

Marcela Alcântara Proença

Associação de polimorfismos nos genes *TLR2* e *TLR4* com
risco de câncer colorretal esporádico e influência na expressão
gênica

São José do Rio Preto
2013

Marcela Alcântara Proença

Associação de polimorfismos nos genes *TLR2* e *TLR4* com
risco de câncer colorretal esporádico e influência na expressão
gênica

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Érika Cristina Pavarino

São José do Rio Preto
2013

Marcela Alcântara Proença

Associação de polimorfismos nos genes *TLR2* e *TLR4* com
risco de câncer colorretal esporádico e influência na expressão
gênica

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Genética, junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética, do Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Campus de São
José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva
UNESP - São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Claudia Aparecida Rainho
UNESP - Botucatu

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
25 de fevereiro de 2013

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto-SP - Universidade Estadual Paulista (UNESP) e na Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP (FAMERP), com o apoio financeiro na forma de bolsa de estudos fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e auxílio à pesquisa da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedicatória

*“À minha família,
especialmente minha mãe,
Maria Angélica, e irmã,
Maíra, por todo amor e
por terem estado sempre
ao meu lado e me
incentivado a vencer mais
uma importante etapa da
minha vida.”*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado, me fornecendo sabedoria e discernimento para tomar decisões, e por ter me guiado nesse caminho, proporcionado sempre vitórias na minha vida.

À Prof.^a Dr.^a Ana Elizabete Silva pela orientação, por tudo que me ensinou, pelos momentos de dedicação, paciência, compreensão e competência, e pelo apoio à minha formação profissional, contribuindo significativamente para que eu desenvolvesse um pensamento crítico e uma visão científica.

À banca examinadora: Prof.^a Dr.^a Claudia Aparecida Rainho e Prof.^a Dr.^a Claudia Regina Bonini Domingos por terem aceitado participar da análise e principalmente por contribuírem para o enriquecimento deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Érika Cristina Pavarino e à Prof.^a Dr.^a Eny Maria Goloni Bertollo por todo conhecimento compartilhado, apoio, incentivo, acolhimento e disponibilização do laboratório para realização da extração de DNA de leucócitos e da técnica de PCR quantitativo e pela contribuição para minha formação.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP que contribuíram e apoiaram financeiramente a execução dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética – IBILCE / UNESP, bem como a todos os professores, alunos e funcionários, os quais contribuíram de maneira importante para minha formação.

À instituição IBILCE / UNESP que forneceu o espaço físico e todo o apoio necessário, proporcionando o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Dr. João Gomes Netinho e à Dr.^a Geni Satomi Cunrath e toda a equipe do Serviço de atendimento ambulatorial, clínico e cirúrgico, a Proctologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, pela coleta de amostras de sangue e de biópsias e/ou fragmentos cirúrgicos intestinais.

Aos profissionais de enfermagem, médicos e demais funcionários do Hospital de Base de São José do Rio Preto que tiveram disposição para ajudar no que fosse preciso no decorrer desta pesquisa.

Aos pacientes que aceitaram participar desta pesquisa.

À Dr.^a Patrícia Matos Biselli Chicote pela sua disponibilidade em me ensinar e me ajudar na técnica de PCR quantitativo.

Agradecimentos

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana, onde este trabalho foi realizado: Aline, Ana Flávia, Ayla, Fernanda, Joice, Luiz Otávio, Maysa, Mayra, Nathália e Simone, que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço a todos de coração pela amizade, convivência e conhecimento compartilhados, que fizeram desta etapa da minha vida muito mais agradável. Tenham certeza que sem o apoio de vocês eu não teria conseguido.

À todos os integrantes da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular - UPGEM, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, que me ajudaram e me acolheram quando eu precisei.

Aos integrantes do Laboratório de Genômica Estrutural e Comparativa: Bruna, Lucas, Mariana Maciel, Mariana Victoretti e Nedenia, como também à Prof.^a Dr.^a Maria Elizabete Jorge Amaral, pela convivência diária e pela disponibilização de equipamentos quando preciso.

À todos os meus amigos que sempre me apoiaram e participaram de alguma forma desta etapa, proporcionando momentos de descontração e alegrias, tornando esta jornada muito mais agradável. Difícil citar os nomes de todos, mas sintam-se presentes neste momento da minha vida.

À toda minha família que sempre apoiou minhas decisões e sempre me incentivou e torceu pelo meu sucesso.

À minha mãe Maria Angélica que é o meu exemplo de vida. Uma mulher guerreira, que sempre esteve ao meu lado, nos momentos bons e ruins, me incentivando e me dando forças para continuar a cada dia. Não tenho palavras para descrever sua importância em minha vida. Agradeço pela educação de qualidade que me proporcionou chegar até aqui, pelo incentivo, compreensão, amizade, amor, e por nunca me deixar desistir.

À minha irmã Máira, que me surpreende a cada dia com sua determinação, força e coragem. Sempre ao meu lado, me apoiando e me dando forças para continuar e finalizar cada etapa da minha vida. Agradeço pelo incentivo, compreensão, amizade, amor, e por nunca me deixar desistir. Sei que posso contar com ela sempre que precisar, e ela comigo. Ela é meu orgulho.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade.

Epígrafe

*“Nenhuma grande
descoberta foi feita jamais
sem um palpite ousado.”*

Isaac Newton

*“O que sabemos é uma gota e
o que ignoramos é um
oceano.”*

Isaac Newton

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	9
Lista de tabelas.....	10
Lista de abreviaturas e símbolos	11
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Casuística.....	32
3.2. Estudo Molecular	34
3.2.1. Extração de DNA e RNA	34
3.2.2. Análise dos polimorfismos genéticos	36
3.2.3. Análise de Expressão Gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	37
3.3. Análises Estatísticas.....	40
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Polimorfismos <i>TLR2 -196 a -174 del</i> , <i>TLR4 +896 A/G</i> e <i>36</i> e <i>TLR4 -1607 T/C</i>	43
4.2. Expressão gênica relativa dos genes <i>TLR2</i> e <i>TLR4</i> e influência dos polimorfismos funcionais	48
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXO 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional	79
ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80
ANEXO 3 - Questionário	81

Lista de figuras

Figuras

Página

Figura 1. Localização e ativação dos receptores *Toll-like*. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 estão localizadas na membrana da célula e reconhecem uma grande variedade de agentes bacterianos. TLR2 reconhece principalmente padrões moleculares associados (PAMPs) e TLR4 reconhece principalmente lipopolissacarídeos (LPS). A maioria das vias de sinalização de receptores de reconhecimento padrão converge para a ativação do NF- κ B, que resulta na transcrição de citocinas pró-inflamatórias. A ativação dos TLRs também conduz à ativação do fator regulatório de interferón (IRF3) (adaptada de KONING et al., 2012).....**24**

Figura 2. Localização dos SNPs +896 A/G (região codificadora) e -1607 T/C (região promotora) no gene *TLR4* (adaptada de RAGNARSDÓTTIR et al., 2010).....**27**

Figura 3. A. Padrão eletroforético dos fragmentos gerados por PCR alelo-específico para o polimorfismo *TLR2* -196 a -174 *del*. As setas indicam fragmentos de 286 pb (presença do alelo selvagem *ins*) e 264 pb (presença do alelo polimórfico *del*). Colunas 1 a 5 e 7 indicam indivíduos com genótipo *ins/ins*; coluna 6 indivíduo com genótipo *del/del*. **B.** Padrão eletroforético dos fragmentos gerados por PCR-RFLP para o polimorfismo *TLR4* +896 A/G. As setas indicam fragmentos de 131 pb (presença do alelo selvagem A) e 108 pb (presença do alelo polimórfico G). Colunas 1 a 7 indicam indivíduos com genótipo heterozigoto A/G. **C.** Padrão eletroforético dos fragmentos gerados por PCR-RFLP para o polimorfismo *TLR4* -1607 T/C. As setas indicam fragmentos de 139 pb (presença do alelo selvagem T) e 117 pb (presença do alelo polimórfico C). Colunas 3 a 6 indicam indivíduos com genótipo T/T; colunas 1 e 2 indivíduos com genótipo T/C e colunas 7 a 9 indivíduos com genótipo C/C. M: marcador de peso molecular de 100 pb.....**43**

Figura 4. Comparação das medianas dos níveis de quantificação relativa (RQ) do RNAm dos genes *TLR2* e *TLR4* entre os *pools* de tecido normal adjacente (TN) e o grupo de tecido de câncer colorretal (TCCR). Diferença estatisticamente significativa para o gene *TLR2* ($p < 0,0001$), mas não para o gene *TLR4* ($p = 0,452$), conforme Teste de *Wilcoxon Signed Rank*.....**49**

Figura 5. Comparação das medianas da quantificação relativa (RQ) do RNAm dos genes *TLR2* e *TLR4* no tecido tumoral estratificados por genótipos, utilizando os *pools* de tecido normal como calibradores. Teste não paramétrico de *Mann Whitney* não mostrou diferenças estatisticamente significantes (*TLR2*, $p = 0,072$ e *TLR4*, $p = 0,587$).....**51**

Figura 6. Comparação dos níveis de quantificação relativa (RQ) do RNAm dos genes *TLR2* (A) e *TLR4* (B) em tecido tumoral entre as amostras de pacientes do grupo CCR com genótipo selvagem (utilizado como calibrador) e pacientes com pelo menos um alelo polimórfico. Diferença estatisticamente significativa para o gene *TLR2* ($p = 0,035$), conforme o teste *t*, mas não para o gene *TLR4* conforme o teste *Wilcoxon Signed Rank* ($p = 1,000$).....**52**

Lista de tabelas

Tabelas	Página
Tabela 1. Caracterização dos grupos de pacientes com câncer colorretal (CCR) e controles (C) quanto à idade, gênero e hábitos tabagista e etilista.....	33
Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos gerados e enzimas utilizadas.....	37
Tabela 3. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos <i>TLR2 -196 a -174 del</i> , <i>TLR4 -1607 T/C</i> e <i>+896 A/G</i> e análise de regressão logística múltipla entre os grupos de carcinoma colorretal (CCR) e controle (C), ajustados por gênero, idade, tabagismo e etilismo.....	45
Tabela 4. Distribuição dos fatores de risco gênero, idade, tabagismo e etilismo e análise de regressão logística múltipla entre os grupos de carcinoma colorretal (CCR) e controle (C).....	46
Tabela 5. Efeito combinado dos polimorfismos <i>TLR2 -196 a -174 del</i> , <i>TLR4 +896 A/G</i> e <i>TLR4 -1607 T/C</i> no risco de carcinoma colorretal (CCR) em comparação ao grupo controle (C).....	47
Tabela 6. Distribuição de frequência de haplótipos das variantes <i>-1607 T/C</i> e <i>+896 A/G</i> do gene <i>TLR4</i> nos grupos de câncer colorretal (CCR) e controle (C). 48	
Tabela 7. Comparação da quantificação relativa (RQ) do RNAm dos genes <i>TLR2</i> e <i>TLR4</i> no tecido tumoral de pacientes com câncer colorretal em comparação com o tecido normal e genes de referência (<i>ACTB</i> e <i>GAPDH</i>).....	49
Tabela 8. Comparação da quantificação relativa (RQ) do RNAm dos genes <i>TLR2</i> e <i>TLR4</i> no tecido tumoral estratificados conforme os genótipos selvagem e polimórfico.....	50

Lista de abreviaturas e símbolos

APC	do inglês, <i>adenomatous polyposis coli</i>
ACTB	do inglês, β -actin
AR	ácido retinóico
Asp299Gly	substituição de um resíduo de ácido aspártico por glicina no aminoácido 299
C	controle
CCR	câncer colorretal
CCRE	câncer colorretal esporádico
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
<i>c-ERBB2</i>	do inglês, <i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog2</i>
<i>c-MYC</i>	do inglês, <i>myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COX-2	do inglês, cyclooxygenase-2
Ct	do inglês, <i>threshold cycle</i>
CYP450E1	citocromo P450 – E1
DCC	do inglês, <i>deleted in colorectal carcinoma</i>
del	deleção
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxirribonucleic acid</i>
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
EGFR	do inglês, <i>Epidermal growth factor receptor</i>
et al	e outros, do latim <i>et alii</i>
F	do inglês, <i>Foward</i>
FAM	do inglês, <i>6-carboxyfluorescein</i>
FAP	polipose adenomatosa familiar, do inglês <i>familial adenomatous polyposis</i>
GAPDH	do inglês, <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
h	horas
<i>hMLH1</i>	do inglês, <i>mutL homolog 1</i>
<i>hMSH2</i>	do inglês, <i>mutS homolog 2</i>

<i>hMSH3</i>	do inglês, <i>mutS homolog 3</i>
<i>hMSH6</i>	do inglês, <i>mutS homolog 6</i>
HNPCC	câncer colorretal hereditário não-polipóide, do inglês <i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>
<i>hPMS1</i>	do inglês, <i>postmeiotic segregation increased 1</i>
<i>hPMS2</i>	do inglês, <i>postmeiotic segregation increased 2</i>
IARC	do inglês, <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IC95%	intervalo de confiança de 95%
ICA	Instituto do Câncer
IκB	IkappaB
IKK	IκB kinase
IL-6	interleucina-6, do inglês <i>interleukin 6</i>
INCA	instituto nacional do câncer
ins	inserção
IRAK-1	do inglês, <i>interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
IRF3	do inglês, <i>interferon regulatory factor 3</i>
<i>k-RAS</i>	do inglês, <i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
L	litro
LPS	lipopolissacarídeo
M	marcador de peso molecular
mg/mL	miligrama por mililitro
MGB	do inglês, <i>minor groove binder</i>
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro (unidade de volume: 10 ⁻³ litro)
mmol/L	milimol por litro
MMR	do inglês, <i>mismatch repair</i>
MyD88	do inglês, <i>myeloid differentiation primary response 88</i>
n	número
NaCl	cloreto de sódio
NFκB	fator nuclear-kappa B, do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>
ng	nanograma (unidade de massa: 10 ⁻⁹ grama)
ng/μL	nanograma por microlitro

nº	número
OR	do inglês, <i>Odds ratio</i>
p	probabilidade
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos, do inglês <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
Pb	pares de base
PBS	tampão fosfato salina, do inglês <i>phosphate buffer solution</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
Prostaglandina E2	do inglês, <i>prostaglandin E receptor 2</i>
qPCR	PCR quantitativa do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
R	do inglês, <i>reverse</i>
RFLP	do inglês, <i>restriction fragment length polymorphism</i>
Rn	do inglês, <i>normalized reporter signal</i>
RNA	ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNAm	RNA mensageiro
ROX	do inglês, <i>6-carboxy-X-rhodamine</i>
rpm	rotações por minuto
RQ	quantificação relativa
SNPs	do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>
SP	São Paulo
SPSS	do inglês, <i>statistical package for the social sciences</i> (programa estatístico)
Tº	temperatura
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCCR	tecido de câncer colorretal
TE	tampão de eluição
TIR	do inglês, <i>toll-interleukin 1 receptor</i>
TLR1	do inglês, <i>toll-like receptor 1</i>
TLR2	do inglês, <i>toll-like receptor 2</i>
TLR4	do inglês, <i>toll-like receptor 4</i>
TLR5	do inglês, <i>toll-like receptor 5</i>

TLR6	do inglês, <i>toll-like receptor 6</i>
TLRs	do inglês, <i>toll-like receptors</i>
TN	tecido normal
<i>Tp53</i>	do inglês, <i>tumor protein p53</i>
TRAF6	do inglês, <i>tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6</i>
U/μL	unidades por microlitro
UNESP	Universidade Estadual Paulista
v.	versão
vs	<i>versus</i>
Δ	delta
#	do inglês, <i>number</i>
%	porcentagem
+	sinal de mais (adição)
<	menor
=	igual
±	mais ou menos
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
®	marca registrada
°C	graus Celsius (medida de temperatura)
μg	micrograma (unidade de massa: 10 ⁻⁶ grama)
μL	microlitro (unidade de volume: 10 ⁻⁶ litro)
μm	micrômetro (unidade de comprimento: 10 ⁻⁶ metro)
μM	micromolar (unidade de concentração: 10 ⁻⁶ molar)
μmol/L	micromol por litro

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal (CCR) é um dos modelos da associação inflamação-câncer. Assim, polimorfismos em genes que desempenham um papel importante na suscetibilidade a doenças inflamatórias, como os receptores *Toll-like* (*TLR2* e *TLR4*), podem ser alvos interessantes para estudos de possíveis marcadores moleculares para CCR. **Objetivos:** Avaliar a associação dos polimorfismos *TLR2 -196 a -174del*, *TLR4 -1607 T/C* (rs10759932) e *TLR4 +896 A/G* (rs4986790), e de fatores de risco (gênero, idade, tabagismo e etilismo) com o desenvolvimento de CCR; assim como determinar os níveis de expressão relativa desses genes no tecido tumoral e a influência dos polimorfismos funcionais sobre os níveis de expressão do RNAm. **Materiais e Métodos:** Foram genotipadas 434 amostras (194 de pacientes com CCR e 240 de indivíduos saudáveis) de DNA de leucócitos de sangue periférico ou de células de tecido tumoral (DNA e RNA), por meio das técnicas de PCR alelo-específico e PCR-RFLP. A análise de regressão logística múltipla foi utilizada para avaliar a associação dos polimorfismos com risco de CCR, aplicando os modelos log-aditivo, dominante e recessivo, ajustados para os fatores de risco. Para a quantificação relativa (RQ) do RNAm foi utilizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) em 40 amostras de tecido tumoral. **Resultados:** A variante polimórfica *TLR2 -196 a -174del* foi associada com risco aumentado de desenvolvimento de CCR de acordo com os modelos dominante (OR=1,72, IC95%=1,03-2,89; p=0,038) e log-aditivo (OR=1,59, IC95%=1,02-2,48; p=0,039), porém para os polimorfismos *TLR4 -1607 T/C* e *TLR4 +896 A/G* não foi encontrada associação. Idade acima de 60 anos (OR=1,83, IC95%=1,26-2,90; p=0,003) e hábito etilista (OR=2,78, IC95%=1,68-4,60; p=0,000) também estão associados com risco aumentado para o desenvolvimento desta neoplasia. A análise de quantificação relativa do RNAm evidenciou aumento significativo na expressão de *TLR2* (RQ=2,36) no tecido tumoral quando comparado com o tecido normal adjacente (p<0,0001), enquanto para o gene *TLR4* não foi observada diferença (RQ=0,74; p=0,452). Quando as amostras de tecido tumoral foram estratificadas conforme os polimorfismos em região promotora, os portadores da variante *TLR2 -196 a -174 del* apresentaram mediana de RQ do RNAm cerca de duas vezes maior (RQ=6,95) em comparação com o genótipo selvagem (RQ=3,57). Contudo, não foi observada influência do polimorfismo *TLR4 -1607 T/C* sobre os níveis de expressão gênica. **Conclusões:** O polimorfismo funcional *TLR2 -196 a -174del* encontra-se associado com risco de CCR em população brasileira, e parece exercer influência sobre os níveis de expressão gênica, aumentando a expressão do gene *TLR2* no tecido tumoral, evidenciando seu papel importante na carcinogênese colorretal esporádica.

Palavras-chave: Polimorfismos Genéticos, *TLR2*, *TLR4*, Câncer Colorretal, Expressão Gênica, Inflamação.

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is one of the models of inflammation-cancer association. Thus, polymorphisms in genes that play a role in susceptibility to inflammatory diseases, such as Toll-like receptors (*TLR2* and *TLR4*) may be interesting targets for studies of potential molecular markers for CRC. **Objectives:** To evaluate the association of polymorphisms *TLR2* -196 to -174del, *TLR4* -1607 T/C (rs10759932) and *TLR4* +896 A/G (rs4986790) and risk factors (gender, age, smoking and drinking habits) with CRC development, as well as to determine the relative expression levels of these genes in tumor tissue and influence of functional polymorphisms on the levels of mRNA expression. **Materials and Methods:** We genotyped 434 samples (194 patients with CRC and 240 from healthy individuals) of DNA from peripheral blood leukocytes or tumor tissue cells (DNA and RNA), by PCR allele-specific or PCR-RFLP. The multiple logistic regression analysis was performed to evaluate the association between the polymorphisms with risk of CRC, applying the log-additive, dominant and recessive models, adjusted for risk factors. The relative quantification (RQ) of the mRNA was performed by the real time quantitative PCR (qPCR) technique in 40 tumor tissue samples. **Results:** The polymorphic variant *TLR2* -196 to -174del was associated with increased risk of developing CRC according to both dominant (OR=1.72, 95%CI=1.03 to 2.89, p=0.038) and log-additive models (OR=1.59, 95%CI=1.02 to 2.48, p=0.039), but for the *TLR4* -1607 T/C and *TLR4* +896 A/G polymorphisms no association was found. Age above 60 years old (OR=1.83, 95%CI=1.26 to 2.90, p=0.003) and alcohol consumption (OR=2.78, 95%CI=1.68 to 4.60, p=0.000) are also associated with increased risk for developing of this cancer. Analysis of relative quantification of the mRNA showed a significant increase in expression of *TLR2* (RQ=2.36) in tumor tissue when compared with adjacent normal tissue (p<0.0001), while for the *TLR4* gene no difference was observed (RQ=0.74, p=0.452). When tumor tissue samples were stratified according to the polymorphisms in the promoter region, the carriers of *TLR2* -196 to -174 del variant had a median of mRNA RQ about 2-fold higher (RQ=6.95) when compared with the wild genotype (RQ=3.57). However, there was no influence of *TLR4* -1607 T/C polymorphism on the levels of gene expression. **Conclusions:** The functional polymorphism *TLR2* -196 to -174del is associated with increased risk of CRC in the Brazilian population, and seems to influence levels of gene expression, increasing the expression of *TLR2* gene in tumor tissue, suggesting an important role in sporadic colorectal carcinogenesis.

Keywords: Genetic Polymorphisms, *TLR2*, *TLR4*, Colorectal Cancer, Gene Expression, Inflammation.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A iniciação e progressão de alguns tipos de câncer estão diretamente relacionadas com fatores de risco ambientais, hábitos, estilos de vida e fatores genéticos (SANTOS, 2007; INCA, 2013). Além disso, um fator de risco com papel importante na carcinogênese é a inflamação crônica (COUSSENS; WERB, 2002; LONKAR; DEDON, 2011; MULTHOFF; RADONS, 2012; WOGAN et al., 2012).

O processo inflamatório ocorre por meio de uma rede de sinais químicos que inicia e mantém uma resposta imune do hospedeiro com a finalidade de cicatrizar o tecido afetado (COUSSENS; WERB, 2002). Em alguns órgãos, como por exemplo, no esôfago, estômago, bexiga e intestino, a inflamação gera um microambiente propício para o desenvolvimento e progressão tumoral, podendo atuar como um fator de risco que aumenta as chances de desenvolvimento desta doença (COUSSENS; WERB, 2002; ITZKOWITZ; YIO, 2004; BORASKA JELAVIĆ et al., 2006). Portanto, muitos tipos de câncer surgem a partir de locais de irritação, infecção crônica e inflamação (COUSSENS; WERB, 2002; TRINCHIERI, 2012).

A relação funcional entre inflamação crônica e câncer esta bem estabelecida, e atualmente está cada vez mais evidente que o microambiente tumoral, em grande parte controlado por células inflamatórias, é um participante indispensável no processo neoplásico, promovendo a sobrevivência, proliferação e migração das células cancerígenas (COUSSENS; WERB, 2002; TRINCHIERI, 2012). Pode-se citar as relações entre gastrite crônica por *Helicobacter pylori*, que é a principal causa mundial de câncer gástrico (KUPER; ADAMI; TRICHOPOULOS, 2000; ERNST; TAKAISHI; CROWE, 2001; PEEK; BLASER, 2002), hepatite crônica ou cirrose por vírus da hepatite B ou C e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (KUPER; ADAMI; TRICHOPOULOS, 2000; BALKWILL; MANTOVANI, 2001; COUSSENS;

WERB, 2002), esquistossomose (*Schistosoma haematobium*) que pode promover um aumento do risco de carcinoma de bexiga (KUPER; ADAMI; TRICHOPOULOS, 2000; COUSSENS; WERB, 2002), e a doença inflamatória intestinal como risco para desenvolvimento de câncer colorretal (CCR) (ORTEGA-CAVA et al., 2003; VAN DER WOUDE et al., 2003; NIHON-YANAGI et al., 2012). Assim, a inflamação crônica tem emergido como um dos principais fatores de risco e como uma das principais características do câncer que afetam qualquer fase da tumorigênese (COLOTTA et al., 2009; GRIVENNIKOV; KARIN, 2010; LONKAR; DEDON, 2011; MULTHOFF; RADONS, 2012).

Uma das principais associações de inflamação crônica com câncer está no CCR provenientes de indivíduos com doenças inflamatórias intestinais, como por exemplo, colite ulcerativa crônica e Doença de Crohn (COUSSENS; WERB, 2002). Alguns estudos indicam que o uso de drogas anti-inflamatórias reduz o risco de CCR em 40 a 50%, causa regressão de adenomas em pacientes com polipose adenomatosa familiar (FAP), e pode ser preventivo para câncer de esôfago, estômago e pulmão (COUSSENS; WERB, 2002; OSHIMA; TAKETO, 2002; BORASKA JELAVIĆ et al., 2006).

O CCR abrange as neoplasias de intestino grosso (cólon e reto), atualmente considerado como uma das doenças mais significativas na medicina, ocorrendo em diversos países como a segunda ou terceira principal causa de morte relacionada ao câncer (NIEDZIELSKA et al., 2009; AGRAWAL et al., 2012). O CCR apresenta anualmente incidência mundial aproximada de 1 milhão de casos e mortalidade de mais de 500.000 (AGRAWAL et al., 2012). No Brasil, encontra-se como o terceiro tipo de câncer mais comum entre homens e mulheres (INCA, 2013), com estimativa em 2012 de 14.180 casos novos em homens e 15.960 em mulheres.

O CCR pode ser dividido em dois grupos: hereditário e esporádico (CCRE), sendo que o CCRE corresponde a mais de 90% dos

casos (SANTOS, 2007). O tipo histológico mais frequente é o adenocarcinoma, responsável por 90% dos casos (GIURIZATO; AREIAS, 2008), em que 60% de todos os adenocarcinomas do intestino grosso se localizam nos seus 20 centímetros terminais (sigmoide distal e reto) (SANTOS, 2007). Na maioria dos casos, o CCR apresenta um bom prognóstico e pode ser facilmente tratado se diagnosticado em estágios iniciais, quando ainda não se espalhou para outros órgãos. Grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso (MORSON, 1968; AGRAWAL et al., 2012). O adenoma é considerado um dos principais precursores de CCR, sendo que este pode progredir pela via adenoma - adenocarcinoma (NOFFSINGER, 2009; IMPERIALE; RANSOHOFF, 2012).

Na etiologia do CCR vários fatores de risco têm sido mais frequentemente destacados como a idade avançada, gênero, pólipos, história clínica individual, história familiar, dieta rica em gorduras, obesidade, sedentarismo, tabagismo, etilismo e diabetes (SANTOS, 2007). Algumas condições hereditárias como FAP e CCR hereditário sem polipose (HNPCC) aumentam o risco desse tipo de neoplasia (NIEDZIELSKA et al., 2009).

Alterações genéticas têm sido descritas em três classes diferentes de genes na etiologia do CCR: oncogenes como *k-RAS*, *c-MYC* e *c-ERBB2* (HAMILTON, 1993; KAPITANOVÍC et al., 1997; CALVERT; FRUCHT, 2002), genes supressores de tumor, destacando-se os genes *APC*, *Tp53* e o *DCC*, em que 70% dos pacientes com CCR apresentam uma mutação neste último gene (FEARON et al., 1990; FEARON; VOGELSTEIN, 1990; CALVERT; FRUCHT, 2002), como também mutações em genes de reparo por pareamento errôneo (*mismatch repair - MMR*) incluindo os genes *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hPMS1*, *hPMS2* e *hMSH6*, que quando mutados podem levar ao desenvolvimento do tipo hereditário HNPCC (CALVERT; FRUCHT, 2002). Portanto, ampliar o

conhecimento das alterações genéticas específicas responsáveis pela carcinogênese colorretal poderá permitir a realização de testes genéticos mais específicos para prevenir a progressão desta doença (CALVERT; FRUCHT, 2002; KAZ; BRETNALL, 2006; LEVENTHAL et al., 2013).

Os avanços nos estudos das causas moleculares de CCR e a capacidade de utilização de testes genéticos para a prevenção, juntamente com o reconhecimento das causas e dos padrões clínicos e a disponibilidade de métodos de detecção, como a colonoscopia, poderão proporcionar ferramentas importantes para prevenção da grande maioria dos casos de CCR (CALVERT; FRUCHT, 2002; KAZ; BRETNALL, 2006; BERG; SOREIDE, 2012; LEVENTHAL et al., 2013).

A doença inflamatória intestinal também é conhecida por estar associada com um risco aumentado de CCR (CAMMAROTA et al., 2010; WOGAN et al., 2012), e resulta da ativação intermitente do sistema imune das mucosas no trato gastrointestinal promovendo a inflamação crônica (WOGAN et al., 2012). A ativação do processo inflamatório e da resposta imune inata e adaptativa é um dos principais mecanismos envolvidos na alteração da homeostase causada pelos tumores nos tecidos adjacentes (FINN, 2008; GARBER, 2009; CAMMAROTA et al., 2010). É conhecido que as células neoplásicas são capazes de atrair diferentes tipos celulares para o microambiente tumoral pela secreção de proteases extracelulares, fatores pró-angiogênicos e citocinas (MACARTHUR; HOLD; EL-OMAR, 2004). Na carcinogênese de cólon, recentemente foi descrito um modelo experimental em que a inflamação, infecção e câncer são mecanicamente ligados, e fornece evidências de que mediadores químicos do sistema imunológico inato e toxinas bacterianas desempenham papéis fundamentais na condução do desenvolvimento desta neoplasia (MANGERICH et al., 2012; WOGAN et al., 2012).

O intestino grosso humano encontra-se constantemente sob um processo inflamatório devido à exposição de microrganismos e seus PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) (FUSUNYAN et

al., 2001), que ativam fatores participantes das vias inflamatórias, bem como receptores e genes relacionados a esse processo (NIHON-YANAGI et al., 2012). Portanto, reforçando as evidências de que as neoplasias de intestino grosso estão diretamente relacionadas com a inflamação (NIEDZIELSKA et al., 2009; NIHON-YANAGI et al., 2012; WOGAN et al., 2012). Assim modificações em fatores que participam do processo inflamatório no intestino podem alterar a suscetibilidade do hospedeiro ao desenvolvimento de CCR.

Dentre as alterações em fatores do hospedeiro encontram-se os polimorfismos genéticos. Essas diferenças genéticas nas regiões reguladoras e funcionais de diversas classes de genes podem influenciar a progressão de vários tipos de câncer, como o CCR (BORASKA JELAVIĆ et al., 2006; TAHARA et al., 2007; LOWE et al., 2010; TESNIERE et al., 2010; OLIVEIRA; SILVA, 2012). Os polimorfismos genéticos podem acarretar mudança na função ou expressão da proteína resultante (NOGUCHI et al., 2004), e no caso de genes relacionados à inflamação, isso pode resultar em uma resposta inflamatória diferenciada.

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são a forma mais comum de variantes genéticas no genoma humano, alguns dos quais tem potencial influência funcional na suscetibilidade a doenças humanas como o câncer. Como o intestino é um órgão dependente da resposta imune inata e adaptativa, devido a constante presença de microrganismos, diferenças na ação das proteínas ou receptores envolvidos neste processo podem contribuir com o aumento do risco de desenvolvimento dessa neoplasia (PANDEY et al., 2011).

Diferentes classes de genes participam ativamente do processo inflamatório, como receptores de membrana e de citocinas pró- e anti-inflamatórias, e quando desregulados ou alterados podem estar relacionados ao desenvolvimento do câncer. Por exemplo, dentre os genes da família Toll, os receptores *Toll-like* (TLRs) de mamíferos tem um papel essencial no reconhecimento direto dos agentes infecciosos,

levando à ativação das respostas imune inata e adaptativa (NIEDZIELSKA et al., 2009; HISHIDA et al., 2010; NIHON-YANAGI et al., 2012). A progressão de uma lesão pré-cancerosa, como os pólipos adenomatosos, envolve ações complexas de várias citocinas na proliferação de células T, adesão célula-célula, apoptose, e imunidade do hospedeiro (JACOBSON-BROWN; NEUMAN, 2004). O papel de alguns TLRs tem sido relatado em doenças do intestino, e acredita-se que um dos papéis desses receptores seja induzir a morte celular por apoptose das células neoplásicas (NIEDZIELSKA et al., 2009).

Os genes da família *TLRs* codificam proteínas transmembranas tipo I, que respondem aos microrganismos patogênicos na matriz extracelular reconhecendo seus componentes conservados (OSPELT; GAY, 2009; ASHTON et al., 2010; HISHIDA et al., 2011). O intestino humano normal, como já destacado, encontra-se em estado de inflamação controlada, por ter evoluído na presença de bactérias comensais (JUMP; LEVINE, 2004; BORASKA JELAVIĆ et al., 2006), e o primeiro passo na interação dessas bactérias com o epitélio intestinal é o seu reconhecimento por receptores TLRs que reconhecem PAMPs. Este processo termina com sinais provenientes de expressão do peptídeo antimicrobiano, fortificação da barreira e proliferação de células epiteliais (RAKOFF-NAHOUM et al., 2004; BORASKA JELAVIĆ et al., 2006). Os TLRs ativam o fator nuclear κ B (NF κ B), principal via de sinalização regulatória da inflamação, e sua ativação está envolvida na patogênese do CCR (GRETEN et al., 2004; PIKARSKY et al., 2004; BORASKA JELAVIĆ et al., 2006).

Até o momento foram identificados doze genes *TLRs* (HISHIDA et al., 2011). Dentre eles pode-se destacar os genes *TLR2* (4q32) e *TLR4* (9q33.1), que são altamente polimórficos e representam alvos interessantes para elucidar seu papel no desenvolvimento do CCR (EL OMAR; NG; HOLD, 2008; ASHTON et al., 2010). O *TLR2* é responsável por reconhecer lipoproteínas bacterianas assim como os PAMPs de uma

ampla gama de patógenos e o *TLR4* está envolvido no reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas (ASHTON et al., 2010; HISHIDA et al., 2011), como por exemplo as bactérias comensais residentes no intestino humano (Figura 1).

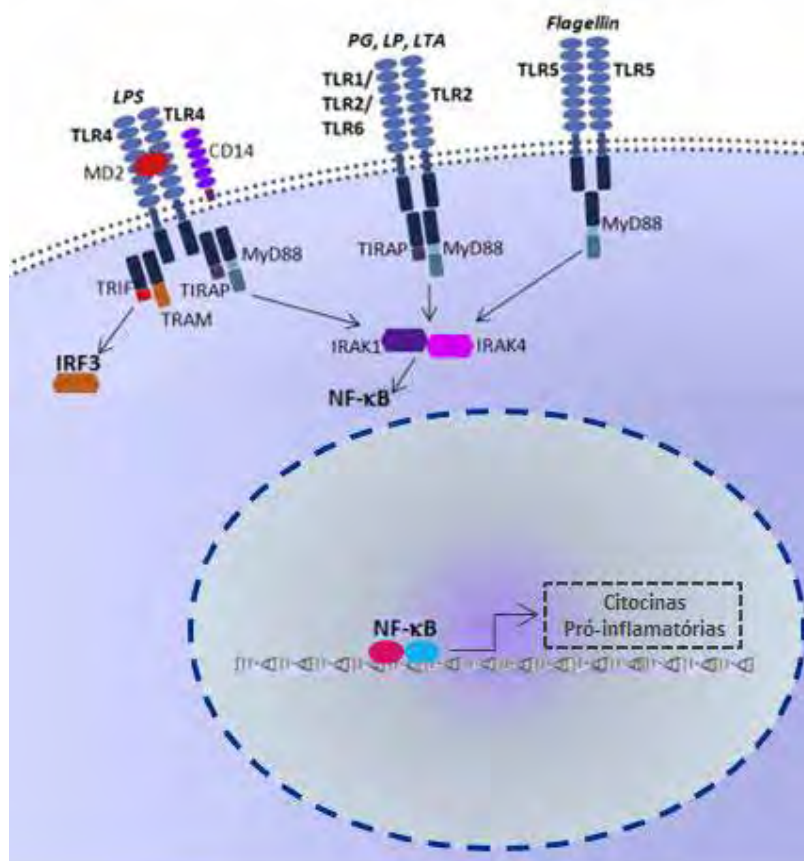


Figura 1. Localização e ativação dos receptores *Toll-like*. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 estão localizadas na membrana da célula e reconhecem uma grande variedade de agentes bacterianos. TLR2 reconhece principalmente padrões moleculares associados (PAMPs) e TLR4 reconhece principalmente lipopolissacarídeos (LPS). A maioria das vias de sinalização de receptores de reconhecimento padrão converge para a ativação do NF-κB, que resulta na transcrição de citocinas pró-inflamatórias. A ativação dos TLRs também conduz à ativação do fator regulatório de interferón (IRF3) (adaptada de KONING et al., 2012).

Portanto, os receptores TLR2 e TLR4 são de importância crucial no reconhecimento de microrganismos no intestino, ativando o processo de inflamação controlada. Variantes polimórficas destes genes foram estudadas em uma série de doenças inflamatórias e câncer (SCHRODER; SCHUMANN, 2005; MISCH; HAWN, 2008; EL OMAR; NG; HOLD, 2008; ASHTON et al., 2010; PANDEY et al., 2011), no entanto a sua associação com CCR na população brasileira ainda não foi determinada.

Polimorfismos nos genes *TLR2* e *TLR4* podem causar uma expressão diferenciada em seus receptores, ou até mesmo alguma mudança de função (NOGUCHI et al., 2004), que pode determinar grupos de indivíduos com maior risco de progressão para carcinoma invasivo (PANDEY et al., 2011). O gene *TLR2* apresenta um polimorfismo correspondente a uma deleção de 22 pares de bases na posição -196 a -174 da região promotora, sugerindo uma redução na atividade de transcrição do gene (NOGUCHI et al., 2004). Alterações no gene *TLR2* têm sido associadas à suscetibilidade para várias doenças infecciosas e inflamatórias, como a hanseníase (KANG; CHAE, 2001), risco aumentado de infecção por bactérias Gram-negativas (SCHRODER et al., 2003), asma (EDER et al., 2004), infecções bacterianas recorrentes (KUTUKCULER et al., 2007), câncer gástrico (TAHARA et al., 2007; OLIVEIRA; SILVA, 2012), metaplasia intestinal (TAHARA et al., 2008) e CCR (BORASKA JELAVIĆ et al., 2006; NIEDZIELSKA et al., 2009; LOWE et al., 2010).

O gene *TLR4* é responsável por codificar um receptor transmembrana de reconhecimento padrão que estabelece uma ligação crítica entre estimulantes do sistema imune produzidos por microrganismos, em particular lipopolissacarídeos, e o início da reação imune inata aos agentes exógenos, bem como às células tumorais (KILLEEN, et al., 2009; CAMMAROTA et al., 2010). Esse gene foi descoberto como sendo expresso por leucócitos, células endoteliais e

células epiteliais (ADEREM; ULEVITCH, 2000; FAURE et al., 2001; VAMADEVAN, et al., 2009; CAMMAROTA et al., 2010).

No intestino, a ativação de *TLR4* em enterócitos leva a uma inibição da migração e da proliferação, bem como a indução de apoptose, fatores que podem promover lesões intestinais quando os mecanismos de reparo são inibidos (CAMMAROTA et al., 2010). Além disso, a sinalização de TLRs epiteliais, que atuam juntamente com a sinalização de TLRs de leucócitos, participa do desenvolvimento da inflamação intestinal (GRIBAR et al., 2008; CAMMAROTA et al., 2010). A ativação do *TLR4* leva a indução de uma resposta inflamatória mediada por múltiplas vias e estimula a produção de citocinas diversas, em especial a IL-6 (ROSE-JOHN, et al., 2009; CAMMAROTA et al., 2010). Foi também demonstrado que a sinalização do *TLR4* é fundamental para a carcinogênese do cólon na colite crônica, sendo responsável pela indução de *COX-2* (ciclooxigenase-2), aumento da produção de prostaglandina E₂, e ativação da fosforilação do EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (BERTAGNOLLI, 2007; FUKATA et al., 2007; GRAU et al., 2009; CAROTHERS et al., 2010; CAMMAROTA et al., 2010). Alguns estudos indicam que os níveis de expressão de *TLR4* podem influenciar a resposta imune inata e potencialmente relacionar a variação na sequência promotora de *TLR4* com a suscetibilidade a doenças humanas como o câncer (RAGNARSDÓTTIR et al., 2010).

O gene *TLR4* apresenta alguns polimorfismos (Figura 2) implicados na suscetibilidade aumentada a várias doenças como a aterosclerose (KIECHL; WIEDERMANN; WILLEIT, 2003), asma (HOLD et al., 2007), malária (MOCKENHAUPT et al., 2006), e também a infecção pela bactéria *H. pylori* associada ao câncer gástrico e seus precursores (LORENZ; FREES; SCHWARTZ, 2001; OLIVEIRA; SILVA, 2012). Polimorfismos no gene *TLR4* têm sido associados a vários tipos de câncer (KUTIKHIN, 2011a). O SNP *TLR4* +896 A/G (rs4986790) tem recebido atenção especial em alguns estudos, embora os resultados ainda sejam

controversos (WU et al., 2006; GARZA-GONZALEZ et al., 2007; ACHYUT et al., 2007; RAGNARSDÓTTIR et al., 2010; OLIVEIRA; SILVA, 2012). A substituição de um resíduo de ácido aspártico por glicina no aminoácido 299 (Asp299Gly) referente ao polimorfismo *TLR4* +896 A/G tem sido associada com colite ulcerativa e Doença de Crohn (FRANCHIMONT et al., 2004; TOROK et al., 2004; GAZOULI et al., 2005), bem como com CCR (BORASKA JELAVIĆ et al., 2006; TESNIERE et al., 2010). Apesar disso, alguns outros estudos não encontraram associação entre este polimorfismo e CCR (GUO; ZHU; XIA, 2006; LANDI et al., 2006).

Outro SNP no gene *TLR4* que merece atenção especial nos estudos é o -1607 T/C (rs10759932) (Figura 2). Esta variante tem sido associada com câncer gástrico (HUANG et al., 2010) e câncer de próstata (CHENG et al., 2007; KUTIKHIN, 2011b), porém ainda não há estudos sobre sua associação com CCR.

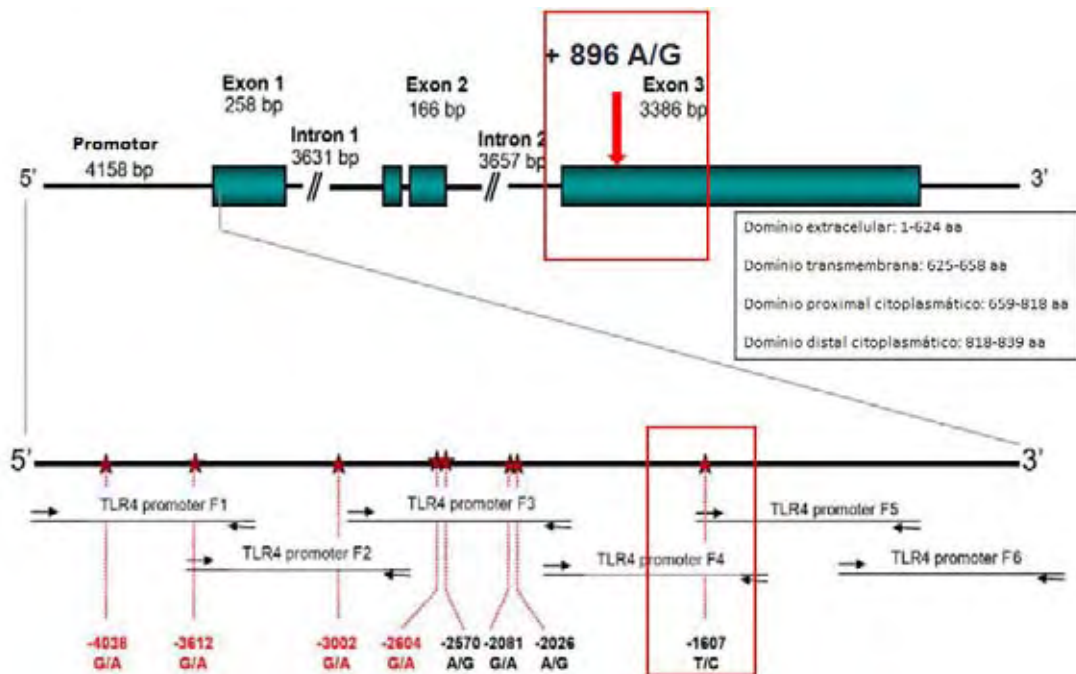


Figura 2. Localização dos SNPs +896 A/G (região codificadora) e -1607 T/C (região promotora) no gene *TLR4* (adaptada de RAGNARSDÓTTIR et al., 2010).

Na população brasileira, polimorfismos nos genes *TLR2* e *TLR4* foram avaliados para verificação de uma possível associação com Doença de Chagas (*TLR4* +896 A/G) (RAMASAWMY et al., 2009), malária (*TLR4* +896 A/G) (SOARES et al., 2008) e colite ulcerativa e Doença de Crohn (*TLR2* Arg753Gln e *TLR4* +896 A/G) (QUEIROZ et al., 2009), mas sem evidência de associação com essas doenças. Contudo, em estudo recente finalizado por nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA; SILVA; 2012), foi observada associação de ambos os polimorfismos *TLR2* -196 a -174 del e *TLR4* +896 A/G com risco de câncer gástrico.

O CCR é um tipo de câncer, que na maioria dos casos pode ser facilmente tratado quando diagnosticado em estágios iniciais. Por isso a importância da busca de marcadores moleculares que possam indicar grupos de risco, facilitando o diagnóstico precoce em indivíduos com risco aumentado do desenvolvimento desta neoplasia. Portanto, considerando o papel importante dos genes *TLR2* e *TLR4* na ativação do processo inflamatório, estes se tornam importantes alvos para pesquisa como possíveis marcadores moleculares para o risco de desenvolvimento de CCRE na população brasileira.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Devido à inexistência de estudos de associação dos polimorfismos *TLR2 -196 a -174 del*, *TLR4 +896 A/G (Asp299Gly)* e *TLR4 -1607 T/C* com o desenvolvimento de CCR esporádico na população brasileira e os resultados controversos na literatura envolvendo outras populações e outros tipos de câncer, o presente estudo teve por objetivos:

1. Determinar as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos *TLR2 -196 a -174del*, *TLR4 +896 A/G (Asp299Gly)* e *TLR4 -1607 T/C* em pacientes com CCRE em comparação com indivíduos saudáveis e a ocorrência de associação desses polimorfismos com suscetibilidade ao CCRE, ajustados com fatores de risco como gênero, idade, tabagismo e etilismo;
2. Verificar a associação dos fatores de risco: gênero, idade, tabagismo e etilismo, ajustados para os polimorfismos, com risco de desenvolvimento de CCRE;
3. Determinar os níveis de expressão relativa do RNAm dos genes *TLR2* e *TLR4* no tecido tumoral de pacientes com CCRE e avaliar a influência dos polimorfismos nas regiões promotoras desses genes sobre os níveis de expressão gênica.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), IBILCE / UNESP, Parecer nº 027/11 (protocolo: 0009.0.229.000-11) (Anexo 1). De todos os participantes foram obtidos o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), pelo próprio pesquisador ou membro da equipe médica no momento da coleta das amostras, após os devidos esclarecimentos. Neste momento, também foi preenchido um questionário contendo informações sobre identificação, idade, gênero, tabagismo, etilismo, história familiar de CCR ou lesões como pólipos adenomatosos, dentre outras (Anexo 3). Foram considerados tabagistas os indivíduos que consumiram acima de 100 cigarros (ou cinco maços) durante a vida e etilistas aqueles que consumiam acima de quatro doses de bebida destilada, ou uma garrafa ou duas latas de cerveja por semana (KJAERHEIN; GAARD; ANDERSEN, 1998; AHRENDT et al., 2000). Todas as amostras foram devidamente identificadas com um código resguardando, assim, a identificação dos indivíduos. Portanto, a pesquisa foi desenvolvida conforme as Normas Regulamentadoras de Pesquisas em Seres Humanos, Resolução CNS 196/96.

3.1. Casuística

Trata-se de estudo caso-controle desenvolvido em um total de 434 indivíduos. O grupo caso (CCR) foi constituído por 194 amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de CCR esporádico (105 homens e 89 mulheres) com média de idade de 62 ± 12 anos (variação de 24 a 88 anos) (Tabela 1), dos quais 160 de sangue periférico e 40 provenientes de biópsias ou fragmentos cirúrgicos de tecido de CCR e respectivos tecidos normais adjacentes (de seis pacientes foram coletados tanto as biópsias como o sangue periférico). Todas as amostras foram coletadas no período

de Dezembro/2010 a Agosto/2012 de pacientes atendidos no ambulatório do Instituto do Câncer (ICA) e da Proctologia, pelo Serviço de Atendimento Ambulatorial do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP. Neste grupo 47,9% dos pacientes tinham hábito tabagista e 41,9% eram etilistas (Tabela 1).

O grupo controle (C) foi constituído por 240 indivíduos saudáveis (121 homens e 119 mulheres) com média de idade de 56 \pm 18 anos (variação de 20 a 93 anos), cujas amostras de DNA de leucócitos já se encontravam armazenadas no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana (IBILCE / UNESP), sob a responsabilidade da orientadora, resultantes de estudo prévio (DUARTE et al., 2005) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IBILCE / UNESP conforme parecer nº 1739/2003.

Tabela 1. Caracterização dos grupos de pacientes com câncer colorretal (CCR) e controles (C) quanto à idade, gênero e hábitos tabagista e etilista.

Variáveis	CCR	C
	n(%)	n(%)
n° de indivíduos	194	240
Idade (anos)		
< 60	72 (37,1)	136 (56,7)
≥ 60	122 (62,9)	104 (43,3)
Média \pm desvio	62 \pm 12	56 \pm 18
Variação	24 a 88	20 a 93
Gênero		
Feminino	89 (45,9)	119 (49,6)
Masculino	105 (54,1)	121 (50,4)
Hábito tabagista		
Não fumantes	101 (52,1)	87 (36,3)
Fumantes	93 (47,9)	153 (63,7)
Hábito Etilista		
Não etilistas	114 (58,8)	178 (74,1)
Etilistas	80 (41,2)	62 (25,9)

3.2. Estudo Molecular

A partir do DNA extraído de leucócitos de sangue periférico ou de biópsias e fragmentos cirúrgicos foi realizada a genotipagem para pesquisa dos polimorfismos nos genes *TLR2* e *TLR4* nos grupos de CCR e controle. Enquanto a partir do RNA extraído do tecido tumoral e normal adjacente, foi realizada a síntese de cDNA para quantificação de RNAm desses genes para avaliação da expressão gênica relativa.

3.2.1. Extração de DNA e RNA

O DNA de leucócitos de sangue periférico do grupo CCR foi extraído segundo a técnica proposta por Miller et al. (1988), com modificações, e armazenado em freezer -20°C para a posterior genotipagem.

Foram coletados aproximadamente 7,0 mL de sangue periférico e transferidos para um tubo de 15 mL estéreis contendo 7 mL de Ficoll a temperatura ambiente (proporção 1:1). O tubo foi centrifugado a 1500 rpm por 30 minutos. Após a formação de três fases (plasma, linfócitos e hemácias), os linfócitos foram transferidos para um novo tubo e, em seguida, adicionada solução tampão (PBS) até completar o volume de 15 mL. O tubo foi centrifugado novamente a 1200 rpm por 15 minutos, o sobrenadante descartado e novamente adicionado PBS até completar o volume de 15 mL. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e adicionado 3 mL de tampão de lise, 200 μL de SDS 10% e 50 μL de proteinase K (20 mg/mL). A solução foi incubada durante a noite a 37°C . Após a digestão proteica foi adicionada 1 mL de NaCl 6M, agitada a solução e em seguida mantida sob refrigeração por 15 minutos. Após este período, a solução foi homogeneizada e centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 15 mL,

descartando-se o *pellet*. Após a adição de etanol 100% gelado, o tubo foi fechado e misturado por inversão. O DNA precipitado foi removido para um microtubo contendo 500 μ L etanol 70%. Este foi centrifugado a 12000 rpm por cinco minutos. O DNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 200 μ L de tampão TE. Após sete dias à temperatura ambiente para diluição, mediu-se a concentração de cada amostra em Nanodrop (*ND1000 – Spectrophotometer*), e estas foram diluídas para 50 ng/ μ L e posteriormente armazenadas em freezer -20°C.

A partir das amostras de tecido foram realizadas as extrações concomitantes de RNA e DNA total utilizando o protocolo do reagente Trizol. As amostras foram fragmentadas com o auxílio de pinças e colocadas em microtubos contendo 1 mL do reagente Trizol, para a quebra das membranas celulares, desagregação das proteínas e liberação do material genético. Após 5 minutos em temperatura ambiente o material recebeu 200 μ L de clorofórmio e foi mantido à temperatura ambiente por 3 minutos e, então, centrifugado por 15 minutos a 2°C. Após a centrifugação, ocorreu a separação do material em três fases: uma vermelha inferior contendo proteínas e DNA, uma intermediária contendo restos celulares e DNA e uma superior contendo RNA. A fase superior foi transferida para outro microtubo no qual foi adicionado 500 μ L de álcool isopropílico. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos e, posteriormente, centrifugadas por 10 minutos a 2°C para a precipitação do RNA total (a fase inferior e intermediária foram reservadas para a posterior extração de DNA). Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA ressuspendido e lavado com etanol 75%, centrifugado novamente por 5 minutos a 2°C e mantido por cerca de 10 minutos à temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foi adicionado 30 μ L de água DEPC (Invitrogen®) para a diluição do RNA em banho-maria a 60°C por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a quantificação da concentração do RNA (*Nanodrop - ND1000 - Spectrophotometer*) e estocagem em freezer -80°C.

No dia anterior a extração de DNA, foi acrescentado à fase orgânica 20 µL de RNase, 20 µL de proteinase K e 20 µL de SDS 10%. A solução foi homogeneizada por inversão e deixada em banho-maria a 37°C durante a noite. No dia seguinte, para precipitação do DNA foi adicionado 300 µL de etanol 100% gelado à fase orgânica reservada. A solução foi misturada por inversão e deixada à temperatura ambiente por 3 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos a uma temperatura de 2°C a 8°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado duas vezes com uma solução de citrato de sódio 0,1M em etanol 10%. Posteriormente, o DNA precipitado foi ressuspenso em 10 mL de etanol 75%, incubado por 15 minutos a temperatura ambiente, misturando-se periodicamente. Após esse tempo, a solução foi centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos a uma temperatura de 2°C a 8°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi colocado na estufa a 37°C para secar completamente e, posteriormente, foi dissolvido em 50 µL de água DEPC (Invitrogen®) em banho-maria a 37 °C por dois ou três dias e armazenado -20°C.

3.2.2. Análise dos polimorfismos genéticos

Para a investigação do polimorfismo *TLR2 -196 a -174 del* foi empregada a técnica de PCR-alelo específico e para os polimorfismos *TLR4 +896 A/G* e *TLR4 -1607 T/C* a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction / Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Tabela 2). Na avaliação dos polimorfismos foram utilizados na reação de PCR (volume total de 25 µL) 2,5 µL de tampão 10X, 2,0 µL de dNTPs (1,23 µmol/L), 0,5 µL de MgCl₂ (25 mmol/L), 1,25 µL de oligonucleotídeos iniciadores (25 µmol/L), 13,3 µL de H₂O, 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/µL) e 4,0 µL de DNA genômico (50 ng/ µL). O material foi processado

em termociclador automático e submetido à digestão enzimática (RFLP) quando necessário. Os produtos de amplificação referentes ao polimorfismo *TLR2 -196 a -174 del* e os produtos de digestão dos polimorfismos *TLR4 +896 A/G* e *TLR4 -1607 T/C* foram visualizados em gel de agarose 1000 (Invitrogen®) 3%, corado com brometo de etídio na presença de um marcador molecular de 100 pb. Em todas as reações foi adicionado um controle positivo, correspondente a uma amostra heterozigota para o polimorfismo que estava sendo avaliado, para garantir maior confiabilidade na genotipagem.

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos gerados e enzimas utilizadas.

Polimorfismos	oligonucleotídeos iniciadores (5`-3`)	Enzima T°/Tempo	Fragmento (pb)	Referências
<i>TLR2 -196 a -174 del</i>	F: CACGGAGGCAGCGAGAAA	-	<i>ins</i> : 286	TAHARA et al. (2008)
	R: CTGGGCCGTGCAAAGAAG		<i>del</i> : 264	
<i>TLR4 +896 A/G</i> (rs4986790)	F:AGCATACTTAGACTACCACCTCGATG	<i>Bst</i> XI 37 °C/3h	A: 131	SOARES et al. (2008)
	R:GTTGCCATCCGAAATTATAAGAAAAG		G: 108 e 23	
<i>TLR 4 -1607 T/C</i> (rs 10759932)	F: TTTGTATAATTTGACTACCATTGCGT	<i>Hha</i> I 37°C/3h	T: 139	HUANG et al. (2010)
	R: CATTTCATCATCTTCACCAGC		C: 117 e 22	

ins: alelo selvagem (inserção); *del*: alelo polimórfico (deleção)

3.2.3. Análise de Expressão Gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A partir do RNA extraído do tecido tumoral e normal adjacente, proveniente das biópsias ou fragmentos cirúrgicos, foi realizada a síntese de cDNA por meio da reação de transcriptase reversa utilizando o kit *High Capacity cDNA (Applied Biosystems)*. O cDNA foi validado por meio de amplificação por PCR de um fragmento de 613 pb do gene *ACTB* (β -*actin*), utilizado como controle para transcritos abundantes.

A reação de qPCR foi realizada pelo ensaio de expressão gênica *TaqMan*[®] (*Applied Biosystems*), utilizando sondas específicas para os genes *TLR2* (*Hs_00610101m1 inventoried*) e *TLR4* (*Hs_01060206m1 inventoried*), conforme instruções do fabricante. Os genes de referência *ACTB* (*Catalog#: 4352935E*) e *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) (*Catalog#: 4352934E*) (*Applied Biosystems*) foram utilizados como controles endógenos. As sondas *TaqMan*[®] *MGB* (*minor groove binder*) contêm o fluoróforo FAM ligado à extremidade 5' e um supressor (*quencher*) não fluorescente ligado à extremidade 3'. As reações foram realizadas no equipamento *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR*.

Durante a qPCR, a sonda *TaqMan*[®] *MGB* hibridiza-se especificamente à sua sequência complementar entre os oligonucleotídeos iniciadores *sense* e *anti-sense*. A intensidade da fluorescência na reação é determinada pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$), onde Rn^+ corresponde à intensidade de emissão do fluoróforo FAM / intensidade de emissão do ROX em determinado momento; e Rn^- corresponde à intensidade de emissão do fluoróforo FAM / intensidade de emissão do ROX antes da amplificação. O fluoróforo ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência emitida é constante durante toda a reação. Para a quantificação relativa foi estabelecido um valor de ΔRn , correspondente a linha de corte (*threshold*) para a curva de amplificação de cada gene estudado. O número do ciclo em que ΔRn cruza a linha de corte corresponde ao ciclo *threshold* (Ct) ou ciclo de quantificação da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade de genes alvos presente na amostra, e quanto menor o seu valor, maior é a quantidade de genes presente.

Para determinação da quantidade de cDNA a ser utilizado na qPCR, foi realizada uma curva padrão de quantificação para cada gene alvo e endógeno com uma amostra previamente escolhida, com alta concentração e boa integridade de RNA. As concentrações de cDNA

testadas foram 100 ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL, 0,1 ng/μL e 0,01 ng/μL. Todas as reações foram realizadas em triplicata em volume final de 20 μL, utilizando-se 10 μL de *TaqMan*[®] *Gene Expression Master Mix 2X* (*Applied Biosystems*), 1 μL de *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays 20X* (*Applied Biosystems*) que contem os oligonucleotídeos iniciadores e a sonda *TaqMan*[®] MGB ligada ao fluoróforo FAM específico para amplificação e detecção de cada gene, 8 μL de água DEPC (*Ambion*[®]) e 1 μL de amostra de cDNA (100 ng) e submetidas a 95°C por 10 minutos, seguidas por 40 ciclos a 95°C por 15 minutos e a 60°C por 1 minuto.

As reações foram realizadas utilizando-se 25 ng de cDNA, e em todos os experimentos houve controle negativo, usado como controle de contaminação. O valor da expressão relativa dos genes de interesse foi determinado pelo método de quantificação relativa em relação aos genes de referência, utilizando quatro *pools* de amostras de tecido normal adjacente, que foram agrupados conforme os genótipos referentes aos polimorfismos *TLR2 -196 a -174 del* e *TLR4 -1607 T/C*, localizados em região promotora (*pool1* e *pool4*: indivíduos ins/ins + T/T; *pool2*: indivíduos T/C + C/C *pool3*: indivíduos ins/del) que foram usados como calibradores. Os dados gerados pelo programa *StepOne*[™] *Software* (v. 2.2.2) foram exportados para uma planilha do *Microsoft Office Excel*. Foi calculada a média geométrica dos valores de Ct dos dois genes de referência (VANDESOMPELE et al., 2002) e o valor resultante foi subtraído do valor de Ct do gene alvo, para obtenção do ΔCt. A partir do ΔCt calculado para cada amostra, foi subtraído o valor do ΔCt calculado para o *pool* de tecido normal correspondente ao tecido tumoral, resultando no valor de ΔΔCt, utilizado para calcular a quantificação relativa (RQ) pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), segundo a fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct} = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene referência}})_{\text{tecido tumoral}} - (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene referência}})_{\text{tecido normal}}$.

Nesse cálculo, os grupos de mucosa normal foram utilizados como calibradores. Assim, os dados de RQ do tumor foram representados

em relação ao grupo de *pools* de tecido normal. Para esse grupo, $\Delta\Delta Ct = 0$ e, como $2^0 = 1$, o RQ do grupo de tecido normal é, por definição, igual a 1 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os resultados de RQ foram utilizados para análise estatística por meio do programa *GraphPad Prism* (v. 6.01). Foram consideradas hiperexpressas as amostras individuais com valores de $RQ \geq 2$.

Para validação dos resultados por meio do programa *ExpressionSuite* (Life Technologies - v. 1.0), esses cálculos não foram necessários, pois este importa diretamente os resultados gerados pelo programa *StepOne™ Software* (v. 2.2.2).

3.3. Análises Estatísticas

O programa *SNPStats* (SOLÉ et al., 2006) foi utilizado para determinar se as frequências alélicas e genotípicas encontravam-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e para a análise de regressão logística múltipla para avaliar a associação dos polimorfismos. Foram testados os seguintes modelos estatísticos: log-aditivo (homozigotos selvagens vs heterozigotos vs homozigotos polimórficos), dominante (homozigotos selvagens vs heterozigotos + homozigotos polimórficos) e recessivo (homozigotos selvagens + heterozigotos vs homozigotos polimórficos). *Odds ratio* (OR) foi calculada para cada um dos modelos, ajustados para os fatores de risco (idade, gênero, tabagismo e etilismo). A análise de regressão logística múltipla para verificar a associação apenas dos fatores de risco com CCR foi realizada pelo programa *SPSS* (v. 11.5). Para avaliar o efeito da combinação de genótipos foi utilizado o teste exato de Fisher por meio do programa *GraphPad InStat* (v. 3.00), e para análise da distribuição das frequências dos haplótipos para os polimorfismos no gene *TLR4* foi utilizado o programa *HaploView* (v. 4.0).

A análise de expressão relativa dos genes *TLR2* e *TLR4* no tecido tumoral foi realizada por meio do programa *GraphPad Prism* (versão 6.01), utilizando os *pools* de tecido normal como calibradores e os resultados obtidos por essa análise foram validados e confirmados pelo programa *ExpressionSuite* (*Life Technologies* - v. 1.0).

Para avaliar a influência das variantes polimórficas na expressão dos genes, foram calculados os níveis de expressão relativa estratificando as amostras por genótipos dos polimorfismos em região promotora (*TLR2* -196 a -174del e *TLR4* -1607 T/C) (programa *GraphPad Prism* - v. 6.01). Posteriormente procederam-se duas análises. Na primeira, os *pools* de tecido normal adjacente foram utilizados como referência para cálculos de RQ do grupo de tecido tumoral. Estes foram agrupados de acordo com os genótipos para cada polimorfismo separadamente (pelo menos um alelo polimórfico vs homozigotos selvagens), e foi posteriormente avaliada a ocorrência de diferença estatisticamente significativa entre as medianas de RQ de cada polimorfismo. Na segunda, as amostras de tecido tumoral que apresentaram genótipos selvagens foram utilizadas como referência, em comparação com aquelas com pelo menos um alelo polimórfico.

Para as análises de expressão gênica foi realizado o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Nos grupos que passaram no teste da normalidade foi aplicado o teste *T*, e nos demais o teste não paramétrico de *Wilcoxon Signed Rank* ou o teste de *Mann Whitney*. Foi realizada a correção de Benjamini-Hochberg para ajustar os valores de probabilidade (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). O nível de probabilidade $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo em todas as análises.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Polimorfismos *TLR2* -196 a -174 *del*, *TLR4* +896 *A/G* e 36 e *TLR4* -1607 *T/C*

Um total de 434 amostras de DNA dos grupos CCR e controle foram utilizadas para genotipagem dos polimorfismos *TLR2* -196 a -174 *del*, *TLR4* +896 *A/G* e *TLR4* -1607 *T/C*, cujo padrão eletroforético encontra-se apresentado na Figura 3.

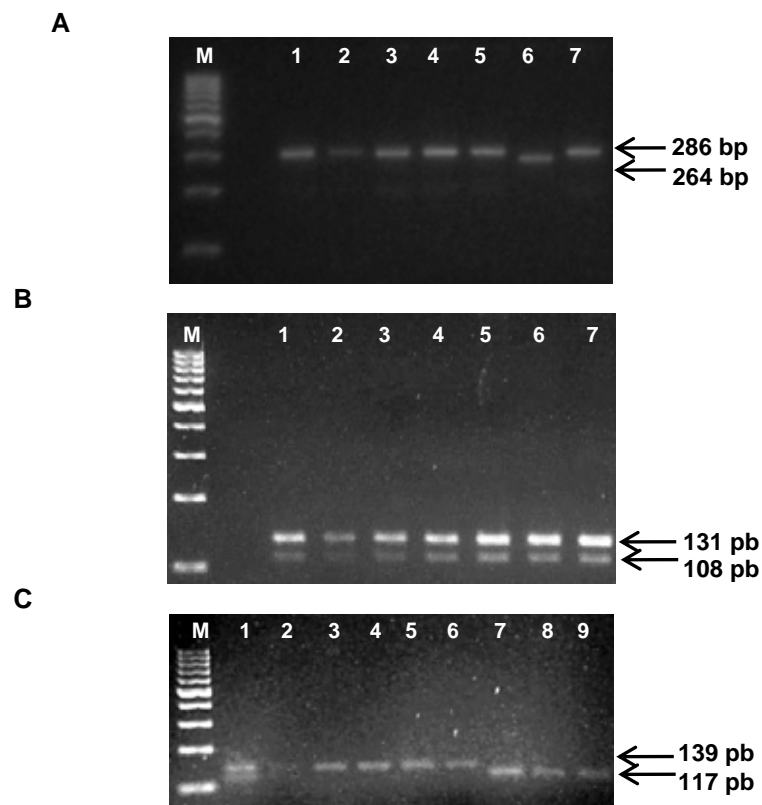


Figura 3. A. Padrão eletroforético dos fragmentos gerados por PCR alelo-específico para o polimorfismo *TLR2* -196 a -174 *del*. As setas indicam fragmentos de 286 pb (presença do alelo selvagem *ins*) e 264 pb (presença do alelo polimórfico *del*). Colunas 1 a 5 e 7 indicam indivíduos com genótipo *ins/ins*; coluna 6 indivíduo com genótipo *del/del*. B. Padrão eletroforético dos fragmentos gerados por PCR-RFLP para o polimorfismo *TLR4* +896 *A/G*. As setas indicam fragmentos de 131 pb (presença do alelo selvagem *A*) e 108 pb (presença do alelo polimórfico *G*). Colunas 1 a 7 indicam indivíduos com genótipo heterozigoto *A/G*. C. Padrão eletroforético dos fragmentos gerados por PCR-RFLP para o polimorfismo *TLR4* -1607 *T/C*. As setas indicam fragmentos de 139 pb (presença do alelo selvagem *T*) e 117 pb (presença do alelo polimórfico *C*). Colunas 3 a 6 indicam indivíduos com genótipo *T/T*; colunas 1 e 2 indivíduos com genótipo *T/C* e colunas 7 a 9 indivíduos com genótipo *C/C*. M: marcador de peso molecular de 100 pb.

As frequências genóticas e alélicas para estes polimorfismos estão apresentadas na Tabela 3, sendo que a distribuição destas está de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos caso (CCR) e controle (C) (dados não mostrados). Devido a problemas de amplificação não foram genotipados seis amostras do grupo caso para o polimorfismo *TLR2 -196 a -174 del*, quatro do grupo caso para o polimorfismo *TLR4 +896 A/G* e 36 (32 do grupo controle e quatro do grupo caso) para o polimorfismo *TLR4 -1607 T/C*.

A ocorrência de associação dos polimorfismos *TLR2 -196 a -174 del* e *TLR4 -1607 T/C* entre os grupos CCR e controle foi avaliada conforme os modelos dominante, recessivo e log-aditivo, com valores de *Odds ratio* ajustados para os fatores de risco (gênero, idade, tabagismo e etilismo), que evidenciou associação apenas da variante *TLR2 -196 a -174 del* com risco aumentado de CCR tanto pelo modelo dominante (OR= 1,72; IC95%= 1,03-2,89; p= 0,038) como pelo modelo log-aditivo (OR= 1,59; IC95%= 1,02-2,48; p= 0,039). Para o polimorfismo *TLR4 -1607 T/C* os resultados da análise de regressão logística múltipla não evidenciaram associação com o risco no desenvolvimento de CCR nos modelos estatísticos utilizados (Tabela 3).

Quanto ao polimorfismo *TLR4 +896 A/G* (Tabela 3) não foram detectados indivíduos com o genótipo homocigoto polimórfico G/G em ambos os grupos, impossibilitando a análise pelos três modelos estatísticos. O resultado da análise de regressão logística múltipla não evidenciou associação do polimorfismo *TLR4 +896 A/G* com risco no desenvolvimento de CCR (OR= 1,28; IC 95%= 0,60-2,73; p= 0,520).

Tabela 3. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos *TLR2 -196 a -174 del*, *TLR4 -1607 T/C* e *+896 A/G* e análise de regressão logística múltipla entre os grupos de carcinoma colorretal (CCR) e controle (C), ajustados por gênero, idade, tabagismo e etilismo.

Polimorfismo	Modelos Estatísticos	Genótipos / Alelos	C	CCR	p
<i>TLR2 -196 a -174 del</i>			n= 240	n= 188	
		<i>ins/ins</i>	200 (83,0%)	144 (77,0%)	
		<i>ins/del</i>	36 (15,0%)	39 (21,0%)	
		<i>del/del</i>	4 (2,0%)	5 (3,0%)	
		<i>ins</i>	436 (0,9)	327 (0,9)	
		<i>del</i>	44 (0,1)	49 (0,1)	
	Dominante	<i>ins/ins</i> <i>ins/del + del/del</i>	200 (83,3%) 40(16,7%)	144 (76,9%) 44 (23,1%)	0,038
	OR (IC95%)		1,72(1,03-2,89)		
	Recessivo	<i>ins/ins + ins/del</i> <i>del/del</i>	236 (98,3%) 4 (1,7%)	183 (97,3%) 5 (2,7%)	0,360
	OR (IC95%)		1,90 (0,48-7,58)		
	Log-aditivo	<i>ins/ins</i> <i>ins/del</i> <i>del/del</i>	200 (83,0%) 36 (15,0%) 4 (2,0%)	144 (77,0%) 39 (21,0%) 5 (3,0%)	0,039
	OR (IC95%)		1,59 (1,02-2,48)		
<i>TLR4 -1607 T/C</i>			n= 208	n= 190	
		<i>T/T</i>	166 (79,0%)	154 (81,0%)	
		<i>T/C</i>	39 (19,0%)	33 (17,0%)	
		<i>C/C</i>	3 (2,0%)	3 (2,0%)	
		<i>T</i>	371 (0,9)	341 (0,9)	
		<i>C</i>	45 (0,1)	39 (0,1)	
	Dominante	<i>T/T</i> <i>T/C + C/C</i>	166 (79,0%) 42 (21,0%)	154 (81,0%) 36 (19,0%)	0,860
	OR (IC95%)		0,95 (0,56-1,63)		
	Recessivo	<i>T/T + T/C</i> <i>C/C</i>	205 (98,0%) 3 (2,0%)	187 (98,0%) 3 (2,0%)	0,940
	OR (IC95%)		0,93 (0,14-5,95)		
	Log-aditivo	<i>T/T</i> <i>T/C</i> <i>C/C</i>	166 (79,0%) 39 (19,0%) 3 (2,0%)	154 (81,0%) 33 (17,0%) 3 (2,0%)	0,860
	OR (IC95%)		0,96 (0,59-1,55)		
<i>TLR4 +896 A/G</i>	Dominante	<i>A/A</i> <i>A/G</i>	224 (93,3%) 16 (6,7%)	172 (90,5%) 18 (9,5%)	0,520
	OR (IC95%)		1,28 (0,60-2,73)		
		<i>A</i>	464 (0,97)	349 (0,95)	
		<i>G</i>	16 (0,03)	17 (0,05)	

Na análise de regressão logística múltipla para os fatores de risco: gênero, idade, tabagismo e etilismo, ajustados para os polimorfismos (Tabela 4) foram considerados apenas os casos com resultado da genotipagem, portanto totalizando 186 amostras do grupo CCR e 208 controles. Os resultados evidenciaram que a idade acima de 60 anos (OR= 1,93; IC95%= 1,26-2,9; p= 0,003) e a ingestão de álcool (OR= 2,78; IC95%= 1,68-4,60; p= 0,000) são fatores de risco para o desenvolvimento de CCR. Enquanto o hábito tabagista foi mais frequente no grupo controle (OR= 0,32; IC95%= 0,20-0,52; p= 0,000).

Tabela 4. Distribuição dos fatores de risco gênero, idade, tabagismo e etilismo e análise de regressão logística múltipla entre os grupos de carcinoma colorretal (CCR) e controle (C).

Variáveis	C n(%)	CCR n(%)	Regressão Logística Múltipla	
			OR (95% IC)	p
N° de indivíduos*	208	186		
Gênero				
Feminino	107 (51,0)	84 (45,0)	Referência	
Masculino	101 (49,0)	102 (55,0)	1,20 (0,76-1,88)	0,436
Idade (mediana)				
< 60 anos	106 (51,0)	86 (46,0)	Referência	
≥ 60 anos	102 (49,0)	100 (54,0)	1,93 (1,26-2,9)	0,003
Hábito tabagista				
Não fumantes	89 (43,0)	85 (46,0)	Referência	
Fumantes	119 (57,0)	101 (54,0)	0,32 (0,20-0,52)	0,000
Hábito Etilista				
Não etilistas	157 (75,0)	111 (60,0)	Referência	
Etilistas	51 (25,0)	75 (40,0)	2,78 (1,68-4,60)	0,000

*para esta análise foram excluídos indivíduos que não foram genotipados para pelo menos um dos polimorfismos analisados.

Em outra análise de regressão logística múltipla foram avaliados ambos os hábitos tabagista e etilista com o risco de desenvolvimento de CCR, mas nenhuma associação foi encontrada (OR= 1,03; IC95%= 0,34-3,08; p= 0,958).

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados para avaliação do efeito combinado entre os três polimorfismos (*TLR2* -196 a -174 del, *TLR4* +896 A/G e *TLR4* -1607 T/C) no risco de CCR. Não foram encontrados indivíduos com a combinação dos três alelos variantes e as combinações de dois alelos variantes não mostraram qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos de CCR e controle.

Tabela 5. Efeito combinado dos polimorfismos *TLR2* -196 a -174 del, *TLR4* +896 A/G e *TLR4* -1607 T/C no risco de carcinoma colorretal (CCR) em comparação ao grupo controle (C).

Genótipos de risco	C	CCR	OR (95% IC)	p
Nenhum	104	136	1,00 (referência)	
<i>TLR2</i> ins/del ou del/del / <i>TLR4</i> +896 A/G	4	3	0,98 (0,21 - 4,48)	1,000
<i>TLR2</i> ins/del ou del/ del / <i>TLR4</i> -1607 T/C ou C/C	11	11	1,31 (0,54 - 3,13)	0,650
<i>TLR4</i> +896 A/G / <i>TLR4</i> -1607 T/C ou C/C	2	2	1,31 (0,18 - 9,44)	1,000

Para os polimorfismos do gene *TLR4* também foi realizada a análise de haplótipos referentes aos polimorfismos -1607 T/C e +896 A/G (Tabela 6). O haplótipo C-G não foi encontrado e para os demais haplótipos não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas frequências das combinações de alelos entre os grupos CCR e C.

Tabela 6. Distribuição de frequência de haplótipos das variantes -1607 T/C e +896 A/G do gene *TLR4* nos grupos de câncer colorretal (CCR) e controle (C).

Haplótipos <i>TLR4</i> -1607/ +896	C	CCR	χ^2	p
T-A	0,861	0,849	0,207	0,649
C-A	0,108	0,103	0,052	0,819
T-G	0,031	0,048	1,414	0,234

*Haplótipo C-G não foi encontrado.

4.2. Expressão gênica relativa dos genes *TLR2* e *TLR4* e influência dos polimorfismos funcionais

A análise de expressão relativa dos genes *TLR2* e *TLR4* foi realizada em 40 amostras de tecido tumoral em comparação com respectivos *pools* de mucosa normal adjacente e os genes de referência (*ACTB* e *GAPDH*), cujos resultados estão apresentados na Tabela 7 e Figura 4. Para o gene *TLR2* foi observada expressão significativamente aumentada no tecido tumoral (mediana de RQ= 2,36; $p < 0,0001$) quando comparado com o tecido normal adjacente, em que 26/40 (65%) dos casos apresentaram expressão relativa aumentada. Porém, para o gene *TLR4* não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de expressão relativa do tecido tumoral e normal (mediana de RQ= 0,74; $p = 0,452$), em que 32/40 (80%) dos casos apresentaram expressão reduzida.

Tabela 7. Comparação da quantificação relativa (RQ) do RNAm dos genes *TLR2* e *TLR4* no tecido tumoral de pacientes com câncer colorretal em relação ao tecido normal e genes de referência (*ACTB* e *GAPDH*).

	<i>TLR2</i>	<i>TLR4</i>
n(%) expressão aumentada	26 (65,0)	8 (20,0)
n(%) expressão reduzida	14 (35,0)	32 (80,0)
RQ (Mediana)	2,36	0,74
RQ máximo	35,80	23,42
RQ mínimo	0,31	0,20
p*	<0,0001	0,452

*Teste de *Wilcoxon Signed Rank* para comparar as medianas de quantificação relativa (RQ) do RNAm entre o tecido tumoral e os *pools* de tecido normal.

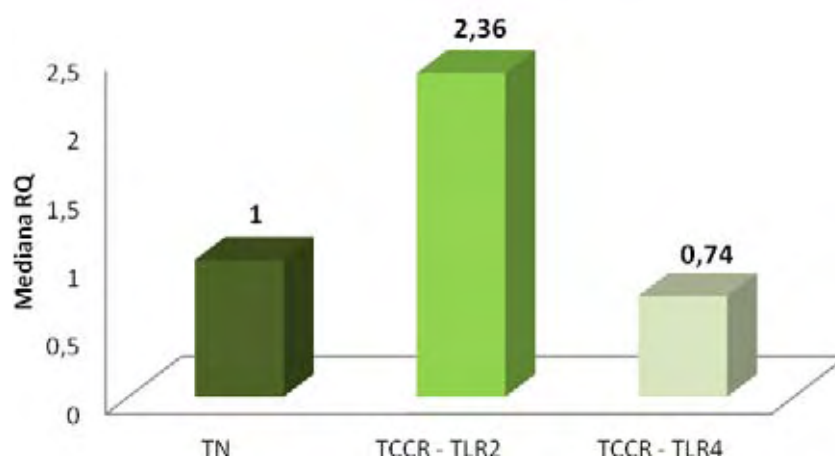


Figura 4. Comparação das medianas dos níveis de quantificação relativa (RQ) do RNAm dos genes *TLR2* e *TLR4* entre os *pools* de tecido normal adjacente (TN) e o grupo de tecido de câncer colorretal (TCCR). Diferença estatisticamente significativa para o gene *TLR2* ($p < 0,0001$), mas não para o gene *TLR4* ($p = 0,452$), conforme Teste de *Wilcoxon Signed Rank*.

Para avaliar a influências dos polimorfismos funcionais (*TLR2* -196 a -174 del e *TLR4* -1607 T/C), sobre os níveis de expressão relativa dos genes *TLR2* e *TLR4*, as amostras foram agrupadas conforme os genótipos considerando a presença de pelo menos um alelo polimórfico em comparação com as amostras de genótipo selvagem (Tabela 8, Figura 5), utilizando os *pools* de tecido normal como calibradores para os dois grupos (polimórfico e selvagem). Não foram encontrados indivíduos com o genótipo *TLR2* -196 a -174 del/del nas amostras de tecido tumoral.

Para o gene *TLR2* observou-se um aumento de cerca de duas vezes da expressão relativa nos portadores de pelo menos um alelo polimórfico (RQ= 6,95) em comparação com os homozigotos selvagens (RQ= 3,57). Porém, segundo o teste de *Mann Whitney*, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0,072$). Quanto ao polimorfismo *TLR4* -1607 T/C não foi observada influência sobre os níveis de expressão relativa do gene *TLR4* após estratificação dos genótipos selvagem e polimórfico, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os valores das medianas de RQ que apresentaram expressão relativa reduzida abaixo de 1,0 ($p= 0,587$).

Tabela 8. Comparação da quantificação relativa (RQ) do RNAm dos genes *TLR2* e *TLR4* no tecido tumoral estratificados conforme os genótipos selvagem e polimórfico.

	<i>TLR2</i> -196 a -174 del		<i>TLR4</i> -1607 T/C	
	ins/ins	ins/del**	T/T	T/C ou C/C
n(%)*	27 (73,0)	10 (27,0)	31 (83,8)	6 (16,2)
Mediana	3,57	6,95	0,75	0,86
Variacão	0,49 - 13,59	0,62 - 14,69	0,20 -23,89	0,47 - 2,27
p	0,072		0,587	

*3 amostras de tecido tumoral não genotipadas foram excluídas dessa análise.

**Não foram observados indivíduos del/del nas amostras de tecido tumoral.

Resultados segundo o teste não paramétrico de *Mann Whitney*.

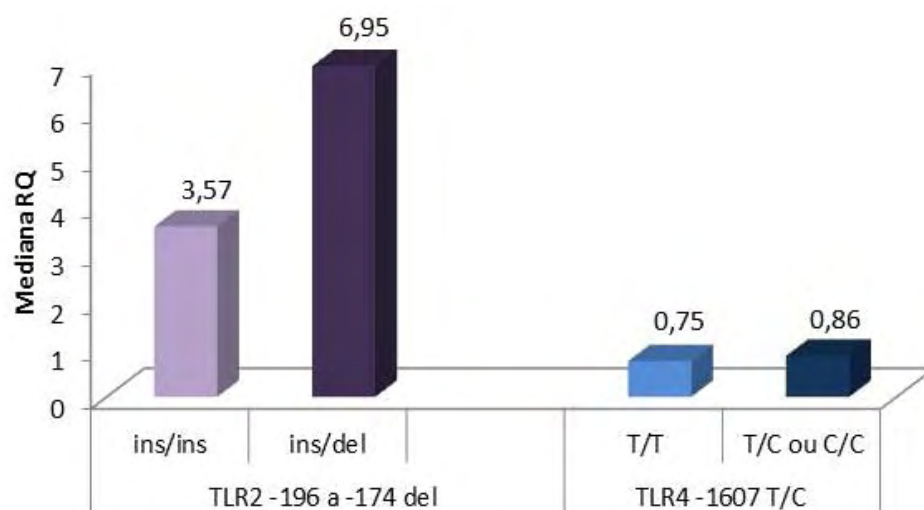


Figura 5. Comparação das medianas da quantificação relativa (RQ) do RNAm dos genes *TLR2* e *TLR4* no tecido tumoral estratificados por genótipos, utilizando os *pools* de tecido normal como calibradores. Teste não paramétrico de *Mann Whitney* não mostrou diferenças estatisticamente significantes (*TLR2*, $p= 0,072$ e *TLR4*, $p= 0,587$).

Em outra análise, também considerando a presença de pelo menos um alelo polimórfico em comparação com as amostras de genótipo selvagem, utilizadas agora como calibrador para cálculo da mediana de expressão relativa ($RQ= 1$), foi observado que indivíduos que apresentam pelo menos um alelo polimórfico *TLR2 -196 a -174 del* possuem um aumento de expressão desse gene no tecido tumoral com mediana de RQ 2,21 vezes maior em relação aos portadores do genótipo selvagem (Figura 6A). Contudo, para o polimorfismo *TLR4 -1607 T/C* não foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão do gene, entre os indivíduos com o alelo polimórfico ($RQ= 0,98$) comparados com os homocigotos selvagens (calibrador: $RQ= 1$) (Figura 6B).

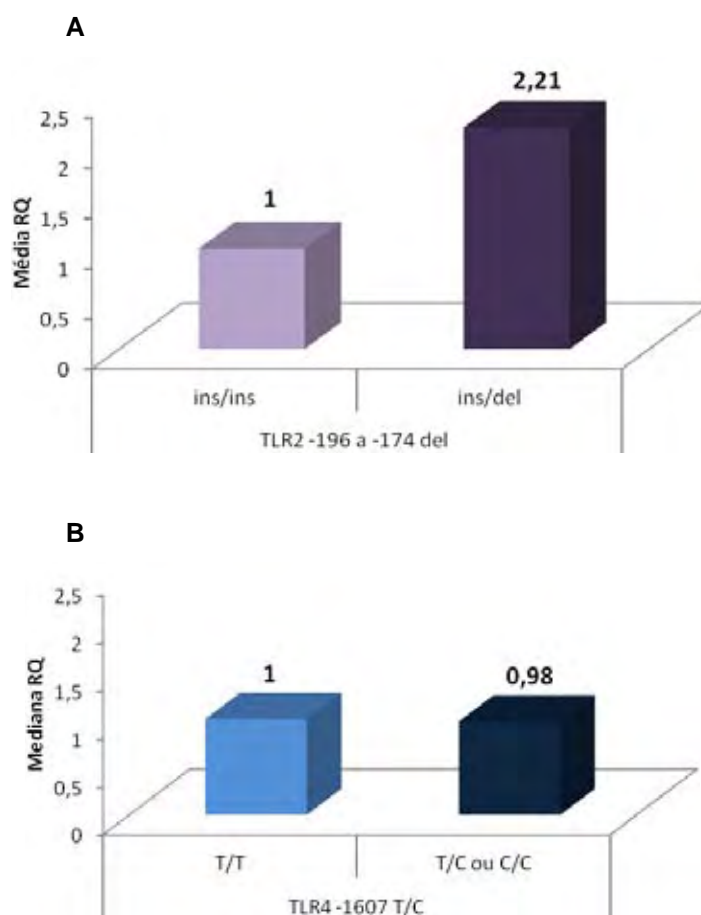


Figura 6. Comparação dos níveis de quantificação relativa (RQ) do RNAm dos genes *TLR2* (A) e *TLR4* (B) em tecido tumoral entre as amostras de pacientes do grupo CCR com genótipo selvagem (utilizado como calibrador) e pacientes com pelo menos um alelo polimórfico. Diferença estatisticamente significativa para o gene *TLR2* ($p= 0,035$), conforme o teste *t*, mas não para o gene *TLR4* conforme o teste *Wilcoxon Signed Rank* ($p= 1,000$).

Para avaliar a associação dos fatores de risco (gênero, idade, tabagismo e etilismo) com os níveis de quantificação relativa de RNAm, foi realizada a análise de regressão logística múltipla, que não mostrou qualquer associação das variáveis de risco com os genes *TLR2* e *TLR4* (dados não mostrados).

Discussão

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, a avaliação de associação de polimorfismos nos genes de receptores *Toll-like*, *TLR2 -196 a -174 del*, *TLR4 -1607 T/C* e *TLR4 +896 A/G*, em um grupo de pacientes com CCR esporádico evidenciou pela primeira vez na população brasileira que a presença do alelo polimórfico *TLR2 -196 a -174 del* está associada com risco aumentado de desenvolvimento dessa neoplasia. Porém, não foi encontrada associação para os polimorfismos *TLR4 -1607 T/C* e *TLR4 +896 A/G*. Considerando que polimorfismos funcionais na região promotora podem alterar os níveis de expressão gênica, este estudo apresentou resultados inéditos da influência da variante *-196 a -174 del* do gene *TLR2* no tecido tumoral de pacientes com CCR, que apresentaram níveis de expressão relativa do RNAm cerca de duas vezes maior em relação aos portadores do genótipo selvagem. Esses dados, em conjunto indicam este polimorfismo como candidato em potencial para marcador molecular em CCR, assim podendo contribuir para identificação de grupos de risco e auxiliar no entendimento do papel de polimorfismos funcionais na regulação da expressão gênica.

A associação de risco de CCR com a variante polimórfica *TLR2 -196 a -174 del* foi evidenciada pelos modelos estatísticos log-aditivo e dominante com risco aumentado em *Odds ratio* de 1,59 e 1,72 vezes, respectivamente. Similarmente ao presente estudo, outros autores encontraram associação da variante *TLR2 -196 a -174 del* em outros tipos de neoplasias, como por exemplo, câncer de mama em população grega (THEODOROPOULOS et al., 2012), câncer gástrico em população brasileira (OLIVEIRA; SILVA, 2012) e em população chinesa (ZENG et al., 2011), câncer de bexiga em população do norte da Índia (SINGH et al., 2012) câncer de próstata (MANDAL; GEORGE; MITTAL, 2012), e câncer cervical (PANDEY et al., 2009). Contudo, Hishida et al. (2010) não encontraram associação deste polimorfismo com câncer gástrico em

população japonesa. Em CCR foi encontrado na literatura apenas um estudo recente em população caucasiana dos Estados Unidos que relatou associação do polimorfismo *TLR2 -196 a -174 del* com esta neoplasia (SLATTERY et al., 2012).

Quanto aos polimorfismos *TLR4 +896 A/G* e *TLR4 -1607 T/C*, no presente estudo, não foram observadas associações com suscetibilidade ao CCR. A variante *TLR4 +896 A/G* está localizada em região codificadora do gene, e causa uma mudança do aminoácido 299 de asparagina para glicina na proteína (ASP299GLY). Alguns estudos indicam que esta variante está relacionada com uma alteração na estrutura do domínio extracelular do receptor TLR4 e sugerem que o alelo polimórfico G está associado com uma resposta imune atenuada a LPS e secreção de níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias (ARBOUR; LORENZ; SCHUTTE, 2000; KIECHL et al., 2002; SCHRODER; SCHUMANN, 2005), de certa forma justificando a falta de associação desse polimorfismo com risco de desenvolvimento do câncer.

Um fato importante neste estudo é que foi observada uma baixa frequência da variante G do polimorfismo *TLR4 +896 A/G*, e não foram detectados indivíduos homozigotos G/G em ambos os grupos de CCR e controle. A raridade deste genótipo tem sido evidenciada em outras populações como da Croácia (BORASKA JELAVIC´ et al., 2006), do norte da Índia (PANDEY et al., 2009) e da Grécia (THEODOROPOULOS et al., 2012). Outros estudos, similarmente aos nossos resultados também relataram ausência de homozigotos polimórficos G/G em população espanhola (LANDI et al., 2006), assim como na população brasileira (OLIVEIRA; SILVA, 2012).

Alguns trabalhos também mostraram a falta de associação do polimorfismo *TLR4 +896 A/G* com CCR em populações espanhola (LANDI et al., 2006) e chinesa (GUO; ZHU; XIA, 2006), bem como em outros tipos de câncer, como em câncer cervical em população do norte da Índia (PANDEY et al., 2009) e câncer de próstata em população da Suécia

(LINDSTRÖM et al., 2010). Pode-se sugerir que essa ausência de associação possa ser resultado de que este polimorfismo não tenha efeito biológico no desenvolvimento de CCR, ou que o eventual efeito possa ser reduzido, e assim imperceptível na análise com um número amostral pequeno (LANDI et al., 2006). Portanto, devido à baixa frequência da variante *G* e raridade dos homozigotos *G/G*, talvez seja necessário um número amostral muito maior para possibilitar uma conclusão mais robusta sobre a associação deste polimorfismo com o desenvolvimento de câncer. Contudo, em estudo recentemente finalizado pelo nosso grupo de pesquisa em pacientes com câncer gástrico, apesar de também não terem sido detectados homozigotos *G/G*, foi observada associação do polimorfismo *TLR4 +896 A/G* com risco de câncer gástrico e gastrite crônica (OLIVEIRA; SILVA, 2012). Da mesma forma outros autores encontraram associação dessa variante com CCR em populações da Croácia (BORASKA JELAVIC´ et al., 2006) e da Europa (PIMENTEL-NUNES et al., 2013a) e câncer de mama em população grega (THEODOROPOULOS et al., 2012).

Quanto ao polimorfismo funcional *TLR4 -1607 T/C*, os estudos de associação desta variante com câncer ainda são escassos. Este polimorfismo foi descrito como sendo relativamente comum, com frequência do alelo polimórfico maior que 5% (HUANG et al., 2010), como constatado neste estudo, cuja frequência do alelo *C* foi de 10% em ambos os grupos. Em alguns estudos este polimorfismo foi associado com efeito protetor em câncer gástrico (HUANG, et al., 2010) e câncer de próstata (KUTIKHIN, 2011b). Por outro lado, um estudo nos Estados Unidos encontrou associação positiva deste polimorfismo com risco de câncer de próstata (CHENG et al., 2007).

Com relação à avaliação do efeito combinado entre os três polimorfismos (*TLR2 -196 a -174 del*, *TLR4 +896 A/G* e *TLR4 -1607 T/C*) no risco de CCR, as combinações de dois alelos variantes não mostraram qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos de CCR e

controle. Porém, um estudo recente realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou que a combinação dos genótipos *TLR2 -196 a -174 ins/del* e *del/del* com *TLR4 +896 A/G* leva a um risco aumentado de desenvolvimento de câncer gástrico (OLIVEIRA; SILVA, 2012).

Além disso, a análise de haplótipos referentes aos polimorfismos *TLR4 -1607 T/C* e *TLR4 +896 A/G* não mostrou diferenças estatisticamente significantes na distribuição das frequências das combinações de alelos entre os grupos CCR e C. Concordante com nosso estudo, outros trabalhos não encontraram associação com haplótipos no gene *TLR4* com CCR (TSILIDIS et al., 2009), nem com gastrite crônica ou metaplasia intestinal (MURPHY et al., 2009). Porém, já foi relatada a associação de outros haplótipos no gene *TLR4* com alguns tipos de câncer, como por exemplo, do haplótipo *TLR4 G-C (299Gly-399Thr)* com risco aumentado de câncer gástrico (OLIVEIRA; SILVA, 2012), bem como do haplótipo *Asp299-Ileu399* com risco aumentado de gastrite e lesões pré-cancerosas (ACHYUT et al., 2007).

Quanto à associação de CCR com fatores de risco ambientais, observou-se associação com risco aumentado de desenvolvimento de CCR a idade acima de 60 anos, com *Odds ratio* de 1,93 vezes e o hábito etilista, com *odds ratio* de 2,78 vezes. A idade avançada já está bem estabelecida como fator de risco tanto para CCR (GIACOSA et al., 2002; MALLMANN et al., 2003; DINIZ; LACERDA-FILHO, 2004; BOTTERI et al., 2008; SIEGERT et al., 2013; INCA, 2013), como também para outros tipos de câncer (INCA, 2013), como por exemplo, para o câncer gástrico (OLIVEIRA; SILVA, 2012).

O consumo de álcool é considerado um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias em humanos (BOSCH et al., 2002), sendo que foi concluído pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC - 2007*) que o consumo de álcool está relacionado ao desenvolvimento de CCR. Similarmente ao presente estudo, outros

autores evidenciaram a relação da ingestão de álcool com o risco aumentado de desenvolvimento de CCR (BOTTERI et al., 2008; HARRISS et al., 2009; FEDIRKO et al., 2011; SIEGERT et al., 2013), bem como para adenoma colorretal (HERMANN et al., 2009), e outros tipos de câncer como do trato gástrico-aéreo superior (KJAERHEIN; GAARD; ANDERSEN, 1998), câncer de cavidade oral, faringe, laringe, esôfago, fígado e mama (SCHRODER; SCHUMANN, 2005; EL OMAR; NG; HOLD, 2008).

Durante a metabolização do etanol o primeiro produto da oxidação é o acetaldeído, que apresenta efeitos mutagênicos e carcinogênicos (SEITZ; STICKEL; HOMANN, 2004), interferindo em muitos locais na síntese de DNA e no mecanismo de reparo, e consequentemente levando ao desenvolvimento de tumores (JELSKI; SZMITKOWSKI, 2008). A presença do acetaldeído pode acarretar a formação de adutos estáveis causando a ocorrência de erros de replicação em oncogenes ou genes supressores de tumor (HOMANN, 2001; JELSKI; SZMITKOWSKI, 2008). Também são conhecidos outros mecanismos relacionados ao metabolismo do etanol com o processo carcinogênico, como por exemplo, a indução do citocromo CYP450E1 que leva à geração de espécies reativas de oxigênio, potencializando a ativação de vários pró-carcinógenos, modulando a regeneração celular e causando deficiências nutricionais (BADGER et al., 1993; JELSKI; SZMITKOWSKI, 2008). Outro mecanismo é a alteração do metabolismo do ácido retinóico (AR), causando uma diminuição de AR, um fator importante para a diferenciação, maturação e regeneração celular (SEITZ, 2000; JELSKI; SZMITKOWSKI, 2008). Portanto, o consumo de bebidas alcoólicas torna-se um importante fator de risco para o desenvolvimento de CCR, bem como de neoplasias no trato digestório superior, fígado, pâncreas, mama, dentre outros (JELSKI; SZMITKOWSKI, 2008).

As análises de expressão relativa do RNAm de *TLR2* e *TLR4* em tecido tumoral e normal adjacente de 40 pacientes com CCR

mostraram que o gene *TLR2* encontra-se com expressão aumentada em 2,36 vezes no tecido tumoral, ao contrário do *TLR4* que apresentou expressão gênica relativa baixa, sem diferença estatisticamente significativa quando comparado com o tecido normal adjacente.

A expressão aumentada do gene *TLR2* no tecido tumoral é condizente com sua função, reforçando seu papel no desenvolvimento de CCR, pois atua no reconhecimento de microrganismos na mucosa intestinal, o que leva a sua ativação e desencadeamento de um processo inflamatório no microambiente do órgão. Portanto, a hiperexpressão de *TLR2* pode provocar um processo inflamatório mais acentuado recrutando MyD88 para o domínio TLR / TIR e assim induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias por uma via clássica de sinalização. A família de proteínas IKK é ativada em um processo que envolve IRAK-1 e TRAF6. O Complexo IKK catalisa a fosforilação e degradação de I κ B pelo proteossomo, permitindo o deslocamento do NF κ B para o núcleo. No núcleo, NF κ B regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a adesão de moléculas (ARANCIBIA et al., 2007), facilitando assim a progressão tumoral.

Resultados similares ao presente estudo foram descritos por Niedzielska et al. (2009) e Nihon-Yanagi et al. (2012) que observaram expressão elevada de *TLR2* em tecidos tumorais de pacientes com CCR quando comparado com tecidos normais, mas não encontraram diferença com relação aos níveis de expressão de *TLR4*. Recentemente, outro trabalho relatou expressão aumentada do RNAm de *TLR2* em câncer gástrico, mas não de *TLR4* (PIMENTEL-NUNES et al., 2013b), como também associada com a indução pela bactéria *H. pylori* no estômago (PACHATHUNDIKANDI et al., 2011).

Quando os níveis de expressão relativa dos RNAm de *TLR2* e *TLR4* dos pacientes com CCR que foram estratificados conforme os genótipos selvagem ou portador de pelo menos um alelo variante, pode-se observar claramente que o subgrupo de pacientes com pelo menos um

alelo polimórfico *TLR2 -196 a -174 del* apresentou nível mediano de quantificação relativa de RNAm de *TLR2*, cerca de duas vezes maior ($RQ_{ins/del} = 6,95$) que os portadores do genótipo selvagem ($RQ_{ins/ins} = 3,57$) quando comparados com os *pools* de tecido normal, e um aumento estatisticamente significativo com média de RQ 2,21 vezes maior em relação ao genótipo selvagem, quando este último foi considerado como calibrador ($RQ = 1,0$).

Devido à localização desse polimorfismo em região promotora, ao contrário do aumento observado de expressão do RNAm de *TLR2* no presente estudo, Noguchi et al. (2004) relataram que o genótipo polimórfico *del/del* em população japonesa diminui a transativação de promotores responsivos, acarretando uma diminuição na transcrição do gene, e assim diminuindo a expressão gênica. Porém, considerando a função importante desse gene na indução do processo inflamatório, e a associação do polimorfismo *TLR2 -196 a -174 del* com diversos tipos de câncer, em conjunto esses dados sugerem que esta deleção deva aumentar os níveis de transcrição gênica em tecido tumoral, intensificando o processo inflamatório e favorecendo a progressão do câncer. Portanto, esses achados são inéditos indicando pela primeira a influência da deleção -174 a -192 da região promotora do gene *TLR2* no aumento da expressão gênica em CCR.

Por outro lado, para o polimorfismo *TLR4 -1607 T/C* não foi encontrada influência do alelo polimórfico nos níveis de expressão relativa do gene *TLR4* em tecido tumoral dos pacientes com CCR. Este polimorfismo foi relatado não influenciar os níveis de transcrição gênica, através de estudo funcional de expressão da luciferase (RAGNARSDÓTTIR et al., 2010). Este resultado corrobora a ausência de associação deste polimorfismo com risco de desenvolvimento de CCR, indicando que a ocorrência desse polimorfismo funcional não acarreta mudanças significantes na transcrição gênica.

Devido ao fato do CCR apresentar, na maioria dos casos, um bom prognóstico e ser tratável quando diagnosticado em estágios iniciais, é de suma importância que se estabeleçam marcadores moleculares que possam indicar grupos de risco e proporcionar o diagnóstico precoce em indivíduos com risco aumentado do desenvolvimento desta neoplasia. De modo geral, nossos resultados indicam que o gene *TLR2* desempenha papel importante na carcinogênese colorretal, evidenciando a importância do polimorfismo *TLR2 -174 a -192 del* no aumento da expressão gênica, e conseqüentemente o risco de desenvolvimento de CCR. Estes resultados em conjunto evidenciam o polimorfismo *TLR2 -174 a -192 del* como sendo um alvo interessante para um possível marcador molecular para CCR, bem como para futuras investigações de risco de desenvolvimento de outras neoplasias em diferentes populações.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Diante do exposto é possível obter as seguintes conclusões:

1. A variante polimórfica *TLR2 -196 a -174 del* está associada com risco aumentado de CCR na população avaliada, destacando sua importância como possível marcador molecular para esta doença. Contudo, não há evidência de associação com os polimorfismos *TLR4 -1607 T/C* e *TLR4 + 896 A/G*.
2. Há uma associação da idade acima de 60 anos e hábito etilista com o risco de desenvolvimento de CCR, reforçando a importância desses fatores no desenvolvimento dessa neoplasia.
3. O gene *TLR2* apresenta expressão aumentada no tecido tumoral de CCR e o polimorfismo *TLR2 -196 a -174 del* aumenta os níveis de expressão do RNAm de *TLR2*, e, conseqüentemente, o risco de desenvolvimento de CCR, evidenciando seu papel importante na carcinogênese colorretal. Porém, não há diferenças na expressão do gene *TLR4*.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHYUT, B. R. et al. Association of *Toll-like receptor-4* (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions. **Hum Immunol**, v. 68, p. 901-907, 2007.
2. ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782-787, 2000.
3. AGRAWAL, D. et al. Diagnosis and treatment of colorectal cancer: a review. **J Drug Deliv**, v. 2, n. 3, p 60-66, 2012.
4. AHRENDT, S.A. et al. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of *p53* mutations in nonsmall cell lung cancer. **Cancer Res**, v. 60, p. 3155-3159, 2000.
5. ARANCIBIA, S. A. et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. **Biol Res**, v. 40, p. 97-112, 2007.
6. ARBOUR, N. C.; LORENZ, E.; SCHUTTE, B. C. *TLR4* mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nat Genet**, v. 25, p. 187-191, 2000.
7. ASHTON, et al. *Toll-like receptor (TLR)* and nucleosome-binding oligomerization domain (nod) gene polymorphisms and endometrial cancer risk. **BMC Cancer**, v. 10, p. 382-388, 2010.
8. BADGER, T. M. et al. Introduction of cytochrome P4502E1 during chronic ethanol exposure occurs via transcription of the *CYP 2E1* gene when blood alcohol concentrations are high. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 190, p. 780-785, 1993.
9. BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, p. 539-545, 2001.
10. BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J R Stat Soc Series B Stat Methodol**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.
11. BERG, M.; SOREIDE, K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer -

- implications for targeted therapy. **Discov Med**, v. 14, n. 76, p. 207-214, 2012.
12. BERTAGNOLLI, M. M. Chemoprevention of colorectal cancer with cyclooxygenase-2 inhibitors: two steps forward, one step back. **Lancet Oncol**, v. 8, p. 439-443, 2007.
 13. BORASKA JELAVIĆ, T. et al. Microsatelite GT polymorphism in the *Toll-like receptor 2* is associated with colorectal cancer. **Clin Genet**, v. 70, p. 156-160, 2006.
 14. BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical Cancer. **J Clin Pathol**, v. 55, p. 244-265, 2002.
 15. BOTTERI, E. et al. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. **JAMA**, v. 300, p. 2765-2778, 2008.
 16. CALVERT, P. M.; FRUCHT, H. The genetics of colorectal cancer. **Ann Intern Med**, v. 137, p. 603-612, 2002.
 17. CAMMAROTA, R. et al. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal *TLR-4* expression as a potential prognostic marker. **J Transl Med**, v. 8, p. 112-127, 2010.
 18. CAROTHERS, A.M. et al. Persistent cyclooxygenase-2 inhibition downregulates NF- κ B, resulting in chronic intestinal inflammation in the min/+ mouse model of colon tumorigenesis. **Cancer Res**, v. 70, n. 11, p. 4433-4442, 2010.
 19. CHENG, I. et al. *Toll-like receptor 4* genetic variation and advanced prostate cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, p. 352-355, 2007.
 20. COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, p 1073-1081, 2009.
 21. COUSSENS, L M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.
 22. DINIZ, B. S. O.; LACERDA-FILHO, A. Prevenção secundária do

- câncer colorretal em indivíduos assintomáticos de baixo risco. **Rev Med**, Minas Gerais, v. 14, n. 1, p. 46-52, 2004.
23. DUARTE, M. C., et al. Polymorphisms of DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3*, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 11, p. 6593-6600, 2005.
 24. EDER, W. et al. *Toll-like receptor 2* as a major gene for asthma in children of European farmers. **J Allergy Clinic Immunol**, v. 113, p. 482-488, 2004.
 25. EL OMAR, E. M.; NG, M. T.; HOLD, G. I. Polymorphisms in *Toll like receptor* genes and risk of Cancer. **Oncogene**, v. 27, p. 244-252, 2008.
 26. ERNST, P. B.; TAKAISHI, H.; CROWE, S. E. *Helicobacter pylori* infection as a model for gastrointestinal immunity and chronic inflammatory disease. **Dig Dis**, v. 19, p. 104-111, 2001.
 27. FAURE, E. et al. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce *Toll-like receptor 2* and *Toll-like receptor 4* expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. **J Immunol**, v.166, p. 2018-2024, 2001.
 28. FEARON, E. R. et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. **Science**, v. 247, p. 46-56, 1990.
 29. FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-767, 1990.
 30. FEDIRKO, V et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. **Ann Oncol**, v. 22, p. 1958-1972, 2011.
 31. FINN, O. J. Cancer immunology. **N Engl J Med**, v. 358, p. 2704-2715, 2008.
 32. FRANCHIMONT, D. et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The Toll-like receptor (*TLR*)-4

- Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gut**, v. 53, p. 987-992, 2004.
33. FUKATA, M. et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. **Gastroenterology**, v. 133, p. 1869-1881, 2007.
 34. FUSUNYAN, R. D. et al. Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: Toll-like receptors on fetal enterocytes. **Pediatr Res**, v. 49, n. 4, 2001.
 35. GARBER, K. First results for agents targeting cancer-related inflammation. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, p. 1110-1112, 2009.
 36. GARZA-GONZALEZ E. et al. Assessment of the *Toll-like receptor 4* Asp299Gly, Thr399Ile and *interleukin-8* -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. **BMC Cancer**, v. 26, p. 70, 2007.
 37. GAZOULI, M. et al. Association between polymorphisms in the *Toll-like receptor 4*, *CD14*, and *CARD15/NOD2* and inflammatory bowel disease in the Greek population. **World J Gastroenterol**, v. 11, p. 681-685, 2005.
 38. GIACOSA, A. et al. Diet and colorectal cancer risk: current views. **Annals of Gastroenterology**, v. 15, n. 4, p. 324-332, 2002.
 39. GIURIZATO, C. S. B.; AREIAS, M. A. C. Estudo da prevalência de câncer colorretal no período de 2005 em um hospital do sistema único de saúde na cidade de Dourados-MS. **Interbio**, v. 2, n. 2, p. 21-28, 2008.
 40. GRAU, M. V. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use after 3 years of aspirin use and colorectal adenoma risk: observational follow-up of a randomized study. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, p. 267-276, 2009.
 41. GRETEN, F. R. et al. IKKb links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cell**, v. 118, p. 285-296, 2004.

42. GRIBAR, S. C. et al. The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 83, p. 493-498, 2008.
43. GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. **Curr Opin Genet Dev**, v. 20, p. 65-71, 2010.
44. GUO, Q.; ZHU, J.; XIA, B. Polymorphism of *CD14* gene but not the mutation of *TLR4* gene is associated with colorectal cancer in Chinese patients. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 21, p. 92-97, 2006.
45. HAMILTON, S. R. The molecular genetics of colorectal neoplasia. **Gastroenterology**, v. 105, p. 3-7, 1993.
46. HARRISS, D. J. et al. Lifestyle factors and colorectal cancer risk (1): systematic review and meta-analysis of associations with body mass index. **Colorectal Dis**, v. 11, p. 547-563, 2009.
47. HERMANN, S.; ROHRMANN, S.; LINSEISEN, J. Lifestyle factors, obesity and the risk of colorectal adenomas in EPIC-Heidelberg. **Cancer Causes Control**, v. 20, p. 1397-1408, 2009.
48. HISHIDA, A. et al. Combined effect of *miR-146a* rs2910164 G/C polymorphism and *Toll-like receptor 4* +3725 G/C polymorphism on the risk of severe gastric atrophy in Japanese. **Dig Dis Sci**, v. 56, p. 1131-1137, 2011.
49. HISHIDA, A. et al. No associations of Toll-like receptor 2 (*TLR2*) -196 to -147del polymorphism with the risk of *Helicobacter pylori* seropositivity, gastric atrophy, and gastric cancer in Japanese. **Gastric Cancer**, v. 13, p. 251-257, 2010.
50. HOLD, G. L. et al. A functional polymorphism of *Toll-like receptor 4* gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. **Gastroenterology**, v. 3, p. 905-912, 2007.
51. HOMANN, N. Alcohol and upper gastrointestinal tract cancer: the role of local acetaldehyde production. **Addict Biol**, v. 6, p. 309-323, 2001.

52. HUANG, H. et al. A 5'-flanking region polymorphism in *Toll-like receptor 4* is associated with gastric cancer in a Chinese population. **J Biomed Res.** v. 24, n. 2, p. 100-106, 2010.
53. IMPERIALE, T. F.; RANSOHOFF, D. F. Risk for colorectal cancer in persons with a family history of adenomatous polyps: a systematic review. **Ann Intern Med**, v. 156, n. 10, p. 703-709, 2012.
54. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2013. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, acesso em 25 de janeiro de 2013.
55. IARC - International Agency for Research on Cancer. Breast and colorectal cancers are associated with alcohol consumption, says IARC. Press Release, n. 175, 2007. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2007/pr175.html>>, acesso em: 11 de fevereiro de 2013.
56. ITZKOWITZ, S.H.; YIO, X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 287, G7-G17, 2004.
57. JACOBSON-BROWN, P.; NEUMAN, M. G. Colorectal polyposis and immune-based therapies. **Can J Gastroenterol**, v.18, p. 239-249, 2004.
58. JELSKI, W.; SZMITKOWSKI, M. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the câncer diseases. **Clin Chim Acta**, v. 395, p. 1-5, 2008.
59. JUMP, R. L.; LEVINE A. D. Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 10, p. 462-478, 2004.
60. KANG, T. J.; CHAE, G. T. Detection of Toll like receptor 2 (*TLR2*) mutation in the leprosy patients. **Fems Immunol Med Microbial**, v. 31, p. 53-58, 2001.
61. KAPITANOVIĆ, S. et al. The expression of *p185* (HER-2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 112; p. 1103-1113, 1997.

62. KAZ, A. M.; BRETNALL, T. A. Genetic testing for colon cancer. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, v. 3, p. 670-679, 2006.
63. KIECHL, S. et al. *Toll-like receptor 4* polymorphisms and atherogenesis. **N Engl J Med**, v. 347, p. 185-192, 2002.
64. KIECHL, S.; WIEDERMANN, C.J.; WILLEIT, J. *Toll-like receptor 4* and atherogenesis. **Ann Med**, v. 35, p. 164-171, 2003.
65. KILLEEN, S. D. et al. Bacterial endotoxin enhances colorectal cancer cell adhesion and invasion through *TLR-4* and *NF-kappaB*-dependent activation of the urokinase plasminogen activator system. **Br J Cancer**, v. 100, p. 1589-1602, 2009.
66. KJAERHEIN, K.; GAARD, M.; ANDERSEN, A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10.900 Norwegian men. **Cancer Causes Control**, v. 9, p. 99-108, 1998.
67. KONING, H. D. et al. Pattern recognition receptors in infectious skin diseases. **Microbes Infect**, v. 14, n. 11, p. 881-893, 2012.
68. KUPER, H.; ADAMI, H. O.; TRICHOPOULOS, D. Infections as a major preventable cause of human cancer. **J Intern Med**, v. 248, p. 171-183, 2000.
69. KUTIKHIN, A. G. Impact of Toll-like receptor 4 polymorphisms on risk of cancer. **Hum Immunol**, v. 72, p. 193-206, 2011a.
70. KUTIKHIN, A. G. Association of polymorphisms in *TLR* genes and in genes of the *Toll-like receptor* signaling pathway with cancer risk. **Hum Immunol**, v. 72, p. 1095-1116, 2011b.
71. KUTUKCULER, N. et al. Arg753Gln polymorphism of the human *Toll-like receptor- 2* gene in children with recurrent febrile infections. **Biochem Genet**, v. 45, p. 507-514, 2007.
72. LANDI, S. et al. Polymorphisms within inflammatory genes and colorectal cancer. **J Negat Results Biomed**, v. 5, p. 15-19, 2006.

73. LEVENTHAL, K. G. et al. "Is it really worth it to get tested?": primary care patients' impressions of predictive SNP testing for colon cancer. **J Genet Couns**, v. 22, n. 1, p. 138-151, 2013.
74. LINDSTRÖM, S. et al. Sequence variants in the *TLR4* and *TLR6-1-10* genes and prostate cancer risk. Results based on *pooled* analysis from three independent studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 19, p. 873-876, 2010.
75. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
76. LONKAR, P.; DEDON, P. C. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: Reconciling chemical mechanisms and biological fates. **Int J Cancer**, v. 128, n. 9, p. 1999-2009, 2011.
77. LORENZ, E.; FREES, K. L.; SCHWARTZ, D. A. Determination of the *TLR4* genotype using allele-specific PCR. **Biotechniques**, v. 31, p. 22-24, 2001.
78. LOWE, E.L. et al. Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. 1-13, 2010.
79. MACARTHUR, M.; HOLD G.L.; EL-OMAR, E. M. Inflammation and cancer II: role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 286, p. 515-520, 2004.
80. MALLMANN, A. C. M. et al. Rastreamento do câncer colorretal. **Mom & Perspec Saúde**, v. 16, n. 1, p. 13-16, 2003.
81. MANDAL, R. K.; GEORGE, G. P.; MITTAL, R. D. Association of *Toll-like receptor (TLR) 2, 3 and 9* genes polymorphism with prostate cancer risk in North Indian population. **Mol Biol Rep**, v. 39, p. 7263-7269, 2012.
82. MANGERICH, A. et al. Infection-induced colitis in mice causes dynamic and tissue-specific changes in stress response and DNA

- damage leading to colon cancer. **Proc Nat Acad Sci**, v.109, n. 27, p. 1820-1829, 2012.
83. MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16, p. 1215, 1988.
 84. MISCH, E. A.; HAWN, T. R. *Toll-like receptor* polymorphisms and susceptibility to human disease. **Clin Sci**, v. 114, p. 347-360, 2008.
 85. MOCKENHAUPT, F. P. et al. *Toll-like receptor (TLR)* polymorphisms in African children: Common *TLR-4* variants predispose to severe malaria. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, p. 177-182, 2006.
 86. MORSON, B. C. Precancerous and early malignant lesions of the large intestine. **British Journal of Surgery**, v. 55, n. 10, p. 725-731, 1968.
 87. MULTHOFF, G.; RADONS, J. Radiation, inflammation, and immune responses in cancer. **Front Oncol**, v. 2, 2012.
 88. MURPHY, G. et al. Association of gastric disease with polymorphisms in the inflammatory-related genes *IL-1B*, *IL-1RN*, *IL-10*, *TNF* and *TLR4*. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 21, n. 6, p. 630-635, 2009.
 89. NIEDZIELSKA, I. et al. Toll-like receptors and the tendency of normal mucous membrane to transform to polyp or colorectal cancer. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, p. 65-71, 2009.
 90. NIHON-YANAGI, Y. et al. Tissue expression of Toll-like receptors 2 and 4 in sporadic human colorectal cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v. 61, p. 71-77, 2012.
 91. NOFFSINGER, A. E. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 343-364, 2009.
 92. NOGUCHI, E. et al. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for *Toll-like* receptor polymorphisms in a Japanese population. **Clin Exp Allergy**, v. 34, p. 177-183, 2004.

93. OLIVEIRA, J. G.; SILVA, A. E. Polymorphisms of the *TLR2* and *TLR4* genes are associated with risk of gastric cancer in a Brazilian population. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 11, p. 1235-1242, 2012.
94. ORTEGA-CAVA, C. F. et al. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. **J Immunol**, v. 170, p. 3977-3985, 2003.
95. OSHIMA, M.; TAKETO, M.M. COX selectivity and animal models for colon cancer. **Curr Pharm Des**, v. 8, p. 1021-1034, 2002.
96. OSPELT, C.; GAY, S. *TLRs* and chronic inflammation. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n.4, p. 495-505, 2009.
97. PACHATHUNDIKANDI, S. K. et al. Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by *Helicobacter pylori* Switches *cagPAI*-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF- α . **PLoS One**, v. 6, n. 5, e19614, 2011.
98. PANDEY, S. et al. Evaluation of *Toll-like receptors* 3 (c.1377C/T) and 9 (G2848A) gene polymorphisms in cervical cancer susceptibility. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 7, p. 4715-4721, 2011.
99. PANDEY, S. et al. Impact of *Toll-like receptors* [*TLR*] 2 (-196 to -174 del) and *TLR* 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. **Gynecol Oncol**, v. 114, n. 3, p. 501-505, 2009.
100. PEEK, R. M.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat Rev Cancer**, v. 2, p. 28-37, 2002.
101. PIKARSKY, E. et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v. 431, p.461-466, 2004.
102. PIMENTEL-NUNES, P. et al. Functional polymorphisms of *Toll-like receptors* 2 and 4 alter the risk for colorectal carcinoma in Europeans. **Dig Liver Dis**, v. 45, n. 1, p. 63-69, 2013a.
103. PIMENTEL-NUNES, P. et al. *Helicobacter pylori* induces increased expression of toll-like receptors and decreased toll-interacting protein

- in gastric mucosa that persists throughout gastric carcinogenesis. **Helicobacter**, v. 18, n. 1, p. 22-32, 2013b.
104. QUEIROZ, D. M. et al. Immune response and gene polymorphism profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 15, p. 353-358, 2009.
 105. RAGNARDSÓTTIR, B. et al. *Toll-like receptor 4* promoter polymorphisms: common *TLR4* variants may protect against severe urinary tract infection. **PLoS One**, v. 5, p. 1-13, 2010.
 106. RAKOFF-NAHOUM, S. et al. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, v. 118, p. 229-241, 2004.
 107. RAMASAWMY, R. et al. Heterozygosity for the S180L variant of MAL/TIRAP, a gene expressing an adaptor protein in the Toll-like receptor pathway, is associated with lower risk of developing chronic Chagas cardiomyopathy. **J Infect Dis**, v. 199, p. 1838-1845, 2009.
 108. ROSE-JOHN, S. et al. Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease. **Curr Pharm Des**, v. 15, p. 2095-2103, 2009.
 109. SANTOS JR., J. C. M. Câncer ano-reto-cólico: aspectos atuais II – câncer colorretal – fatores de riscos e prevenção. **Rev bras Coloproct**, v. 27, n. 4, p. 459-473, 2007.
 110. SCHRODER, N. W.; SCHUMANN, R. R. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. **Lancet Infect Dis**, v. 5, p. 156-164, 2005.
 111. SCHRODER, N.W. et al. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (*TLR*)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas *TLR*-4 and MD-2 are not involved. **J Biol Chem**, v. 18, p. 15587-15594, 2003.
 112. SEITZ, H. K. Alcohol and retinoid metabolism. **Gut**, v. 47, p. 748-750, 2000.

113. SEITZ, H. K.; STICKEL, F.; HOMANN, N. Pathogenic mechanism of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics. **Int J Cancer**, v. 108, p. 483-487, 2004.
114. SIEGERT, S. et al. Genome-wide investigation of gene-environment interactions in colorectal cancer. **Hum Genet**, 2013.
115. SINGH, V. et al. Single-nucleotide polymorphisms in genes encoding *Toll-like receptor -2, -3, -4, and -9* in a case e control study with bladder cancer susceptibility in a North Indian population. **Arch Med Res**, v. 6, p. 27-23, 2012.
116. SLATTERY, M. L. et al. *Toll-like receptor* genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis. **Int J Cancer**, v. 130, p. 2974-2980, 2012.
117. SOARES, S.C. et al. Genetic polymorphisms in *TLR4*, *CR1* and *Duffy* genes are not associated with malaria resistance in patients from Baixo Amazonas region, Brazil. **Genet Mol Res**, v. 7, p. 1011-1019, 2008.
118. SOLÉ, X. et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. **Bioinformatics**, v. 22, p. 1928-1929, 2006.
119. TAHARA T. et al. *Toll-like receptor 2 (TLR) -196 to 174del* polymorphism in gastro-duodenal diseases in Japanese population. **Dig Dis Sci**, v. 53, p. 919-924, 2008.
120. TAHARA, T. et al. Toll-like receptor 2 -196 to 174del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric cancer. **Cancer Sci**, v. 11, p. 1790-1794, 2007.
121. TESNIERE, A. et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. **Oncogene**, v. 29, p. 482-491, 2010.
122. THEODOROPOULOS, G. E. et al. *Toll-like receptors* gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development. **The Breast**, v. 21, p. 534-538, 2012.
123. TOROK, H.P. et al. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a

- mutation in the *Toll-like receptor 4* gene with ulcerative colitis. **Clin Immunol**, v. 112, p. 85-91, 2004.
124. TRINCHIERI, G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 677-706, 2012.
125. TSILIDIS, K. K. et al. Association of common polymorphisms in *IL10*, and in other genes related to inflammatory response and obesity with colorectal cancer. **Cancer Causes Control**, v. 20, n. 9, p. 1793-1751, 2009
126. VAMADEVAN, A.S. et al. Regulation of *Toll-like receptor 4*-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. **Innate Immun**, v. 16, n. 2, p. 93-103, 2009.
127. VAN DER WOUDE, C. J. et al. Expression of apoptosis related proteins during malignant progression in chronic ulcerative colitis. **J Clin Pathol**, v. 58, p.811-814, 2003.
128. VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, Research 0034, 2002.
129. WOGAN, G. N. et al. Infection, inflammation and colon carcinogenesis. **Oncotarget**, v. 3, n. 8, p. 737-738, 2012.
130. WU, M. S. et al. Functional polymorphisms of CD14 and Toll-like receptor 4 in Taiwanese Chinese with *Helicobacter pylori* - related gastric malignancies. **Hepatogastroenterology**, v. 71, p. 807-810, 2006.
131. ZENG, H. M. et al. Genetic variants of Toll-like receptor 2 and 5, *Helicobacter Pylori* infection, and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 20, p. 2594-2602, 2011.

Anexos

ANEXO 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto



**PARECER CONSUBSTANCIADO
PROJETO DE PESQUISA**

IDENTIFICAÇÃO

Nome do pesquisador: Marcela Alcântara Proença
Departamento: Biologia
Instituição: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP
Protocolo: 0009.0.229.000-11
Projeto: Investigação de associação de polimorfismos em receptores Toll-like TLR-2 e TLR-4 com câncer colorretal

PARECER nº. 027/11

O projeto visa analisar a distribuição de variantes genéticas para dois tipos de receptores envolvidos com a resposta inflamatória (Receptores Toll-like TLR 2 e TLR 4) em amostras da população brasileira com câncer colorretal tipo esporádico (150 indivíduos) e saudáveis (200 indivíduos). Pretende-se investigar a possível associação entre polimorfismos dos genes acima mencionados com a suscetibilidade ao câncer colorretal. Tal associação ainda permanece inconclusiva na literatura e não existem estudos dessa natureza para a população brasileira. O projeto é inédito e relevante, pois trará novos subsídios para a compreensão da relação entre processos inflamatórios e o desenvolvimento dessa neoplasia.

Os itens do projeto (introdução, objetivos, material e métodos, plano de trabalho e referências bibliográficas) estão bem fundamentados e redigidos adequadamente. A metodologia e casuística são apropriadas para os objetivos propostos. Destaca-se que a orientadora do projeto tem vasta experiência científica na área do estudo e domínio das técnicas a serem utilizadas. As análises moleculares e genéticas serão realizadas em amostras de sangue periférico e em fragmentos do tecido normal ou tumoral obtidas por colonoscopia ou durante cirurgia para remoção do tumor. As amostras de sangue do grupo controle (indivíduos normais) a serem utilizadas são referentes a estudo anterior, aprovado por esse Comitê e pela CONEP (parecer 1739/2003), e desenvolvido sob responsabilidade da orientadora, as quais estão armazenadas no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana. Devido ao grande número de amostras e impossibilidade de contato com esses indivíduos, solicita-se a dispensa do TCLE. As amostras biológicas de pacientes com câncer serão coletadas por profissionais especializados dos serviços competentes do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Tais procedimentos envolvem riscos mínimos e não resultarão em riscos adicionais para a saúde dos indivíduos. O termo de consentimento livre esclarecido está redigido de forma clara, objetiva e elucida plenamente quanto aos propósitos da pesquisa, os possíveis riscos e benefícios científicos.

O projeto está em conformidade com as normas regulamentadoras, os riscos para os sujeitos da pesquisa são mínimos e sua importância científica é evidente. Portanto, este CEP considera o projeto:

- APROVADO**
 COM PENDÊNCIA, máximo de 60 dias para atendimento
 RETIRADO
 NÃO APROVADO
 APROVADO, aguardar apreciação final da CONEP

Datas previstas para apresentação dos relatórios

1º relatório: maio/2012 – 2º relatório: maio/2013

Obs.: Para facilitar a apresentação do relatório poderá seguir como orientação o roteiro no site http://www.iblce.unesp.br/instituicao/comissoes/etica/arquivos/Roteiro_02.doc

São José do Rio Preto, 16 de maio de 2011.

Prof. Dr. Raul Aragão Martins
Vice-Coordenador do CEP

Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth - CEP 15054-000
São José do Rio Preto – SP – Brasil
Tel (17) 3221-2456

ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa “**Investigação de associação de polimorfismos em receptores Toll-like – TLR-2 e TLR-4 com câncer colorretal**”, e em extensões deste, sob responsabilidade da pesquisadora **Marcela Alcântara Proença**. O estudo será realizado utilizando sangue, que será colhido com seringa descartável por enfermeira e o risco da colheita pode incluir inchaço e vermelhidão no local, sem qualquer outro risco para sua saúde. O material (sangue) será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, minha privacidade e identidade serão preservadas. O material genético (DNA), ou seja hereditário, extraído do sangue será utilizado para atingir os objetivos deste estudo que visa obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer colorretal esporádico. Este estudo tem como objetivo principal: analisar alterações nos genes (material hereditário) TLR2 e TLR4, que atuam na resposta imune inata, com a finalidade de esclarecer o papel de fatores genéticos no desenvolvimento do tumor. Você poderá consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da instituição, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Será solicitado que forneça informações através de um questionário realizado durante uma entrevista antes do seu exame e também deverá autorizar a coleta de dados em seu prontuário médico e colheita de seu sangue periférico. Todas as informações fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo, sem sua identificação, pois o material coletado será identificado por código. Os resultados serão utilizados apenas para divulgação em reuniões e revistas científicas. Você será informado pelo seu médico dos resultados obtidos que possam auxiliar seu tratamento ou prevenir a progressão da lesão que apresenta no intestino, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Se você concordar com a retirada e uso do seu sangue, do modo descrito acima, você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Esta pesquisa científica é importante pois poderá fornecer conhecimentos sobre o padrão de expressão e a associação de alterações nos genes TLR2 e TLR4 com o risco de desenvolvimento de câncer colorretal, podendo melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto oferecer novas possibilidades de diagnóstico e de melhora na qualidade de vida, considerando que esses genes atuam diretamente no sistema imune inato, e que o câncer colorretal está diretamente relacionado com a resposta inflamatória. O material biológico cedido será armazenado no nosso laboratório e poderá ser utilizado para pesquisas futuras mediante aprovação pelo CEP ou pela CONEP, em cumprimento à Resolução CNS 347/2005.

Diante das explicações, se você concordar em participar deste projeto, coloque sua assinatura a seguir e forneça os dados solicitados.

Nome: _____ R.G. _____
Endereço: _____ Fone: _____

_____, _____ de _____ de 2012.

Usuário ou responsável legal

Pesquisador responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante e a outra ao pesquisador

Nome: Marcela Alcântara Proença	Cargo/Função: Aluna de Mestrado
Instituição: IBILCE / UNESP	
Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265, Bairro Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto - SP	
Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP – parecer nº 027/11 São José do Rio Preto – fone 17-3221.2456 / 3221.2317	

ANEXO 3 - Questionário**I. IDENTIFICAÇÃO**

Nome: _____ Prontuário: _____
 Data de nascimento: ____/____/____ Local: _____
 Sexo: () Etnia: () Branco () Não-branco [pardo/negro] () Asiático Escolaridade: _____
 Endereço: Rua _____ Nº: ____ Fone: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____ Estado: ____
 Profissão atual: _____ Tempo de atuação: _____
 Profissão anterior: _____ Tempo de atuação: _____

II. DADOS DO TUMOR

Local do tumor: _____ Data de diagnóstico: ____/____/____
 TNM Clínico: _____ Patológico: _____
 Tumor primário: () Sim () Não Local: _____
 Recidiva: () Sim () Não Local: _____
 Início do diagnóstico do câncer: Mês () Ano () Tipo: _____
 Cirurgia: () Sim () Não Tipo: _____ Data: ____/____/____
 Radioterapia: () Sim () Não Data de início - Período: ____/____/____ - _____
 Quimioterapia: () Sim () Não Data de início - Período: ____/____/____ - _____

III. FATORES DE RISCO AMBIENTAL

Exposição ao tabaco*: () Sim () Não () Ex-fumante Tipo: _____
 Início: _____ Término: _____ Duração: _____ Consumo diário: _____
 Consumo de álcool**: () Sim () Não () Ex-etilista Tipo: _____
 Início: _____ Término: _____ Duração: _____ Consumo semanal: _____
 Você teve algum trabalho em que se expôs a produtos químicos ou pesticidas? () Sim () Não

* Serão considerados tabagistas os indivíduos que consumiram acima de 100 cigarros durante a vida.

** Serão considerados etilistas os indivíduos que consomem acima de 4 doses de bebida destilada, ou 1 garrafa de cerveja (ou 2 latas de cerveja) por semana.

IV. HISTÓRICO MÉDICO PESSOAL E FAMILIAL

Antecedentes pessoais:	Antecedentes familiares:	Grau de Parentesco
() <i>Diabetes mellitus</i> há __ anos	() <i>Diabetes mellitus</i> há __ anos	_____
() Doença de Crohn há __ anos	() Doença de Crohn há __ anos	_____
() Retocolite Ulcerativa Crônica __ anos	() Retocolite Ulcerativa Crônica há __ anos	_____
() Pólipo () Adenoma () Câncer	() Pólipo () Adenoma () Câncer	_____
Tipo: _____	Tipo: _____	_____
Outras: _____	Outras: _____	_____

Tratamentos anteriores: () Sim () Não Tipo: _____
 Cirurgias anteriores: () Sim () Não Tipo: _____
 Uso de medicamentos: () Sim () Não Tipo: _____

V. DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO

Data: ____/____/____

Responsável pelo procedimento: _____

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Marcela Alcântara Proença