor que eu própria e que me apoiam em todas as decisões que tome, mesmo que isso implique a minha ausência. O meu mais profundo e sincero obrigado.

RESUMO

O carcinoma colo-retal (CCR) constitui atualmente uma das principais doenças responsáveis por elevadas taxas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. Embora se trate de uma doença multifatorial, inúmeros estudos têm sugerido uma forte associação entre períodos prolongados de inflamação e o aumento do risco de CCR. Sendo as citocinas o principal agente mediador de respostas imunes no organismo humano, estas podem constituir biomarcadores fundamentais na prevenção, controlo e tratamento desta doença.

Nesta perspetiva, este estudo pretendeu averiguar o impacto dos variantes genéticos das citocinas envolvidos no mecanismo de inflamação, IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ e TGF- β , no risco de CCR. Para tal, os polimorfismos IL-1 α -889 T>C, IL-1 β -511 C>T & +3960 C>T, IL-1R Pst1970 C>T, IL-1Ra 11100 T>C, IL-2 -330 T>G & +160 G>T, IL-6 -174 C>G & nt565 G>A, IL-12 +1188 G>C, TNF- α -238 G>A & -308 G>A, IFN- γ +874 T>A, TGF- β cod10 T>C & cod25 G>C foram analisadas por PCR-SSP em 56 biópsias de indivíduos portadores de adenocarcinoma colo-retal esporádico (ACRE) e em 100 amostras provenientes de indivíduos saudáveis. Neste trabalho, os genótipos associados à alta produção/atividade da IL-1 α : *IL1A*-889 TC (53 vs 20, p=0,00003); *IL1R*-1970TT (7% vs 43%, p<0,0001); *IL1RA* 11100TT (6% vs 29%, p=0,0002) surgiram associados à prevalência de ACRE. Também os genótipos associados à alta expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL2: *TNFA*-238AA (6% vs 18%, p=0,02); *IL2*+160GG (61% vs 32%, p=0,0005) apareceram associados à prevalência desta patologia. Finalmente, os haplótipos de alta produção/atividade das citocinas Th3, IL-6 e TGF- β : *IL6*-174/nt565 GG (46% vs 23%, p<0,0001) *TGFB* cod10/cod25 TG (50% vs 34%, p=0,005) encontraram-se associados à diminuição de risco para ACRE.

Estes resultados sugerem a existência de uma associação entre a maioria dos variantes polimorfismos das citocinas e o risco para o ACRE. Deste modo, as mutações dos genes *IL1A*, *IL1R*, *IL1RA*, *TNFA* e *IL2* associadas ao aumento de expressão/atividade das citocinas pró-inflamatória IL-1 α , TNF- α e IL2, parecem aumentar os níveis de inflamação de longo prazo na mucosa cólica e retal e conseqüentemente despoletar o desenvolvimento tumoral. Contrariamente, os variantes de alta expressão/atividade da IL-6 e TGF- β parecem associar-se à diminuição dos processos inflamatórios/tumorais do colon e reto. Estes resultados parecem suportar a hipótese de que o CCR esta relacionado com o aumento das atividades pró-inflamatórias (Th1) e que a genotipagem destas citocinas tem potencial para ser uma ferramenta útil no estabelecimento do diagnóstico clínico do ACRE.

Palavras-chave: adenocarcinoma colo-retal esporádico (ACRE); Citocinas; Inflamação; estabelecimento do diagnóstico clínico do ACRE.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is currently one of the main diseases responsible for high rates of mortality and morbidity worldwide. Although it is a multifactorial disease, numerous studies have suggested a strong association between prolonged stages of inflammation and the increase of CRC risk. Cytokines could constitute key biomarkers in prevention, control and treatment of this disease, once they are the major immune mediator agents of immune responses in the human body. In this perspective, this study sought to investigate the impact of genes involved in inflammation, IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ e TGF- β , and CRC risk. For such polymorphisms IL-1 α -889 T>C, IL-1 β -511 C>T & +3954 C>T, IL-1R Pst1970 C>T, IL-1Ra 11100 T>C, IL-2 -330 T>G & +160 G>T, IL-6 -174 C>G & nt565 G>A, IL-12 +1188 G>C, TNF- α -238 G>A & -308 G>A, IFN- γ +874 T>A, TGF- β cod10 T>C & cod25 G>C were analyzed by PCR-SSP for 56 biopsy with sporadic colorectal adenocarcinoma (SCA) and 100 healthy patients.

High production/activity genotypes IL-1 α : IL1A-889 TC (53 vs 20, p=0,00003); IL1R -1970TT (7% vs 43%, p<0,0001); IL1RA 11100TT (6% vs 29%, p=0,0002) were associated with SCA prevalence. Also, high expression genotypes of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL2: TNFA -238AA (6% vs 18%, p=0,02); IL2 +160GG (61% vs 32%, p=0,0005) were associated with this pathology. Finally, high production haplotypes in Th3 cytokines, IL-6 e TGF-b: IL6 -174/nt565 GG (46% vs 23%, p<0,0001) TGFb cod10/cod25 TG (50% vs 34%, p=0,005) were associated with SCA prevention.

These results suggest the existence of an association between most of the studied polymorphic variants and SCA risk. Mutations in *IL1A*, *IL1R*, *IL1RA*, *TNFA* and *IL2* genes associated with IL-1 α , TNF- α e IL2 expression/activity rising, appear to increase inflammation levels in colon and rectal mucosa, and consequently could trigger tumor development. In contrast, IL-6 and TGF-b high expression/activity variants seem to decrease inflammatory/tumor processes in colon and rectum. This findings seem to support the hypothesis that CRC is related with pro-inflammatory (Th1) activities increasing and that cytokines genotyping have the potential to constitute an important tool in SCA clinical diagnosis establishment.

Key words: Sporadic colorectal adenocarcinoma (SCA); Cytokines; Inflammation; SCA clinical diagnosis establishment.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE ABREVIACÕES	x
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Dados Epidemiológicos	1
1.1.1 Taxa de Incidência e de Mortalidade.....	1
1.1.2 Etiologia.....	4
1.2 Classificação Histológica	6
1.3 Fatores de Risco	8
1.4 Citocinas e Inflamação	10
1.4.1 Classificação das Citocinas.....	11
1.4.1.1. Interleucina-1	12
1.4.1.2 <i>Tumor Necrosis Factor- alpha</i>	14
1.4.1.3 Interleucina-2	16
1.4.1.4 Interleucina-6	17
1.4.1.5 Interleucina-12	18
1.4.1.6 Interferão-Gama	19
1.4.1.7 <i>Transforming Growth Factor- Beta</i>	20
1.4.1.8 Importância do estudo de citocinas em carcinoma	21

1.4.1.9	Importância do estudo dos polimorfismos em citocinas.....	24
1.4.1.10	Caracterização dos polimorfismos nas citocinas estudadas.....	25
1.4.1.11	Polimorfismos de citocinas e carcinoma colo-retal	31
1.5	Objetivos	34
II.	MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1	Constituição da amostra	35
2.2	Estudo das variantes polimórficas	36
2.2.1	Extração de DNA.....	36
2.2.2	Análise da qualidade e grau de pureza do DNA extraído.....	37
2.3	Tipagem Genética.....	37
2.4	Visualização por eletroforese em gel de agarose	39
2.5	Análise estatística	39
2.5.1.	Análise da Pureza e da Concentração de DNA.....	39
2.5.2	Frequências Alélicas e Genotípicas	39
III.	RESULTADOS	41
3.1	Qualidade das amostras estudadas.....	41
3.2	Normalidade da amostra.....	41
3.3	Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados no adenocarcinoma bem diferenciado do colo-retal versus grupo controle.....	42
3.3.1	Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos IL-1A -889T>C, IL-1B -511C>T, IL-1RA 11100T>C e IL-1R Pst1970	46
3.3.2	Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos TNF- α -308 G>A e -238 G>A	49
3.3.3	Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos IL-2 -330 T>G e +160 G>T.....	50

3.3.4 Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos IL-6 -174 C>G e +565 A>G	52
3.3.5 Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo IL-12 +1188 A>C.....	53
3.3.6 Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo IFN- γ +874 T>A.....	54
3.3.7 Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo TGF- β +869 T>C (Codão 10) e +915 G>C (Codão 25)	55
IV. DISCUSSÃO.....	57
4.1. Interleucina-1 e Adenocarcinoma Colo-Retal	57
4.2 TNF- α e Adenocarcinoma Colo-Retal	58
4.3 Interleucina-2 e Adenocarcinoma Colo-Retal	60
4.4 Interleucina-6 e Adenocarcinoma Colo-Retal	61
4.5 Interleucina-12 e Adenocarcinoma Colo-Retal	62
4.6 IFN- γ e Adenocarcinoma Colo-Retal	63
4.7 TGF- β e Adenocarcinoma Colo-Retal	65
V. CONCLUSÃO.....	67
VI. BIBLIOGRAFIA.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxa de mortalidade estimada para (A) indivíduos do sexo masculino e (B) indivíduos do sexo feminino devido a cancro do colo-retal a nível mundial	2
Figura 2. Taxa de incidência e de mortalidade estimada de cancro do colo-retal em diferentes países pertencentes ao território Europeu	2
Figura 3. Percentagem de indivíduos sobreviventes de cancro ao fim de 5 anos de tratamento em Portugal.....	3

Figura 4. Esquema representativo dos tipos de cancro do colo-retal existentes e respetivas síndromes que podem advir de cancro do colo-retal do tipo hereditário.....	5
Figura 5. Esquema representativo da via de carcinogénese clássica de CCR, designada de via adenoma-carcinoma.....	6
Figura 6. Representação esquemática da anatomia das camadas epiteliais que caracterizam a região do cólon e representação sobre quais as principais tecidos afetados de acordo com o estágio de desenvolvimento da patologia (T1,T2,T3,T4).	7
Figura 7. Critérios de classificação implementados e utilizados pela Organização Mundial de Saúde na classificação histológica de tumores presentes nas regiões do cólon e do reto	8
Figura 8. Localização citogenética do gene <i>IL1</i> no cromossoma 2.....	12
Figura 9. Representação das diferentes áreas onde a IL-1 intervêm e principais funções desempenhadas	12
Figura 10. Estrutura tridimensional das moléculas de IL-1 α (A) e IL-1 β (B), determinadas por cristalografia de raio-x	13
Figura 11. Estrutura tridimensional da molécula TNF- α , determinadas por cristalografia de raio-x.....	14
Figura 12. Localização citogenética do gene <i>TNFA</i> no cromossoma 6.....	14
Figura 13. Representação sobre os diferentes mecanismos de ação que podem resultar da ação do TNF- α	16
Figura 14. Estrutura tridimensional da molécula IL-2, determinadas por cristalografia de raio-x.....	17
Figura 15. Localização citogenética do gene <i>IL2</i> no cromossoma 4.....	17
Figura 16. Localização citogenética do gene <i>IL6</i> no cromossoma 7.....	18
Figura 17. Localização citogenética do gene <i>IL12</i> no cromossoma 3.....	18
Figura 18. Localização citogenética do gene <i>IFNG</i> no cromossoma 12.....	19
Figura 19. Localização citogenética do gene <i>TGFB</i> no cromossoma 19	20

Figura 20. Mecanismo de ativação da via Stat3 através da ação do gene <i>IL-6</i> e respostas celulares consequentes desta ação	23
Figura 21. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene (A) <i>IL1A</i> , (B) <i>IL1B</i> e (C) <i>IL1Ra</i>	26
Figura 22. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene <i>TNFA</i>	27
Figura 23. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene <i>IL2</i>	28
Figura 24. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene <i>IL-6</i>	28
Figura 25. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene <i>IL12</i>	29
Figura 26. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene <i>IFNG</i>	30
Figura 27. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene <i>TGFB</i>	31
Figura 28. (A), (B) Imagem Histológica da mucosa colónica normal: 40x HE (Haematoxylin-eosin), 200x HE; (C), (D) Imagem Histológica de adenocarcinoma coloretal esporádico bem diferenciado (De acordo com critérios da OMS). 100x HE; 200x HE. Imagem proveniente do IAP-FMUC.....	35
Figura 29. Comparação das frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos da <i>IL-1</i> entre os grupos controlo e com CCR.....	48
Figura 30. Comparação das frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos do <i>TNF-α</i> entre os grupos controlo e com CCR.....	50
Figura 31. Comparação das frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos da <i>IL-2</i> entre os grupos controlo e com CCR.....	51
Figura 32. Comparação das frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos da <i>IL-6</i> entre os grupos controlo e com CCR.....	53

Figura 33. Comparação das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da IL-12 entre os grupos controlo e com CCR.....	54
Figura 34. Comparação das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos do IFN- γ entre os grupos controlo e com CCR.....	54
Figura 35. Comparação das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos do TGF- β entre os grupos controlo e com CCR	55
Figura 36. Esquema representativo, relativo às principais vias de interação na qual a IL-12 se encontra	63
Tabela 37. Resumo do papel que o gene <i>IFNG</i> pode adquirir quer na promoção ou prevenção de cancro do colo-retal	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos grupos da amostra em estudo	36
Tabela 2. Descrição dos polimorfismos estudados.....	37
Tabela 3. Ciclos de temperatura e de tempos que caracterizam o programa de PCR utilizado na amplificação dos polimorfismos em estudo	38
Tabela 4. Média e desvio-padrão relativos aos valores de pureza e de concentração das amostras de DNA estudadas	41
Tabela 5. Resultados do teste ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os marcadores estudados	42
Tabela 6. Frequências alélicas em indivíduos com CCR e indivíduos controlo	43
Tabela 7. Frequências genotípicas em indivíduos com CCR e indivíduos controlo	44

ÍNDICE DE ABREVIACÕES

aa	Aminoácidos
ACRE	Adenocarcinoma colo-retal esporádico
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
CAA	Células Apresentadoras de Antígenos
CCHSP	Carcinoma do Cólon hereditário sem polipose
CCR	Carcinoma Colo-retal
CCRE	Carcinoma Colo-Retal Esporádico
CG	Carcinoma Gástrico
CRC	Colorectal cancer
CU	Colite Ulcerosa
DC	Doença de Chron
DII	Doença Inflamatória dos Intestinos
ERRO	Espécies reativas de oxigénio
IARC	<i>International Agency for Research Cancer</i>
IFN- γ	Interferão-gama
IMS	Instabilidade de microssatélite
INC	Instabilidade Cromossómica
IL-1	Interleucina-1
IL-1R	Recetor de interleucina-1
IL-1Ra	Antagonista do recetor de interleucina-1
IL-1 α	Interleucina-1 alfa
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12

LAK	<i>Lymphokine activated killer</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
NF-K β	Fator nuclear kappa B
NK	Células <i>natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
SCA	Sporadic colorectal adenocarcinoma
SCI	Síndrome do Cólon Irritável
SL	Síndrome de Lynch
SNP's	<i>Single nuclear polymorphism</i>
SPO	Sociedade Portuguesa de Oncologia
SRDNA	Sistema de reparação do DNA
PAF	Polipose adenomatosa familiar clássica do cólon
PAFA	Polipose adenomatosa familiar atenuada do cólon
PAM	Polipose adenomatosa com mutação no gene <i>MUTYH</i>
PCR-SSP	<i>Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers</i>
TCGF	Fator de crescimento de células T
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor- beta</i>
Th1	Citocinas pro-inflamatórias
Th2	Citocinas anti-inflamatórias
Th3	Citocinas pró- e anti-inflamatórias
TNF- α	<i>Transforming Growth Factor-alpha</i>
UTR	Região não transcrita do terminal 3'

I. INTRODUÇÃO

O carcinoma Colo-Rectal (CCR) é atualmente apontado como sendo o segundo tipo de cancro com maior incidência a nível mundial e a segunda maior causa de morte por cancro a nível europeu, apresentando a taxa de morbilidade mais elevada em todo o Mundo (Ouakrim *et al.*, 2015). Deste modo, o CCR apresenta-se como um problema de saúde pública, sobretudo em países desenvolvidos, onde se registam as taxas mais elevadas e constituem cerca de 55% de todos os casos de carcinoma registados (Terzić *et al.*, 2010; Hagggar *et al.*, 2009; Ferlay *et al.*, 2012).

O processo de carcinogénese do CCR é caracterizado pela acumulação de mutações em genes responsáveis pelo crescimento e diferenciação da mucosa do cólon (Potter e Lindor, 2009; Goel *et al.*, 2003). Os principais fatores de risco que podem estimular os mecanismos de carcinogénese ocorrem através de alterações genéticas e epigenéticas provocadas por variações ambientais e de estilo de vida do sujeito (Terzić *et al.*, 2010; Potter e Lindor, 2009; Hagggar *et al.*, 2009). Todavia, outros estudos têm também evidenciado o papel preponderante dos mecanismos de inflamação crónica, nomeadamente, na infiltração de monócitos nos tecidos epiteliais do cólon, no aumento de stresse oxidativo, e na ocorrência de alterações genéticas ao nível de proto-oncogenes (Tanaka, 2012; Gusdkov *et al.*, 2011; Iacopetta, 2003; Landskron *et al.*, 2014; Laurent-Puig *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 2015; Arvelo *et al.*, 2015; Haigis, 2013). Assim, o estudo do impacto da condição inflamatória no desenvolvimento das vias de carcinogénese que caracterizam o CCR, bem como, das moléculas envolvidas no processo de inflamação tornam-se essenciais na execução de planos de prevenção deste tipo de carcinoma.

1.1 Dados Epidemiológicos

1.1.1 Taxas de Incidência e de Mortalidade

A incidência do CCR, à semelhança de outros tipos de carcinoma, varia consoante as características pessoais, e os contextos étnicos e culturais dos indivíduos, sendo deste modo, comum existirem variações dentro das diferentes populações (Young *et al.*, 2011; Potter e Lindor, 2009).

No final do século XX a percentagem de indivíduos com CCR constituíam cerca de 9.5% de todos os casos de carcinoma registados (Potter e Lindor, 2009), enquanto

atualmente o número de novos casos ultrapassa um milhão (Terzić *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2011). Segundo os últimos dados apresentados pela *International Agency for Research Cancer* (IARC), o CCR constitui a segunda maior causa de morte em todo o Mundo, sendo quarta maior causa no género masculino (373,639 casos, 8.0% dos casos totais) e a terceira no género feminino (320,294 casos, 9,0% dos casos totais) (Figura 1) (Ferlay *et al.*, 2012).

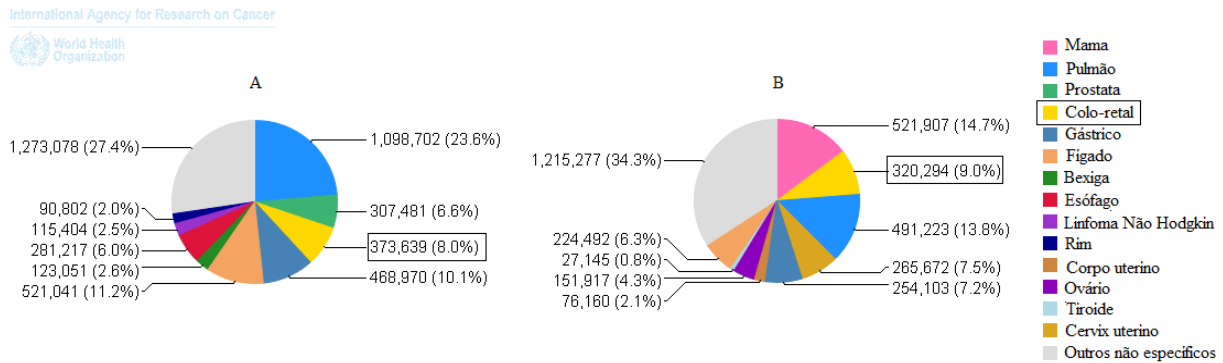


Figura 1. Taxa de mortalidade estimada para (A) indivíduos do sexo masculino e (B) indivíduos do sexo feminino devido a cancro do colo-retal a nível mundial. Adaptado de: Ferlay *et al.*, 2012.

A nível Europeu o CCR é responsável pela morte de 113200 indivíduos do sexo masculino (10%) e pela morte de 101500 indivíduos do sexo feminino (9,2%) no ano de 2012 (Figura 2) (Ouakrim *et al.*, 2015). Para além destas taxas de mortalidade, foram detetados 241600 novos casos de CCR em indivíduos do sexo masculino e 205200 do sexo feminino em território europeu no ano de 2012 (Figura 2) (Ouakrim *et al.*, 2015).

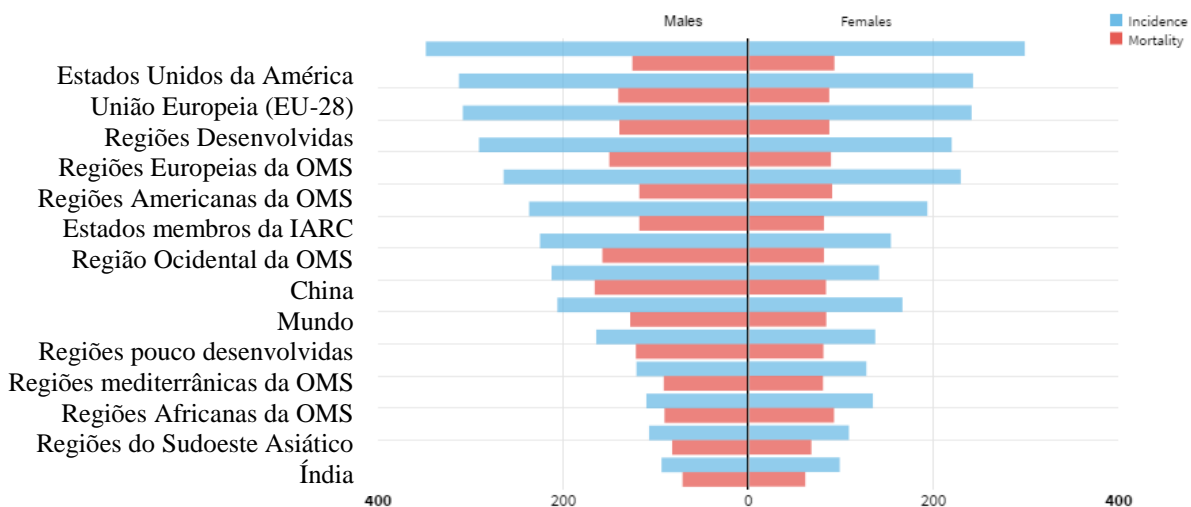


Figura 2. Taxa de incidência e de mortalidade estimada de cancro do colo-retal em diferentes países pertencentes ao território Europeu. Adaptado de: Ferlay *et al.*, 2012.

Segundo Cotter, o número de novos casos de CCR registados na Europa representam 12.9% de todos os novos casos de carcinoma diagnosticados mundialmente e 12.2% de todas as mortes provocadas por qualquer tipo de carcinoma (Cotter, 2013).

Em Portugal, à semelhança dos dados obtidos a nível mundial, os indivíduos mais afetados por CCR pertencem ao sexo masculino, com idades superiores a 50 anos (Young *et al.*, 2011; Allemani *et al.*, 2015). Segundo os dados obtidos pela Sociedade Portuguesa de Oncologia (SPO), entre os anos de 2002 e 2012, a taxa de mortalidade provocada por carcinoma em Portugal aumentou 14.1%, tendo sido registados 70 novos óbitos diário em 2012 (SPO, 2016). Um artigo publicado recentemente pela revista *Lancet*, relativo aos tipos de carcinoma mais frequentes em Portugal, relatou que o CCR ocupa um lugar de destaque, com o registo de 7129 novos casos diagnósticos e 3797 mortes em 2012 (Allemani *et al.*, 2015).

Apesar do aumento da incidência, a taxa de sobrevivência de indivíduos com CCR localizado nas regiões do cólon e do reto tem vindo a aumentar entre 1995-96 e 2005-06 (Figura 3) (SPO, 2016). Este aumento na taxa de sobrevivência foi em grande parte devido à implementação de medidas preventivas e de vigilância, como por exemplo a colonoscopia, implementada pelos rastreios nacionais, que permitiu a monitorização dos tecidos colónicos e o controlo da evolução da doença em fases iniciais do seu desenvolvimento (Balboa *et al.*, 2014; Potter e Lindor, 2009; Kumar *et al.*, 2015; Allemani *et al.*, 2015; Cotter, 2013).

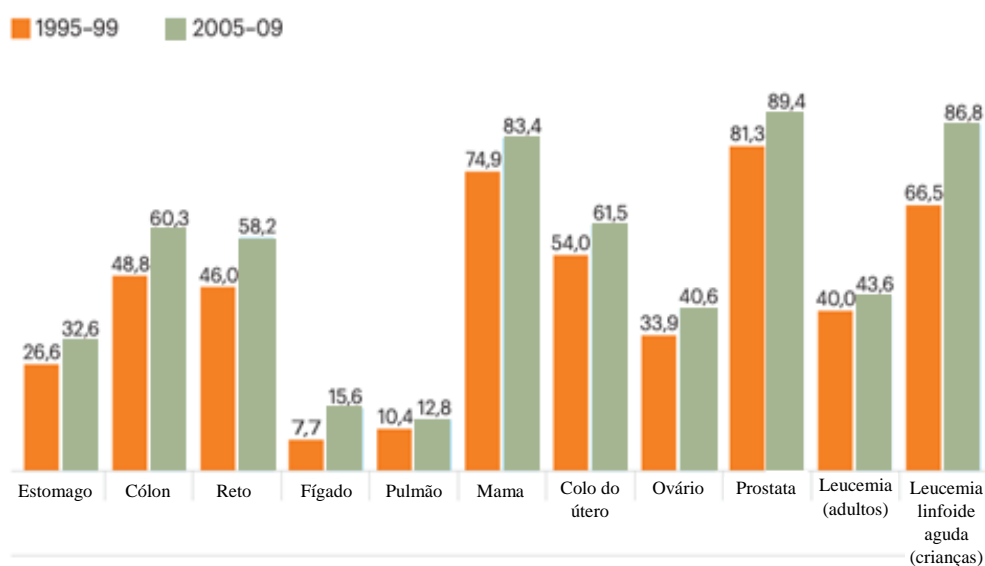


Figura 3. Percentagem de indivíduos sobreviventes de cancro ao fim de 5 anos de tratamento em Portugal. Adaptado de : SPO, 2016.

O aumento do número de casos de CCR começou a registar-se sobretudo a partir dos anos 80, período em que se verificaram alterações massivas nos hábitos alimentares e estilo de vida da população, nomeadamente, o aumento do consumo de bebidas de elevado teor alcoólico, tabaco, a ingestão de alimentos ricos em gorduras e hábitos de vida mais sedentários (SPO, 2016; Landi *et al.*, 2006; Raskov *et al.*, 2014; Terzić *et al.*, 2010; Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Sarvari *et al.*, 2014; Potter e Lindor, 2009; Waldner *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2007; Potter e Lindor, 2009; Kumar *et al.*, 2015; Osório-Costa e Carvalheira, 2013). Esta relação direta entre dieta, estilo de vida e prevalência de CCR deve-se à função primária do cólon na absorção de nutrientes, que o propicia a uma maior exposição a agentes físicos, químicos e biológicos, e que o torna mais vulnerável ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (Arvelo *et al.*, 2015).

1.1.2 Etiologia

Ao nível da sua génese, o CCR pode ser de origem esporádica ou hereditária, sendo os casos esporádicos os mais frequentes (Figura 4) (Haigis, 2013). Os casos de CCR de natureza esporádica constituem cerca de 85% dos casos registados e devem-se, sobretudo, à ocorrência de mutações somáticas, isto é, mutações ocorridas ao longo da vida dos indivíduos sem correlação com patologias hereditárias (Arvelo *et al.*, 2015; Haigis, 2013). O mesmo não sucede quando nos referimos aos cerca de 15% dos casos hereditários de CCR registados, nos quais os indivíduos possuem certo tipo de mutações de índole familiar/hereditária que os torna mais suscetíveis ao desenvolvimento desta doença (Terzić *et al.*, 2010; Arvelo *et al.*, 2015; Haigis, 2013). Em Portugal, o número de casos provocados por CCR hereditário constituem cerca de 10-15% de todos os casos registados a nível nacional (Isidro *et al.*, 2013).

De entre os vários tipos de síndromes que decorrem de mutações hereditárias e que tornam os indivíduos mais suscetíveis a CCR, a polipose adenomatosa familiar clássica e atenuada do cólon (PAF e PAFA), a polipose adenomatosa com mutação no gene *MUTYH* (PAM) e a Síndrome de Lynch (SL), também designado por Carcinoma do Cólon hereditário sem polipose (CCHSP) são as principais síndromes conhecidas (Figura 4)

(Young *et al.*, 2011; Potter e Lindor, 2009; Isidro *et al.*, 2013; Kumar et al 2015; Goel et al., 2003; Munteanu e Mastalier, 2014; Fleming *et al.*, 2012).

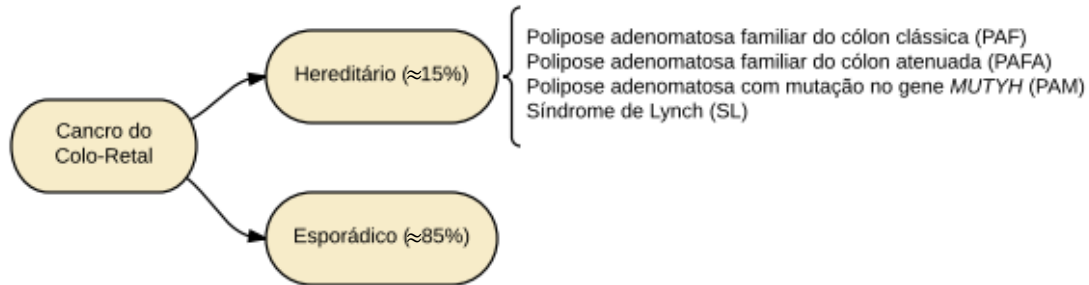


Figura 4. Esquema representativo dos tipos de cancro do colo-retal existentes e síndromes associadas às formas hereditárias de CCR.

A percentagem de indivíduos portadores de SL, segundo alguns estudos (Kumar *et al.*, 2015; Munteanu e Mastalier, 2014; Allemani *et al.*, 2015) localiza-se entre 3-4%, enquanto outros autores (Fleming *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2011) apontam uma margem percentual que pode ir de 1% até aos 20%. Os tumores que derivam de SL são caracterizados por níveis elevados de instabilidade de microssatélite (IMS), mecanismo responsável por alterações na frequência de repetições de nucleótidos. Normalmente, o aumento de IMS é provocado por mutações na sequência dos genes envolvidos no sistema de reparação do DNA (SRDNA), como por exemplo, os genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* (Young *et al.*, 2011; Potter e Lindor, 2009; Isidro *et al.*, 2013; Munteanu e Mastalier, 2014; Fleming *et al.*, 2012). No caso da PAF, apesar de ser uma das formas hereditárias associada ao desenvolvimento de CCR, apenas é responsável por 1% de novos casos no Mundo e a sua prevalência é de 1 caso por cada 14,000 habitantes (Hamilton e Aaltonen, 2012). A PAF consiste numa síndrome autossómica dominante de alta penetrância, que resulta de uma mutação provocada ao nível do gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*) presente no cromossoma 5 (Potter e Lindor, 2009; Kumar *et al.*, 2015; Fleming *et al.*, 2012). A PAF provoca Instabilidade Cromossómica (INC), que consiste na alteração do número ou da estrutura dos cromossomas, podendo ser responsável por mutações no gene *APC*, *P53* (cromossoma 17), *SMAD 2* e *SMAD4* (cromossoma 18) (Munteanu e Mastalier, 2014; Goel *et al.*, 2003).

O Carcinoma Colo-Retal Esporádico (CCRE) é caracterizado pela acumulação de mutações que desencadeiam a perda de função de genes supressores tumorais e a passagem de proto-oncogenes a oncogenes, promovendo deste modo estados de

proliferação celular alterados (Fearon e Vogelstein, 1989; Raskov *et al.*, 2014). Contudo, os processos de carcinogénese que caracterizam o CCR, de natureza esporádica e hereditária, seguem um padrão de mutação mais ao menos previsível. O padrão de mutações mais conhecido em CCR (via clássica), designa-se de sequência de adenoma-carcinoma e é caracterizada pelo silenciamento dos genes *APC*, *K-ras* e *TP53* (Figura 5) (Tanaka, 2012; Balboa *et al.*, 2014; Raskov *et al.*, 2014; Terzić *et al.*, 2010; Laurent-Puig *et al.*, 1994; Uchiyama *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015).

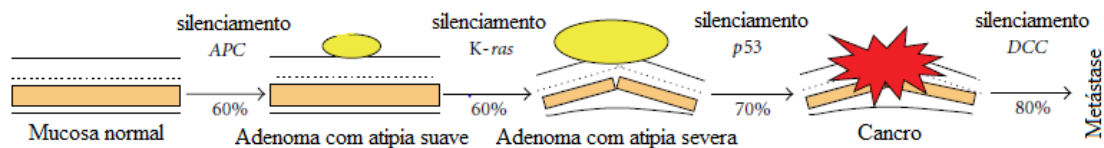


Figura 5. Esquema representativo da via de carcinogénese clássica de CCR, designada de via adenoma-carcinoma. Adaptado de: Tanaka, 2012.

Todavia, é importante referir a existência de outras vias de carcinogénese igualmente potenciadoras de CCR. Uma dessas vias é caracterizada pela precedência de doenças inflamatórias crónicas, tais como, a colite ulcerosa (CU), doença de Chron (DC) e Síndrome do Cólon Irritável (SCI), que se caracterizam pela libertação prolongada e anormal de citocinas e espécies reativas de oxigénio (Tanaka, 2012; Landskron *et al.*, 2014; Bromberg e Wang, 2009; Waldner *et al.*, 2012; Scheller *et al.*, 2001). Este processo impede que os tecidos danificados do colon e reto regenerem, criando lesões pré-neoplásicas e aumentando assim o risco de carcinogénese.

1.2 Classificação Histológica

Atualmente mais de 90% dos carcinomas em CCR são do tipo adenocarcinoma (Fleming *et al.*, 2012). A identificação histopatológica do adenocarcinoma é feita com base na extensão da distribuição de formações glandulares que caracterizam a estrutura deste tipo de carcinoma (Fleming *et al.*, 2012; Hamilton e Aaltonen, 2012). Deste modo, quando é possível observar: i) estruturas glandulares em >95% do tumor diz-se que estamos perante um adenocarcinoma bem diferenciado (Grau 1); ii) quando é possível observar uma distribuição de estruturas glandulares em 50 a 95% do tumor diz-se que

este é moderadamente diferenciado (Grau 2); iii) quando é possível observar uma distribuição de estruturas glandulares em 5 a 50% do tumor diz-se que este é pouco diferenciado (Grau 3) e, finalmente, iv) quando se verifica a presença de estruturas glandulares em <5% da extensão tumoral e a presença de um tumor sobretudo sólido e dotado de estruturas irregulares, diz-se que se trata de um adenocarcinoma indiferenciado (Grau 4) (Fleming *et al.*, 2012; Hamilton e Aaltonen, 2012; Compton, 2003). O adenocarcinoma mais frequente é o de Grau 2, constituindo cerca de 70% dos casos diagnosticados (Fleming *et al.*, 2012). Ao nível da localização do adenocarcinoma, apenas se diz que o mesmo possui potencial invasivo quando este consegue infiltrar-se na *muscularis mucosae* (Figura 6) (Hamilton e Aaltonen, 2012).

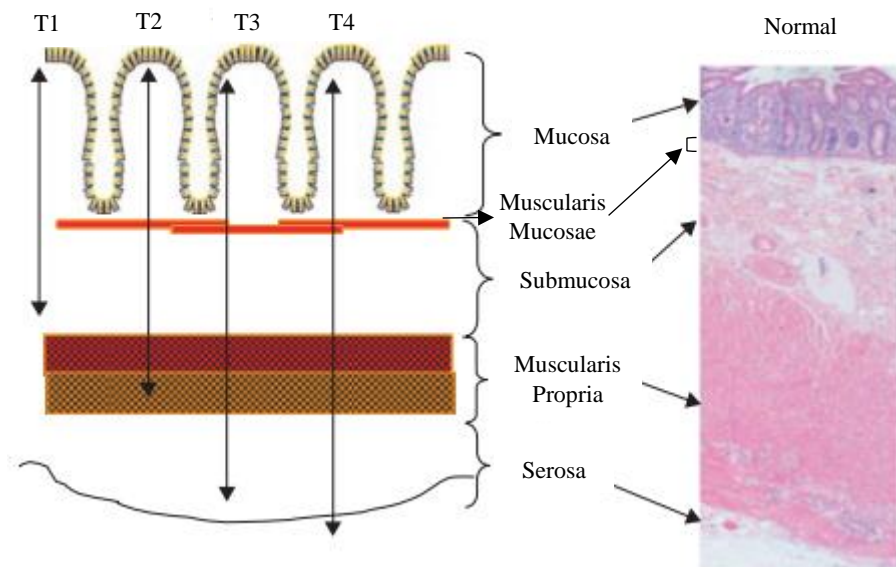


Figura 6. Representação esquemática da anatomia das camadas epiteliais que caracterizam a região do cólon e representação sobre quais as principais tecidos afetados de acordo com o estágio de desenvolvimento da patologia (T1,T2,T3,T4). Adaptado de: Young *et al.*, 2011.

Os parâmetros de classificação do CCR são baseados na Classificação de Tumores, publicado pela da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2012 (Figura 7) (Hamilton e Aaltonen, 2012).

Epithelial tumours		Non-epithelial tumours	
Adenoma	8140/0	Lipoma	8850/0
Tubular	8211/0	Leiomyoma	8890/0
Villous	8261/0	Gastrointestinal stromal tumour	8936/1
Tubulovillous	8263/0	Leiomyosarcoma	8890/3
Serrated	8213/0	Angiosarcoma	9120/3
Intraepithelial neoplasia ² (dysplasia)		Kaposi sarcoma	9140/3
associated with chronic inflammatory diseases		Malignant melanoma	8720/3
Low-grade glandular intraepithelial neoplasia		Others	
High-grade glandular intraepithelial neoplasia		Malignant lymphomas	
Carcinoma		Marginal zone B-cell lymphoma of MALT Type	9699/3
Adenocarcinoma	8140/3	Mantle cell lymphoma	9673/3
Mucinous adenocarcinoma	8480/3	Diffuse large B-cell lymphoma	9680/3
Signet-ring cell carcinoma	8490/3	Burkitt lymphoma	9687/3
Small cell carcinoma	8041/3	Burkitt-like /atypical Burkitt-lymphoma	9687/3
Squamous cell carcinoma	8070/3	Others	
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Secondary tumours	
Medullary carcinoma	8510/3	Polyps	
Undifferentiated carcinoma	8020/3	Hyperplastic (metaplastic)	
Carcinoid (well differentiated endocrine neoplasm)	8240/3	Peutz-Jeghers	
EC-cell, serotonin-producing neoplasm	8241/3	Juvenile	
L-cell, glucagon-like peptide and PP/PYY producing tumour			
Others			
Mixed carcinoid-adenocarcinoma	8244/3		
Others			

Figura 7. Critérios de classificação implementados e utilizados pela Organização Mundial de Saúde na classificação histológica de tumores presentes nas regiões do cólon e do reto. Adaptado de: Hamilton e Aaltonen, 2012.

1.3 Fatores de risco

As causas que originam CCR são multifatoriais e resultam do efeito combinado e cumulativo de fatores ambientais e genéticos (Terzić *et al.*, 2010; Hagggar *et al.*, 2009; Brambilla *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 2014). Atualmente, áreas como a nutrição, genética, epidemiologia, ambiente e outras têm evoluído no sentido de uniformizar e determinar os fatores mais contributivos para o desenvolvimento de CCR (Potter e Lindor, 2009). O potencial de risco que os fatores ambientais podem adquirir para o aumento/diminuição do risco de progressão CCR já é reconhecido, em grande parte devido à realização de estudos de interação entre diferentes populações e as respetivas culturas/etnias (Young *et al.*, 2011; Potter e Lindor, 2009). Os principais fatores de risco ambientais envolvidos no desenvolvimento de CCR referem-se ao estilo de vida e à alimentação que cada indivíduo adquire, nomeadamente o consumo de álcool, tabaco e o consumo de alimentos ricos em gorduras saturadas (Hagggar *et al.*, 2009; Potter e Lindor, 2009). Dentre os diversos mecanismos carcinogénicos são de salientar a produção de ácidos biliares secundários, a produção de espécies reativas de oxigénio (ERO), acetal aldeídos, aminoácidos aromáticos, N-nitrosamina e a libertação não controlada de citocinas e quimiocinas (Raskov *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015).

A inerência de patologias hereditárias, como é o caso da Doença Inflamatória dos Intestinos (DII) e DC, também se encontram descritos na literatura como potenciadores do risco de desenvolvimento e progressão de CCR (Gusdkov *et al.*, 2011; Landskron *et al.*, 2014; Terzić *et al.*, 2010; Dinarello, 2009; Waldner *et al.*, 2012; Xu e Pasche, 2007; Gök *et al.*, 2015; Hanada *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2015; Fleming *et al.*, 2012; Brenner *et al.*, 2014). Também a presença de infeções ao nível do cólon provocadas por *Helicobacter pylori* e outros agentes patogénicos podem aumentar o risco de desenvolvimento de CCR, uma vez que proporcionam a ocorrência de longos períodos de inflamação que podem resultar em estados de inflamação crónica nos tecidos (Landskron *et al.*, 2014; Terzić *et al.*, 2010; Xu e Pasche, 2007; Ito *et al.*, 2007; Brenner *et al.*, 2014). Outro indutor de cronicidade inflamatória relatado como potenciador de CCR e outros tipos de carcinoma, como sendo o Carcinoma Gástrico (CG), é a CU (Tanaka, 2012; Landskron *et al.*, 2014; Terzić *et al.*, 2010; Popivanova *et al.*, 2008; Osório-Costa e Carvalheira, 2013; Wang e Lin, 2008; Sampaio *et al.*, 2015; Bromberg e Wang, 2009; Waldner *et al.*, 2012; Uchiyama *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2014; Gök *et al.*, 2015; Ito *et al.*, 2007).

Estados de inflamação crónica são provocados pela persistência de respostas imunitárias nos tecidos, devido à forte infiltração de granulócitos e linfócitos, e que resultam na produção de biomoléculas ativas e em danos nos tecidos (Tanaka, 2012; Landi *et al.*, 2006; Landskron *et al.*, 2014; Terzić *et al.*, 2010; Waldner *et al.*, 2012; Krzystek-Korpacka *et al.*, 2013). Entre os vários tipos de biomoléculas ativas passíveis de serem produzidas no microambiente no cólon e reto, encontram-se fatores de crescimento, citocinas e de quimiocinas (Landskron *et al.*, 2014). O nível de inflamação dos tecidos cólicos e rectais está diretamente associada à produção de citocinas pro-inflamatórias (Th1) e anti-inflamatórias (Th2), tais como o TNF- α , a IL-6, o TGF- β e a IL-1, que podem adquirir um papel importante no desenvolvimento de CCR (Waterston e Bower, 2004; Landskron *et al.*, 2014; Stanilov *et al.*, 2014; Van *et al.*, 2006; Osório-Costa e Carvalheira, 2013; Bromberg e Wang, 2009; Gasche *et al.*, 2011; Céspedes *et al.*, 2012; Kubiczikova *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2003; Apte *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2012; Elaraj, 2006; Matsuo *et al.*, 2009).

Os genes que codificam as citocinas constituem uma fonte de estudo promissora na área na Oncoimunologia, uma vez que as suas sequências promotoras são constituídas por regiões polimórficas que podem influenciar a mediação dos processos inflamatórios,

e consequentemente, podem estar envolvidos na promoção dos processos de carcinogénese (Lu *et al.*, 2014; Howell e Rose-Zerilli, 2007; Perri *et al.*, 2010). A variação polimórfica de um único par de bases ou nucleótidos, designa-se de SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), e constitui a variação genética mais frequente (Stanilov *et al.*, 2013; Landi *et al.*, 2006). O estudo dos SNPs torna-se relevante dado que muitas destas variações têm sido reconhecidas como tendo carácter clínico relevante (*clinical variants*), designadamente, as mutações ocorridas nas suas regiões promotoras, que podem provocar alterações ao nível da expressão, e as variações nas regiões codificantes desta moléculas, que podem provocar alterações ao nível da sua atividade (Stanilov *et al.*, 2013; Landi *et al.*, 2006; Perri *et al.*, 2010).

1.4 Citocinas e Inflamação

O termo “citocina” designa um vasto conjunto de glicoproteínas e péptidos de baixo peso molecular, responsáveis pelo desenvolvimento de processos de comunicação e sinalização molecular (Cardoso *et al.*, 2012; Zhang e An, 2009). A distinção entre citocinas é executada com base na sua origem celular, na célula(s) alvo e na função desempenhada (Cardoso *et al.*, 2012). Com base neste critério, o termo citocina pode englobar: i) quimiocinas, (produzidas em monócitos e macrófagos, envolvidas nos mecanismos de orientação e movimentação celular); ii) adipocinas, (produzidas em adipócitos); iii) linfocinas, (produzidas em linfócitos, envolvidas na mediação de respostas imunológicas inatas); iv) monocinas, (produzidas em monócitos, envolvidas na mediação de respostas inflamatórias do sistema inato, sob a forma de macrófago ou células dendríticas) e v) interleucinas (produzidas por leucócitos, envolvidas no controlo de outros leucócitos) (Cardoso *et al.*, 2012; Zhang e An, 2009).

A ação das citocinas pode ocorrer através de mecanismos autócrinos, na qual a citocina atua na sua célula produtora, parácrinos, na qual a citocina atua em células adjacentes, ou endócrinos, na qual a citocina atua em células mais distantes (Cardoso *et al.*, 2012; Zhang e An, 2009; Dembic, 2015; Kundu *et al.*, 1996; Murphy, 2012). Estas ações são executadas através da ligação a recetores específicos de elevada afinidade, permitindo que pequenas quantidades de citocinas produzam efeitos biológicos pronunciados (Murphy, 2012; Hanada *et al.*, 2002). A eficácia das respostas desencadeadas pelas citocinas encontra-se também relacionada com as suas principais características,

nomeadamente, por serem pleiotrópicas (adquirirem diferentes ações em diferentes contextos biológicos), redundantes (diferentes citocinas poderem produzir o mesmo efeito biológico), sinérgicas (várias citocinas poderem cooperar de modo a potenciar uma resposta biológica) e antagónicas (diferentes citocinas possuem ação oposta, podendo assim autorregular-se entre si) (Cardoso *et al.*, 2012; Zhang e An, 2009; Dembic, 2015; Murphy, 2012). Assim sendo, embora as citocinas desempenhem papéis importantes no desenvolvimento de funções cognitivas, nos processos de embriogénese e no envelhecimento celular, a sua principal função compreende a sua ação nas imunidades inata e adquirida/específica (Cardoso *et al.*, 2012; Murphy, 2012; Hanada *et al.*, 2002). Durante a atuação do sistema imune inato a produção de citocina deriva de células mononucleares, enquanto que na atuação do sistema imune adquirido a produção de citocinas é executada a partir de linfócitos T (Lee *et al.*, 2011,189).

1.4.1 Classificação das Citocinas

Comummente, a classificação das citocinas é efetuada de acordo com as propriedades inflamatórias associadas a cada uma delas. Assim sendo, as citocinas têm surgido classificadas na literatura como detentoras de propriedades pró-inflamatórias (Th1) ou propriedades anti-inflamatórias (Th2) (Cardoso *et al.*, 2012; Zhang e An, 2009; Dembic, 2015; Maurille e Leo, 1998; Kundu *et al.*, 1996; Murphy, 2012). Encontram-se, atualmente, classificadas como citocinas pró-inflamatórias, a interleucina-1 (IL-1), o *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α), a Interleucina-2 (IL-2), a Interleucina (IL-12) e o Interferão-gama (IFN- γ), enquanto a Interleucina-10 (IL-10) e a Interleucina-4 (IL-4) encontram-se classificadas como sendo citocinas com atividade anti-inflamatória (Zaidi e Merlino, 2011; Zhang e An, 2009). Porém, esta classificação constituiu apenas uma formalidade, uma vez que têm surgido descrito na literatura citocinas que podem adquirir propriedades anti- e pró-inflamatórias (Th3), de acordo com diferentes fases do processo inflamatório, mais concretamente, o *Transforming Growth Factor- beta* (TGF- β) e a Interleucina-6 (IL-6) (Diehl e Ricón, 2002). Contudo, o impacto que uma determinada citocina possui nos processos de carcinogénese não dependerá apenas da sua atividade (Th1, Th2 ou Th3), mas também da fase do processo em que atua (Lee *et al.*, 2011).

1.4.1.1 Interleucina-1

A IL-1 é caracterizada por ser uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica, localizada no braço longo do cromossoma 2, sintetizada sobretudo por macrófagos e é constituída por mais de 430 quilobases (Figura 8) (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Dinarello, 1994; Dube *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2011; Apte *et al.*, 2015). A IL-1 foi inicialmente classificada em 1977 como sendo uma proteína co ativadora de linfócitos T (Dinarello, 2009; Dinarello, 2011; Apte *et al.*, 2015). Em 1984, através do descobrimento das suas isoformas, foi estabelecido o seu envolvimento na regulação de processos pertencentes à imunidade inata e a diversas áreas de investigação (Figura 9) (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Dinarello, 1994; Garlanda *et al.*, 2013; Apte *et al.*, 2015). Esta interleucina possui assim capacidade de aumentar a produção de vários elementos pertencentes ao sistema imunitário inato, nomeadamente macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos (Garlanda *et al.*, 2013).

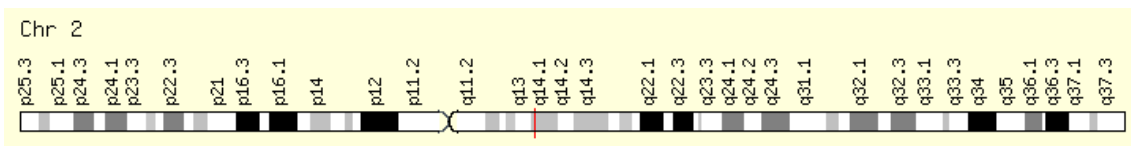


Figura 8. Localização citogenética do gene *IL1* no cromossoma 2. (Adaptado de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL1B&keywords=INTERLEUKIN-1>).

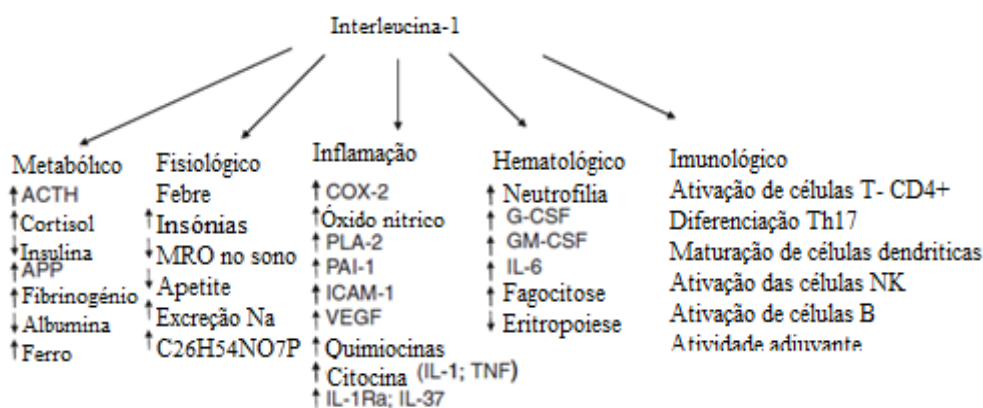


Figura 9. Representação das diferentes áreas onde a IL-1 intervém e principais funções desempenhadas. Adaptado de: Dinarello, 2011.

As duas isoformas que caracterizam a IL-1 são a interleucina-1 alfa (IL-1 α) (Figura 10A) e a interleucina-1 beta (IL-1 β) (Figura 10B) (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Dinarello, 1994; Dinarello, 2009; Garlanda *et al.*, 2013; Dinarello, 2011; Dube *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2011; Apte *et al.*, 2015). Embora sejam codificadas em genes distintos do cromossoma 2 e derivem de diferentes percursos proteicos, ambas as isoformas possuem pesos moleculares semelhantes nos estádios prematuro (31kDa) e maturo (17kDa), um recetor em comum, (recetor de interleucina-1; IL-1R), pela qual estas moléculas competem e ambas estimulam a produção de IL-6. (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Garlanda *et al.*, 2013; Murphy *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2011)

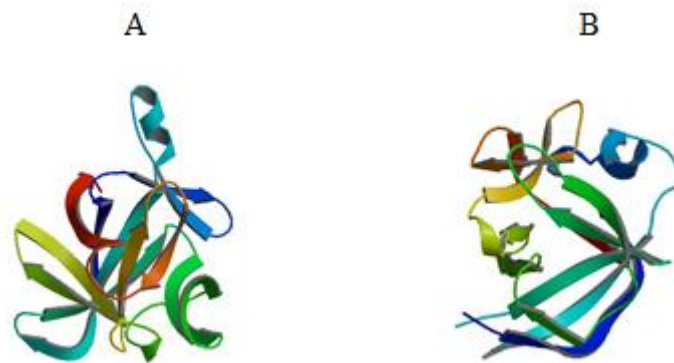


Figura 10. Estrutura tridimensional das moléculas de IL-1 α (A) e IL-1 β (B), determinadas por cristalografia de raio-x. (Adaptado de:<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1I1B> e <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2ILA>).

Para que haja a ligação efetiva da IL-1 α ou β ao seu recetor é necessário que a estas se liguem simultaneamente aos dois locais de reconhecimento do recetor. Este reconhecimento permite que a IL-1 desempenhe a sua função biológica nas células alvo. Na presença do antagonista do recetor de interleucina-1 (IL-1Ra), uma glicoproteína com cerca de 25 kDa, as funções desempenhadas pela IL-1 α e IL-1 β são inibidas (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Dinarello, 1994; La *et al.*, 2001). O IL-1Ra inibe a IL-1 através da sua ligação a um dos locais de reconhecimento do IL-1R bloqueando-o (Yuzhalin e Kutikhin, 2014). Assim sendo, sempre que se inicia o desencadeamento de um processo inflamatório, estes três elementos encontram-se em disputa por locais disponíveis no seu recetor (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Dinarello, 1994). Embora possuam inúmeras semelhanças funcionais, a IL-1 α e IL-1 β apenas partilham 22% de homologia genética entre si. Estas diferenças justificam as divergências entre elas ao nível da função, da

localização e do seu impacto em processos de carcinogénese. (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Dinarello, 1994; Garlanda *et al.*, 2013)

1.4.1.2 Tumor Growth Factor- α

O TNF- α consiste numa citocina pró-inflamatória multifuncional, que na sua forma matura adquire 17 kDa de massa e pode existir sob a forma de monómero, dímero ou de um homotrímero constituído por uma sequência de 157 aminoácidos (aa) (Figura 11) (Waterston e Bower, 2004; Stanilov *et al.*, 2014; Van *et al.*, 2006; Osório-Costa e Carvalheira, 2013; Wang e Lin, 2008; Horiuchi *et al.*, 2010; Esposito e Cuzzocrea, 2011). A sequência genética desta citocina localiza-se no cromossoma 6 (Figura 12) e é produzida sobretudo em macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, e células *natural killer* (NK) (Waterston e Bower, 2004; Stanilov *et al.*, 2014; Van *et al.*, 2006; Esposito e Cuzzocrea, 2011).

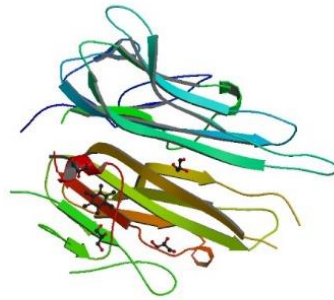


Figura 11. Estrutura tridimensional da molécula TNF- α , determinadas por cristalografia de raio-x. (Adaptado de: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4TWT>).

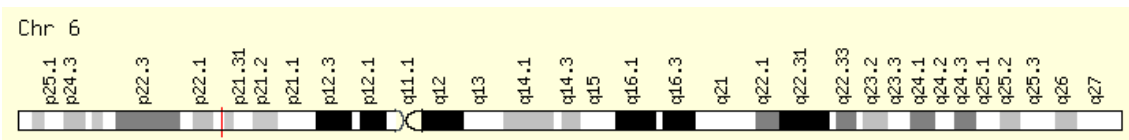


Figura 12. Localização citogenética do gene *TNFA* no cromossoma 6. (Adaptado de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNF&keywords=TNF>).

O TNF- α foi primeiramente descoberto em 1970, sendo nessa altura caracterizado pela sua capacidade de indução de processos de apoptose celular em células tumorais e de impedimento do desenvolvimento de processos de carcinogénese (Wang e Lin, 2008; Pfeffer, 2003). Esta citocina foi ainda denominada de catequina e caracterizada como sendo um fator de diferenciação de linfócitos T (Waterston e Bower, 2004; Van *et al.*, 2006). Cinco anos após a sua descoberta, o TNF- α foi isolado e em 1984 foi clonado a partir de genoma humano, data a partir do qual esta citocina foi vista como preponderante para o desenvolvimento de respostas físicas, imunitárias e patológicas (Van *et al.*, 2006; Wang e Lin, 2008).

As principais funções da TNF- α envolvem mecanismos fundamentais na sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celular (Figura 13) (Wang e Lin, 2008). Estas funções englobam mecanismos anti-tumorais responsáveis pela lise de células tumorais e pelo desenvolvimento de mecanismos de apoptose nas mesmas (Stanilov *et al.*, 2014). São também conhecidos mecanismos em comum com a IL-1, nomeadamente, o desenvolvimento de respostas imunitárias pertencentes ao sistema inato embora os seus recetores e estruturas sejam distintos, o desenvolvimento de repostas imunitária pró-inflamatória e a ativação de monócitos na presença de lipopolissacarídeos (LPS) (Waterston e Bower, 2004; Garlanda *et al.*, 2013; Dube *et al.*, 2001; Stanilov *et al.*, 2014). Por fim e também à semelhança da IL-1, o TNF- α é capaz de induzir a produção de IL-6 devido ao desencadeamento de respostas imunitárias pró-inflamatórias (Waterston e Bower, 2004). Contudo e ao nível das respostas patológicas, o TNF- α também se encontra envolvido no desenvolvimento de inflamações, rejeição de transplantes, no desenvolvimento de artrite reumatoide, septicemia, e no crescimento tumoral, (Wang e Lin, 2008). Sendo assim, quando se considera os processos de carcinogénese, o TNF- α surge como sendo uma citocina ambígua, dado que ainda não foi possível perceber se o mesmo possui um papel protetor ou impulsionador no desenvolvimento de carcinoma.

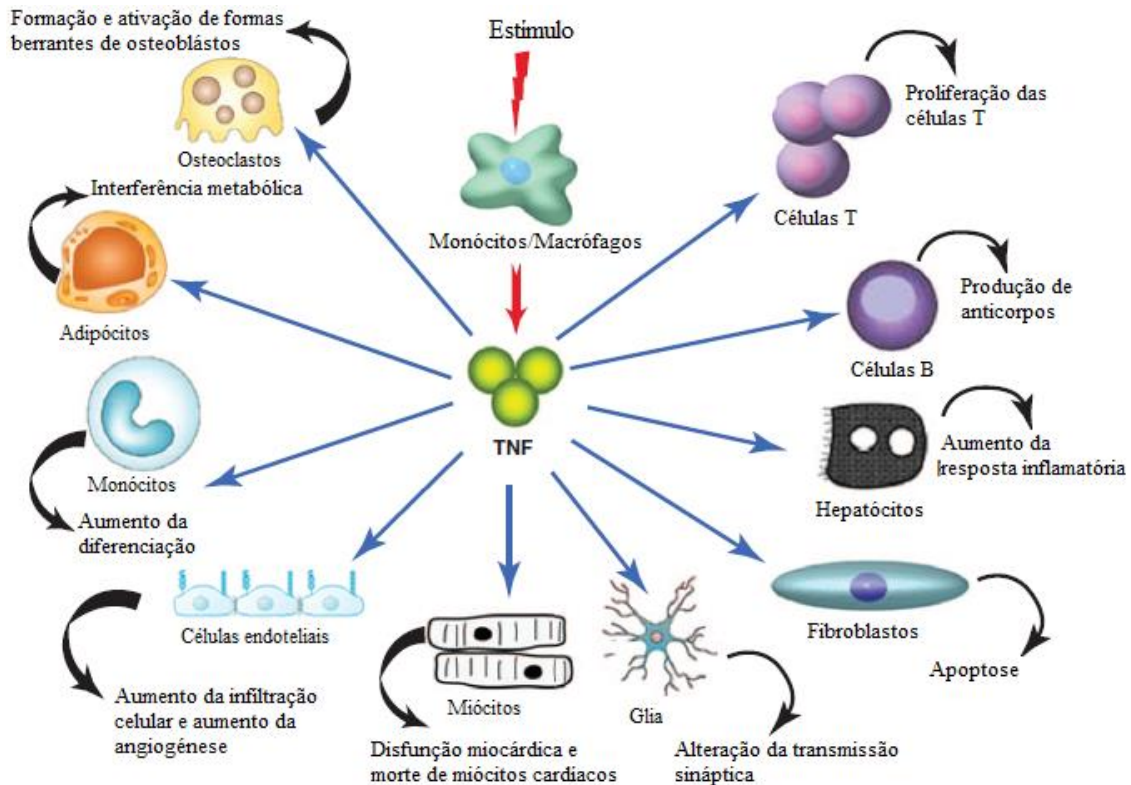


Figura 13. Representação sobre os diferentes mecanismos de ação que podem resultar da ação do TNF- α . Adaptado de: Esposito e Cuzzocrea, 2011.

1.4.1.3 Interleucina-2

A IL-2 (Figura 14), primeiramente denominada de fator de crescimento de células T (TCGF), foi a primeira interleucina devidamente purificada, caracterizada e identificada na história das interleucinas (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Olejniczak *et al.*, 2008; Bubenök, 2004). A IL-2 encontra-se localizada entre as posições 26-28 do cromossoma 4 e é constituída por 4 exões intercalados por três intrões, um deles curto e constituído por 90pb, e dois longos constituídos por 2290pb e por 1847pb (Figura 15) (Olejniczak *et al.*, 2008). Na sua forma madura, esta citocina é ainda caracterizada por ser uma glicoproteína globular com cerca de 15,5kDa e constituída por uma sequência de 153 aa (Olejniczak *et al.*, 2008; Bubenök, 2004; Rosenberg, 2014).

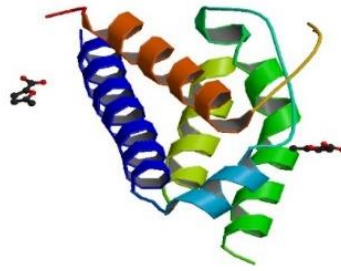


Figura 14. Estrutura tridimensional da molécula IL-2, determinadas por cristalografia de raio-x. (Adaptado de: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4NEJ>).

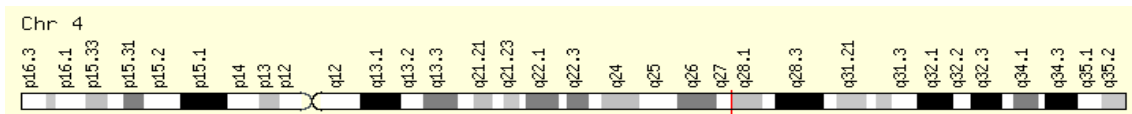


Figura 15. Localização citogenética do gene *IL2* no cromossoma 4. (Adaptado de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL2&keywords=IL-2>).

A sua produção ocorre sobretudo ao nível de linfócitos T do tipo CD4+ ativos, mas também se encontra expressa e pode ser produzida ao nível de linfócitos T do tipo CD8+ inativos, células dendríticas e células do timo (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Olejniczak *et al.*, 2008; Bubenõk, 2004; Paoli, 2001; Rosenberg, 2014). As principais funções da IL-2 são a promoção do crescimento e diferenciação de linfócitos T citotóxicos e auxiliares, bem como, a promoção da expressão e diferenciação das células NK em células citotóxicas e *lymphokine activated killer* (LAK), englobadas no mecanismo Th1 (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Olejniczak *et al.*, 2008; Rosenberg, 2014). A IL-2 pode ainda mediar a inibição do crescimento de linfócitos T que se encontrarem em processo de apoptose (Olejniczak *et al.*, 2008).

1.4.1.4 Interleucina-6

A IL-6 caracteriza-se por ser uma citocina Th3 multifuncional localizada na posição 15 do cromossoma 7 (Figura 16). Esta interleucina possui funções relevantes ao nível dos processos de sobrevivência, proliferação e morte celular (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Bromberg e Wang, 2009; Uchiyama *et al.*, 2012; Esfandi *et al.* 2006; Gasche *et al.*, 2011; Kakourou *et al.*, 2015). A IL-6 pode ainda funcionar como fator de diferenciação em

linfócitos B e como um mediador de respostas inflamatórias crônicas ou pontuais (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Waldner *et al.*, 2012).

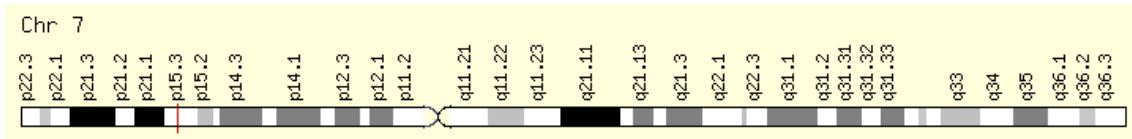


Figura 16. Localização citogenética do gene *IL6* no cromossoma 7. (Adaptado de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL6&keywords=IL-6>).

Os principais produtores de IL-6 são monócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e granulócitos (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Esfandi *et al.* 2006; Waldner *et al.*, 2012). Assim sendo, esta citocina tem surgido associada à regulação de processos patofisiológicos, tendo sido já associada a casos de mieloma múltiplo, Doença de Alzheimer, osteoporose pós-menopausica, artrite reumatoide, doença de Castleman e mieloma múltiplo, mas também a casos de carcinoma de pele comum, do esófago, em carcinoma do pulmão, em melanomas, e colites associadas a carcinoma do colo-retal (Gasche *et al.*, 2011; Uchiyama *et al.*, 2012; Esfandi *et al.* 2006; Waldner *et al.*, 2012; Malicki *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2015; Kakourou *et al.*, 2015; Stanilov *et al.*, 2010).

1.4.1.5 Interleucina-12

A IL-12 localiza-se na posição 27 do cromossoma 3 (Figura 17) e constitui um heterodímero composto por duas subunidades p40 a p35, também denominadas por subunidade β e α respetivamente, que se encontram conectadas por uma ponte dissulfito (Stanilov *et al.*, 2013; O'Hara *et al.*, 1998; Colombo e Trinchieri, 2002; Stern *et al.*, 1996; Lasek *et al.*, 2014; Navaglia *et al.*, 2005). A segunda subunidade em particular possui algum grau de homologia com a IL-6 (Stern *et al.*, 1996).

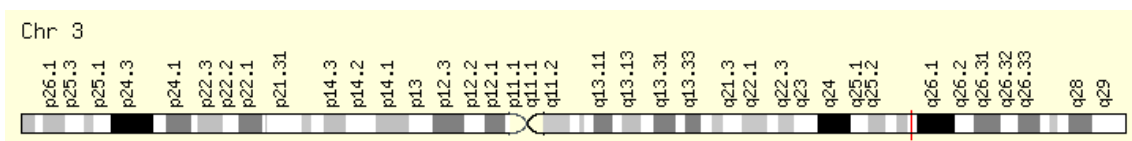


Figura 17. Localização citogenética do gene *IL12* no cromossoma 3. (Adaptado de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL12&keywords=IL-12>).

Os principais locais produtores de IL-12 localizam-se em células apresentadoras de antígenos, nomeadamente, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (Stanilov *et al.*, 2013; O'Hara *et al.*, 1998; Colombo e Trinchieri, 2002; Stern *et al.*, 1996). Sob o ponto de vista funcional, as principais funções da IL-12 integram a produção do IFN- γ , IL-2 e TNF- α (O'Hara *et al.*, 1998) através de linfócitos T, e células NK, e a maturação dos linfócitos Th0 em linfócitos do tipo Th1 (O'Hara *et al.*, 1998; Colombo e Trinchieri, 2002; Stern *et al.*, 1996; Stanilov *et al.*, 2013; Colombo e Trinchieri, 2002; Lasek *et al.*, 2014). A IL-12 pode ainda funcionar como um fator de crescimento (O'Hara *et al.*, 1998) e é responsável pela inibição dos processos de angiogénese e pela libertação de IL-6 em resposta ao aumento de LPS (Yuzhalin e Kutikhin, 2014).

1.4.1.6 Interferão- Gama

O IFN- γ constitui uma citocina imunomodulatória, pró-inflamatória, localizada na posição 15 do cromossoma 12 (Figura 18). Esta citocina, pertencente a uma família mais vasta de IFN, pode também surgir denominada na literatura por IFN do tipo II dado que possui um recetor específico e uma localização genética diferente dos restantes elementos da mesma família (Zaidi e Merlino, 2011; Schroder *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2014; Hanada, 2006).

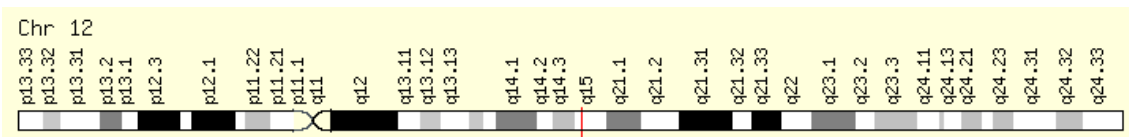


Figura 18. Localização citogenética do gene *IFNG* no cromossoma 12. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFNG&keywords=IFN,GAMMA>).

Inicialmente, o IFN- γ foi denominado de fator ativador de macrófagos, dada a sua associação a funções desempenhadas ao nível do sistema imunitário que interferiam com os processos de replicação viral e com o progresso de infeções microbianas e bacterianas (Fei *et al.*, 2014; Hanada, 2006; Schroder *et al.*, 2011). Os principais locais de produção de IFN- γ são linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares, células NK, podendo ainda ser detetada a sua produção em linfócitos B e Células Apresentadoras de Antígenos

(CAA) (Schroder *et al.*, 2011). Ao nível da sua função, o IFN- γ é responsável pela ativação de macrófagos e encontra-se envolvido na regulação de processos desencadeados por linfócitos B e células NK (Schroder *et al.*, 2011). O IFN- γ é responsável pela ativação do MHC do tipo II em linfócitos B, células dendríticas, monócitos e macrófagos, bem como pela especificação de linfócito T do tipo Th0 em linfócitos do tipo Th1 (Schroder *et al.*, 2011). No que se refere à regulação de outras citocinas, o IFN- γ é capaz de promover a produção de IL-12 e inibir a ação anti-inflamatória desencadeada pela IL-4 (Schroder *et al.*, 2011). As principais citocinas agonistas do interferão-gama são a IL-12 e o TNF- α , enquanto as citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β possuem um efeito antagonista sobre o IFN- γ , impedindo assim o seu funcionamento (Schroder *et al.*, 2011).

1.4.1.7 Transforming Growth Factor-Beta

O TGF- β pode ser subdividido em três isoformas, TGF- β 1, - β 2 e - β 3, que partilham entre si cerca de 70% de homologia genética (Fi *et al.*, 2008; Lebrun *et al.*, 2012; Kubiczkova *et al.*, 2012). O TGF- β 1 constitui uma citocina multifuncional localizada na posição 13.2 do cromossoma 19 (Figura 19) (Kemik, 2011; Kubiczkova *et al.*, 2012). Na sua forma ativa, o TGF- β 1 é constituída por dois monómeros ligados entre si e por uma ligação dissulfito, adquirindo assim uma massa de cerca 25 kDa (Fi *et al.*, 2008; Lebrun *et al.*, 2012; Kemik, 2011). Esta citocina atua sobretudo ao nível de células epiteliais, endoteliais, mieloides e em células linfoides (Fi *et al.*, 2008; Lebrun *et al.*, 2012; Kemik, 2011).

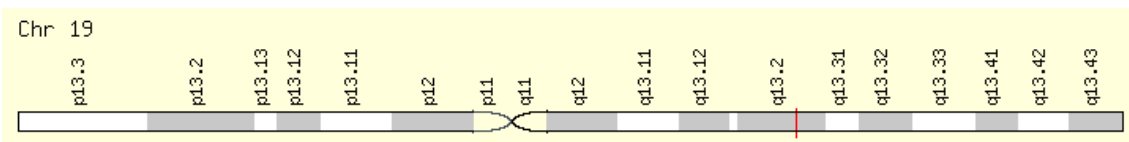


Figura 19. Localização citogenética do gene *TGFβ*1 no cromossoma 19. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TGFβ1&keywords=TGF>).

Ao nível da sua função, o TGF- β 1 é responsável pela regulação dos processos de crescimento, diferenciação e morte celular, maioritariamente pela mediação de respostas imunitárias do tipo Th2 e pela remodelação da matriz extracelular, o que o torna numa

citocina abundante numa grande variedade de tecidos (Fi *et al.*, 2008; Lebrun *et al.*, 2012; Xu e Pasche, 2007; Kemik, 2011; Kubiczkova *et al.*, 2012). Contudo, e à semelhança do que ocorre com a maioria das citocinas, o TGF- β 1 pode adquirir um papel promotor ou dissuasor no crescimento tumoral (Lebrun *et al.*, 2012; Kemik, 2011; Kubiczkova *et al.*, 2012). A totalidade dos estudos que associam o TGF- β 1 com o aparecimento de carcinoma têm evidenciado esta citocina como sendo um agente protetor em fases iniciais do desenvolvimento de carcinoma, e como um fator de risco e de metastização em fases mais avançadas (Céspedes *et al.*, 2012; Fi *et al.*, 2008; Lebrun *et al.*, 2012; Xu e Pasche, 2007; Kemik, 2011; RIEC, 2014; Yang e Yang, 2010; Langenskiöld *et al.*, 2008; Kubiczkova *et al.*, 2012). O momento a partir do qual esta citocina passa de anti-cancerígena para pró-cancerígena ainda não se encontra estabelecido (Xu e Pasche, 2007).

1.4.1.8 Importância do estudo de citocinas em carcinomas

Devido ao papel preponderante das citocinas na regulação dos processos imunitários, estas proteínas têm vindo a ser consideradas importantes biomarcadores de células tumorais, nomeadamente em CCR. Embora ainda sejam necessários trabalhos científicos que esclareçam o impacto da ação das citocinas no risco de CCR, é possível prever o papel que algumas destas moléculas poderão ter no desenvolvimento deste tipo de carcinoma.

A IL-1 β surge caracterizada na literatura como indicadora de mau prognóstico para CCR, dado ser dependente do microambiente tumoral e aparecer associada aumento do risco de carcinomas mais severos e invasivos (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Apte *et al.*, 2015; Maihofner *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 2006). Por sua vez, IL-1 α tem sido qualificada como anti-tumoral, devido ao retro-controlo negativo que exerce sobre a IL-1 β e pelo seu papel bloqueador na progressão de células tumorais como o verificado nos estádios precoces do carcinoma da pele (Apte *et al.*, 2015; Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Murphy *et al.*, 2003). Contudo, esta citocina também foi referenciada como sendo pró-tumoral, no que se refere aos processos de angiogénese no carcinoma do cólon e do fígado (Sakurai *et al.*, 2008; Matsuo *et al.*, 2009). O IL-1Ra tem sido descrito como um agente anticancerígeno, na medida em que impede as funções pró-inflamatórias desempenhadas pela IL-1 β e que impede a progressão dos processos de angiogénese e metastização tumoral, diminuindo assim a suscetibilidade para os processos de

carcinogénese (Apte *et al.*, 2015; La *et al.*, 1999; Garlanda *et al.*, 2013; Yuzhalin e Kutikhin, 2014; La *et al.*, 2001). Este antagonista da IL-1, foi detetado em variados tipos de carcinomas, nomeadamente, em casos de carcinoma gástrico, cervical, pele, mamário, próstata e colo-retal (Yuzhalin e Kutikhin, 2014, La *et al.*, 2001).

Ao nível do TNF- α , a sua expressão têm surgido associada ao aumento do risco de carcinoma. Esta associação deve-se à sua deteção em células pré-cancerígenas em casos de leucemia linfocítica crónica, carcinoma cervical, carcinoma da próstata e carcinoma mamário (Wang e Lin, 2008). Esta citocina também foi associada ao crescimento de micrometastases no fígado, um dos primeiros locais de metastização de CCR, e na promoção da carcinogénese em indivíduos com carcinoma do cólon e reto (Yuzhalin e Kutikhin, 2014 ; Jiao *et al.*, 2014; Popivanova *et al.*, 2008; Stanilov *et al.*, 2014; Osório-Costa e Carvalheira, 2013; Stanilov *et al.*, 2010). Assim sendo, o TNF- α parece estar implicado nas diferentes fases que caracterizam o processo de carcinogénese, nomeadamente, as fases de iniciação, promoção e progressão de carcinoma (Osório-Costa e Carvalheira, 2013).

Por sua vez, o estudo da IL-2 tem sido direcionado para casos de carcinoma do pulmão, carcinoma mamário, carcinoma do intestino delgado, carcinoma do fígado e carcinoma da próstata (Olejniczak *et al.*, 2008). Na grande maioria dos casos tem-se verificado uma associação entre a diminuição dos níveis de IL-2 e o aumento de progressão dos carcinomas para estadios mais avançados (Olejniczak *et al.*, 2008). Esta associação adquire algum fundamento, uma vez que a IL-2 é dotada de propriedades pró-inflamatórias fundamentais no controlo da dispersão tumoral (Olejniczak *et al.*, 2008; Cote-Sierra *et al.*, 2004). Assim, a IL-2 tem sido usada como um agente terapêutico em fases avançadas no combate de carcinoma renal, melanoma, linfoma carcinoma de bexiga e leucemia mieloide com resultados promissores (Zhu *et al.*, 2015; Rosenberg, 2014; Rosenberg, 2007).

Na maioria dos estudos relativos à IL-6, esta encontra-se associada à uma ação pró-inflamatória e pró-tumoral (Waldner *et al.*, 2012; Gasche *et al.*, 2011; Kakourou *et al.*, 2015). Variados estudos verificaram que a produção de IL-6 em células tumorais funciona como um fator promotor de proliferação celular e de metastização em CCR, via STAT3 (Figura 16) (Esfandi *et al.* 2006; Waldner *et al.*, 2012; Gusdkov *et al.*, 2011; Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Bromberg e Wang, 2009; Waldner *et al.*, 2012; Grivennikov e Karin, 2008). Esta via encontra-se mais frequentemente ativa em casos de carcinoma com mau

prognóstico (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Waldner *et al.*, 2012; Grivennikov e Karin, 2008). Simultaneamente à ativação da via STAT3 encontra-se também à ativação desregulada do fator nuclear kappa B (NF- κ B), um fator de transcrição envolvido em todas as fases e vias de transdução de sinal associadas a inflamação (Figura 20) (Gusdkov *et al.*, 2011; Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Bromberg e Wang, 2009; Waldner *et al.*, 2012; Grivennikov e Karin, 2008).

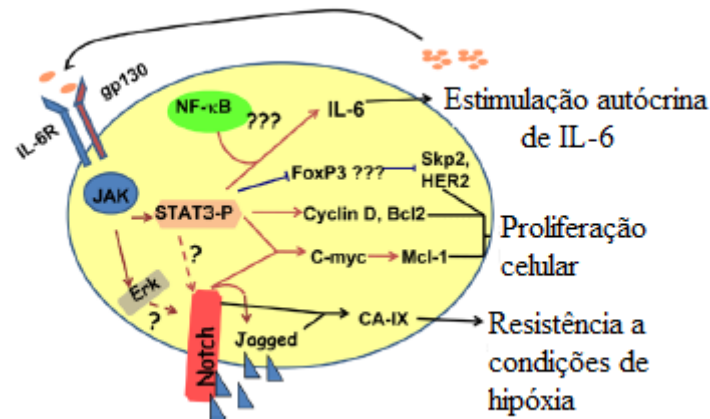


Figura 20. Mecanismo de ativação da via Stat3 através da ação do gene *IL-6* e respostas celulares consequentes desta ação. Adaptado de: Grivennikov e Karin, 2008.

Relativamente à IL-12 e ao IFN- γ ainda pouco é conhecido sobre o seu impacto nos processos de carcinogénese, podendo comportar-se como agentes pró-tumoral ou anti-tumoral, de acordo com as características do microambiente tumoral e os processos inflamatórios inerentes (Figura 19) (Zaidi e Merlino, 2011). Na IL-12, é conhecido o seu papel na proteção de carcinoma em fases de desenvolvimento mais avançadas e no aumento do risco em fases iniciais da carcinogénese em diversos tipos de carcinoma, nomeadamente, carcinoma nasofaríngeal, carcinoma do pulmão e CCR (Ben Chaaben *et al.*, 2011; O'Hara *et al.*, 1998; Colombo e Trinchieri, 2002; Kaarvatn *et al.*, 2012; Lasek *et al.*, 2014; Stanilov *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015). Enquanto que, vários autores têm demonstrado uma associação entre o aumento dos níveis de IFN- γ no sangue e o aumento do risco de colite e carcinoma do cólon, entre outros (Fei *et al.*, 2014), alguns estudos caracterizam esta citocina como um agente terapêutico (Zaidi e Merlino, 2011). No caso particular de CCR o aumento de expressão do IFN- γ tem aparecido associado ao aumento do grau de inflamação dos tecidos e ao aumento do risco de progressão tumoral (Lu *et al.*, 2014).

Finalmente, o TGF- β é responsável pela manutenção da integridade do tecido, através do desencadeamento de processos apoptóticos em células anómalas (Xu e Pasche, 2007). Esta capacidade é devida à ação do tipo autócrina ou parácrina que esta citocina pode possuir, e que tem sido associada à prevenção de carcinoma da próstata, carcinoma mamário, carcinoma do pulmão e carcinoma do cólon (Fi *et al.*, 2008; Lebrun *et al.*, 2012; Kemik, 2011). Contudo, outros estudos têm demonstrado uma associação entre o aumento dos níveis de TGF- β no sangue e o aumento do risco de carcinoma do pâncreas e colo-retal (Yang e Yang, 2010). Relativamente ao CCR, o TGF- β tem sido descrito como um fator preventivo em fases iniciais e fator de risco em fases mais avançadas (Céspedes *et al.*, 2012; Fi *et al.*, 2008; Lebrun *et al.*, 2012; Xu e Pasche, 2007; Kemik, 2011; RIEC, 2014). Esta dualidade de funções deve-se ao fato de o TGF- β ser uma citocina com atividade Th3 (Céspedes *et al.*, 2012; Fi *et al.*, 2008; Lebrun *et al.*, 2012; Xu e Pasche, 2007; Kemik, 2011; RIEC, 2014). A via que tem surgido ativa nos casos em que esta citocina adquire funções pro-tumorogénica é a via das SMADs (SMAD2, SMAD3, SMAD4), a partir da qual o TGF- β sofre um aumento da taxa de mutações e alterações ao nível da expressão e/ou função dos seus recetores (Xu e Pasche, 2007; Kubiczikova *et al.*, 2012).

1.4.1.9 Importância do estudo dos polimorfismos em citocinas

Um polimorfismo pode ser definido como qualquer variante genética com frequências superiores ou iguais a 1% numa determinada população (Jobling *et al.*, 2014). São conhecidos vários tipos de polimorfismos possíveis de ocorrer ao nível do DNA genómico simples, sendo os SNP os mais estudados e frequentes (Stanilov *et al.*, 2013). O estudo de SNP ou mutações pontuais tem ganho cada vez mais importância e interesse, dado que a ocorrência na região promotora pode desencadear alterações nos seus níveis de expressão e ao nível da sua reatividade, nomeadamente, no desencadeamento de respostas inflamatórias (Stanilov *et al.*, 2013). Assim sendo, a ocorrência de SNP's pode provocar modificações genéticas e fenotípicas, que podem levar à modificação do grau de suscetibilidade à qual um determinado indivíduo se encontra sujeito (Stanilov *et al.*, 2013).

Ao nível do CCR tem-se verificado, sobretudo em países desenvolvidos, que o seu desenvolvimento é precedido, muitas das vezes, por processos inflamatórios crónicos

e/ou prolongados, normalmente sob a forma de CU (Landskron *et al.*, 2014; Popivanova *et al.*, 2008; Gök *et al.*, 2015). Assim sendo, torna-se evidente a importância que a ação das citocinas podem adquirir nos processos de tumorigénese, invasão, dispersão e metástase. Por outro lado, como as variantes polimórficas das citocinas alteram a funcionalidade destas torna-se fundamental o estudo de SNP's na investigação dos principais fatores de suscetibilidade ao nível do CCR (Stanilov *et al.*, 2013).

1.4.1.10 Caracterização dos polimorfismos nas citocinas estudadas

O gene da IL-1 integra um complexo de genes na qual se inserem a -1 α , -1 β , -1R e a -1Ra (Dinarello, 1994). Ao nível da região promotora da IL-1 α é possível identificar em polimorfismo localizado na posição -889 e que consiste na substituição do alelo T para o alelo C (Figura 21A) (Lee *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2008; Tseng *et al.*, 2002; Uboldi *et al.*, 2003; Gök *et al.*, 2015; López-Hernández *et al.*, 2015). Este polimorfismo já se encontra devidamente caracterizado, assim como os seus genótipos de alta produção *IL1A* -889TT, de baixa produção *IL1A* -889CC e de produção intermédia *IL1A* 889CT (Tseng *et al.*, 2002; Uboldi *et al.*, 2003). Contudo, os estudos de associação e o impacto deste polimorfismo na área da oncolobiologia, particularmente, ao nível do adenocarcinoma colo-retal ainda são praticamente inexistentes.

Por sua vez e ao nível do gene da IL-1 β são conhecidos vários polimorfismos, entre os quais o polimorfismo *IL1B* -511C/T, localizado na região promotora, e o polimorfismo *IL1B* +3954C/T, localizado na região codificante, intrão 4 (Figura 21B) (Lee *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2008; Harrison *et al.*, 2008; Balasubramanian *et al.*, 2006; Tseng *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2001; Uboldi *et al.*, 2003; Gök *et al.*, 2015; Ito *et al.*, 2007; López-Hernández *et al.*, 2015). Para todos os polimorfismos mencionados anteriormente, já foram executados estudos de associação com o risco de desenvolvimento de vários tipos de carcinoma, entre os quais, o CCR (Fei *et al.*, 1989; Stanilova, 2013; Yuzhalin e Kutikhin, 2011; Tseng *et al.*, 2002). De acordo com o estudo levado a cabo por El-Omar *et al.* foi possível verificar a existência de associação dos polimorfismos mutantes *IL1B* -511T e *IL1B* +3954T com o aumento do risco de CG. Noutro estudo realizado por Ito *et al.* foi possível encontrar associação entre o aumento da prevalência de indivíduos portadores do genótipo *IL1B* -511CT e a diminuição do risco de CG e CCR (El-Omar *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2007)

Relativamente aos restantes elementos da família da IL-1, o IL-1Ra é caracterizado por possuir o polimorfismo *IL1RA* mspa111100, responsável pela substituição de T para C (Figura 21C), e o IL-1R é caracterizado por possuir o polimorfismo pst1970, responsável pela substituição de C para T (Tseng *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2001; Uboldi *et al.*, 2003). Apesar de serem polimorfismos relevantes para o funcionamento da IL-1, não existem estudos de associação destes SNPs ao nível do adenocarcinoma colo-retal.

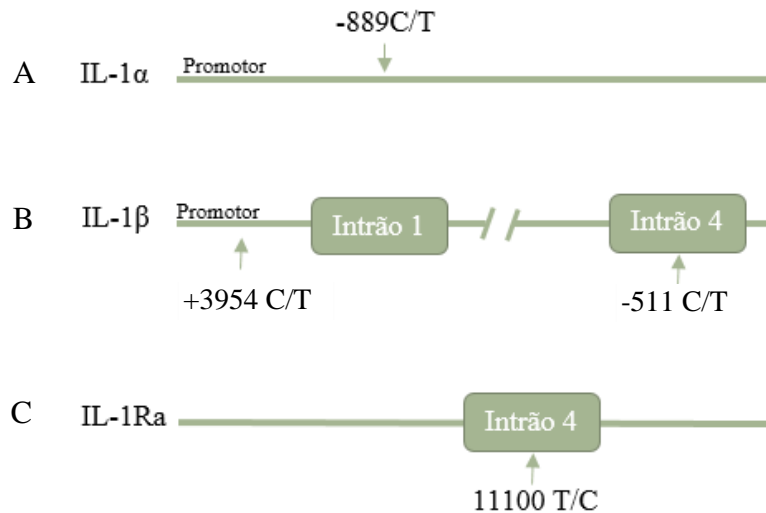


Figura 21. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene (A) *IL1A*, (B) *IL1B* e (C) *IL1Ra*.

Ao nível do TNF- α , os principais polimorfismos estudados encontram-se localizados na região promotora, mais concretamente nas posições -308 e -238, e ambos consistem na substituição de G para A (Figura 22) (Stanilov *et al.*, 2013; Landi *et al.*, 2003; Wang e Lin, 2008). Para ambos os polimorfismos, têm sido identificados como alelos de elevada produção de TNF- α o *TNFA* -308A e o *TNFA* -238A e como alelos de baixa produção o *TNFA* -308G e o *TNFA* -238G. O estudo de ambos os SNPs tem sido executado por vários autores com o intuito de averiguar o seu impacto na suscetibilidade para o desenvolvimento de vários tipos de carcinoma, nomeadamente, o CCR (Stanilov *et al.*, 2013; Landi *et al.*, 2003; Wang e Lin, 2008). Segundo Wang e Lin, o aumento de expressão de TNF- α no sangue, provocada pelo aumento da prevalência dos genótipos de alta expressão *TNFA* -308AA e *TNFA* -308GA parece promover o aumento do risco de CCR. Por sua vez, Jang e sua equipa verificaram uma associação entre o aumento da

frequência do alelo *TNFA* -238A e a diminuição do risco de CCR (Jang *et al.*, 2001; Wang e Lin, 2008)



Figura 22. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene *TNFA*.

Relativamente à *IL2*, existem dois polimorfismos que têm sido intensivamente estudado em várias áreas de investigação, nomeadamente, os polimorfismos *IL2* T/G -330 e *IL2* G/T +166 (Figura 23). Ao nível do polimorfismo *IL2* -330T\G foi identificado o *IL2* -330GG como genótipo de alta produção e o genótipo *IL2* -330TT como sendo de baixa produção (Zhao e Wang, 2015; Uboldi *et al.*, 2003; Barkhordari *et al.*, 2010; Sişman *et al.*, 2007; Sayad e Movafagh, 2014). Adicionalmente foi identificado em ambos os polimorfismos, *IL2* T/G -330 e *IL2* G/T +166 os haplótipos (*IL2* -330/+166) GG-GG e (*IL2* -330/+166) GG-TG como sendo altos produtores e os haplótipos (*IL2* -330/+166) TG-TT e (*IL2* -330/+166) TT-TT como sendo baixos produtores de IL-2 (Zhao e Wang, 2015; Uboldi *et al.*, 2003; Barkhordari *et al.*, 2010; Sişman *et al.*, 2007; Sayad e Movafagh, 2014). Devido à sobre expressão que tem sido detetada ao nível do gene da IL-2 em vários tipos de carcinoma e doenças inflamatórias presentes no cólon, muitos estudos têm sido executados com a finalidade de averiguar a associação entre ambos (Zhao e Wang, 2015; Barkhordari *et al.*, 2010; Sişman *et al.*, 2007). Zhao e Wang verificaram uma associação entre o aumento da frequência do alelo mutante *IL2* -330G e o aumento do risco de carcinomas no trato gastro-intestinal (Zhao e Wang, 2015). Por sua vez, Barkhordari e os seus colaboradores demonstraram uma associação entre o aumento da prevalência do haplótipo de produção intermédia (*IL2* -330/+160) TG e o aumento do risco de DII (Barkhordari *et al.*, 2011).

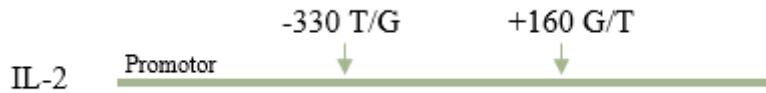


Figura 23. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene *IL2*.

O papel e impacto da *IL6* no desenvolvimento de carcinoma surge presentemente descrito na literatura como sendo contraditório, pelo que os estudos dos polimorfismos característicos desta citocina se encontram longe de uma resolução (Stanilov *et al.*, 2013; Landi *et al.*, 2003; Maria *et al.*, 2015). Dentre os vários polimorfismos existentes na região promotora da *IL-6*, os mais estudados encontram-se nas posições -174 que consiste na troca de C para G e o +565 caracterizado pela troca de A para G (Figura 24) (Stanilov *et al.*, 2013; Landi *et al.*, 2003; Maria *et al.*, 2015). Os haplótipos de alta produção identificados para ambos os polimorfismos são o (*IL6* -174/565) GG e (*IL6* -174/565) GA, enquanto os haplótipos de baixa produção são o (*IL6* -174/565) CG e (*IL6* -174/565) CA (Maria *et al.*, 2015; Stanilov *et al.*, 2013). Segundo Uchiyama *et al.*, o aumento dos níveis de *IL-6* na corrente sanguínea pode provocar um aumento do risco de CCR. Por sua vez, Sugimoto *et al.* e Sampaio *et al.* verificaram uma associação entre o aumento da frequência do alelo alta produção -174G e o aumento do risco de CG (Uchiyama *et al.*, 2012; Sampaio *et al.*, 2015; Sugimoto *et al.*, 2010).



Figura 24. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene *IL-6*.

Ao nível da *IL12*, a subunidade $-\beta$ tem sido a principal implicada no desenvolvimento de carcinoma, sendo um desses polimorfismos localizado na região não transcrita do terminal 3' (UTR), mais concretamente na posição +1188 que consiste em uma substituição de A para C (Figura 25) (Stanilov *et al.*, 2013; Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Navaglia *et al.*, 2005; Ben Chaaben *et al.*, 2011; Kaarvatn *et al.*, 2012). O alelo *IL12* +1188C tem sido referenciado como sendo um alelo de baixa produção e o alelo A como sendo de elevada produção, pelo que o genótipo *IL12* +1188AA é considerado de elevada

produção, o genótipo *IL12* +1188AC é considerado de produção intermédia e o genótipo *IL12* +1188CC é considerado de baixa produção (Ben Chaaben *et al.*, 2011; Kaarvatn *et al.*, 2012). Na sua generalidade, a IL-12 têm sido apontada como um fator de risco para o desenvolvimento de vários tipos de carcinoma, uma vez que favorece os processos de tumorigénese e carcinogénese e no caso particular de adenocarcinoma colo-retal a presença do genótipo *IL12* +1188AA proporciona um risco acrescido para o seu desenvolvimento, comparativamente a portadores dos genótipos *IL12* +1188AC e *IL12* +1188CC (Stanilov *et al.*, 2013; Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Ben Chaaben *et al.*, 2011; Kaarvatn *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015). Esta associação surge descrita no estudo levado a cabo por Sun e colaboradores, corroborado pelos trabalhos de Kaarva *et al.* e López-Hernández *et al.*, onde se verificou uma associação entre o aumento da frequência do alelo *IL12* +1188A e o aumento do risco de CCR (Hernández *et al.*, 2015; Kaarvatn *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015)



Figura 25. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene *IL12*.

O IFN- γ é dotado de um polimorfismo localizado no intrão 1, mais concretamente na posição +874 e consiste na substituição de T para A (Figura 26) (Srivastava *et al.*, 2014; Barkhordari *et al.*, 2010; Sarvari *et al.*, 2014). Muito embora seja do conhecimento científico que o alelo *IFNG* +874T e o genótipo *IFNG* +874TT constituam o alelo e o genótipo de alta produção do IFN- γ , pouco ou nada se sabe sobre a sua associação com o risco de desenvolvimento de carcinoma, particularmente, CCR (Sarvari *et al.*, 2014). Sarvari e os seus colaboradores não conseguiram estabelecer uma associação entre o risco de CCR e a prevalência do polimorfismo mutante *IFNG* +874T. Por sua vez, López-Hernández e colaboradores verificaram uma maior prevalência do genótipo de alta produção *IFNG* +874CC em indivíduos com CU (Hernández *et al.*, 2015; Sarvari *et al.*, 2014).



Figura 26. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene *IFNG*

Por fim, os polimorfismos mais investigados ao nível do TGF- β localizam-se na região promotora do gene, nomeadamente, nas posições +869 do codão 10 e +915 do codão 25 e consistem nas substituições de T para C e de G para C, respetivamente (Figura 27) (Lee *et al.*, 2010; Uboldi *et al.*, 2003; Gök *et al.*, 2015). Quer ao nível do codão 10 ou 25 o genótipo CC surge como sendo um genótipo de baixa produção (Uboldi *et al.*, 2003). Particularmente ao nível do codão 10, o alelo T tem vindo a ser associado a um alelo de produção elevada, enquanto ao nível do codão 25 o genótipo GG têm sido associado a uma elevada produção de TGF- β e encontra-se muito presente em algumas populações europeias (Uboldi *et al.*, 2003). Tal como já mencionado anteriormente, muita investigação tem sido executada sobre a associação desta citocina com o aumento do risco de desenvolvimento de adenocarcinoma cólon retal, devendo este interesse ao fato do seu mecanismo de ação e função se encontrar interligado com o mecanismo de ação de outras citocinas, como por exemplo, o IL-4R e a IL-6 (Becker *et al.*, 2004; Osório-Costa e Carvalheira, 2013; Céspedes *et al.*, 2012; Fi *et al.*, 2008; Xu e Pasche, 2007; Yang e Yang, 2010; Langenskiöld *et al.*, 2008; Kubiczkova *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010). O estudo de Langenskiöld *et al.* demonstrou uma associação entre níveis elevados de TGF- β na corrente sanguínea e o aumento do risco de metástase em CCR (Langenskiöld *et al.*, 2008). Por outro lado, Lee *et al.* verificaram uma associação entre o aumento da frequência do alelo T no codão 10 e o aumento do risco de carcinoma do colón (Lee *et al.*, 2010).

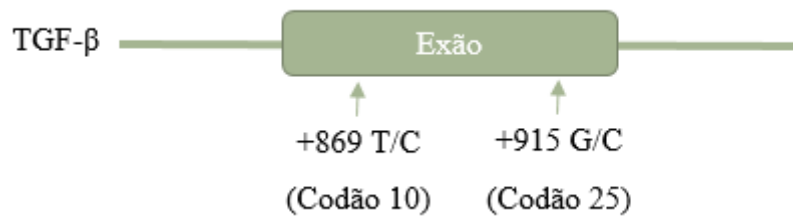


Figura 27. Representação esquemática da localização das posições polimórficas do gene *TGFβ*.

1.4.1.11 Polimorfismos das citocinas e carcinoma colo-retal

Tal como já referido anteriormente, as citocinas constituem os principais mediadores inflamatórios presentes no organismo humano e a ocorrência de polimorfismos ao nível das suas regiões promotoras pode desencadear a evolução da inflamação para uma condição crónica, e conseqüentemente uma condição de risco propícia ao desenvolvimento de CCR (Stanilov *et al.*, 2013; Krzystek-Korpacka *et al.*, 2013; Sáenz-López *et al.*, 2008; López-Hernández *et al.*, 2015). Sendo assim, os estudos de associação entre os fatores gene e doença têm permitido uma melhor compreensão sobre os possíveis impactos que a ocorrência de polimorfismos em citocina pode adquirir na promoção/prevenção do adenocarcinoma colo-retal (Stanilov *et al.*, 2013). Todavia torna-se importante referir que, quando se consideram vários estudos, nem sempre esta relação entre a ocorrência de polimorfismos em citocinas e carcinoma é clara ou concordante (Gök *et al.*, 2015).

O polimorfismo *IL1B* -511 tem sido apontado como redutor do risco de desenvolvimento de carcinoma colo-retal, na presença do alelo T (Stanilov *et al.*, 2013; Tseng *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2007). Contudo, estes estudos foram realizados em populações Asiáticas, onde o alelo T é mais frequente, comparativamente às populações Europeias, pelo que as frequências alélicas nestas populações e o risco associado ao desenvolvimento deste tipo de carcinoma poderão ser distintos (Tseng *et al.*, 2001). A questão geográfica impõem-se no polimorfismo *IL1B* +3954 C/T (Tseng *et al.*, 2001), uma vez que à semelhança do polimorfismo *IL1B* -511 C/T, ainda não foram executados estudos de associação em populações europeias. Por outro lado, no caso do polimorfismo -889 C/T localizado no gene *IL1A*, embora existam estudos em populações Europeias, não existem referências a estudos realizados em CCR (Balasubramanian *et al.*, 2006;

Harrison *et al.*, 2008; Gök *et al.*, 2015; López-Hernández *et al.*, 2015). Apenas um estudo, levado a cabo por Lee e colaboradores, executou o estudo da associação entre o polimorfismo *IL1A* -889 C/T e o risco de desenvolvimento de CCR em coreanos (Lee *et al.*, 2010).

Por sua vez, e relativamente ao gene *TNFA* os dois polimorfismos que o caracterizam (*TNFA* -308 G/A e *TNFA* -238 G/A) têm sido alvo de estudo de associação com o CCR (Waterston e Bower, 2004; Wang e Lin, 2008; Balasubramanian *et al.*, 2006). No caso particular do polimorfismo *TNFA* -238 G/A, verificou-se que os portadores dos genótipos AA/GA apresentam uma menor suscetibilidade para o CCR, assim como os portadores do alelo A (Stanilov *et al.*, 2013; Wang e Lin, 2008). Por outro lado, o polimorfismo *TNFA* -308 G/A apresenta resultados contraditórios, uma vez que há registo da sua associação e da não-associação com o risco de desenvolvimento de adenocarcinoma colo-retal. Os autores Wang e Lin referem que indivíduos portadores do genótipo *TNFA* -308AA/GA apresentam níveis de expressão superiores de TNF- α , fator que os mesmos associam ao aumento do risco de desenvolvimento de adenocarcinoma colo-retal derivado de colite ulcerativa (Wang e Lin *et al.*, 2008). Esta associação foi igualmente verificada por Theodoropoulou e os seus colaboradores num estudo realizado na população Grega, e por Gök, Uçar e Ozgur na população Turca (Gök *et al.*, 2015; Stanilov *et al.*, 2013). Porém, outros estudos falharam ao tentar demonstrar alguma associação entre polimorfismos -308 do *TNFA* e o risco de desenvolvimento da mesma doença (Stanilov *et al.*, 2013; Landi *et al.*, 2003).

Em relação aos polimorfismos -174 da *IL-6*, um estudo liderado por Landi e colaboradores propôs a existência de uma correlação entre baixos níveis de expressão do alelo *IL-6* -174 C e um aumento dos níveis de inflamação nas células de indivíduos com carcinoma do colo-retal esporádico (CCRE) (Landi *et al.*, 2003). Todavia, esta associação ganha uma maior relevância em estadios avançados do desenvolvimento tumoral e de metastização (Stanilov *et al.*, 2013). Apesar disso, a maioria dos estudos relacionam o aumento da suscetibilidade de CCR à presença do alelo de alta produção da *IL-6* +565G (Stanilov *et al.*, 2013). Belluco e os seus colaboradores verificaram que pacientes com CCR possuem tendencialmente níveis de *IL-6* mais elevados no sangue e são portadores do genótipo *IL-6* GG (alto produtor) (Stanilov *et al.*, 2013).

Por sua vez, ao nível do polimorfismo da +1188 A/C que caracteriza a *IL-12*, tal como já referido, foi implicado no aumento de suscetibilidade para o desenvolvimento de vários

tipos de carcinoma, entre os quais, o CCR (Stanilov *et al.*, 2013; Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Ben Chaaben *et al.*, 2011; Kaarvatn *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015). Todavia, apenas foi possível encontrar um estudo de suscetibilidade entre o polimorfismo +1188 e o desenvolvimento de CCR (Stanilov *et al.*, 2013). Neste estudo, executado em indivíduos Búlgaros, não foi possível identificar diferenças significativas entre os grupos controlo e o grupo de indivíduos com CCR (Sun *et al.*, 2015). Sendo assim, é possível identificar uma carência, quer em termos de numéricos quer em termos étnicos de estudos de associação entre o polimorfismo *IL12* +1188 A/C e a maior/menor suscetibilidade de desenvolvimento de CCR. Esta carência de estudos é ainda maior quando se considera o polimorfismo +874 presente no *IFN- γ* , onde a maioria dos estudos incidem em outras patologias que não o carcinoma (Srivastava *et al.*, 2014; Sarvari *et al.*, 2014; López-Hernández *et al.*, 2015). Na realidade, a maioria dos estudos que envolvem o polimorfismo +874 do *IFNG*, são relativos a estudos de associação e/ou suscetibilidades de desenvolvimento de DII ou tratando-se de processos de carcinogénese os resultados obtidos são considerados inconclusivos (Landi *et al.*, 2006; Landi *et al.*, 2003; Landskron *et al.*, 2014; Osório-Costa e Carvalheira, 2013; Luziana *et al.*, 2012; Bromberg e Wang, 2009; Hanada *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2007; Krzystek-Korpacka *et al.*, 2013; Van *et al.*, 2005; Waldner *et al.*, 2012; Trifunović *et al.*, 2015).

Embora não existam estudos sobre o impacto dos polimorfismos da *IL-2* e do *TGF- β* no CCR, alguns estudos têm demonstrado uma associação com outras patologias e carcinomas. Sayad e Movafagh verificaram uma associação entre o aumento da prevalência do genótipo *IL2* -330TT e o aumento do risco dos indivíduos virem a desenvolver Esclerose Múltipla (EM) (Sayad e Movafagh, 2014). Por sua vez, Barkhordari *et al.* demonstraram uma relação entre o aumento da prevalência do haplótipo (*IL2* -330/+160) GT e o aumento do risco de aparecimento de Síndrome do Cólon Irritável (SCI) (Barkhordari *et al.*, 2010). Relativamente a estudos de associação entre os polimorfismos que caracterizam a *IL-2*, apenas existe um estudo de associação em CG, na qual o aumento da frequência do alelo *IL2* -330T e *IL2* +160T surge associado ao aumento do risco para este tipo de carcinoma (Segimoto *et al.*, 2015). No caso do *TGF- β* , apenas existe um estudo que relaciona o seu aumento ao nível da corrente sanguínea e o aumento do risco de CG (Li *et al.*, 2008). Os restantes estudos falharam em demonstrar uma associação entre os níveis ou graus de expressão do *TGF- β* com o risco de desenvolvimento de carcinoma mamário e carcinoma uterino (Gonullu *et al.*, 2007; Stanczuk *et al.*, 2002).

Deste modo, o estudo do papel desempenhado pelas citocinas, bem como, as consequências que advêm dos polimorfismos que ocorrem nas mesmas, são relevantes na investigação dos fatores inflamatórios que tornam certos indivíduos mais suscetíveis ao desenvolvimento de CCR.

1.5 Objetivos

O principal objetivo do presente estudo foi pesquisar associações estatísticas entre a presença de vários polimorfismos localizados na sequência dos genes que codificam citocinas e a susceptibilidade para desenvolver adenocarcinoma colo-retal esporádico (ACRE). Para cumprir este objetivo foi seguido uma abordagem do tipo caso-controlo, em que foi analisada uma amostra de 156 indivíduos de nacionalidade portuguesa. O grupo controlo foi constituído por 100 indivíduos saudáveis, enquanto o grupo de casos foi constituído por 56 biópsias, previamente diagnosticadas com ACRE.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Constituição da amostra

Na pesquisa dos polimorfismos definidos, foram utilizadas para este estudo um grupo controlo de 100 amostras de indivíduos saudáveis e um grupo de 56 biopsias de indivíduos com CCRE (Figura 28). Todas as amostras foram previamente fixadas em formol e incluídas em parafina, sendo depois selecionadas de acordo com o seu tipo histológico e segundo os critérios estabelecidos pela OMS (Figura 6). As amostras foram coletadas a partir dos arquivos do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (IAP-FMUC) e o seu processamento foi executado no Laboratório de Patologia Molecular pertencente ao mesmo instituto. O período temporal das amostras selecionadas encontra-se compreendido entre os anos de 2009 e 2011 e todo o estudo foi aprovado pelo comité de ética (CIMAGO- Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal).

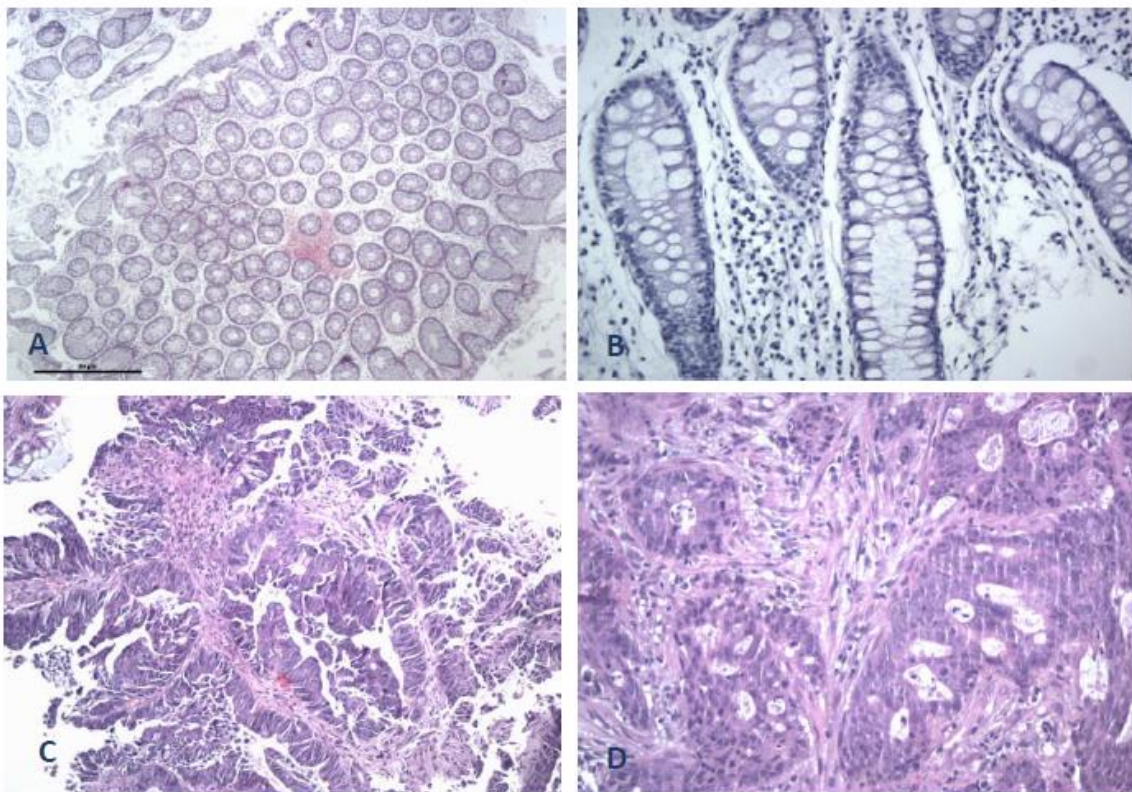


Figura 28. (A), (B) Imagem Histológica da mucosa colónica normal: 40x HE (Haematoxylin-eosin), 200x HE; (C), (D) Imagem Histológica de adenocarcinoma colo-retal esporádico bem diferenciado (De acordo com critérios da OMS). 100x HE; 200x HE. Imagem proveniente do IAP-FMUC.

Das 56 biopsias de CCRE, 75% correspondiam a indivíduos do sexo masculino (N=42), enquanto 25% correspondiam a indivíduos do sexo feminino (N=14) (Tabela 1). A idade média dos indivíduos com CCRE era 70.0 +/-11.0 anos. A seleção das amostras foi executada de acordo com o número de células malignas, sendo o critério quantitativo de seleção base para o estudo um valor superior a 60. Com base neste critério e após a avaliação clínica pelo Patologista, obtiveram-se 24 amostras correspondentes à região do cólon e 32 amostras correspondentes à região do reto. Relativamente à classificação histológica das amostras, todas foram classificadas como sendo ACRE bem diferenciado (Figura 28 C,D).

Tabela 1. Caracterização dos grupos da amostra em estudo

Grupo	Sexo	%	Idade		Localização Tumoral				Total
			Média	Des. Padrão	Cólon		Reto		
					n	%	n	%	
CCRE	Masculino	75	70.0	11.0	19	79	24	75	42
	Feminino	25			5	21	8	25	14
	Total	100			24	100	32	100	56
Controlo	Masculino	79							
	Feminino	21	72.7	10.7					
	Total	100							

2.2 Estudo das variantes polimórficas

2.2.1 Extração de DNA

Dado que as amostras de DNA se encontram incluídas em parafina, efetuou-se primeiramente o processo de extração do DNA a partir de blocos de parafina. Este processo consistiu na microdissecação de cada bloco, seguido da colocação de 5 a 10 cortes com cerca 10µm de grossura cada em tubos de 1,5 ml, ao qual se adicionou depois 1000µl de xilol como forma de dissolver a parafina. De seguida, centrifugou-se a 11,000xg durante 3 minutos, descartando-se depois o sobrenadante e lavando-se as

amostras com 1 ml de etanol (96%-100%), a fim de se repetir novamente o ciclo de centrifugação. Para assegurar uma lise eficaz adicionou-se ao pellet Proteinase K “overnight”, sendo depois completado o protocolo de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo fornecedor do kit em utilização. Após a finalização do protocolo, obtiveram-se amostras de DNA purificadas que foram depois armazenadas a uma temperatura de – 20°C até ao momento de utilização. A extração de DNA foi depois executada de acordo com o protocolo proveniente do kit NZY Tissue gDNA Isolation Kit (NZYTech, Lisbon, Portugal).

2.2.2 Análise da qualidade e grau de pureza do DNA extraído

As amostras de DNA foram quantificadas num espectrofotómetro *GeneQuant Pro* (Biochrom, Cambridge, Inglaterra), utilizando-se como tampão de referencia *RNAse-free water*. De seguida, utilizou-se 7 µl de amostra de DNA para a quantificação da concentração de DNA e determinação da pureza da amostra, através da leitura a densidades óticas adequadas (230 nm, 260 nm e 280 nm). A um comprimento de onda de 280nm é detetada a existência de nucleótidos e de proteínas. Por sua vez, a 260nm é detetada apenas a existência de nucleótidos e a 230 nm é detetada presença de sais na amostra (Maniats *et al.*, 1989).

2.3 Tipagem Genética

A tipagem genética foi realizada com recurso à amplificação das regiões que estão na origem dos alelos alvo em estudo (Tabela 2). Para tal recorreu-se à técnica de *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers* (PCR-SSP). A deteção dos polimorfismos através de PCR-SSP foi executada a partir de um protocolo pré-estabelecido (Tabela 3) no termociclador MyCycler Personal (BioRad, Califórnia, EUA), com capacidade para 96 poços. Os *primers* utilizados estão incluídos no kit comercial “Nutri Box Kit” e são específicos de cada polimorfismo (Genebox, Cantanhede – Portugal).

Tabela 2. Descrição dos polimorfismos estudados.

	NCBI SNP <i>DataBase</i>	Região do gene	Posição	Alelos
IL-1 α	rs1800587	Promotora	-889	T>C
IL-1 β	rs16944	Intrão 4	-511	C>T

	rs1143634	Promotora	+3954	C>T
IL-1R	rs2234650	-	Pst1970	C>T
IL-1Ra	rs315952	Intrão 4	+11100	T>C
TNF- α	rs361525	Promotora	-238	G>A
	rs1800629	Promotora	-308	G>A
IL-2	rs2069762	Promotora	-330	T>G
	rs2069763	Promotora	+160	G>T
IL-6	rs1800795	Promotora	-174	C>G
	rs1800797	Promotora	nt565	A>G
IL-12	rs3212227	3' UTR	+1188	G>C
IFN- γ	rs2430561	Intrão 1	+874	T>A
TGF- β 1	rs1982073	Codão10	+869	T>C
	rs1800471	Codão 25	+915	G>C

Tabela 3. Ciclos de temperatura e de tempos que caracterizam o programa de PCR utilizado na amplificação dos polimorfismos em estudo

Passo	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	1'	1
Desnaturação	95°C	25''	
Emparelhamento	70°C	45''	5
Extensão	72°C	30''	
Desnaturação	95°C	25''	
Emparelhamento	65°C	45''	21
Extensão	72°C	30''	
Desnaturação	95°C	25''	
Emparelhamento	55°C	1'	4
Extensão	72°C	2'	
Extensão final	72°C	10'	1

2.4 Visualização por eletroforese em gel de agarose

Após a amplificação, os produtos da reação de PCR foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose (NZYTech, Lisbon, Portugal) a 2% em TAE 1x (*Tris-acetate-EDTA*) (NZYTech, Lisbon, Portugal) de modo a visualizar o produto amplificado. Para tal, dissolveu-se agarose e TAE em água destilada por 15 segundos, sendo depois esta solução transferida para o micro-ondas durante cerca de 2 minutos a 900W, a fim de dissolver toda a agarose adicionada. De seguida e após o arrefecimento da solução, adicionou-se 1×10^{-5} SYBR Safe (Molecular Probes, Oregon – USA), um reagente que permite a melhor visualização do DNA sob incidência de luz ultravioleta (UV), e agitou-se a solução por 15 segundos para homogeneização da mesma, sendo depois colocada num suporte destinado à sua solidificação, que ocorreu por efeito da temperatura ambiente. Após solidificar colocou-se o gel no suporte destinado à execução da eletroforese, previamente preenchido com tampão TAE 1x (NZYTech, Lisbon, Portugal), e onde se colocaram as amostras nos poços existentes do gel. As amostras foram depois submetidas a uma corrente elétrica de 300 volts, através do uso do aparelho *Power Pac Basic device* (Bio-Rad, California, USA), durante 10 minutos. Finalmente, visualizou-se o produto de PCR contido em cada amostra através do uso de um transiluminador (UVi Tech, Cambridge, United Kingdom) e registaram os resultados por meio de câmara digital (NIKON DMX1200F).

2.5 Análise estatística

2.5.1. Análise da Pureza e da Concentração de DNA

A fim de averiguar o grau de pureza e concentração das amostras estudadas foi necessária a execução do cálculo da média, desvio padrão e intervalo de confiança para cada uma das amostras, em relação ao seu grau de concentração e de pureza obtido a partir da técnica de espectrofotometria. Esta análise tem como principal objetivo verificar se os padrões de qualidade obtidos eram viáveis na validação dos resultados obtidos e discutidos neste trabalho.

2.5.2 Análise das frequências Alélicas e Genóticas

Os desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os polimorfismos bialélicos foram testados com recurso ao teste Qui-Quadrado (χ^2) implementado no programa informático PLINK 1.07 (Purcell *et al.*, 2007). Para comparar o espectro de frequências

alélicas e genóticas entre grupos (caso e controlo) foram utilizados o teste de Qui-Quadrado (χ^2), para $N > 5$, e o Teste Exato de Fisher, para $N < 5$, implementados no programa informático STATISTICA 14 (StatSoft, Inc., 2013). Os resultados observados foram, posteriormente confirmados e ajustados para o sexo e para a idade pelo teste de Fisher implementado o programa estatístico PLINK 1.07 (Purcell *et al.*, 2007). Foi considerada a probabilidade de ocorrência de um erro tipo I (α) de 0,005 em todas as análises inferenciais realizadas.

III. RESULTADOS

3.1 Qualidade das amostras estudadas

A concentração de DNA obtida neste estudo não foi uniforme ($\pm 29,3 \mu\text{g/ml}$) e foi inferior ao valor considerado normal ($100 \mu\text{g/ml}$) (Green e Sambrook, 2012) (Tabela 4). Por outro lado, enquanto algumas amostras apresentaram elevadas quantidades de proteína, outras continham níveis de contaminação acima dos intervalos normais (1,6-1,8 para D.O.260nm/D.O.280nm e de 0,4-0,6 para O.D.230nm/O.D.260nm) (Green e Sambrook, 2012) (Tabela 4). Os elevados níveis de contaminação devem-se ao facto de as amostras utilizadas no estudo serem parafinadas. Adicionalmente, os coeficientes de variância obtida em algumas das amostras encontrava-se fora dos padrões normais de concentração e de qualidade de DNA. Contudo, as amostras apresentaram um grau de eficiência aceitável e a sua amplificação por PCR-SSP decorreu sem problemas, uma vez que o protocolo utilizado se encontra adaptado às concentrações de DNA utilizado no estudo.

Tabela 4. Média e desvio-padrão relativos aos valores de pureza e de concentração das amostras de DNA estudadas.

	Concentração	O.D.260nm/O.D.280nm	O.D.230nm/O.D.260nm
Média	42.4	1.83	0.54
Desvio Padrão	29.316	0.09	0.15
Coefficiente de Variação	69.14%	5%	28%
Intervalo de confiança (95%)		1.7-1.9	0.4-0.7

3.2 Normalidade da amostra

Os grupos (caso e controlo) encontram-se no equilíbrio de Hardy-Weinberg, à exceção dos polimorfismos *TNFA* -238 e *TGFB* +869. Contudo, estes genes podem encontrar-se sujeitos a pressões seletivas devido à sua interação com agentes patogénicos, como a doença da malária no caso de ambos os polimorfismos e o surgimento de Sépsis no caso do TGF- β (Omer, Riley, 1998; Kent *et al.*, 2009). Deste modo, todos os resultados foram

tomados em consideração. Para análise das variáveis sexo e idade não se verificaram diferenças significativas entre os grupos controlo e com ACRE.

Tabela 5. Resultados do teste ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os marcadores estudados

Cromossoma	Gene	SNP	P-HW Total (N=156)	P-HW Controlo (N=100)
2	IL1A -889	rs1800587	0,0224	0,635
2	IL1B -511	rs16944	1	0,671
2	IL1B +3960	rs1143634	0,123	0,578
2	IL1R -1970	rs2234650	0,019	0,273
2	IL1RA 11100	rs315952	1	0,341
6	TNFA -308	rs361525	0,024	≤0,00001
6	TNFA -238	rs1800629	0,170	0,054
4	IL2 -330	rs2069762	0,412	0,385
4	IL2 +160	rs2069763	1	0,538
7	IL6 -174	rs1800795	0,002	0,119
7	IL6 nt565	rs1800797	0,284	0,256
3	IL12 +1188	rs3212227	0,861	0,626
12	IFNG +874	rs2430561	0,047	0,533
19	TGFB cod.10	rs1982073	0,033	≤0,00001
19	TGFB cod 25	rs1800471	≤0,00001	0,0006

3.3 Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados no adenocarcinoma bem diferenciado do colo-retal *versus* grupo controlo.

Relativamente aos resultados das frequências alélicas verificamos associação estatisticamente significativa entre os alelos IL1A -889T; IL1B -511C; IL1B +3960T; IL1R -1970T IL1Ra 11100C; TNFA -238A; TNFA -308A; IL2 -330G; IL2 +160G; IL12 1188A; e TGFB cod25C a prevalência de ACRE ($p < 0,05$) (tabela 5). Por outro lado, os alelos IL1A -889C; IL1B -511T; IL1B +3960C; IL1R -1970C; IL1R 11100T; TNFA -238G; TNFA -308G; IL2 -330T; IL2 +160T e IL12 1188C; TGFB cod25G e a ausência de ACRE ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Frequências alélicas em indivíduos com CCR e indivíduos controlo.

Posição	Alelo	Frequências alélicas				Valor de p		95% IC	
		Controlo		CCR		Controlo vs CCR	OR	RR	
		n(200)	%	n(112)	%				
IL-1α									
-889	T	53	27	51	46	0,0005	2,32(1,43-3,77)	1,67(1,25-2,23)	
	C	147	74	61	54	0,0005	0,43(0,27-0,70)	0,60(0,45-0,80)	
IL-1β									
-511	C	76	38	58	52	0,013	1,75(1,20-2,80)	1,43(1,06-1,92)	
	T	124	62	54	48	0,013	0,57(0,36-0,91)	0,70(0,52-0,94)	
+3960	C	155	78	46	41	<0,0001	0,20(0,12-0,33)	0,38(0,29-0,52)	
	T	45	23	66	59	<0,0001	4,94(2,99-8,16)	2,60(1,93-3,50)	
IL-1R									
-1970	C	148	74	43	38	<0,0001	0,22(0,13-0,40)	0,39(0,29-0,54)	
	T	52	26	69	62	<0,0001	4,57(2,78-7,49)	2,53(1,87-3,44)	
IL-1Ra									
11100	T	141	71	55	49	0,0002	0,40(0,25-0,65)	0,57(0,43-0,76)	
	C	59	30	57	51	0,0002	2,48(1,53-4,00)	1,75(1,31-2,34)	
TNF-α									
-238	G	151	76	56	50	0,000005	0,32(0,20-0,53)	0,51(0,38-0,68)	
	A	49	25	56	50	0,000005	3,08(1,89-5,04)	1,97(1,48-2,63)	
-308	G	153	77	61	54	0,00006	0,37(0,22-0,60)	0,55(0,41-0,73)	
	A	47	24	51	46	0,00006	2,72(1,66-4,47)	1,83(1,37-2,43)	
IL-2									
-330	T	118	59	52	46	0,022	0,60(0,54-0,97)	0,72(0,54-0,97)	
	G	82	41	60	54	0,022	1,66(1,04-2,65)	1,38(1,03-1,86)	
160	G	46	23	66	59	<0,0001	4,80(2,31-7,92)	2,56(1,90-3,45)	
	T	154	77	46	41	<0,0001	0,21(0,13-0,34)	0,39(0,29-0,53)	
IL-6									
-174	C	88	44	60	54	NS			
	G	112	56	52	46	NS			
Nt565	A	67	34	46	41	NS			
	G	133	66	66	59	NS			
IL-12									

1188	C	154	77	60	54	0,00002	0,34(0,21-0,57)	0,53(0,40-0,70)
	A	46	23	52	46	0,00002	2,90(1,77-4,77)	1,89(1,42-2,51)
IFN-γ								
+874	T	90	45	53	47	NS		
	A	110	55	59	53	NS		
TGF-β								
Cod.10 (+869)	T	103	52	59	53	NS		
	C	97	49	53	47	NS		
Cod. 25 (+915)	G	181	91	40	36	<0,0001	0,06(0,03-0,11)	0,23(0,17-0,31)
	C	19	10	72	64	<0,0001	17,15(9,31-31,58)	4,37(3,24-5,90)

(N.S- Não significativo; p- Probabilidade; IC- Intervalo de Confiança; RR-Risco Relativo)

Relativamente aos resultados das frequências genóticas verificamos associação entre os genótipos IL1A -889 TC; IL1B +3960 TT; IL1R -1970 TT; IL1RA 11100TT; TNFA -238GA & -238AA; TNFA -308GA; IL2 -330TG; IL2 +160TG; IL6 -174CC; IL6 nt565AA; IL12 +1188AC; IFNG +874 TA; TGF β cod10TC; TGF β cod25 CC & GC e a prevalência de ACRE (p<0,002) (tabela 6). Por outro lado, os alelos IL1A -889CC; IL1B +3960 CC; IL1R -1970 CC; IL1RA 11100CC; TNFA -238GG; TNFA -308GG; IL2 -330TT; IL2 160GG; IL6 nt565AG; IFNG +874AA; IL12 +1188CC; IFNG +874TT & IFNG +874AA; TGF β cod10 GG e a ausência de ACRE (p<0,05) (Tabela 7).

Tabela 7. Frequências genóticas em indivíduos com CCR e indivíduos controlo.

Posição	Alelo	Frequências genóticas				Valor de p	95% IC	
		Controlo		CCR			OR	RR
		n(100)	%	n(56)	%	Controlo vs CCR		
IL-1α								
-889	CC	53	53	11	20	0,00003	0,22(0,10-0,45)	0,35(0,20-0,63)
	TC	40	40	39	70	0,0003	3,44(1,72-6,90)	2,24(1,39-3,60)
	TT	7	7	6	11	NS		
IL-1β								
-511	CC	38	38	13	23	NS		
	TC	47	47	32	57	NS		
	TT	15	15	11	20	NS		
+3960	CC	61	61	11	20	<0,0001	0,13(0,07-0,34)	0,29(0,16-0,51)

	TC	33	33	24	43	NS		
	TT	6	6	21	38	0,000001	9,4(3,50-25,22)	2,87(2,03-4,06)
IL-1R								
-1970	CC	55	55	11	20	0,00001	0,2(0,09-0,43)	0,33(0,19-0,59)
	TC	38	38	21	38	NS		
	TT	7	7	24	43	<0,0001	9,96(3,92-25,33)	3,02(2,12-4,31)
IL-1Ra								
11100	TT	6	6	16	29	0,0002	6,27(2,29-17,18)	2,44(1,69-3,51)
	TC	46	46	25	45	NS		
	CC	48	48	15	27	0,007	0,40(0,19-0,81)	0,54(0,33-0,89)
TNF-α								
-238	GG	59	59	15	27	0,00009	0,25(0,12-0,52)	0,41(0,25-0,67)
	GA	35	35	31	55	0,01	2,30(1,18-4,49)	1,69(1,11-2,57)
	AA	6	6	10	18	0,02	3,41(1,17-9,95)	1,90(1,22-2,98)
-308	GG	65	65	9	16	<0,0001	0,10(0,05-0,23)	0,21(0,11-0,40)
	GA	21	21	38	68	<0,0001	7,94(3,79-16,63)	3,47(2,19-5,49)
	AA	14	14	9	16	NS		
-238/-308	GG	106	53	44	39	0,01	0,57(0,36-0,92)	0,70(0,51-0,95)
	AG	47	24	16	14	0,03	0,54(0,29-1,01)	0,66(0,42-1,03)
	GA	45	23	12	11	0,006	0,41(0,21-0,82)	0,54(0,32-0,91)
	AA	2	1	40	36	<0,0001	55(12,96-233,43)	3,57(2,90-4,40)
IL-2								
-330	TT	37	37	5	9	0,00007	0,17(0,06-0,46)	0,27(0,11-0,62)
	TG	44	44	42	75	0,0001	3,82(1,85-7,86)	2,44(1,46-4,09)
	GG	19	19	9	16	NS		
160	TT	8	8	8	14	NS		
	TG	31	31	30	54	0,005	2,57(1,31-5,04)	1,80(1,19-2,72)
	GG	61	61	18	32	0,0005	0,3(0,15-0,60)	0,46(0,29-0,73)
-330/160	TG	76	38	18	16	<0,0001	0,15(0,07-0,31)	0,31(0,20-0,50)
	GG	78	39	48	43	NS		
	GT	3	2	12	11	0,0005	7,88(2,17-28,57)	2,38(1,76-3,20)
	TT	43	22	34	30	NS		
IL-6								
-174	CC	18	18	22	39	0,003	2,95(1,41-6,18)	1,88(1,26-2,79)
	CG	39	39	16	29	NS		
	GG	43	43	18	32	NS		

Nt565	AA	9	9	16	29	0,002	4,04(1,65-9,92)	2,10(1,42-3,10)
	AG	49	49	14	25	0,003	0,35(0,17-0,71)	0,49(0,29-0,82)
	GG	42	42	26	46	NS		
-174/Nt565	CA	56	14	20	18	0,03	0,56(0,32-0,99)	0,68(0,45-1,02)
	CG	18	30	40	36	<0,0001	5,62(3,02-10,44)	2,43(1,87-3,16)
	GA	10	10	26	23	0,000003	5,74(2,65-12,44)	2,32(1,77-3,03)
	GG	116	46	26	23	<0,0001	0,22(0,13-0,37)	0,36(0,25-0,53)
IL-12								
1188	CC	62	62	14	25	0,000007	0,20(0,10-0,42)	0,35(0,21-0,59)
	AC	30	30	32	57	0,0008	3,11(1,58-6,14)	2,02(1,33-3,08)
	AA	8	8	10	18	NS		
IFN-γ								
+874	TT	25	25	4	7	0,004	0,23(0,08-0,70)	0,34(0,13-0,86)
	TA	40	40	45	80	<0,0001	6,14(2,84-13,27)	3,42(1,92-6,10)
	AA	35	35	7	13	0,002	0,27(0,11-0,65)	0,39(0,19-0,79)
TGF-β								
Cod.10 (+869)	TT	25	25	9	16	NS		
	TC	47	47	41	73	0,002	3,08(1,52-6,27)	2,12(1,28-3,48)
	CC	28	28	6	11	0,009	0,31(0,12-0,8)	0,43(0,2-0,92)
Cod. 25 (+915)	GG	86	86	30	54	0,00001	0,19(0,09-0,41)	0,40(0,27-0,58)
	GC	5	5	12	21	0,002	5,18(1,72-15,61)	2,23(1,51-3,30)
	CC	9	9	14	25	0,008	3,37(1,35-8,40)	1,93(1,28-2,91)
Cod10/ Cod25	CG	82	41	21	19	0,00004	0,33(0,19-0,58)	0,47(0,31-0,71)
	CC	15	8	17	15	NS		
	TG	99	50	38	34	0,005	0,52(0,32-0,85)	0,66(0,48-0,90)
	TC	4	2	36	32	<0,0001	23,21(7,99-67,43)	3,22(2,59-4,00)

(N.S- Não significativo; p- Probabilidade; IC- Intervalo de Confiança; RR- Risco Relativo)

3.3.1 Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos IL-1A - 889T>C, IL-1B -511C>T, IL-1RA 11100T>C e IL-1R Pst1970

Para o polimorfismo *IL1A* -889 verificou-se uma maior frequência do alelo de baixa produção *IL1A* -889C no grupo controlo (74% vs 54%, p=0,0005, OR:0,43,95% 95% IC:0,45-0,80), e do alelo de alta produção *IL1A* -889T no grupo com ACRE (27% vs 46% p=0,0005, OR:2,32, 95% IC:1,25-2,23), evidenciando-se assim a existência de diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos (Figura 29A). Relativamente aos

genótipos que podem ocorrer para este polimorfismo, foi possível verificar uma maior prevalência do genótipo de baixa produção *IL1A* -889CC no grupo controlo (53% vs 20%, $p=0,00003$, OR:0,22, 95% IC:0,20-0,63) e do genótipo de produção intermédia *IL1A* -889TC no grupo desta doença (40% vs 70%, $p=0,0003$, OR:3,44, 95% IC:1,39-3,60) (Figura 29 B).

Da análise dos variantes polimórficos referentes ao polimorfismo *IL1B* -511 observou-se uma maior frequência do alelo de baixa produção *IL1B* -511C no grupo controlo (38% vs 52%, $p=0,013$, OR:1,75, 95% IC:1,06-1,92), e do alelo mutado e alto produtor *IL1B* -511T no grupo com ACRE (62% vs 48%, $p=0,013$, OR:0,57, 95% IC:0,52-0,94) (Figura 29C). Por sua vez, o alelo baixo produtor *IL1B*+3960C apresentou uma maior frequência no grupo controlo (78% vs 41%, $p<0,0001$, OR:0,20, 95% IC:0,29-0,54), enquanto o alelo *IL1B*+3960T foi mais prevalente no grupo desta doença (23% vs 59%, $p<0,0001$, OR:4,94, 95% IC:1,93-3,50) (Figura 29E). Esta tendência verificou-se também para genótipos do polimorfismo *IL1B*+3960, uma vez que o genótipo de baixa produção *IL1B*+3960CC foi mais frequente no grupo controlo (61% vs 20%, $p<0,0001$, OR:0,13, 95% IC:0,16-0,51) e o *IL1B*+3960TT no grupo com ACRE (6% vs 38%, $p<0,0001$, OR:9,4, 95% IC:2,03-4,06) (Figura 29F). Para o polimorfismo *IL1R* -1970 observou-se uma maior frequência do alelo *IL1R* -1970C no grupo controlo (74% vs 38%, $p<0,0001$, OR:0,2, 95% IC:0,29-0,54) e do seu alelo mutado no grupo com ACRE (26% vs 62%, $p<0,0001$, OR:4,57, 95% IC:1,87-3,44) (Figura 29G). Relativamente aos genótipos do polimorfismo *IL1R* -1970, o genótipo *IL1R* -1970CC apresentou-se mais frequente no grupo controlo (55% vs 20%, $p=0,00001$, OR:0,2, 95% IC:0,19-0,59), enquanto o genótipo *IL1R* -1970TT foi mais prevalente no grupo com doença (7% vs 43%, $p<0,0001$, OR:9,96, 95% IC:2,12-4,31) (Figura 29H). Ainda foram encontradas diferenças com significado estatístico no polimorfismo *IL1RA*11100. O alelo mutado *IL1RA* 11100C apresentou uma maior frequência no grupo desta doença (30% vs 51%, $p=0,0002$, OR:2,48, 95% IC:1,31-2,34), enquanto o alelo normal *IL1RA* 11100T foi mais frequente no grupo controlo (71% vs 49%, $p=0,0002$, OR:0,40, 95% IC:0,43-0,76) (Figura 29I). Estas diferenças também se verificaram ao nível dos seus genótipos, com o *IL1RA* 11100TT mais prevalente no grupo controlo (29% vs 6%, $p=0,0002$, OR:6,27, 95% IC:1,69-3,51), e o *IL1RA* 11100CC mais frequente no grupo de ACRE (48% vs 27%, $p=0,007$, OR:0,40, 95% IC:0,33-0,89) (Figura 29J).

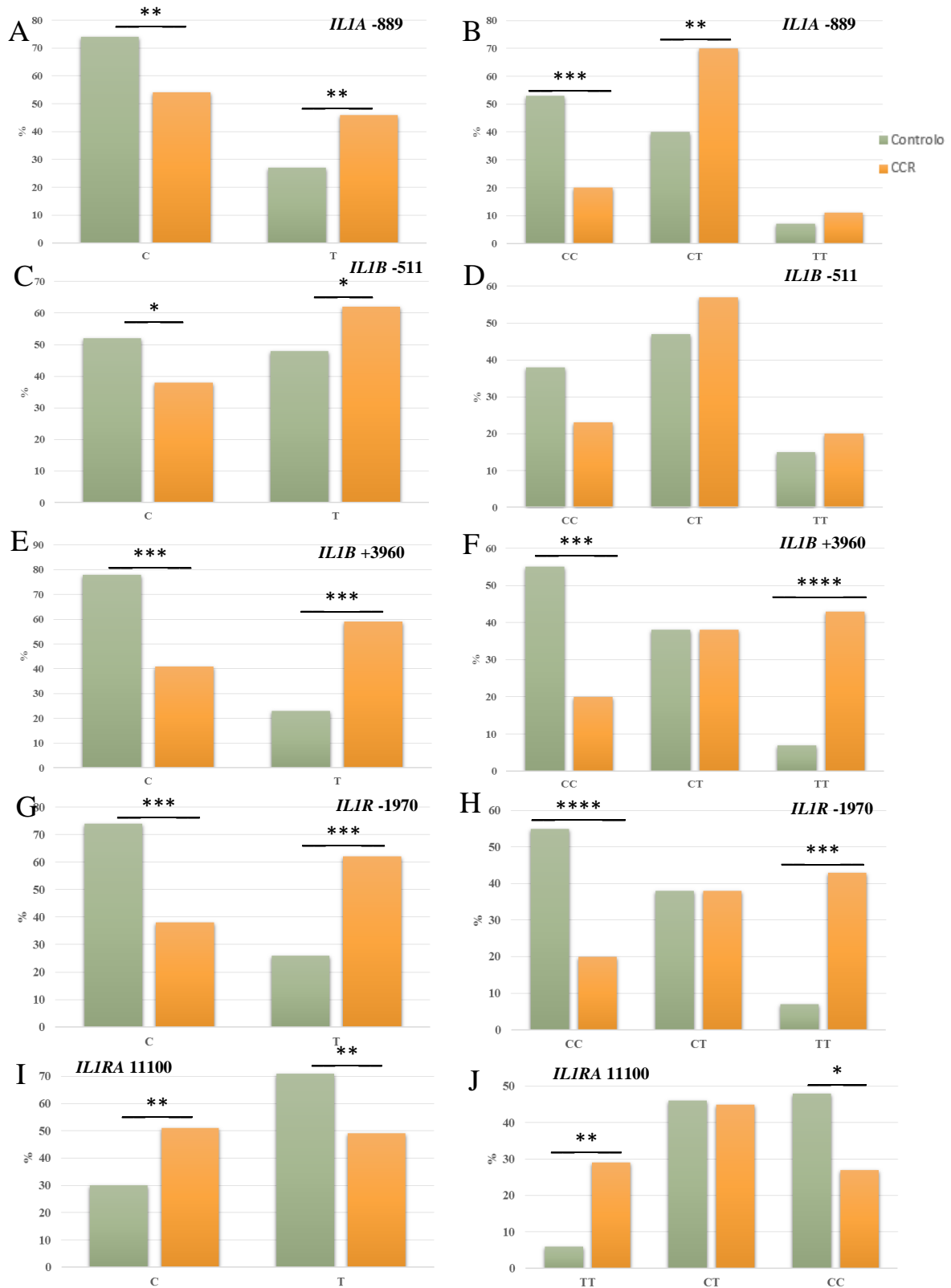


Figura 29. Comparação das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da IL-1 entre os grupos controlo e com CCR. (A) Frequências alélicas da posição -889, (B) Frequências genotípicas da posição -889, (C) Frequências alélicas da posição -511, (D) Frequências genotípicas da posição -511, (E) Frequências alélicas da posição +3960, (F) Frequências genotípicas da posição +3960, (G) Frequências alélicas da posição -1970, (H) Frequências genotípicas da posição -1970 (I) Frequências alélicas da posição 11100, (J) Frequências genotípicas da posição 11100 (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$; **** $p \leq 0,00001$).

3.3.2 Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos TNF- α -308 G>A e -238 G>A

Da análise dos variantes polimórficos que caracterizam os polimorfismos *TNFA*-308 e *TNFA*-238, foi possível identificar a existência de diferenças significativas entre os grupos em análise e as respetivas frequências alélicas e genótípicas para cada polimorfismo. No que se refere ao polimorfismo *TNFA* -238 verificou-se que o alelo de baixa produção *TNFA* -238G apresentou uma maior frequência no grupo controlo (76% vs 50%, $p=0,000005$, OR:0,32, 95% IC:0,38-0,68), enquanto o alelo de alta produção *TNFA* -238A foi mais frequente no grupo ACRE (25% vs 50%, $p=0,000005$, OR:3,08, 95% IC:1,48-2,63) (Figura 30A). Por sua vez, para o polimorfismo *TNFA* -238 observou-se uma maior frequência do alelo de baixa produção *TNFA* -308G no grupo controlo (77% vs 54%, $p=0,00006$, OR:0,37, 95% IC:0,41-0,73), enquanto o alelo de alta produção *TNFA* -308A demonstrou-se mais frequente no grupo com adenocarcinoma (24% vs 46%, $p=0,00006$, OR:2,72, 95% IC:1,37-2,43) (Figura 30B). No que se refere aos genótipos do polimorfismo *TNFA* -238, observou-se uma maior prevalência do genótipo *TNFA* -238GG no grupo controlo (59% vs 27%, $p=0,00009$, OR:0,25, 95% IC:0,25-0,67) e dos genótipos *TNFA* -238GA (35% vs 55%, $p=0,01$, OR:2,30, 95% IC:1,11-2,57) e *TNFA* -238AA (6% vs 18%, $p=0,02$, OR:3,41, 95% IC:1,22-2,98) no grupo ACRE (Figura 30C). Estes padrões de frequência também se verificaram para o polimorfismo *TNFA* -308, para o qual se observou uma maior frequência do genótipo *TNFA* -308GG no grupo controlo (65% vs 16%, $p<0,0001$, OR:0,10, 95% IC:0,11-0,40) e do genótipo *TNFA* -308GA (21% vs 68%, $p<0,0001$, OR:7,94, 95% IC:2,19-5,49) no grupo ACRE (Figura D).

Através da análise dos haplótipos foi igualmente possível identificar diferenças significativas entre os grupos em análise, com os haplótipos *TNFA* (-238/-308) GG (53% vs 39%, $p=0,01$, OR:0,57, 95% IC:0,51-0,95), *TNFA* (-238/-308) AG (24% vs 14%, $p=0,03$, OR:0,54, 95% IC:0,42-1,03) e *TNFA* (-238/-308) GA (23% vs 11%, $p=0,006$, OR:0,41, 95% IC:0,32-0,91) a apresentarem uma maior prevalência no grupo controlo, enquanto o haplótipo *TNFA* (-238/-308) AA exibiu uma maior prevalência no grupo com doença (1% vs 36%, $p<0,0001$, OR:55, 95% IC:2,90-4,40) (Figura 30 E).

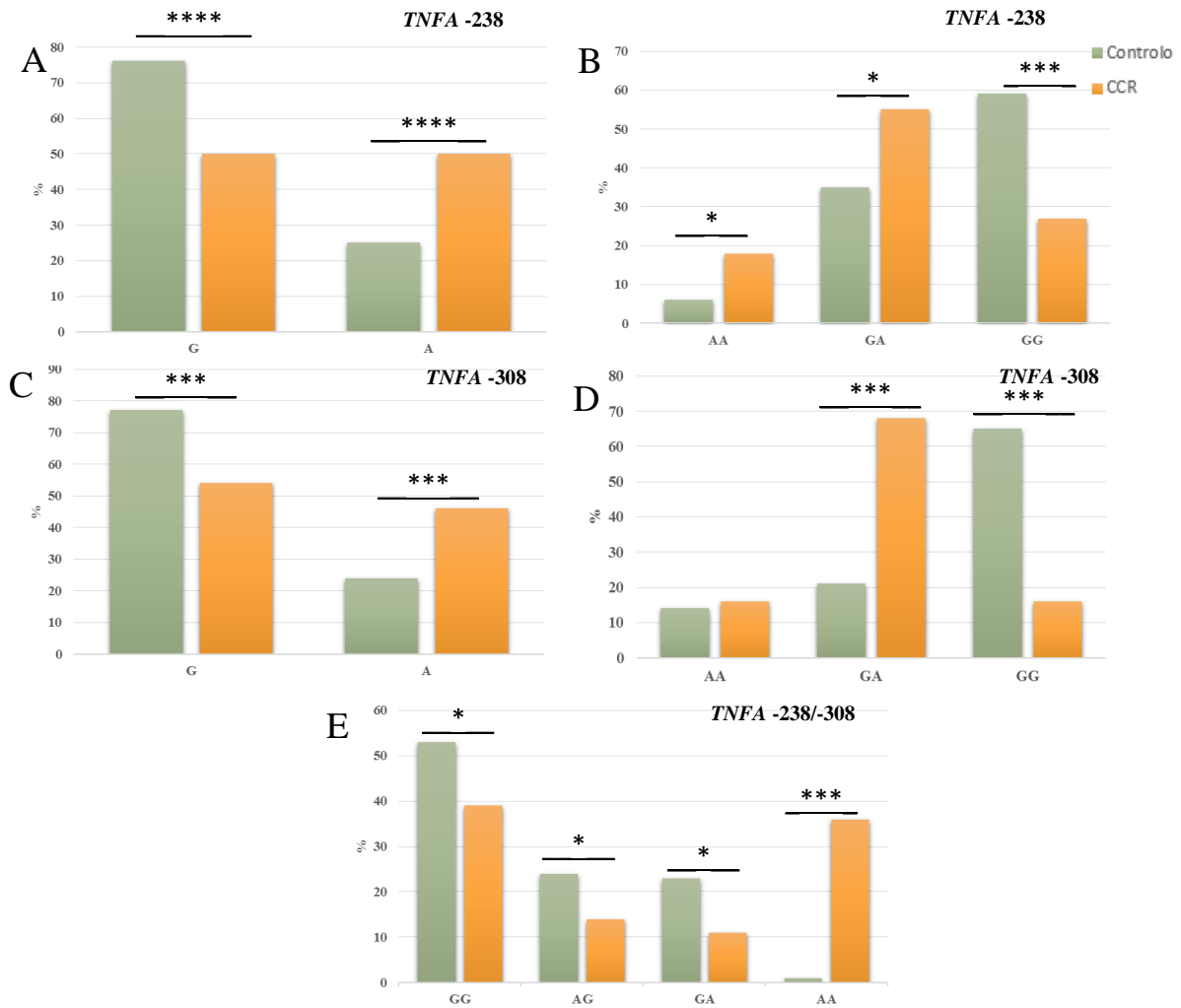
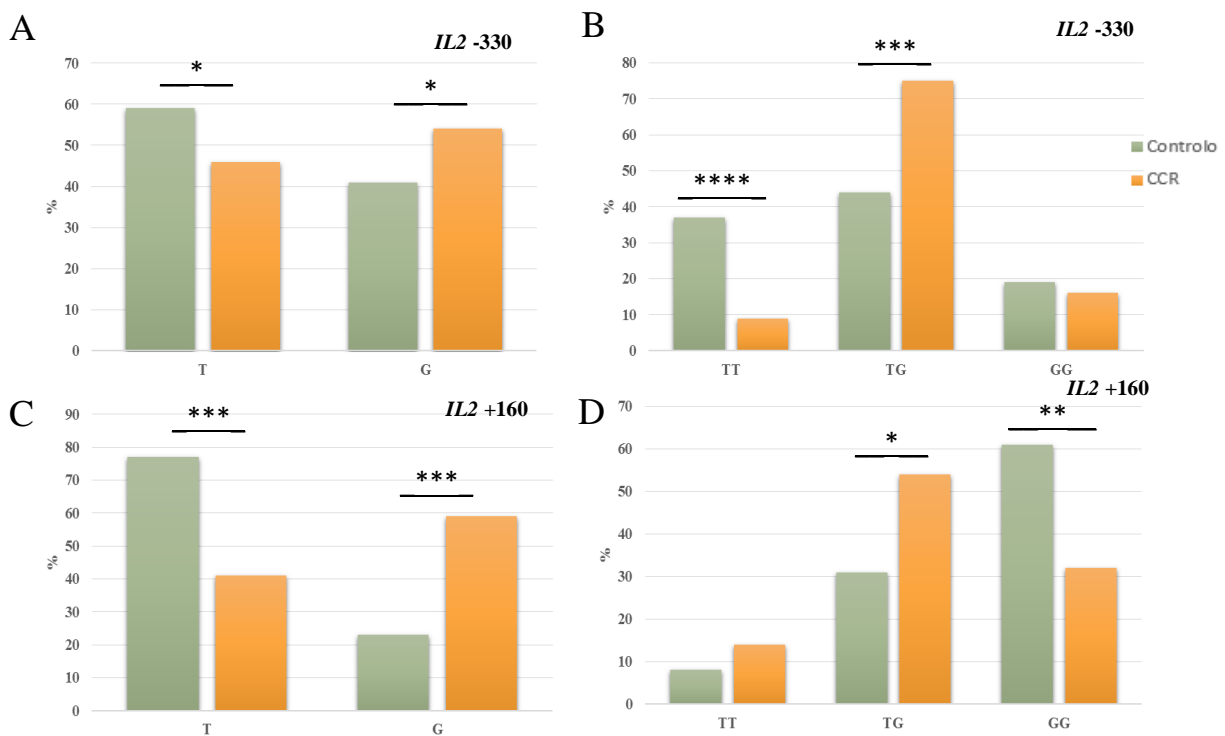


Figura 30. Comparação das frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos do TNF- α entre os grupos controlo e com CCR. (A) Frequências alélicas da posição -238, (B) Frequências genóticas da posição -238, (C) Frequências alélicas da posição -308, (D) Frequências genóticas da posição -308, (E) Frequências relativas para os haplótipos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$; **** $p \leq 0,00001$).

3.3.3 Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos IL-2 -330 T>G e +160 G>T

Os polimorfismos *IL2* -330 e *IL2* +160 apresentaram diferenças com significado estatístico entre os grupos em análise e as respetivas frequências alélicas e genóticas para cada polimorfismo. Para o polimorfismo *IL2* -330 observou-se uma maior frequência do alelo de baixa produção *IL2* -330T no grupo controlo (59% vs 46%, $p=0,02$, OR:0,60, 95% IC:0,54-0,97), e do alelo de alta produção *IL2* -330G no grupo com doença (41% vs 54%, $p=0,02$, OR:1,66, 95% IC:1,03-1,86) (Figura 31A). Para os genótipos que

caracterizam este polimorfismo, verificou-se a existência de diferenças bastante significativas ao nível do genótipo *IL2* -330TT, que se verificou mais prevalente no grupo controlo (37% vs 9%, $p=0,00007$, OR:0,17, 95% IC:0,11-0,62), e do genótipo *IL2* -330TG, que demonstrou uma maior frequência no grupo ACRE (44% vs 75%, $p=0,0001$, OR:3,82, 95% IC:1,46-4,09) (Figura 31B). Por sua vez e no que se refere ao polimorfismo *IL2* +160, observou-se uma maior frequência do alelo *IL2* +160T no grupo controlo (77% vs 41%, $p<0,0001$, OR:0,21, 95% IC:0,29-0,53) e uma maior prevalência do genótipo *IL2* +160G no grupo ACRE (23% vs 59%, $p<0,0001$, OR:4,80, 95% IC:1,90-3,45) (Figura 31C). Para os genótipos que caracterizam este polimorfismo, observou-se uma maior frequência do genótipo *IL2* +160GG no grupo controlo (61% vs 32%, $p=0,0005$, OR:0,3, 95% IC:0,29-0,73), enquanto o genótipo *IL2* +160TG apresentou uma maior frequência no grupo com a doença (31% vs 54%, $p=0,0005$, OR:2,57, 95% IC:1,19-2,72) (Figura 31D). Da análise dos haplótipos da *IL-2*, verificou-se um aumento da prevalência do haplótipo *IL2* (+160/-330) TG no grupo controlo (38% vs 16%, $p<0,0001$, OR:0,15, 95% IC:0,20-0,50), e do haplótipo *IL2* +160/-330 GT no grupo com ACRE (2% vs 11%, $p<0,0001$, OR:7,88, 95% IC:1,76-3,20) (Figura 31E).



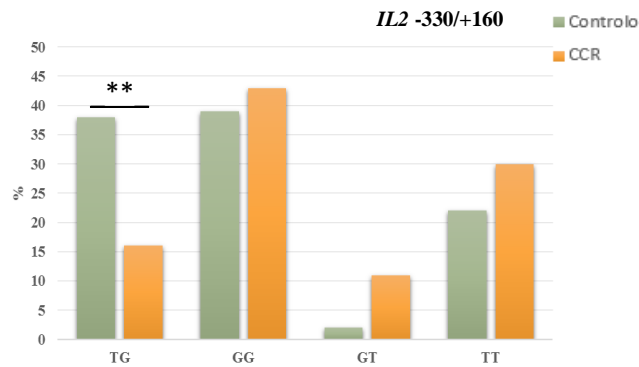


Figura 31. Comparação das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da IL-2 entre os grupos controlo e com CCR. (A) Frequências alélicas da posição -330, (B) Frequências genotípicas da posição -330, (C) Frequências alélicas da posição +160, (D) Frequências genotípicas da posição +160, (E) Frequências relativas para os haplótipos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$; **** $p \leq 0,00001$).

3.3.4 Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos IL-6 -174 C>G e +565 A>G

No que respeita os polimorfismos que caracterizam o IL-6, localizados nas posições -174 e +565, foi possível identificar diferenças significativas entre os dois grupos de em análise. Relativamente ao polimorfismo *IL6* -174, verificou-se uma maior prevalência do genótipo de baixa produção *IL6* -174CC no grupo com adenocarcinoma (18% vs 39%, $p=0,003$, OR:2,95, 95% IC:1,26-2,79) (Figura 32A). Por sua vez e para o polimorfismo *IL6* +565, observou-se uma maior prevalência do genótipo de alta produção *IL6* +565AA no grupo com doença (9% vs 29%, $p=0,002$, OR:4,04, 95% IC:1,42-3,10), e do geótipo produção intermédia +565AG no grupo controlo (49% vs 25%, $p=0,003$, OR:0,35, 95% IC:0,29-0,82) (Figura 32B). Através da análise dos haplótipos da *IL6* (-174/nt565) verificou-se uma maior prevalência do haplótipos *IL6* (-174/nt565) GA (10% vs 23%, $p=0,000003$, OR:5,74, 95% IC:1,77-3,03) no grupo desta doença, e do haplótipo da alta produção *IL6* (-174/nt565) GG no grupo controlo (46% vs 23%, $p<0,0001$, OR:0,22, 95% IC:0,25-0,53) (Figura 32C). Também se observou uma maior frequência do haplótipo haplótipos *IL6* (-174/nt565) CG (30% vs 36%, $<0,0001$, OR:5,62, 95% IC:1,87-3,16) no grupo com ACRE (Figura 32C).

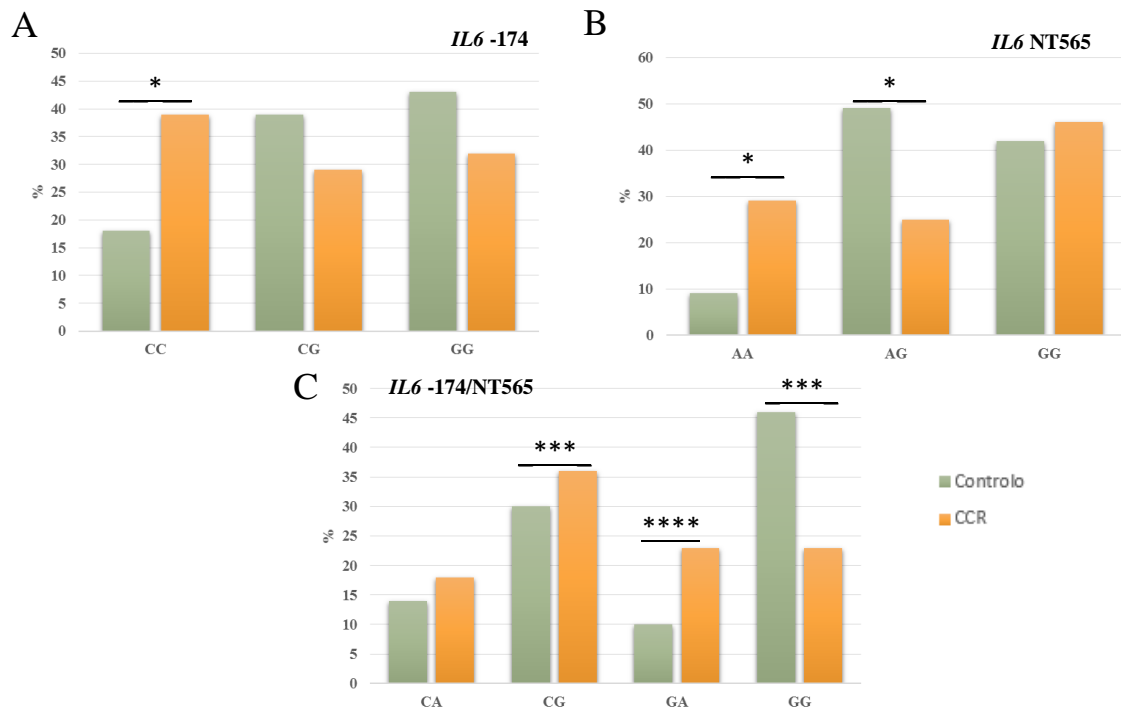


Figura 32. Comparação das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da IL-6 entre os grupos controlo e com CCR. (A) Frequências genotípicas da posição -174, (B) Frequências da posição Nt565, (C) Frequências relativas para os haplótipos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$; **** $p \leq 0,00001$).

3.3.5 Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo IL-12 +1188

A>C

No que respeita ao polimorfismo *IL12* +1188 foi possível identificar diferenças significativas entre os grupos controlo e com adenocarcinoma. Em relação aos alelos, observou-se uma maior frequência do alelo de baixa produção *IL12* +1188C no grupo controlo (77% vs 54%, $p=0,00002$, OR:0,34, 95% IC:0,40-0,70), enquanto o alelo de alta produção *IL12* +1188A apresentou uma maior frequência no grupo com ACRE (23% vs 46%, $p=0,00002$, OR:2,90, 95% IC:1,42-2,51) (Figura 33A). Estas diferenças significativas também se verificaram ao nível dos genótipos, com o aumento da prevalência do genótipo de baixa produção *IL12* +1188CC no grupo controlo (62% vs 25%, $p=0,000007$, OR:0,20, 95% IC:0,21-0,59) e do genótipo *IL12* +1188AC no grupo no grupo com a doença (30% vs 57%, $p=0,0008$, OR:3,11, 95% IC:1,33-3,08) (Figura 33B).

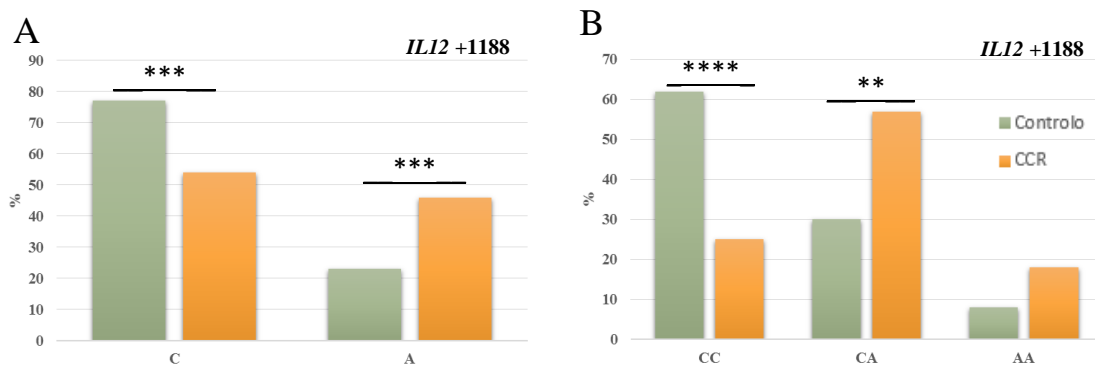


Figura 33. Comparação das frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos da IL-12 entre os grupos controlo e com CCR. (A) Frequências alélicas da posição +1188, (B) Frequências genóticas da posição +1188, (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$; **** $p \leq 0,00001$).

3.3.6 Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo IFN- γ +874 T>A

No caso do polimorfismo *IFNG* +874 apenas foi possível verificar diferenças com significado estatístico para as frequências genóticas. Assim, verificou-se uma maior prevalência do genótipo de alta produção *IFNG* +874TT no grupo controlo (25% vs 7%, $p=0,004$, OR:0,23, 95% IC:0,13-0,86) e do genótipo *IFNG* +874TA no grupo com ACRE (40% vs 80%, $p < 0,0001$, OR:6,14, 95% IC:1,92-6,10) (Figura34). O genótipo de baixa produção *IFNG* +874AA mostrou uma maior frequência no grupo controlo (35% vs 13%, $p=0,002$, OR:0,27, 95% IC:0,19-0,79) (Figura 34).

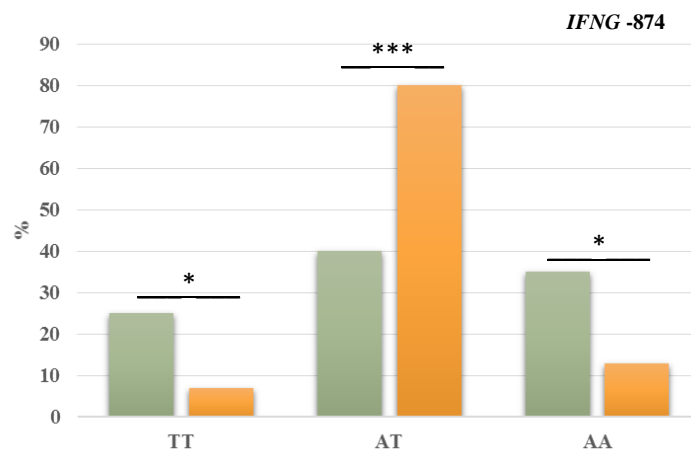
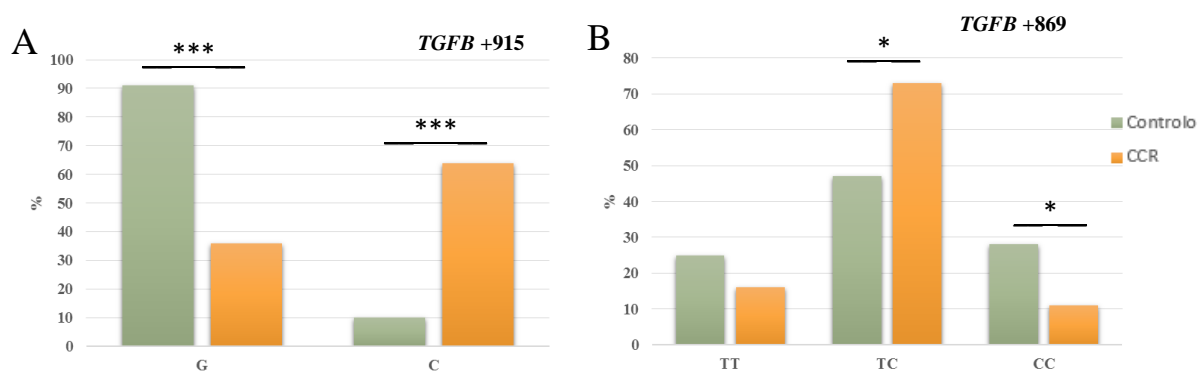


Figura 34. Frequências genóticas relativas ao polimorfismo *IFNG* -874, (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$; **** $p \leq 0,00001$).

3.3.7 Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo TGF- β +869 T>C (Codão 10) e +915 G>C (Codão 25)

Da análise dos variantes polimórficos que caracterizam o gene *TGFB* foi possível observar diferenças significativas entre os grupos controlo e com ACRE. Ao nível das frequências alélicas no polimorfismo *TGFB* +915, verificou-se uma maior frequência do alelo *TGFB* +915G no grupo controlo (91% vs 36%, $p < 0,0001$, OR:0,06, 95% IC:0,17-0,31) e do alelo *TGFB* +915 C no grupo com ACRE (10% vs 64%, $p < 0,0001$, OR:17,15, 95% IC:3,24-5,90) (Figura 35A). Para os genótipos que caracterizam este polimorfismo, observou-se uma maior prevalência do genótipo de baixa produção *TGFB* +915CC no grupo com ACRE (9% vs 25%, $p = 0,008$, OR:3,37, 95% IC:1,28-2,91) e do genótipo de alta produção *TGFB* +915GG no grupo controlo (86% vs 54%, $p = 0,00001$, OR:0,19, 95% IC:0,27-0,58) (Figura 35C). O genótipo *TGFB* +915GC também apresentou uma maior frequência no grupo desta doença (5% vs 21%, $p = 0,002$, OR:5,18, 95% IC:1,51-3,30) (Figura 35C). Para o polimorfismo *TGFB* +869 verificou-se uma maior prevalência do genótipo *TGFB* +869TC no grupo com ACRE (47% vs 73%, $p = 0,002$, OR:3,08, 95% IC:1,28-3,48) e do genótipo *TGFB* +869CC no grupo controlo (28% vs 11%, $p = 0,009$, OR:0,31, 95% IC:0,2-0,92) (Figura 35B). Da análise dos haplótipos observou-se uma maior prevalência dos haplótipos *TGFB* (+869/+915) CG no grupo controlo (41% vs 19%, $p = 0,00004$, OR:0,33, 95% IC:0,31-0,71) e do haplótipo *TGFB* (+869/+915) TC no grupo com ACRE (2% vs 32%, $p < 0,0001$, OR:23,21, 95% IC:2,59-4,00) (Figura 35D). Finalmente, o haplótipo *TGFB*(+869/+915) TG apresentou uma maior frequência no grupo controlo (50% vs 34%, $p = 0,005$, OR:0,52, 95% IC: 0,48-0,90) (Figura 35D).



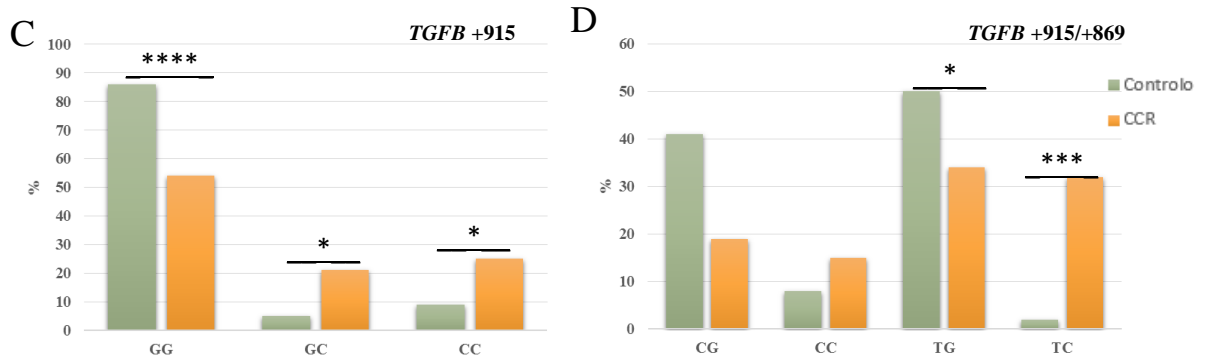


Figura 35. Comparação das frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos do TGF- β entre os grupos controlo e com CCR. (A) Frequências alélicas da posição +915, (B) Frequências genóticas da posição +869, (C) Frequências genóticas da posição +915, (D) Frequências relativas para os haplótipos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$; **** $p \leq 0,00001$).

IV. DISCUSSÃO

4.1. Interleucina-1 e Adenocarcinoma Colo-Retal

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória, responsável pela mediação de processos fundamentais do sistema imunitário inato, nomeadamente na ativação de linfócitos T (Dinarello, 2009; Dinarello, 2011). O papel da IL-1 nos processos de carcinogénese é considerado divergente, uma vez que o seu impacto se encontra dependente do subtipo produzido (IL-1 α , IL-1 β ou IL-1Ra) (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Dinarello, 1994, Garlanda *et al.*, 2013; La *et al.*, 2001). Esta divergência deve-se sobretudo aos diferentes tipos de atividade que subtipo da *IL1* pode adquirir. Assim e de forma generalizada, as isoformas IL-1 α e IL-1 β são dotadas de ação pró-inflamatória e são referidas como promotoras dos processos de carcinogénese (Hanada *et al.*, 2002; Arvelo *et al.*, 2015). Por sua vez, a IL-1Ra, a forma antagonista da IL-1 e com atividade anti-inflamatória, surge associada a um potencial preventivo dos processos de carcinogénese (La *et al.*, 1999; Garlanda *et al.*, 2013; Yuzhalin e Kutikhin, 2014; La *et al.*, 2001). Todavia existe ainda uma carência de estudos em populações Europeias no que se refere ao impacto destas citocinas e dos seus polimorfismos no ACRE (Stanilov *et al.*, 2013; Balasubramanian *et al.*, 2006; Harrison *et al.*, 2008; Tseng *et al.*, 2001; Gök *et al.*, 2015; Ito *et al.*, 2007; López-Hernández *et al.*, 2015). Neste estudo verificou-se que alguns dos polimorfismos da IL-1 parecem influenciar a suscetibilidade dos indivíduos a esta doença.

Face os resultados obtidos, é possível afirmar que a presença dos alelos *IL1A* -889C e *IL1R* -1970C, associados à baixa produção/atividade da IL-1 α , e a presença do alelo *IL1B* -511T e *IL1B* +3960C, associado à elevada produção da IL-1 β , correlacionaram-se com a diminuição do risco de ACRE. O mesmo se verificou para os genótipos *IL1A* -889CC, *IL1R* -1970CC e *IL1RA* 11100CC apareceram associados com a diminuição do risco de ACRE. Por outro lado, os alelos *IL1A* -889T, *IL1B* -511C, *IL1B* +3960T, *IL1R* -1970T, *IL1RA* 11100T e os genótipos *IL1A* -889TC, *IL1R* -1970TT e *IL1RA* 11100TT, associados à elevada produção/atividade da IL-1 α , encontram-se associados ao aumento do risco de desenvolvimento ACRE. Assim, o aumento da produção do gene *IL1* provocado pelo aumento de expressão da isoforma - α parece promover o desenvolvimento dos processos de carcinogénese. Enquanto o aumento de produção da forma antagonista IL-1Ra, apresenta um papel protetor no desenvolvimento do ACRE. Este mecanismo inflamatório

é característico de citocinas que atuam em fases iniciais dos processos de carcinogénese, desencadeado pela resposta inata de inflamação (Lee *et al.*, 2011). A relação encontrada entre o aumento de respostas inflamatórias do tipo Th1 e o aumento do risco de ACRE pode dever-se ao aumento dos níveis de stresse oxidativo, ácidos biliares secundários e de monócitos infiltrados nos tecidos epiteliais do cólon, que podem resultar na alteração genética dos proto-oncogenes em oncogenes (Gusdkov *et al.*, 2011; Iacopetta, 2003; Landskron *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Arvelo *et al.*, 2015; Haigis, 2013). Por outro lado, a diminuição da expressão da IL-1 β está associado à prevalência de ACRE, indicando a sua atuação numa fase mais tardia do desenvolvimento dos processos de carcinogénese. (Dinarello, 2011; Latz *et al.*, 2013) Apesar dos resultados obtidos neste trabalho estarem em desacordo com alguns estudos de associação publicados (Stanilov *et al.*, 2013; Tseng *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; López-Hernández *et al.*, 2015; Gök *et al.*, 2015), as diferenças podem dever-se ao facto destes estudos serem referentes a populações Asiáticas, onde as frequências alélicas e genotípicas das citocinas são distintas (Tseng *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2014). Van Dyke e colaboradores detetaram uma distribuição diferencial das frequências alélicas e genotípicas por região geográfica, sugerindo a necessidade de integração deste facto em estudos futuros (Van Dyke *et al.*, 2009).

4.2 TNF- α e Adenocarcinoma Colo-Retal

O TNF- α é uma citocina envolvida nos mecanismos de sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celular (Osório-Costa e Carvalheira, 2013; Wang e Lin, 2008). Esta citocina encontra-se fundamentalmente envolvida em mecanismos de indução de apoptose celular (Wang e Lin, 2008; Pfeffer, 2003). Contudo, o papel do TNF- α nos processos de carcinogénese é considerado ambíguo, uma vez que pode adquirir um papel protetor ou impulsionador no desenvolvimento de carcinoma (Wang e Lin, 2008). Ao nível do ACRE, o TNF- α parece ser como um agente promotor do desenvolvimento e metastização tumoral (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Dinarello, 1994; Popivanova *et al.*, 2008; Stanilov *et al.*, 2014; Osório-Costa e Carvalheira, 2013; Stanilov *et al.*, 2010). Estudos referentes aos polimorfismos localizados na região promotora deste gene demonstram a necessidade de execução de novos estudos, uma vez que os resultados

existentes são inconclusivos ou contraditórios (Stanilov *et al.*, 2013; Landi *et al.*, 2003; Wang e Lin, 2008; Gök *et al.*, 2015).

Neste estudo verificou-se que os polimorfismos *TNFA* -308 G>A e *TNFA* -238 G>A parecem ter um papel importante nos processos de carcinogénese do cólon e reto. A presença dos alelos de alta produção, *TNFA* -308A e *TNFA* -238A, encontram-se associados ao aumento do risco de ACRE. Por sua vez, a presença dos alelos *TNFA* -308G e *TNFA* -238G associam-se à diminuição do risco da doença. No caso dos genótipos que caracterizam o polimorfismo *TNFA* -238, observou-se uma conexão dos genótipos *TNFA* -238AA e *TNFA* -308GA com o aumento do risco de ACRE enquanto que os genótipos de baixa produção, *TNFA* -238GG e *TNFA* -308GG parecem diminuir o risco de ACRE. Também se observou uma associação entre o haplótipo de alta produção, *TNFA* -238/-308 AA, e o aumento do risco desta patologia. Desta forma, a alta produção do TNF- α , provocada pela troca de G para A em ambas as variantes, parece desencadear o aumento atividade pró-inflamatória desta citocina e o aumento do risco de ACRE. Contrariamente, a baixa produção de TNF- α parece diminuir a prevalência deste tipo de carcinoma. Este mecanismo inflamatório é característico de citocinas que atuam em fases iniciais dos processos de carcinogénese, e que desencadeiam processos Th1 de inflamação (Lee *et al.*, 2011,189). O papel promotor do TNF- α nos processos de carcinogénese deve-se à estimulação da produção de espécies reativas de oxigénio (ERO), através da inflamação incontrolada da mucosa cólica e retal, que são responsáveis por lesões ao nível do DNA e inibição das enzimas de reparação, despoletando o aumento da taxa de mutações celulares (Waterston e Bower, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho para o polimorfismo *TNFA* -308 vão de encontro aos estudos de Wang e Lin, Theodoropoulou e colaboradores, e de Gök, Uçar e Ozgur, que revelaram uma forte associação entre o aumento da frequência do alelo A e o aumento do risco de adenocarcinoma colo-retal (Wang e Lin, 2008; Stanilov *et al.*, 2013; Gök *et al.*, 2015). Contudo, para o polimorfismo *TNFA* -238 os estudos existentes não conseguiram obter resultados significativos entre esta variante e o CCR (Stanilov *et al.*, 2013; Wang e Lin, 2008).

4.3 Interleucina-2 e Adenocarcinoma Colo-Retal

A IL-2 é uma citocina pró-inflamatória muito importante, que promove a ativação da via Th1, através da diferenciação de células NK em células citotóxicas e da maturação e ativação de linfócitos T citotóxicos e auxiliares (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Olejniczak *et al.*, 2008; Rosenberg, 2014). Contudo, impacto real que a que esta IL possui nos processos de carcinogénese é desconhecido, uma vez que o seu estudo tem sido focalizado em fases tumorais mais avançadas (Olejniczak *et al.*, 2008; Rosenberg, 2007; Rosenberg, 2014; Zhu *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2015). Não obstante, devido à sua natureza pró-inflamatória, é esperado que o aumento da expressão IL-2 resulte num aumento do risco em CCR. Esta convicção, partilhada por alguns autores, parte do pressuposto de que a desregulação da expressão desta e de outras citocinas pró-inflamatórias podem induzir processos de inflamação crónica, que resultam na alteração morfológica dos tecidos e no impedimento da sua regeneração (Gusdkov *et al.*, 2011; Raskov *et al.*, 2014; Landskron *et al.*, 2014; Terzić *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho suportam o potencial de risco que a IL-2 possui no desenvolvimento dos processos carcinogénicos em CCR. Tendo-se detetado uma forte associação entre o alelo de alta produção, *IL2* -330G e *IL2*+160G, com o aumento do risco de ACRE, enquanto que os alelos de baixa expressão, *IL2* -330T e *IL2*+160T, eram prevalentes na população controlo. Em relação aos genótipos que caracterizam o polimorfismo *IL2* -330, verificou-se uma associação entre o genótipo de baixa produção, *IL2* -330TT, e a diminuição do risco ACRE, e dos genótipos *IL2* -330TG e *IL2* +160TG com aumento do risco para esta doença. Finalmente, foi verificada uma forte associação entre o haplótipo de alta produção, *IL2* -330/+160 GT, e o aumento do risco de ACRE. Estes resultados parecem indicar que o aumento do nível de produção de IL-2 aumenta o risco de ACRE, enquanto a sua diminuição parece ter um efeito protetor no desenvolvimento deste tipo de carcinoma. À semelhança com o que ocorre com a IL-1 e o TNF- α , o mecanismo inflamatório desempenhado pela IL-2 é característico de citocinas que atuam em fases iniciais dos processos de carcinogénese (Lee *et al.*, 2011). Esta associação pode dever-se ao papel promotor da IL-2 na produção de agentes fundamentais para a mediação de processos pró-inflamatórios, como linfócitos T e NK (Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Olejniczak *et al.*, 2008; Rosenberg, 2014). Contudo, não foi possível comparar estes resultados com outros trabalhos científicos sobre o impacto dos

polimorfismos da IL-2 e o risco de desenvolvimento de adenocarcinoma colo-retal devido a estes serem inexistentes.

4.4 Interleucina-6 e Adenocarcinoma Colo-Retal

A IL-6 é uma citocina com ação pró e anti- inflamatória (Th3), pelo que o seu papel nos processos de carcinogénese colo-rectal ainda não se encontram totalmente esclarecidos (Yuan *et al.*, 2004; Waldner *et al.*, 2012; Gasche *et al.*, 2011; Scheller *et al.*, 2001). Dado o envolvimento da IL-6 nas diferentes fases do ciclo celular, esta pode ser responsável pela inibição dos processos de apoptose celular e pela promoção dos processos de proliferação celular e de angiogénese (Grivennikov e Karin, 2008). Estes processos ganham particular impacto quando são promovidos por células tumorais, que tornam esta citocina num potencial fator de risco tumoral (Gusdkov *et al.*, 2011; Yuzhalin e Kutikhin, 2014; Bromberg e Wang, 2009; Waldner *et al.*, 2012; Grivennikov e Karin, 2008). Contudo, já foi estabelecida uma forte associação entre o aumento dos níveis de expressão e produção desta citocina, e o aumento do risco de carcinoma do colo-retal (Uchiyama *et al.*, 2012; Esfandi *et al.* 2006; Waldner *et al.*, 2012; Malicki *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2015; Kakourou *et al.*, 2015; Stanilov *et al.*, 2010), embora, o número de estudos que analisam a associação entre os polimorfismos da IL-6 e o risco adenocarcinoma colo-retal seja muito escasso (Stanilov *et al.*, 2013).

Neste estudo verificou-se que os polimorfismos *IL6* -174 C>G e *IL6* +565 A>G possuem um papel importante na carcinogénese do CCR. Com base nos resultados obtidos, verificou-se uma conexão entre os genótipos de baixa produção, *IL6* -174CC e *IL6* nt+565AA, e o risco de desenvolvimento de ACRE. Adicionalmente, o genótipo *IL6* nt+565AG associa-se à ausência de ACRE. Estes resultados poderão indicar que a IL-6 atuará em fases mais avançadas despoletando a imunidade adquirida. Estes resultados são corroborados por Ladi e colaboradores, uma vez os autores confirmam o impacto do polimorfismo *IL6* -174 em fases mais avançadas dos processos de carcinogénese (Landi *et al.*, 2003). Adicionalmente, outro estudo relacionou o aumento da suscetibilidade para CCR com o aumento dos níveis de *IL6* nt 565 no sangue (Stanilov *et al.*, 2013). Assim, estes resultados parecem comprovar a dualidade de atividades que esta citocina pode possuir, uma vez que tanto pode apresentar atividade pró- inflamatória ou anti-

inflamatória, de acordo com a fase em que se encontram os processos de carcinogénese (Diehl e Ricón, 2002).

4.5 Interleucina-12 e Adenocarcinoma Colo-Retal

A IL-12 é responsável pela regulação de outras citocinas e desempenha um papel fundamental no processo de maturação da via Th1 (Stanilov *et al.*, 2013; O'Hara *et al.*, 1998; Stern *et al.*, 1996; Colombo e Trinchieri, 2002; Lasek *et al.*, 2014). Estudos recentes têm descrito uma forte associação entre o aumento da expressão desta citocina e o aumento do risco de ACRE (Stanilov *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015). Esta associação dever-se-á à sua atividade pró-inflamatória, uma vez que a IL-12 surge vulgarmente referida como um fator facilitador dos processos de carcinogénese e de tumorigénese (Stanilov *et al.*, 2013). Porém, ainda não existe muita informação sobre o impacto do seu polimorfismo no risco de desenvolvimento de CCR, sendo a maioria dos trabalhos referentes a estadios mais avançados da doença (O'Hara *et al.*, 1998; Colombo e Trinchieri, 2002; Lasek *et al.*, 2014).

Neste Trabalho verificou-se que o polimorfismo da IL-12 encontram-se associados ao risco de ACRE. Foi observada uma associação entre o alelo de alta produção, *IL12* +1188A, e o aumento do risco de ACRE, e o alelo de baixa produção, *IL12* +1188C, e a ausência de doença. Relativamente aos genótipos da *IL12* +1188, verificou-se uma associação entre o genótipo de baixa produção, *IL12* +1188CC, e a diminuição do risco de ACRE e enquanto que o genótipo de produção intermédia, *IL12* +1188 AC, apareceu associado ao aumento do risco para este adenocarcinoma. Nesta perspetiva, a IL-12 parece possuir um papel preponderante no aumento do risco de ACRE em fases iniciais da inflamação, uma vez que o aumento desta citocina pró-inflamatória promove o aparecimento de carcinoma. Estas funções devem-se à ativação da via Th1 através da inativação da IL-4 (principal ativadora da via Th2) e ativação do INF- γ (Figura 36) (Li *et al.*, 2009). Apesar dos nossos resultados apontarem para a função pró-tumoral da IL-12, maioria dos trabalhos existentes referem a IL-12 como agente preventivo de carcinogénese em fases avançadas de CCR (Colombo e Trinchieri, 2002; Lasek *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015; Hanada *et al.*, 2002). Contudo, o estudo levado a cabo por O'Hara e colaboradores parece suportar os dados obtidos neste trabalho, confirmando o papel

anti-tumoral desta citocina apenas em fases avançadas e não nas precoces, dando espaço para a sua ação pró-tumoral (O'Hara *et al.*, 1998)

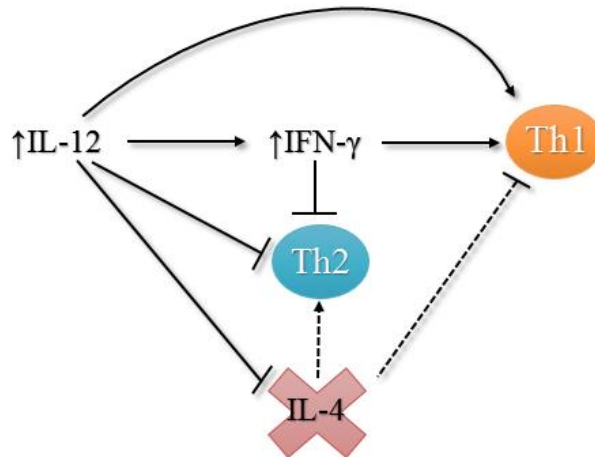


Figura 36. Esquema representativo, relativo às principais vias de interação na qual a IL-12 se encontra.

4.6 IFN- γ e Adenocarcinoma Colo-Retal

À semelhança do que ocorre com a IL-12, o IFN- γ desempenha um papel fundamental na maturação e ativação da via Th1 (Schroder *et al.*, 2011), uma vez que, é conhecido o retro-controlo positivo que a IL-12 exerce sobre este interferão (Bream *et al.*, 2003; Colombo e Trinchieri, 2002; Stern *et al.*, 1996; Lasek *et al.*, 2014; Schroder *et al.*, 2011; Commins *et al.*, 2010). Porém, o papel do IFN- γ nos processos de carcinogénese não é linear (Figura 37), existindo evidências sobre a dualidade de papéis que esta citocina pode adquirir de acordo com as condições microambientais e com a intensidade dos processos inflamatórios (Zaidi e Merlino, 2011). No caso concreto de CCR, existe um estudo que relaciona o aumento dos níveis de expressão do gene *IFNG* com diminuição do tempo de vida dos indivíduos (Lu *et al.*, 2014). Contudo, ainda são escassos ou ausentes o estudo do impacto do polimorfismo *IFNG* +874T>A no risco para CCR.

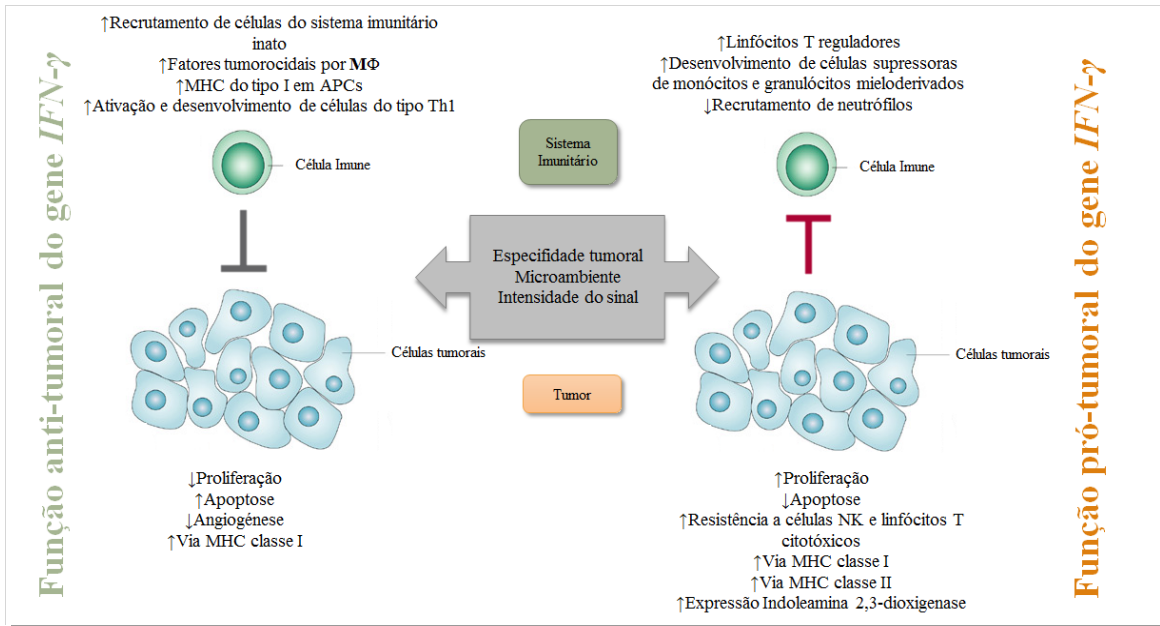


Figura 37. Resumo do papel que o gene *IFNG* pode adquirir quer na promoção ou prevenção de cancro do colo-retal. Adaptado de Zaidi *et al.*, 2011.

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível verificar uma associação entre o genótipo de alta produção *IFNG* +874TT e o genótipo de baixa produção *IFNG* +874AA com a prevenção de adenocarcinoma colo-retal. Por outro lado, verificou-se uma associação entre o genótipo de produção intermédia com *IFNG* +874TA e o aumento do risco de ACRE. Tal como já mencionado anteriormente, a ação pró-inflamatória do IFN- γ encontra-se intrinsecamente relacionado com o mecanismo de ativação da via Th1 mediado pela IL-12 (Bream *et al.*, 2003; Maurille e Leo, 1998; Colombo e Trinchieri, 2002; Stern *et al.*, 1996; Lasek *et al.*, 2014; Commins *et al.*, 2010). Este princípio surge apoiado pela maioria dos autores que estudam o impacto do IFN- γ no risco de desenvolvimento de carcinoma (Landskron *et al.*, 2014; Maurille e Leo, 1998; Colombo e Trinchieri, 2002; Schroder *et al.*, 2011; Hanada, 2006). Contudo à semelhança do que ocorre com outras citocinas, o IFN- γ pode atuar em fases mais avançadas no processo de carcinogénese, onde o aumento da expressão desta citocina aumenta resposta imune anti-tumoral. Deste modo, face aos resultados obtidos, não é possível afirmar de forma assertiva qual o verdadeiro impacto desta citocina nos processos de carcinogénese, contudo parece evidente que o *IFNG* atua e influencia a progressão tumoral em várias etapas deste processo.

4.7 TGF- β e Adenocarcinoma Colo-Retal

O TGF- β é citocina com uma ação Th3, que oscila entre uma regulação positiva e negativa das respostas imunes, o que lhe confere uma dualidade de papéis e desconhecendo-se o seu papel nos processos de carcinogénese (Lebrun *et al.*, 2012; Kemik, 2011; Kubiczikova *et al.*, 2012). Nas fases iniciais de desenvolvimento de CCR, esta citocina aparece descrita por alguns autores como um fator preventivo (Céspedes *et al.*, 2012; Fi *et al.*, 2008; Lebrun *et al.*, 2012; Kemik, 2011; RIEC, 2014). Assim, será esperado que o TGF- β seja responsável pela mediação de respostas anti-inflamatórias, que ao contrário da resposta pró-inflamatória, funcionam como agentes preventivos da doença, através do aumento de atividade da citocina (Maurille e Leo, 1998; Kristen *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2014; López-Hernández *et al.*, 2015). Contudo, pouco ou nada se conhece sobre o impacto dos polimorfismos estudados neste trabalho (*TGFB* +869 e *TGFB* +915) e o risco de desenvolvimento de adenocarcinoma de colo-retal.

Neste estudo verificou-se que os polimorfismos do TGF- β parecem influenciar a suscetibilidade de ACRE, tendo-se obtido uma forte associação entre o alelo *TGFB* +915G e a prevenção de ACRE, e entre o alelo baixa atividade *TGFB* +915C e o aumento do risco para esta patologia. Ao nível dos genótipos verificou-se uma associação entre o genótipo de baixa atividade, *TGFB* +869CC, e a prevenção de adenocarcinoma colo-retal, e uma associação entre o genótipo *TGFB* +819TC e o aumento do risco para este carcinoma. Por sua vez, observou-se uma associação do genótipos *TGFB* +915CC e *TGFB* +915GC com o aumento do risco de ACRE. Enquanto que, o genótipo de elevada atividade, *TGFB* +915GG, aparece associado à ausência de ACRE. Assim, a atividade aumentada do TGF- β parece prevenir o desenvolvimento dos processos de carcinogénese na mucosa cólica e retal. Este mecanismo de ação é característico de citocinas com atividade Th2, anti-inflamatória ou preventiva da inflamação crónica. Estes resultados são corroborados pela literatura, onde surge evidenciado o papel protetor desta citocina em fases iniciais e de risco em fases avançadas de progressão tumoral (Céspedes *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Lebrun, 2012; Xu e Pasche, 2007; Kemik, 2011; Yang e Yang, 2010; Kubiczikova *et al.*, 2012). Contudo e devido ao fato do TGF- β ser uma citocina Th3, alguns autores encontraram casos de associação entre o aumento dos níveis desta citocina no sangue e o aumento do risco de carcinoma (Bubenök, 2004; RIEC, 2014; Yang e Yang, 2010). A atividade Th3 do TGF pode dever-se ainda ao seu papel regulador

de citocinas com atividades do tipo Th2 e Th3, nomeadamente IL-4 e a IL-6 (Malicki *et al.*, 2009; Scheller *et al.*, 2001).

V. CONCLUSÃO

O CCR é conhecido por ser uma doença multifatorial, para a qual ainda não existe um esclarecimento sobre o impacto que algumas variantes genéticas possuem na sua progressão. As citocinas analisadas neste trabalho parecem ter um papel fundamental nos processos de carcinogénese do CCR, na medida em que podem influenciar o grau de suscetibilidade dos indivíduos. Neste trabalho, os genótipos associados à alta produção/atividade das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , TNF- α e IL-2 apareceram associados à prevalência desta patologia. Enquanto que, os genótipos associados à baixa produção/atividade desta citocinas pró-inflamatórias apareceram associados à ausência de ACRE. Relativamente aos genótipos e haplótipos de alta produção/atividade das citocinas Th3, IL-6 e TGF- β foi verificada uma associação com a diminuição de risco para ACRE. Por outro lado, aos genótipos e haplótipos de baixa produção/atividade destas citocinas Th3 apresentou uma associação com o aumento da prevalência desta patologia.

Estes resultados sugerem a existência de uma associação entre a maioria dos variantes polimorfismos das citocinas e o risco para o ACRE. Deste modo, as mutações dos genes *IL1A*, *IL1R*, *IL1RA*, *TNFA* e *IL2* associadas ao aumento de expressão/atividade das citocinas pró-inflamatória IL-1a, TNF- α e IL2, pela presença dos alelos *IL1A* -889T, *IL1R* -1970T, *IL1RA* 11100T *TNFA* -238A e *IL2* +160G, parecem aumentar os níveis de inflamação de longo prazo na mucosa cólica e retal e conseqüentemente despoletar o desenvolvimento tumoral. Contrariamente, os variantes de alta expressão/atividade da IL-6 e TGF-b parecem associar-se à diminuição dos processos inflamatórios/tumorais do colon e reto. Estes resultados parecem suportar a hipótese de que o CCR esta relacionado com o aumento das atividades pró-inflamatórias (Th1) e que a genotipagem destas citocinas tem potencial para ser uma ferramenta útil no estabelecimento do diagnóstico clínico da ACRE. Contudo, é necessária execução de estudos com uma amostragem superior. Também se torna relevante a integração de fatores de risco ambientais, como hábitos alimentares, índice de massa corporal e localização geográfica, de modo a determinar a interação estatística entre gene/ambiente.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, *et al.* Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015;385(9972):977–1010.
- Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, *et al.* The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Reviews*. 2006;25(3):387–408.
- Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*. 2015;9:1–20.
- Balasubramanian SP, Azmy IAF, Higham SE, Wilson AG, Cross SS, Cox A, *et al.* Interleukin gene polymorphisms and breast cancer: a case control study and systematic literature review. *BMC Cancer*. 2006;6(1):188.
- Balboa E, Carracedo A, Barros F. The Complexity of Colorectal Cancer Biology — Putting Bricks on the Path to Personalized Medicine. *Intech* [Internet]. 2014. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/colorectal-cancer-surgery-diagnostics-and-treatment/the-complexity-of-colorectal-cancer-biology-putting-bricks-on-the-path-to-personalized-medicine>.
- Barkhordari E, Rezaei N, Mahmoudi M, Larki P, Ahmadi-Ashtiani HR, Ansaripour B, *et al.* T-helper 1, T-helper 2, and T-regulatory cytokines gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Inflammation*. 2010;33(5):281–6.
- Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, *et al.* TGF- β Suppresses Tumor Progression in Colon Cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*. 2004;21(4):491–501.
- Ben Chaaben A, Busson M, Douik H, Boukouaci W, Mamoghli T, Chaouch L, *et al.* Association of IL-12p40 +1188 A/C polymorphism with nasopharyngeal cancer risk and tumor extension. *Tissue Antigens*. 2011;78(2):148–51

- Brambilla E, Travis WD, Colby T V, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *European Respiratory Society*. 2001;18(6):1059–68.
- Bream J, Curiel R, Yu C. IL-4 synergistically enhances both IL-2- and IL-12-induced IFN-gamma expression in murine NK cells. *Blood*. 2003;102(1):207–14.
- Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490–502.
- Bromberg J, Wang TC. Inflammation and Cancer: IL-6 and STAT3 Complete the Link. *Cancer Cell*. 2009;15(2):79–80
- Bubenök J. Interleukin-2 Therapy of Cancer. *Folia Biologica*. 2004;50:120-130.
- Cardoso E, Arosa F, Pacheco Francisco. 2012. *Fundamentos de imunologia (2ª ed.)*. Lidel.Portugal.
- Céspedes MV, Sevillano M, Nadal C, Jung P. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven programme in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell*. 2012; 22(5): 571–84.
- Cheng D, Hao Y, Zhou W. IL-1 α -889 C / T polymorphism and cancer susceptibility : a meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*. 2014;7 2067–2074.
- Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Review*. 2002;13(2):155–68.
- Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2):S53–72.
- Compton CC. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. *Modern Pathology*. 2003;16(4):376–88.
- Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti L, Young HA, Hu-Li J, *et al*. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*.2004;101(11):3880–5.

- Cotter J. Colorectal cancer: Portugal and the world. *Acta Médica Portuguesa*. 2013;26(5):485–6.
- Dembic Z. 2015. *The Cytokines Of The Immune System The Role Of Cytokines In Disease Related To Immune Response*. Elsevier. London.
- Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology*. 2002;39(9):531–6.
- Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB*. 1994;8:1314–25.
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*. 2009;27:519–50.
- Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *European Journal of Immunology*. 2011;41(5):1203–17.
- Dube PH, Revell PA, Chaplin DD, Lorenz RG, Miller VL. A role for IL-1 alpha in inducing pathologic inflammation during bacterial infection. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(19):10880–5
- Elaraj DM. The Role of Interleukin 1 in Growth and Metastasis of Human Cancer Xenografts. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(4):1088–96.
- Esfandi F, Mohammadzadeh Ghobadloo S, Basati G. Interleukin-6 level in patients with colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2006;244(1):76–8.
- Esposito E, Cuzzocrea S. Anti-TNF therapy in the injured spinal cord. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2011;32(2):107–15.
- Fearon E. R, Vogelstein B. A Genetic model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*. 1989;61:759–67.
- Fei B, Lv H, Cheng Y, Yang J. Association between the IFN- γ and IL-1 genetic polymorphisms and colorectal cancer in the Chinese Han population. *Indian Academy of Sciences*. 2014;93(1):235–9.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase. 2012;No. 11 Lyon, France. *International Agency for Research on Cancer* [Internet]. Disponível em : <http://globocan.iarc.fr>.

Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma : Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2012;3(3):153–73.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*. Elsevier. 2013;39(6):1003–18.

Gasche J, Hoffmann J, Boland C. R, Goel A. Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. *International Journal of Cancer*. 2011;129(5):1053–63.

Gene Card. (<http://www.genecards.org/>), acedido em Janeiro 2016.

Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, *et al*. Characterization of Sporadic Colon Cancer by Patterns of Genomic Instability. *Cancer Research*. 2003;1608–14.

Gonullu G, Basturk B, Evrensel T, Oral B, Gozkaman A, Manavoglu O. Association of breast cancer and cytokine gene polymorphism in Turkish women. *Saudi Medical Journal*. 2007;28(11):1728-33.

Gök İ, Uçar F, Ozgur O. Inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Turkish patients with ulcerative colitis. *Medicinski Glasnik*. 2015;12(1):33–9.

Grivennikov S, Karin M. Autocrine IL-6 Signaling: A Key Event in Tumorigenesis?. *Cancer Cell*. 2008;13(1):7–9.

Gudkov A. V, Gurova K. V, Komarova E A. Inflammation and p53: A Tale of Two Stresses. *Genes Cancer*. 2011;2(4):503–16.

Haggar F. A, Boushey R. P. Colorectal Cancer Epidemiology : Incidence , Mortality , Survival , and Risk Factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2009;6(212):191–7.

- Haigis K. 2013. *Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer*. Springer. New York.
- Hamilton S. R, Aaltonen L. A. World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system (7th Edition). *IARC Press*. 2012; 2(2):314;
- Hanada T. IFN -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(6):1391–7.
- Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2002;13(4-5):413–21.
- Harrison P, Pointon JJ, Chapman K, Roddam A, Wordsworth BP. Interleukin-1 promoter region polymorphism role in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of IL-1B-511A/G variant reveals association with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2008;47(12):1768–70.
- Hoffmann J, Junker H, Schmieder A, Venz S, Brandt R, Multhoff G, *et al*. EGCG downregulates IL-1RI expression and suppresses IL-1-induced tumorigenic factors in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*. 2011;82(9):1153–62.
- Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*. 2010;49(7):1215–28.
- Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. *The journal of nutrition*. 2007;137(1 Suppl):194S – 199S.
- Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Human Mutation*. 2003;21(3):271–6.
- Isidro G, Theisen P, Pereira I, Gonçalves J. Cancro colo-retal hereditário : pesquisa de mutações em famílias portuguesas. *Boletim Epidemiológico*. 2013.
- Ito H, *et al*. Interleukin-1beta gene in esophageal, gastric and colorectal carcinomas. *Oncology Reports*. 2007;18(2):473–81.

- Jang W H, Yang Y I, Yea S S, Lee Y J, Chun J H, Kim H I, *et al.* The -238 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. *Cancer Letters*. 2001;166(1):41-6.
- Jobling M, Hollox E, Kivisild T, Tyler-Smith C. *Human Evolutionary Genetics (2^a ed.)*. 2012. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.
- Kaarvatn MH, Vrbanec J, Kulic a, Knezevic J, Petricevic B, Balen S, *et al.* Single nucleotide polymorphism in the interleukin 12B gene is associated with risk for breast cancer development. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2012;76(3):329–35.
- Kakourou A, Koutsoumpa C, Lopez DS, Hoffman-Bolton J, Bradwin G, Rifai N, *et al.* Interleukin-6 and risk of colorectal cancer: results from the CLUE II cohort and a meta-analysis of prospective studies. *Cancer Causes Control. Springer International Publishing*. 2015;26(10):1449–60.
- Kemik Ö, *et al.* Transforming Growth Factor Beta-1 in Human Colorectal Cancer Patients. *European Journal of General Medicine*. 2011;8(1):53-6.
- Kent D, Leelahavanichkul A, Peter S.T. Yuen, Robert A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *Journal of Clinical Investigation*. 2009; 119(10): 2868–2878.
- Kristen L. D, Nichole R. B, Fotini G, Khashayarsha K. Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cancer. NIH Public Access. 2008;15(10):1203–14.
- Krzystek-Korpacka M, Diakowska D, Kapturkiewicz B, Bębenek M, Gamian A. Profiles of circulating inflammatory cytokines in colorectal cancer (CRC), high cancer risk conditions, and health are distinct. Possible implications for CRC screening and surveillance. *Cancer Letters*. 2013;337(1):107–14.
- Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10(1):183.
- Kumar V, Abbas A, Aster J. 2015. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (9^a ed.)*. Elsevier. Philadelphia.

- Kundu N, Beaty T. L, Jackson M. J, Fulton A. M. Antimetastatic and Antitumor Activities of Interleukin 10 in a Murine Model of Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996; 88(8):536-541.
- La E, Rundhaug JE, Fischer SM. Role of intracellular interleukin-1 receptor antagonist in skin carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*. 2001;30(4):218–23.
- La E, Muga SJ, Locniskar MF, Fischer SM. Altered expression of interleukin-1 receptor antagonist in different stages of mouse skin carcinogenesis *Molecular Carcinogenesis*. 1999;24(4):276–86.
- Landi S, Gemignani F, Bottari F, Gioia-Patricola L, Guino E, Cambray M, *et al*. Polymorphisms within inflammatory genes and colorectal cancer. *Journal of Negative Results in BioMedicine*. 2006;5:15.
- Landi S, Moreno V, Gioia-patricola L, Guino E, Navarro M, Oca J De, *et al*. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFKB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Research*. 2003;63(13):3560-6.
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of Immunology Research*. 2014:1-9.
- Langenskiöld M, Holmdahl L, Falk P, Angenete E, Ivarsson M-L. Increased TGF-beta 1 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*. 2008;97(5):409–15.
- Lasek W, Zagożdżon R, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy?. *Cancer Immunology and Immunotherapy Journal*. 2014;63(5):419–35.
- Latz E, Xiao T, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*. 2013; 13(6): 10.1038.
- Laurent-Puig P. Genetic alterations in colorectal cancer. *Ann Pathol*. 1994;14(5):339–49.

- Lebrun J-J. The Dual Role of TGF β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *International Scholarly Research Notices: Molecular Biology*. 2012;1–28.
- Lee S, Margolin K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 2011; 3: 3856-3893.
- Lee YS, Choi HB, Lee IK, Kim TG, Oh ST. Association between interleukin-4R and TGF- β 1 gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer in a Korean population. *Colorectal Disease*. 2010;12(12):1208–12.
- Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of Translational Medicine*. 2006;4:48.
- Li F, Cao Y, Jr CMT, Ko TC. TGF- β Signaling in Colon Cancer Cells. *World Journal of Surgery*. 2005;29:306–11.
- Li X, Yue Z C, Zhang Y Y, Bai J, Meng X N, Geng J S, Fu S B. Elevated serum level and gene polymorphisms of TGF-beta1 in gastric cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2008;22(3):164-71.
- Li Y, Wang L, Pappan L, Galliher-Beckley A, Shi J. IL-1beta promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation. *Molecular Cancer*. 2012;11:87.
- Li Z, Chen L, Qin Z. Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology*. 2009;6(6):415–22.
- Liu W, Reinmuth N, Stoeltzing O, Parikh AA, Tellez C, Williams S, *et al*. Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. *Cancer Research*. 2003;63(13):3632–6.
- López-Hernández R, Valdés M, Campillo JA, Martínez-García P, Salama H, Bolarin JM, *et al*. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene single-nucleotide

- polymorphisms in inflammatory bowel disease. *International Journal of Immunogenetics*. 2015;42(1):38–45.
- Lu C-C, Kuo H-C, Wang F-S, Jou M-H, Lee K-C, Chuang J-H. Upregulation of TLRs and IL-6 as a Marker in Human Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(1):159–77.
- Lu S, Pardini B, Cheng B, Naccarati A, Huhn S, Vymetalkova V, *et al.* Single Nucleotide Polymorphisms within Interferon Signaling Pathway Genes Are Associated with Colorectal Cancer Susceptibility and Survival. *PLoS One*. 2014;9(10):e111061.
- Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GAW, Shea-Donohue T, Atamas SP. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives.” *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;92(4):753–64.
- Maihofner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geisslinger G, Gooderham NJ. Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2003;24(4):665–71.
- Malicki S, Winiarski M, Matlok M, Kostarczyk W, Guzdek a, Konturek PC. IL-6 and IL-8 responses of colorectal cancer in vivo and in vitro cancer cells subjected to simvastatin. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009;60(4):141–6.
- Mao C, Fu X-H, Yuan J-Q, Yang Z-Y, Huang Y-F, Qian-Ling YE, *et al.* Interleukin-2 as maintenance therapy for children and adults with acute myeloid leukaemia in first complete remission. *Cochrane Database System Review*. 2015;(11):2–5.
- Matsuo Y, Sawai H, Ma J, Xu D, Ochi N, Yasuda A, *et al.* IL-1 α secreted by colon cancer cells enhances angiogenesis: The relationship between IL-1a release and tumor cells’ potential for liver metastasis. *Journal of Surgical Oncology* 2009;99(6):361–7.
- Maurille E, Leo O. The Th1 Th2 Paradigm Revisited. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1998;47:1-9.

- Munteanu I, Mastalier B. Genetics of colorectal cancer. *Journal of Medicine and Life*. 2014;7(4):507–11.
- Murphy K. 2012. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group. London & New York.
- Murphy J-E, Morales RE, Scott J, Kupper TS. IL-1 alpha, innate immunity, and skin carcinogenesis: the effect of constitutive expression of IL-1 alpha in epidermis on chemical carcinogenesis. *Journal of Immunology*. 2003;170(11):5697–703.
- Navaglia F, Basso D, Zambon C-F, Ponzano E, Caenazzo L, Gallo N, *et al*. Interleukin 12 gene polymorphisms enhance gastric cancer risk in H pylori infected individuals. *Journal of Medical Genetics*. 2005;42(6):503–10
- O'Hara RJ, Greenman J, MacDonald AW, Gaskell KM, Topping KP, Duthie GS, *et al*. Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. *Clinical Cancer Research*. 1998;4(8):1943–8.
- Olejniczak K, Kasprzak A. Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases: a review. *Medical Science Monitor*. 2008;14(10):RA179–A189.
- Omer FM1, Riley EM. Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998;188(1):39-48.
- Osório-Costa F, Carnevalheira JBC. TNF- α in obesity-associated colon cancer. *Translational Gastrointestinal Cancer*. 2013;2(10):179–93.
- Ouakrim D, Pizot C, Boniol M, Malvezzi M, Boniol M, Negri E, *et al*. Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *The BMJ*. 2015;351.
- Paoli P. Immunological Effects of Interleukin-2 Therapy in Human Immunodeficiency Virus-Positive Subjects. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001;8(4):671–7.

- Perri F, Terracciano F, Gentile M, Merla A, Scimeca D, Zullo A. Role of interleukin polymorphisms in gastric cancer: “Pros and cons”. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2010;2(6):265–71.
- Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 2003;14(3-4):185–91.
- Popivanova BK1, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, Oshima M, Fujii C, Mukaida N. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(2): 560-70.
- Potter J, Lindor N. 2009. *Genetics of Colorectal Cancer*. Springer. New York
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ & Sham PC (2007). PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*, 81
- Raskov H, Pommergaard H-C, Burcharth J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis- update and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(48):18151–64.
- RCSB PDB: RCSB Protein Data Bank.(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>),
acedido em Janeiro 2016.
- Rosenberg S. A. Interleukin 2 for patients with renal cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2007;4(9):497.
- Rosenberg S. A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *Journal of Immunology*. 2014;192(12):5451–8.
- Sáenz-López P, Carretero R, Cózar JM, Romero JM, Canton J, Vilchez JR, *et al*. Genetic polymorphisms of RANTES, IL1-A, MCP-1 and TNF-A genes in patients with prostate cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:382.

- Sakurai T, He G, Matsuzawa A, Yu G. Y, Maeda S, Hardiman G, *et al.* Hepatocyte Necrosis Induced by Oxidative Stress and IL-1 α Release Mediate Carcinogen-Induced Compensatory Proliferation and Liver Tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2008;14:156–65.
- Sampaio M., Caramujo S, Reis M, Alarcão A, João M, Ferreira T, *et al.* Association Between IL-4 and IL-6 Expression Variants and Gastric Cancer Among Portuguese Population. *GE Portuguese Journal of Gastroenterology*. 2015;22(4):135-6.
- Sarvari J, Norozian H, Fattahi MR, Pirbonyeh N, Moattari A. The Role of Interferon Gamma Gene Polymorphism (+874A/T, +2109A/G, and -183G/T) in Response to Treatment Among Hepatitis C Infected Patients in Fars Province, Southern Iran. *Hepatitis Monthly*. 2014;14(1):e14476.
- Sayad A, Movafagh A. The association of -330 interleukin-2 gene polymorphism with its plasma concentration in Iranian multiple sclerosis patients. *Scientifica (Cairo)*.2014: 1-4.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011;1813(5):878–88.
- Schroder K, Hertzog P. J, Ravasi T, Hume D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukozyte Biology*. 2004;75: 173-89.
- Shin WG, Jang JS, Kim HS, Kim SJ, Kim KH, Jang MK, *et al.* Polymorphisms of interleukin-1 and interleukin-2 genes in patients with gastric cancer in Korea. *Journal od Gastroenteroly and Hepatology*. 2008;23:1567–73.
- Şişman AR, Küme T, Taş G, Akan P, Tuncel P. Comparison and evaluation of two C-reactive protein assays based on particle-enhanced immunoturbidimetry. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2007;21(2):71–6.
- Sociedade Portuguesa de Oncologia, As Faces do Cancro (<http://www.asfacesdocancro.pt/>), acedido em Março 2016.

- Srivastava M, Ranjan A, Choudhary J. K, Tripathi M. K, Verma S, Dixit V. K, *et al.* Role of Proinflammatory Cytokines (Interferon Gamma) and Anti-Inflammatory Cytokine (Interleukin-10) Gene Polymorphisms in Chronic Hepatitis B Infection: An Indian Scenario. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2014;34(7):547–51.
- Stanczuk G A, Tswana S A, Bergstrom S, Sibanda E N. Polymorphism in codons 10 and 25 of the transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) gene in patients with invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Europe Journal of Immunogenetics*. 2002;29(5):417-21.
- Stanilova S. Cytokine Gene Polymorphisms in Colorectal Cancer. *Intech* [Internet]. 2013. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/colorectal-cancer-biology-from-genes-to-tumor/cytokine-gene-polymorphisms-in-colorectal-cancer>.
- Stanilov NS, Dobрева ZG, Stanilova SA. Higher TNF-Alpha Production Detected in Colorectal Cancer Patients Monocytes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment Journal*. 2014;26(sup1):107–10.
- Stanilov N, Miteva L, Deliysky T, Jovchev J, Stanilova S. Advanced Colorectal Cancer Is Associated With Enhanced IL-23 and IL-10 Serum Levels. *Laboratory Medicine*. 2010;41(3):159–63.
- Stern A. S, Magram J, Presky D. H. Interleukin-12 an integral cytokine in the immune response. *Life Science*. 1996;58(8):639–54.
- Sugimoto M, Yamaoka Y, Furuta T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(10):1188-200
- Sun R, Jia F, Liang Y, Li L, Bai P, Yuan F, Gao L, Zhang L. Interaction analysis of IL-12A and IL-12B polymorphisms with the risk of colorectal cancer. *Tumor Biology*. 2015; 36(12):9295-301.

- Tanaka T. Development of an Inflammation-Associated Colorectal Cancer Model and Its Application for Research on Carcinogenesis and Chemoprevention. *International Journal of Inflammation*. 2012;2012:1–16.
- Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2101–14.e5.
- TGF-beta signaling in colorectal cancers. *Research and Innovation: European Commission*. Italy. 2014. Disponível em: http://cordis.europa.eu/result/rcn/61898_en.html.
- Tseng L-H, Chen P-J, Lin M-T, Shau W-Y, Chaung S-M, Martin PJ, *et al*. Single nucleotide polymorphisms in Intron 2 of the human interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene: further definition of the IL-1beta and IL-1Ra polymorphisms in North American Caucasians and Taiwanese Chinese. *Tissue Antigens*. 2001;57(4):318–24.
- Tseng L-H, Chen P-J, Lin M-T, Singleton K, Martin EG, Yen A-H, *et al*. Simultaneous genotyping of single nucleotide polymorphisms in the IL-1 gene complex by multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Immunologic Methods*. 2002;267(2):151–6.
- Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano M, Rendine S, Curtioni E. Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. *Europeans Journal of Immunogenetics*. 2003;30(1):5–10.
- Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, Sakai E, Hosono K. IL-6 Plays Crucial Roles in Sporadic Colorectal Cancer through the Cytokine Networks including CXCL7. *Journal of Cancer Therapy*. 2012;3: 874–9.
- Van Dyke AL, Cote ML, Wenzlaff AS, Land S, Schwartz AG. Cytokine SNPs: Comparison of allele frequencies by race and implications for future studies. *Cytokine*. 2009;46(2):236-44.

- Van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *Oncologist*. 2006;11(4):397–408.
- Van Kampen C, Gauldie J, Collins SM. Proinflammatory properties of IL-4 in the intestinal microenvironment. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2005;288(1):G111–7
- Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6 - A Key Regulator of Colorectal Cancer Development. *International Journal of Biological Sciences*. 2012;8(9):1248–53.
- Wang X, Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2008;29(11):1275–88.
- Waterston A, Bower M. TNF and cancer : good or bad? Review Article. *Cancer Therapy*. 2004;2:131–48.
- Xu Y, Pasche B. TGF- signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *The Human Molecular Genetics Network*. 2007;16(R1):R14–20.
- Yang G, Yang X. Smad4-mediated TGF-beta signaling in tumorigenesis. *International Journal of Biological Sciences*. 2010;6(1):1–8.
- Young A, Hobbs R, Kerr D. 2011. *ABC of colorectal cancer (2^a ed.)*. Wiley-Blackwell. Oxford.
- Yuan H, Liddle F. J, Mahajan S, Frank D A. IL-6-induced survival of colorectal carcinoma cells is inhibited by butyrate through down-regulation of the IL-6 receptor. *Carcinogenesis*. 2004;25(11):2247–55.
- Yuzhalin A. E, Kutikhin A. G. *Interleukins in Cancer Biology: Their Heterogeneous Role*. 2014. Elsevier. ??
- Zaidi MR, Merlino G. The Two Faces of Interferon- in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(19):6118–24.

Zhang J-M, An M. Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*. 2009;69(2):482–9.

Zhao H, Wang R. IL-2 -330T / G polymorphism and cancer risk : a meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*. 2015;1753–60.

Zhu Y, Pang S, Lei C, Luo Y, Chu Q, Tan W. Development of a therapy against metastatic bladder cancer using an interleukin-2 surface-modified MB49 bladder cancer stem cells vaccine. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6(1):224.