

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA



**“NUTRIÇÃO E GENES EM DOENÇAS INTESTINAIS”**

Catarina Sousa Guerreiro

*Doutoramento em Ciências e Tecnologias da Saúde*

2011



UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



## **“NUTRIÇÃO E GENES EM DOENÇAS INTESTINAIS”**

Catarina Sousa Guerreiro

Tese orientada pela Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Mendes de Assis Camilo

*Doutoramento em Ciências da Saúde*

*Especialidade em Nutrição*

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade da sua autora, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

***A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 18 de Janeiro de 2011***

A presente Tese de Doutoramento foi realizada com base nas seguintes publicações:

- Catarina S Guerreiro, Marília Cravo, Miguel Brito, Pedro M Vidal, Paulo O Fidalgo, e Carlos N Leitão.  
The D1822V APC polymorphism interacts with fat, calcium, and fiber intakes in modulating the risk of colorectal cancer in Portuguese persons.  
American Journal of Clinical Nutrition 2007; 85(6):1592-97.
- Catarina Sousa Guerreiro, Bruno Carmona, Susana Gonçalves, Elisabete Carolino, Paulo Fidalgo, Miguel Brito, Carlos Nobre Leitão, e Marília Cravo.  
Risk of colorectal cancer associated with the 677 polymorphism in 5, 10- methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients.  
American Journal of Clinical Nutrition 2008; 88(5):1413-18.
- Catarina Sousa Guerreiro, Marília Cravo, Ana Raimundo Costa, Ana Miranda, Lourdes Tavares, Paula Moura-Santos, Pedro Marques Vidal, e Carlos Nobre Leitão.  
A comprehensive approach to evaluate nutritional status in Crohn's patients in the era of biologic therapy: a case-control study.  
American Journal of Gastroenterology 2007;102(11):2551-56.
- Catarina Sousa Guerreiro, Paula Ferreira, Lourdes Tavares, Paula Moura-Santos, Manuela Neves, Miguel Brito, e Marília Cravo.  
Fatty acids, IL-6 and TNF- $\alpha$  polymorphisms: An example of nutrigenetics in Crohn's disease.  
American Journal of Gastroenterology 2009;104(9):2241-49.



## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	IX
<b>RESUMO</b> .....	XI
<b>SUMMARY</b> .....	XV

## CAPÍTULO 1

### I) Fundamentação Teórica

1. Nutrição .....	3
2. Genes .....	4
3. Nutrigenética .....	5
4. Cancro do Cólon e Recto	
4.1. Factores Ambientais .....	6
4.2. Factores Genéticos .....	11
4.3. Nutrigenética no Cancro do Cólon e Recto .....	12
5. Doença de Crohn	
5.1. Factores Ambientais .....	14
5.2. Factores Genéticos .....	17
5.3. Nutrição, Genes e Doença de Crohn .....	17
5.3.1. Nutrição e Doença de Crohn.....	18
5.3.2. Polimorfismos genéticos e influência no fenótipo da Doença de Crohn .....	20
5.3.3. Nutrigenética no desenvolvimento da Doença de Crohn .....	20
6. Referências Bibliográficas.....	22

<b>II) Objectivos</b> .....	37
-----------------------------	----

## CAPÍTULO 2

### I) Cancro do Cólon e Recto

<b>Estudo 1</b> .....	40
<i>O polimorfismo D1822V APC interage com a ingestão de gordura, cálcio e fibra na modulação do risco de Cancro Colo Rectal em indivíduos portugueses</i>	
<b>Estudo 2</b> .....	54
<i>O risco de Cancro Colo Rectal associado ao polimorfismo C677T na 5,10 metilenotetrahidrofolato reductase depende, em doentes portugueses, da ingestão de nutrientes dadores de grupos metilo.</i>	

### II) Doença de Crohn

<b>Estudo 3</b> .....	67
<i>Uma abordagem global na avaliação do estado nutricional de Doentes de Crohn na era da terapia biológica: um estudo caso-controlo</i>	

<b>Estudo 4</b> .....	81
<i>Ácidos gordos e polimorfismos da IL6 e TNF<math>\alpha</math>: um exemplo de nutrigenética na Doença de Crohn</i>	
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>I) Discussão</b> .....	99
<b>II) Considerações Finais</b> .....	102
<b>III) Referências Bibliográficas</b> .....	104
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	XIX
<b>ANEXOS</b> .....	XX

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AGPI</b>	Ácidos gordos polinsaturados
<b>APC</b>	Adenomatous Polyposis Coli
<b>BIA</b>	Bioimpedância
<b>CARD</b>	Caspase recruitment domain
<b>CCR</b>	Cancro do cólon e recto
<b>CDAI</b>	Crohns' disease activity index
<b>Cox2</b>	Ciclo-oxigenase 2
<b>DRI</b>	Dietary Reference Intake
<b>DC</b>	Doença de Crohn
<b>DHA</b>	Docosahexaenóico
<b>DII</b>	Doença inflamatória intestinal
<b>EPA</b>	Eicosapentaenóico
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>F</b>	Feminino
<b>IHB</b>	Índice Harvy-Bradshaw
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>IPOLFG</b>	Instituto Português Oncologia Lisboa, Francisco Gentil
<b>LT</b>	Linfotoxina
<b>M</b>	Masculino
<b>%MG</b>	Percentagem de massa gorda
<b>%MLG</b>	Percentagem de massa livre de gordura
<b>MTHF</b>	Metilenotetrahidrofolato
<b>MTHFR</b>	Metilenotetrahidrofolato reductase
<b>MTR</b>	Metionina sintase
<b>NOD</b>	Nucleotide-binding oligomerization
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>PCT</b>	Prega tricípital
<b>PG</b>	Prostaglandinas
<b>PCR</b>	Reacção em cadeia polimerase
<b>QFA</b>	Questionário de frequência alimentar
<b>RR</b>	Risco relativo
<b>SGA</b>	Avaliação subjectiva global
<b>SHMT</b>	Serina hidroximetiltransferase
<b>SPSS</b>	Statistical package for social sciences
<b>TBA</b>	Tecido branco adiposo
<b>TNF</b>	Factor de necrose tumoral
<b>USDA</b>	Departamento de agricultura dos Estados Unidos



## RESUMO

A nutrição é um dos principais factores modificáveis das doenças crónicas. Para além da sua indispensável função como veículo de nutrientes para o organismo, desempenha também um efeito fisiológico primordial ao ser parte integrante de muitas reacções ao nível celular. É sabido que por um lado os nutrientes podem alterar a expressão e transcrição genética condicionando mecanismos envolvidos na doença, e por outro podem também influenciar a predisposição para certas patologias como resultado da variabilidade genética individual. Este último aspecto poderá justificar respostas diferentes a estímulos nutricionais idênticos frequentemente detectadas em estudos que avaliam a relação entre dieta e doença.

No cancro do cólon e recto (CCR) e na doença de Crohn (DC), duas patologias que afectam o tracto gastrointestinal influenciando a relação individuo/dieta e consequente metabolização dos nutrientes, muita atenção é dada ao estado nutricional dos indivíduos. São vários os estudos que avaliam não só a importância dos nutrientes/alimentos no risco de doença, como também no comportamento e actividade da mesma. Apesar dos inúmeros estudos, os seus resultados são muitas vezes discordantes em ambas as doenças; nalguns, determinados nutrientes parecem ser ou protectores ou promotores, ao passo que noutros esse efeito já não se observa. A hipótese em questão parece poder estar relacionada com a heterogeneidade genética das populações em estudo.

O conjunto dos quatro estudos que compõem esta tese pretende explorar a influência de variáveis nutricionais e genéticas no desenvolvimento de duas doenças intestinais, em concreto o CCR e a DC. Os estudos pretendem dar a conhecer de forma mais pormenorizada o padrão e estado nutricional de duas populações distintas. Foram igualmente estudados alguns exemplos de nutrigenética: a) foi estimado o risco de CCR associado à interacção entre a ingestão de determinados nutrientes e polimorfismos de genes de susceptibilidade, e de metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA); b) no caso da DC, uma doença inflamatória, avaliou-se o efeito da interacção entre os polimorfismos em genes que codificam as citocinas pró e anti-inflamatórias e o tipo de gordura da dieta, também esta com influência no perfil inflamatório.

A presente tese divide-se em quatro capítulos.

O **CAPÍTULO 1** consiste numa introdução geral, onde são expostos conceitos genéricos sobre nutrição, genes e nutrigenética. É ainda apresentada uma revisão da literatura sobre estas temáticas aplicadas ao CCR e à DC.

O **CAPÍTULO 2** apresenta como temática central aspectos de nutrição e genes no CCR. O **estudo 1** é um estudo caso-controlo que incluiu 196 doentes com CCR e 200 indivíduos saudáveis. Um dos objectivos deste estudo foi avaliar o padrão alimentar e sua influência no risco de CCR. Foi avaliado o consumo dietético dos doentes (fase pré diagnóstico) e dos controlos, de forma a estimar

o risco de CCR associado à ingestão de nutrientes. Do vasto número de nutrientes analisados, foram identificados como nutrientes protectores: a fibra, o cálcio, a vitamina C e os carotenos. Verificámos que as quantidades necessárias para conferir protecção coincidiam ou estavam muito próximas das Dietary Reference Intakes (DRI) estabelecidas pela National Academy of Sciences, reforçando a importância da ingestão das doses mínimas necessárias de nutrientes, sem qualquer necessidade acrescida. Por oposição, o único factor nutricional a apresentar-se como deletério para o risco de CCR foi o álcool. Ainda no que respeita ao estado nutricional detectámos que, segundo o índice de massa corporal (IMC), mais de 50% dos doentes com CCR apresentavam excesso de peso/obesidade e apenas 5% apresentava baixo peso. Ainda no **estudo 1** foi avaliado o risco de CCR associado à presença de um polimorfismo no gene *APC*, importante supressor tumoral; como factor isolado, o polimorfismo D1822V *APC* não influenciou o risco de CCR. É sabido que o CCR resulta de uma interacção entre factores genéticos e ambientais, pelo que fomos estudar se determinados nutrientes teriam um efeito divergente no risco de CCR associado ao perfil genético do polimorfismo em questão. Observámos que o efeito protector conferido pela dieta rica em cálcio e em fibra era mais evidente nos indivíduos portadores do genótipo com o alelo mutado; por outro lado, constatámos também que, de forma a minimizar o risco de CCR os indivíduos com genótipo wildtype deveriam consumir uma dieta com reduzido teor de colesterol.

O **estudo 2** que também integra este capítulo é igualmente um estudo caso-controlo, envolvendo doentes com CCR e indivíduos saudáveis. Neste estudo foi avaliada a influência individual e conjunta de factores nutricionais (folato, vitamina B<sub>6</sub> ou B<sub>12</sub>, aminoácidos e álcool) e factores genéticos como os polimorfismos dos genes *metilnotetrahidrofolato reductase (MTHFR)*, *metionina sintase (MTR)*, e *serina hidroximetiltransferase (SHMT)*, todos implicados no ciclo de metilação e síntese de DNA. Dos polimorfismos estudados, o localizado no codão 677 do gene da *MTHFR* foi o único a revelar resultados estatisticamente significativos; a presença do polimorfismo de forma isolada foi associada a um aumento significativo no risco de CCR, e quando estudado em interacção com factores dietéticos verificámos que a sua presença se tornava especialmente deletéria nos indivíduos com reduzido consumo de folato. Foi assim novamente verificado um exemplo de nutrigenética associado ao CCR.

O **CAPÍTULO 3** desta tese incluiu dois estudos (**estudos 3 e 4**) os quais abordaram as temáticas: nutrição e genes na DC.

O **estudo 3**, um estudo caso-controlo que incluiu 78 doentes com DC com reduzida actividade e 80 controlos saudáveis, pretendeu avaliar o estado nutricional desta população. Os nossos resultados mostraram que apenas menos do que 5% da nossa população tinha baixo peso, e maioritariamente apresentava um IMC médio próximo do excesso ponderal, apesar de uma marcada depleção na massa livre de gordura. A ingestão energética e a ingestão média diária ajustada de glícidos, gordura monoinsaturada, fibra, cálcio, e vitaminas C, D, E e K eram significativamente inferiores nos doentes. Verificámos ainda a frequente exclusão de alimentos como o leite, vegetais, frutos ou cereais, que estava directamente associada à diminuição da ingestão de micronutrientes.

Com a realização do **estudo 4**, que incluiu 99 doentes com DC, pretendemos estudar a influência de variáveis genéticas e nutricionais na actividade da DC. No que respeita às variáveis nutricionais avaliámos o consumo dos diferentes tipos de gordura, com potencial influência no estado inflamatório do indivíduo. Relativamente à componente genética, estudámos polimorfismos localizados em genes que codificam a produção de citocinas pró e anti inflamatórias: interleucina (IL) 1, factor de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), linfotóxina alfa (LT $\alpha$ ) e IL6. Questionámos de que forma a presença destes polimorfismos e o consumo de gordura poderiam influenciar a resposta inflamatória e com isso modificar a actividade da DC. Os resultados revelaram que, mesmo isoladamente, o elevado consumo de gordura total, saturada, monoinsaturada, ou o genótipo homocigótico para a variante 857 do *TNF $\alpha$*  se associavam a doença mais activa. No entanto a presença desta variante era especialmente deletéria para os indivíduos que apresentavam um elevado consumo de gordura total, monoinsaturada, saturada, um elevado ratio n-6:n-3 ou uma dieta pobre em ácidos gordos polinsaturados n-3. Também o elevado consumo de gordura total ou monoinsaturada era especialmente deletério nos indivíduos portadores da variante 174 do gene da *IL6*. Verificou-se assim haver um sinergismo entre os polimorfismos e ingestão de gordura pela observação do efeito deletério/promotor de um consumo elevado/baixo de gordura associado aos polimorfismos de citocinas.

Por fim o **CAPÍTULO 4** consiste na discussão dos resultados dos estudos contemplados; e também uma reflexão sobre dúvidas e questões relacionadas com a temática da nutrigenética.

Destaca-se a importância da prática de uma dieta saudável, equilibrada, da manutenção do peso corporal adequado e da prática de exercício físico regular em situações de CCR e de DC. Na abordagem à nutrigenética, os nossos resultados parecem revelar a importância dos factores nutricionais em indivíduos geneticamente susceptíveis, fazendo crer que nalguns subgrupos da população (geneticamente susceptíveis) a nutrição pode assumir um papel preponderante no risco de doença.

**Palavras-chave:** Nutrição, polimorfismos genéticos, cancro do cólon e recto, doença de Crohn.



## **SUMMARY**

Nutrition is a major modifiable factor for chronic diseases. In addition to its important role as a nutrients' source to the human body; being an integral part of many cellular reactions, nutrition also plays an important physiological effect. It is known that nutrients may change the expression and gene transcription which influence mechanisms involved in disease; on the other hand they may also influence the predisposition to certain diseases as a result of individual genetic variability. The latter may explain different responses to identical stimuli often detected in studies aimed at evaluating the relationship between diet and disease.

In colorectal cancer and Crohn's disease, two conditions affecting the gastrointestinal tract hence likely to influence the relation between subjects and diet and subsequent nutrient metabolism, much attention is paid to individual nutritional status. Several studies not only assess the significance of nutrients/foods in disease risk, but also in its behavior and activity. Despite the numerous studies in both diseases, results are often contradictory. In some, certain nutrients present themselves as protectors or promoters, whilst this effect is no longer observed in others. The hypothesis to be studied may derive from the potential relationship with the genetic heterogeneity of the populations under study.

The four papers included in this thesis aim at exploring the influence of genetic and nutritional variables in the development of two intestinal diseases, specifically colorectal cancer and Crohn's disease. The studies illustrate a detailed pattern and nutritional status of two distinct populations. We also studied some examples of nutrigenetics: a) the risk of colorectal cancer was estimated depending on the interaction between the intake of certain nutrients and polymorphisms of susceptibility genes and ADN methylation; b) in the inflammatory Crohn's disease, the interaction between polymorphisms in genes encoding pro and anti-inflammatory cytokines and the type of dietary fat, also known as modulatory of inflammatory status, were evaluated.

The present thesis is divided into four chapters.

**CHAPTER 1** is a general introduction where common concepts about nutrition, genes and nutrigenetics are exposed. It also presents a review of the literature on these topics applied to colorectal cancer and Crohn's disease.

**CHAPTER 2** is centered on nutrition, genes and colorectal cancer. **Study 1** is a case-control study involving 196 patients with colorectal cancer and 200 healthy individuals. One objective of this study was to evaluate the dietary pattern and its influence on colorectal cancer risk. The dietary intake of patients (pre diagnosis) and controls was evaluated in order to estimate the risk of colorectal cancer associated with nutrient intake. From the vast number of analyzed nutrients some were identified as protective: fiber, calcium, vitamin C and carotenoids. We found that the doses

required for protection coincided or were very close, to the Dietary Reference Intakes established by the National Academy of Sciences, highlighting the importance of the minimum required nutrient intake, without any increased need. By contrast, alcohol was the only nutritional factor identified as deleterious for colorectal cancer risk. Moreover, with regard to nutritional status, according to body mass index (BMI), we observed that over 50% of the population were overweight/obese and only 5% presented low body weight. In this study we also evaluated the risk of colorectal cancer associated with the presence of a polymorphism in the *APC* gene, an important tumor suppressor; we found that the D1822V *APC* polymorphism *per se* did not influence colorectal cancer risk. It is known that colorectal cancer results from an interaction between genetic and environmental factors, so we also studied whether the intake of particular nutrients would have a dissimilar effect on colorectal cancer risk depending on the profile of the above genetic polymorphism. We found that the protective effect conferred by a diet rich in calcium and fiber was more obvious in individuals carrying the genotype with the mutant allele; what's more, the holders of wildtype genotype should consume a diet low in cholesterol to minimize the risk of colorectal cancer.

Also part of this chapter, **study 2** is a case control study involving patients with colorectal cancer and healthy subjects. This study evaluated the individual and combined influence of nutritional factors (folate, vitamins B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub>, aminoacids and alcohol), and genetic factors such as polymorphisms of genes *MTHFR*, *MTR*, *SHMT*, all implicated in the methylation and synthesis of the DNA cycle. Among the studied polymorphisms, the one located in the 677 codon of *MTHFR* gene was the only which showed statistically significant results; the effect of the polymorphism *per se* was associated with a significant increase in colorectal cancer risk, and when analyzed in interaction with dietary factors its presence became especially deleterious in individuals with low intake of folate. Thus, we verified again an example of nutrigenetics associated with colorectal cancer.

**CHAPTER 3** included two studies (**studies 3** and **4**) which addressed the topics: nutrition and genes in Crohn's disease.

**Study 3**, a case control study that included 78 patients with mildly active Crohn's disease and 80 healthy controls, aimed at assessing nutritional status. Our results showed that underweight was found in less than 5% of the evaluated population, whose overall mean BMI almost reached overweight values, despite the marked depletion in fat-free mass. Energy intake and adjusted mean daily intake of glicids, monounsaturated fat, fibre, calcium and vitamins C, D, E and K were significantly lower. Furthermore we did verify frequent foods' exclusion, such as milk, vegetables, fruits or cereals, which was directly associated with a decreased intake of micronutrients.

**Study 4** that included 99 patients with Crohn's disease aimed at studying the influence of genetic and nutritional variables in the activity of Crohn's disease. In what concerns nutritional variables we assessed the consumption of different types of fat, due to their potential influence in individual inflammatory status. Regarding the genetic component, we studied polymorphisms located in genes that encode pro and anti inflammatory cytokine production: interleukin 1 (IL1), tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), lymphotoxin alpha (LT $\alpha$ ) and IL6. We hypothesized whether the presence of these

polymorphisms and fat consumption might influence the inflammatory response and thereby modify DC activity. Results showed that, even on their own, high intake of total fat, saturated, monounsaturated, or the genotype homozygous for the variant 857 of *TNFA* were associated with a more active disease. However, the presence of this variant was especially harmful for individuals with a high intake of total fat, monounsaturated, saturated, a high n-6:n-3 ratio or a diet low in polyunsaturated fatty acids n-3. High intakes of total or monounsaturated fat were also particularly deleterious in patients with the variant 174 of the *IL6* gene. A synergy between the polymorphism and intake of fat was thus revealed due to the observation of a deleterious/promoter effect of a high/low consumption of fat associated with cytokine polymorphisms.

Finally **CHAPTER 4** outlines a global discussion of the results obtained in the original studies; it also addresses some reflections and thoughts about nutrigenetics.

This work highlights the importance of a healthy and balanced diet, the maintenance of an adequate body weight and of a regular physical exercise practice in cases of CRC and CD. In what concerns nutrigenetics, our results seem to show the importance of nutritional factors in genetically susceptible individuals, further suggesting that in some population subgroups (genetically susceptible) nutrition may play a leading role in the risk of disease.

**Key-words:** Nutrition, genetic polymorphisms, colorectal cancer, Crohn's disease.



## **CAPÍTULO 1**

---



## I) FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1. NUTRIÇÃO

Desde Hipócrates que a nutrição é considerada um elemento essencial à vida humana. Actualmente, a nutrição é reconhecida como um vasto campo de conhecimentos integrados abrangendo um conjunto de conhecimentos relacionados com o metabolismo de nutrientes com importante papel na promoção da saúde e prevenção da doença; na fisiopatologia de várias doenças muito frequentes quer por excesso quer por défice de nutrientes; na terapêutica da doença ao actuar como terapêutica nutricional e por fim como veículo de nutrientes isolados que podem actuar como agentes preventivos ou terapêuticos (1).

Nos últimos 10.000 anos, desde o paleolítico até aos dias de hoje, registou-se uma profunda alteração no padrão e comportamento alimentar dos indivíduos (2). Recentemente, com a expansão da industrialização, a urbanização e a globalização económica ocorridas na segunda metade do século XX, primeiro nos países desenvolvidos e mais recentemente nos países em desenvolvimento, foram muitas as mudanças no padrão alimentar e estilos de vida com impacto significativo na saúde e estado nutricional das populações (3). Alimentos e produtos alimentares tradicionalmente produzidos e comercializados num contexto local passaram a abranger um mercado mais global proporcionando uma maior oferta e diversificação no consumo alimentar. Se por um lado passou a existir uma maior disponibilidade e acesso a alimentos facilitando a diversidade alimentar, por outro emergiram padrões alimentares e estilos de vida pouco saudáveis, acompanhados por uma taxa crescente de doença crónicas (3). Observou-se um aumento no consumo de alimentos altamente energéticos, ricos em gordura, especialmente saturada e pobre em hidratos de carbono complexos, acompanhado por um declínio no dispêndio de energia associado a um estilo de vida sedentário, onde é dada primazia aos transportes motorizados e à eliminação progressiva de actividades fisicamente exigentes no local de trabalho e nos tempos de lazer (4,5).

A nutrição é actualmente considerada um dos principais factores determinantes modificáveis das doenças crónicas, com evidência científica a suportar a ideia de que alterações na dieta têm fortes implicações, positivas e/ou negativas, na saúde de cada indivíduo durante todo o seu ciclo de vida (3,6). À luz do conhecimento actual a nutrição já não é apenas estudada na sua perspectiva clássica, na qual é considerada como um veículo major de nutrientes que suprem as necessidades nutricionais do indivíduo (2,7). Actualmente o moderno conceito de nutrição é suportado pelo facto de alguns alimentos e/ou ingredientes, para além do seu papel nutritivo, apresentarem também um efeito fisiológico benéfico para o organismo (2). Este tipo de nutrientes/alimentos são designados de funcionais e incluem entre outros os ácidos gordos polinsaturados (AGPI) n-3, cujas fontes são alimentos como os peixes gordos (ex. salmão, sardinha), sementes ou frutos oleaginosos. Também os polifenóis, a fibra ou os fitoesteróis são nutrientes cuja relação com a doença tem vindo a ser amplamente estudada com o intuito da optimização do estado físico e mental do indivíduo (2,8). As recomendações nutricionais para o alcance de um óptimo estado de saúde são

desde há muito publicadas por entidades de referência como a Organização Mundial de Saúde (9) ou o Departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA) (10). É no entanto interessante observar que a recomendação de consumo de determinados alimentos/nutrientes específicos (funcionais), faz cada vez mais parte integrante das recomendações para tratamento de determinadas patologias (11). Constata-se assim que a nutrição de hoje apresenta um importante papel não só na promoção da saúde mas também na prevenção e tratamento da doença (3,6).

## 2. GENES

Estima-se que o genoma humano possua entre 25.000-40.000 genes (12,13). Os genes são segmentos de cadeias de DNA, compostos por uma sequência de bases nucleótídicas (adenina, timidina, guanina, e citosina) que codificam a informação que permite a síntese de proteínas necessárias ao funcionamento do organismo humano. Cada conjunto de três bases que compõem a cadeia de DNA vai caracterizar um aminoácido a ser incorporado numa proteína. As proteínas codificadas por genes executam várias funções celulares, incluindo o metabolismo de nutrientes, fármacos ou toxinas (14). Na última década, com o mapeamento do genoma humano foram reconhecidas mais de 1000 mutações responsáveis por doenças humanas e foram identificadas mais de 3 milhões de alterações nas bases da sequência do DNA (13). Estas variações são designadas de polimorfismos que, na maioria das vezes, não provocam alterações significativas na estrutura, actividade ou expressão das proteínas (12,15); porém, na presença de determinados estímulos ambientais, nomeadamente nutricionais, poderão aumentar a susceptibilidade ou protecção a determinadas doenças (15).

A determinação da sequência do genoma humano veio facilitar o estudo da relação entre inúmeras variantes de genes polimórficos presentes nas populações humanas e seu impacto na patogénese de diversas patologias (13,16,17). A interpretação e detecção de mutações genéticas, com elevada penetrância, determinantes para o desenvolvimento das doenças monogénicas, como a fenilcetonúria ou fibrose quística, são bem conhecidas. A sua incidência no genoma humano é contudo reduzida quando comparada com a incidência de variações alélicas, causadoras de polimorfismos que contribuem de forma muito reduzida para o risco de desenvolver doença (18). No desenvolvimento de doenças poligénicas, o efeito destes polimorfismos é muitas vezes difícil de avaliar. Nestas doenças a constituição genética individual, definida por uma combinação única de variantes de milhares de genes polimórficos que regem vias metabólicas e sistemas regulatórios, interage com inúmeras influências ambientais, tornando-se difícil prever de que forma estas interacções irão condicionar a expressão do genótipo, e consequentemente um fenótipo indicador de um estado de saúde e/ou doença (19). É cada vez mais consensual que a interacção entre os genes e a interacção entre genes e ambiente podem alterar as associações dos polimorfismos e o processo da própria doença (20). Por este motivo a investigação actual neste âmbito centra-se na a) caracterização dos genes representados pelos 3 biliões de nucleótidos que compõem a cadeia de DNA; b) identificação das proteínas codificadas por cada um dos genes e compreensão da sua função (proteómica); c) associação das variações genéticas com determinadas doenças específicas; d) compreensão do modo como genes,

proteínas e factores ambientais interagem de forma a causar disfunção fisiológica que resulta em doença; e e) identificação de metabolitos que serão úteis na monitorização da progressão da doença (metabolómica) (21).

### **3. NUTRIGENÉTICA**

No século XXI, é um importante campo de investigação a compreensão da relação entre a nutrição e a genética, que procura atingir conhecimentos que permitam o desenvolvimento de recomendações/guidelines que promovam a saúde e previnam a doença (22). As actuais guidelines dietéticas não têm em consideração as eventuais diferenças genéticas individuais na resposta ao padrão alimentar, o que poderá afectar a nível individual a eficácia dessas recomendações (23,24). São ainda pouco claros os mecanismos responsáveis pelas diferenças individuais na resposta à dieta (24). Actualmente sabe-se que: 1) o padrão alimentar ou nutrientes específicos poderão influenciar o risco de doença ao alterar processos envolvidos no início, progressão ou gravidade da doença; 2) os nutrientes poderão influenciar o genoma humano de forma directa ou indirecta, influenciando assim a sua expressão; 3) os efeitos da dieta na saúde estão dependentes do equilíbrio entre estado de saúde e/ou doença e a susceptibilidade genética individual (23,25,26). Estes pressupostos têm motivado a investigação quanto à forma como a dieta influencia a relação entre a saúde e a doença: se porque altera a expressão genética individual, ou se porque influencia a predisposição para certas patologias como resultado da variabilidade genética dos indivíduos (20,23,27). No campo da genética nutricional, destacam-se dois novos conceitos, a nutrigenómica e a nutrigenética (28). A nutrigenómica baseia-se no estudo de como os nutrientes podem alterar a expressão génica do indivíduo, nomeadamente ao nível do genoma, proteoma e metaboloma, ao passo que a nutrigenética se baseia na identificação, classificação e caracterização de variações genéticas humanas que alteram o metabolismo e utilização de nutrientes, levando à compreensão de como a susceptibilidade genética influencia a resposta à dieta (22, 25, 28).

A aplicação da nutrigenética possibilita a análise de variações individuais nos genes com implicações no metabolismo dos nutrientes, criando a expectativa de ser possível a personalização da dieta consoante a identidade genética individual do consumidor (29). Este conceito baseado na susceptibilidade genética, por oposição ao determinismo genético, leva à possibilidade de identificar indivíduos com vias metabólicas menos eficientes, pelo que as suas recomendações nutricionais têm de ser mais individualizadas (21,30). No âmbito da saúde pública, com a aplicação da nutrigenética, poderá ser possível desenvolver guidelines nutricionais baseadas em informação genética ou otimizar medidas de intervenção comunitária, como por ex. fortificação ou suplementação de nutrientes em determinadas populações; no contexto clínico poderá ser possível individualizar, com base na susceptibilidade genética, a terapêutica nutricional em função da doença (31). Acresce que dado o grau de personalização aplicado na nutrigenética, esta poderá promover uma motivação extra na adesão à terapêutica nutricional (32). Contudo, apesar da evidência actual revelar que a relação dieta-genes é um campo promissor, os resultados não são ainda suficientes para se dar início a recomendações nutricionais personalizadas. Só com o avanço

do conhecimento desta interacção em diferentes contextos clínicos poderá ser possível perceber e conhecer de forma mais precisa a resposta do indivíduo à dieta, e com isso realizar um aconselhamento nutricional personalizado, baseado no perfil e susceptibilidade genética de cada indivíduo (25,33,34).

#### **4. CANCRO DO CÓLON E RECTO**

O cancro do cólon e recto (CCR) é um dos tumores mais prevalentes da sociedade de hoje, em particular nos países desenvolvidos (35-37). À escala mundial, este tumor representa a terceira maior causa de morte por cancro nos homens e a segunda nas mulheres (37). Em estatísticas de 2008, o CCR é responsável nos Estados Unidos da América (EUA) por 9% das mortes por cancro e por 12% na Europa (38). Em Portugal, as estatísticas indicam que o CCR é o tipo de tumor mais frequente em localizações comuns aos dois sexos (1 em cada 6 tumores malignos diagnosticados), sendo o segundo cancro com maior incidência em ambos os géneros (38). A taxa de mortalidade associada a este tumor é elevada, contribui para 15% do total da mortalidade oncológica em Portugal, traduzindo-se por aproximadamente 8 mortes/100 000 habitantes/ano (38,39); de notar que a mortalidade por CCR aumentou cerca de 80% nas duas últimas décadas do século XX (40). O CCR constitui em Portugal um grave e premente problema de saúde pública (41).

Sabe-se hoje que a origem do CCR é multifactorial, estando reconhecida na sua etiopatogénese a complexa interacção entre factores ambientais e susceptibilidade genética (42,43).

##### **4.1. FACTORES AMBIENTAIS**

Também designados de factores modificáveis, os factores ambientais implicados no CCR, referem-se à composição corporal, exercício físico e padrão alimentar (44,45).

##### **Composição Corporal**

Segundo dados revelados pelo relatório dos World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, há suficiente evidência epidemiológica para afirmar que a obesidade é um factor de risco para o CCR (44). A metanálise, realizada por Moghaddam e colaboradores, que incluiu 70.000 indivíduos oriundos de 18 estudos de coorte realizados nos continentes Europeu, Americano e Asiático, revelou que indivíduos obesos (IMC superior a  $30\text{kg/m}^2$ ) apresentavam um aumento de aproximadamente 20% no risco de CCR (RR =1,19; IC 95%: 1,11-1,29) quando comparados com indivíduos normoponderais (46). Resultados semelhantes foram obtidos por Marques Vidal e colaboradores, numa metanálise de 11 estudos de coorte através da qual se verificou um aumento de 50% no risco de CCR nos indivíduos obesos (RR=1,50; IC 95%:1,30-1,73) (47). Os mecanismos deste aumento de risco associado à obesidade não são claros, mas presume-se que o CCR e o excesso de massa gorda estejam interligados por mecanismos de inflamação crónica associados à obesidade com reflexos na mucosa cólica (48). Com o aumento do número de adipócitos verifica-se maior libertação de adipocitocinas, onde se inclui a leptina e a adiponectina, e citocinas pró-inflamatórias como o TNF $\alpha$  e a IL6 (49,50). Os elevados níveis destas citocinas estão

associados ao aumento da resistência à insulina, com maior quantidade de insulina circulante e diminuição da tolerância à glicose (51). Estudos experimentais em animais revelam que a insulina promove a hiperproliferação das células do cólon (50) diminuindo também a apoptose (52). Também a presença de leptina elevada parece promover a mitose celular e diminuir a apoptose das células epiteliais (53). Acresce que um ambiente inflamatório pode induzir a activação do factor de transcrição NFK $\beta$  e aumentar a expressão da óxido nítrico sintase e Cox-2, mecanismos associados à supressão da apoptose (54). Colectivamente, estes diferentes fenómenos surgem como mecanismos explicativos da associação entre obesidade e CCR (55).

### **Actividade física**

Foi avaliada a relação entre a prática de actividade física e risco de CCR em vários estudos coorte (56-59). Segundo a literatura, a actividade física parece ter um maior efeito protector no cancro do cólon (44,59) do que noutros tipos de cancro (60); não existindo evidência de que a actividade física seja protectora para o desenvolvimento de tumores ao nível do recto (56,59,61). Num estudo prospectivo multicêntrico, realizado em vários países Europeus que incluiu 413.000 participantes, Friedenreich e colaboradores observaram redução do risco de cancro do cólon em cerca de 20% nos indivíduos mais activos (59). Huxley e colaboradores observaram a mesma tendência numa recente metanálise de 27 estudos coorte que incluiu 27.482 indivíduos e também verificou uma redução do risco nos indivíduos mais activos (45). Os mecanismos que conferem protecção pela prática da actividade física parecem estar relacionados com: a) aceleração do trânsito intestinal, diminuindo o tempo de exposição da mucosa a potenciais carcinogéneos, b) melhoria da resistência à insulina, c) diminuição da massa gorda corporal, d) melhoria no rácio das prostaglandinas F e E<sub>2</sub>, com conseqüente aumento da F (estimuladora da motilidade intestinal e inibidora da proliferação celular da mucosa cólica), e diminuição da E<sub>2</sub> (promotora da proliferação celular) (60,62).

### **Padrão Alimentar**

É reconhecido que a nutrição tem um papel importante na prevenção deste tipo de tumor; nos países industrializados é geralmente aceite que mais de 50% dos CCR são atribuídos a causas alimentares (45,63,64). Com a informação do mais recente relatório dos World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, tornaram-se conhecidas diversas associações, com maior ou menor grau de evidência, entre alimentos/nutrientes e o risco de CCR (44).

No que respeita aos alimentos, o elevado consumo de carne vermelha, carne processada e bebidas alcoólicas encontra-se significativamente associado a um maior risco de CCR; alimentos como o alho e o leite parecem revelar uma tendência protectora no risco de CCR (44). No que diz respeito aos nutrientes, aqueles que provavelmente desempenham um papel mais evidente na protecção para o CCR são a fibra e o cálcio. Quanto ao folato, vitamina D, selénio, verifica-se uma ligeira tendência de efeito protector; e uma ligeira tendência de efeito

promotor para o ferro, açúcares e gordura animal, sem forte grau de evidência associado (44).

Um dos objectos em análise neste trabalho foi o estudo da relação entre nutrientes e CCR, que a seguir será sucintamente explanado.

### Fibra

Existem muitos estudos caso-controlo que assinalam o efeito protector deste nutriente no risco de CCR (64,65); contudo um elevado número de estudos coorte de grandes dimensões, realizados nos EUA e Europa, não demonstraram de forma conclusiva o efeito protector da fibra (66-71). Os possíveis efeitos benéficos deste nutriente prendem-se com: o aumento do volume fecal associado a uma maior diluição de potenciais carcinogéneos; com a aceleração do trânsito intestinal e menor tempo de contacto entre possíveis carcinogéneos e a mucosa intestinal; e também com o aumento da fermentação bacteriana dando origem aos ácidos gordos de cadeia curta: acetato, propionato e butirato (72). Sabe-se que o butirato é a primeira fonte de energia para o epitélio do cólon, estimulando o seu crescimento; inibe ainda o crescimento das células tumorais promovendo também a apoptose celular (73). Apesar da inconsistência de resultados são várias as entidades, como a American Gastroenterological Association, World Health Organization e o National Cancer Institute, que recomendam um consumo diário de fibra que atinja 30-35g/dia (74).

### Cálcio

Segundo os World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, também a ingestão de cálcio poderá ter um papel protector no desenvolvimento do CCR (44). Este relatório atribui uma forte evidência para esta associação, sobretudo fundamentada em estudos essencialmente experimentais em humanos com recurso à suplementação em cálcio (44); mantém-se a dúvida se o cálcio de origem alimentar terá os mesmos efeitos protectores (75).

O papel protector do cálcio no CCR parece associar-se à prevenção primária deste tumor, ao reduzir o risco de desenvolvimento do tumor numa fase anterior à alteração neoplásica (76). São muitos os mecanismos que poderão explicar esta associação protectora. *In vitro*, este nutriente forma sabões cálcicos insolúveis ao reagir com os ácidos gordos ionizados e com ácidos biliares, reduzindo os efeitos nefastos destes compostos (77,78). Está igualmente descrito que a presença de cálcio poderá também influenciar a actividade proliferativa da mucosa cólica (79). Apesar destes mecanismos teoricamente protectores, alguns estudos prospectivos da década de noventa não demonstraram protecção por parte do cálcio no aparecimento de adenomas (80,81). Contudo, foram recentemente publicados estudos prospectivos (82-84) e uma meta-análise (85) que revelaram uma relação inversa entre consumo de cálcio e CCR. Assim, dos resultados até agora publicados, destaca-se a recomendação para evitar o baixo consumo de cálcio (valores inferiores às DRI: 1000mg/dia) com o objectivo de minimizar o risco de CCR (86).

### Vitamina D

O consumo de vitamina D apresenta-se como possível protector de CCR por estar intimamente associada ao metabolismo do cálcio (75). Estudos experimentais *in vitro* com células humanas sugerem que esta vitamina induz a diferenciação celular e inibe a proliferação; ou por efeito directo, ao induzir alterações na expressão de genes envolvidos no controlo da proliferação celular (87) ou por potenciar a absorção de cálcio (88,89). Embora com resultados ainda pouco claros, a associação inversa entre CCR e consumo de vitamina D tem sido confirmada em alguns estudos prospectivos de coorte (83,90,91) e também em estudos caso-controlo (92,93). Da metanálise realizada por Gorham e colaboradores que analisou 18 estudos observacionais, destaca-se que o consumo diário de 1000 UI de vitamina D poderá conferir uma redução de 50% no risco de CCR (94).

### Folato

Segundo os World Cancer Research/American Institute for Cancer Research os alimentos ricos em folato têm um papel pouco claro na protecção do CCR (44). A eventual protecção desta vitamina é pela primeira vez referida por Freudenheim e colaboradores (95) ao observarem que uma dieta com baixos níveis de folato e metionina e elevado teor de álcool estava associada a um aumento no risco de CCR. Vários foram os estudos posteriores a sugerir que a deficiente ingestão de folatos aumenta o risco de CCR (96-99). O folato é obtido na dieta através do consumo de leguminosas, vegetais, frutos oleaginosos ou cereais. O mecanismo através do qual esta vitamina pode influenciar o processo de carcinogénese parece estar relacionado com o seu envolvimento tanto na síntese como na metilação do DNA (100,101). O folato circula no sangue sob a forma de 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), fonte de grupos metilo necessários à síntese de nucleótidos fundamentais para a síntese e reparação do DNA. Actua também como dador de grupos metilo para a remetilação da homocisteína em metionina, que posteriormente será metabolizada em S-adenosilmetionina, dador universal de grupos metilo, fundamentais para a metilação da citosina na molécula de DNA (102). A deficiência de folato promove e acelera o processo de carcinogénese por alterar estes processos. Com uma reduzida ingestão desta vitamina, fica alterada a síntese de precursores de DNA e incompletos os mecanismos de reparação do DNA. Na presença de uma dieta pobre em folatos, a molécula de uracilo que habitualmente não se encontra presente na cadeia de DNA, é nela incorporada em vez da timidina resultando em quebras na cadeia de DNA (103). Acresce que níveis alterados de metilação da citosina conduzem a hipometilação do DNA promovendo a sobreexpressão de vários genes, incluindo oncogenes que conduzem à desregulação na proliferação celular (103,104). A hipometilação conduz também a quebras na cadeia de DNA, originando mutações que contribuem para a expressão alterada de genes envolvidos na carcinogénese colorectal como é o caso do gene *APC* (105). Na recente metanálise de Kim e colaboradores (106), a protecção conferida pelo consumo de folato só foi observada para consumos superiores a 409µg/dia, valor semelhante à DRI (400µg/dia) estabelecida pela National Academy of Sciences (107).

### Selénio

Os estudos que avaliam a associação entre o consumo dietético de selénio e CCR são essencialmente de caso-controlo (108-112). Apesar de nem sempre significativos os seus resultados revelam, na sua grande maioria, uma diminuição no risco de CCR associado a um maior consumo de selénio (109,111,112). Os mecanismos anticarcinogénicos que suportam estes resultados estão associados à indução da apoptose (113), ao papel antioxidante e anti-inflamatório do selénio, como constituinte das enzimas glutatião peroxidase e selenoproteína P, com extrema importância na diminuição do stress oxidativo (114).

### Ferro

O ferro poderá promover a carcinogénese colo-rectal ao gerar radicais livres que danificam o DNA, devido às suas características pro-oxidantes (115,116). Estudos epidemiológicos revelam evidência de associações positivas entre CCR e elevadas reservas de ferro no organismo (117-119). O efeito nefasto do ferro surge associado ao ferro heme (120) que revelou em estudos experimentais em animais: a) ter propriedades citotóxicas e hiperproliferativas ao nível da mucosa do cólon (121), b) induzir a peroxidação de gorduras com conseqüente efeito dos lipoperóxidos na carcinogénese, e c) promover a activação das aminas heterocíclicas (122) e de compostos nitrogenados (120), ambos potentes mutagénicos e carcinogénicos.

### Gordura animal

Quase há 4 décadas, Ernest Wynder relacionou o aumento da mortalidade por cancro do cólon aos países com maior consumo de gordura *per capita* (123). Mais tarde, seis estudos prospectivos estudaram a relação entre gordura animal e CCR (67,124-128); três revelaram um aumento de risco associado ao elevado consumo de gordura animal (67,125,128). Os mecanismos teóricos propostos para esta associação foram estudados em modelos animais e relacionam-se com o facto de dietas ricas em gordura animal determinarem uma maior excreção de ácidos biliares que parecem actuar como promotores da tumorigénese ao causarem danos nas membranas celulares (129). Apesar de descritos os mecanismos biológicos que associam o risco de CCR ao consumo de gordura animal, segundo os World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Report não há ainda evidência científica suficiente a suportar esta ideia (44). A recente metanálise de Alexander e colaboradores, que incluiu resultados de estudos prospectivos e de estudos caso-controlo, suporta esta mesma ideia, ao observarem uma falta de associação significativa entre o consumo de gordura animal e o CCR (RR:1,15 IC95%=0,93-1,42) (130).

### Açúcares

Os açúcares foram dos primeiros nutrientes a ser identificados como eventuais potenciadores da carcinogénese colo-rectal (131), ao poderem provocar um aumento da resposta glicémica com conseqüente aumento da produção de insulina, que pode actuar como factor de crescimento e promover a carcinogénese (132). Os resultados de estudos publicados têm-se revelado muito divergentes; alguns estudos recentes contrariam a hipótese

de que uma dieta com elevada carga glicémica influencie o risco de CCR (133-135), contrapondo com outros estudos coorte ou caso-controlo que revelam uma relação positiva entre dieta com elevada carga glicémica e CCR (136-138). A disparidade de resultados torna inconsistente a relação entre açúcares e CCR (44).

### Álcool

Por ser um antagonista do metabolismo do folato, o álcool surge classicamente referenciado como promotor da carcinogénese colo-rectal (95,98,139); são vários os mecanismos que apoiam essa eventual relação: a) diminuição da absorção de folato e vitamina B<sub>6</sub> com consequentes alterações no seu metabolismo resultando numa diminuição da síntese de grupos metilo (140), b) redução da actividade da metionina sintetase, diminuindo os níveis de S-adenosilmetionina (141,142), c) produção por oxidação do acetaldeído, metabolito carcinogénico (143,144) d) diminuição da síntese hepática do glutatião, via transulfuração da homocisteína, aumentando assim a susceptibilidade à actividade peroxidativa (145,146), e) inibição da actividade da enzima DNA metilase responsável pela transferência de grupos metilo para o DNA (139). A evidência obtida através de estudos coorte e caso-controlo revela que um consumo regular, de longa duração e superior a 30g de etanol/dia poderá aumentar o risco de CCR nos homens e provavelmente nas mulheres (44).

## **4.2. FACTORES GENÉTICOS**

Na etiopatogénese do CCR também se encontram implicados factores genéticos (42,147). São reconhecidas 3 formas de doença: as formas esporádicas, os síndromas hereditários e as formas familiares (147). Cerca de 70% de todos os CCRs correspondem a formas esporádicas da doença que seguem a via supressora da carcinogénese, conforme hipótese formulada por Fearon e Vogelstein na década de 80 (105). Esta via caracteriza-se pela acumulação de mutações e perdas alélicas em diversos genes supressores tumorais, entre os quais se destaca a inactivação do gene *Adenomatous Polyposis Coli (APC)* (105).

Os restantes 30% têm uma forte componente hereditária (147); dentro destes, 5% resultam de mutações com elevada penetrância em alguns genes específicos. A presença destas mutações conduz ao desenvolvimento de dois síndromas distintos: a polipose adenomatosa familiar e o carcinoma hereditário do cólon não associado a polipose (50). O primeiro caracteriza-se por um excesso de adenomas ao longo de todo o cólon; a causa deste síndrome reside numa mutação germinal no gene *APC* (148). Ao contrário da polipose adenomatosa familiar, o carcinoma do cólon hereditário não associado a polipose, também designado por síndrome de Lynch, não tem uma expressão fenotípica característica e o seu desenvolvimento resulta de mutações germinais nos genes de reparação do DNA (149,150). A acumulação destas mutações resulta de um sistema de reparação inactivado, e esta via de carcinogénese designa-se por via mutadora da carcinogénese (151). Os restantes 25% correspondem a formas familiares de CCR cujos mecanismos se encontram pouco esclarecidos, tanto do ponto de vista clínico como do ponto de vista molecular (152,153). Neste contexto, o risco de desenvolver CCR em indivíduos sem história familiar de CCR e

com idade superior a 50 anos é de 5-6%. Este número aumenta para 20% quando existe história de CCR num parente em 1º ou 2º grau e atinge 80-100% nos indivíduos detentores de um dos síndromas antes referidos (154).

#### 4.3. NUTRIGENÉTICA NO CCR

É hoje reconhecido que a dieta pode influenciar a expressão génica e que também o património genético de cada indivíduo pode ser responsável por respostas diferentes a estímulos nutricionais idênticos (23,155,156). No caso do CCR estão descritos polimorfismos em genes de susceptibilidade como o gene *APC*, ou em genes essenciais para a metilação do DNA como o da *Metileno-tetra-hidrofolato Reductase (MTHFR)* que, em interacção com alguns nutrientes, parecem influenciar o risco de CCR (157).

#### Exemplo do ciclo do folato

No que respeita às aplicações da nutrigenética no CCR, aquela que mais consenso obtém está relacionada com o folato e polimorfismos no gene *MTHFR*, ambos fundamentais no ciclo de metilação e síntese de DNA (Figura 1). Este gene codifica uma enzima fundamental no metabolismo do ácido fólico e metionina (100,158); trata-se de uma enzima termolábil cuja actuação tem como substrato o 5,10-MTHF, e como produto o 5-MTHF, a forma activa de folato no plasma. Este último composto é um dador fundamental de grupos metilo que, em presença de vitamina B<sub>12</sub> como co-factor, permite a metilação da homocisteína em metionina. A metionina é precursora da S-adenosilmetionina, fornecedora universal dos grupos metilo para a maioria das reacções de transmetilação, incluindo a metilação do DNA (100,158). Também o substrato desta enzima, 5,10-MTHF, desempenha um importante papel na síntese de DNA, uma vez que é um co-factor para a síntese *de novo* dos nucleótidos, permitindo uma conversão equilibrada da desoxiuridilato em timidilato, pela acção da timidilato sintetase (100,158).

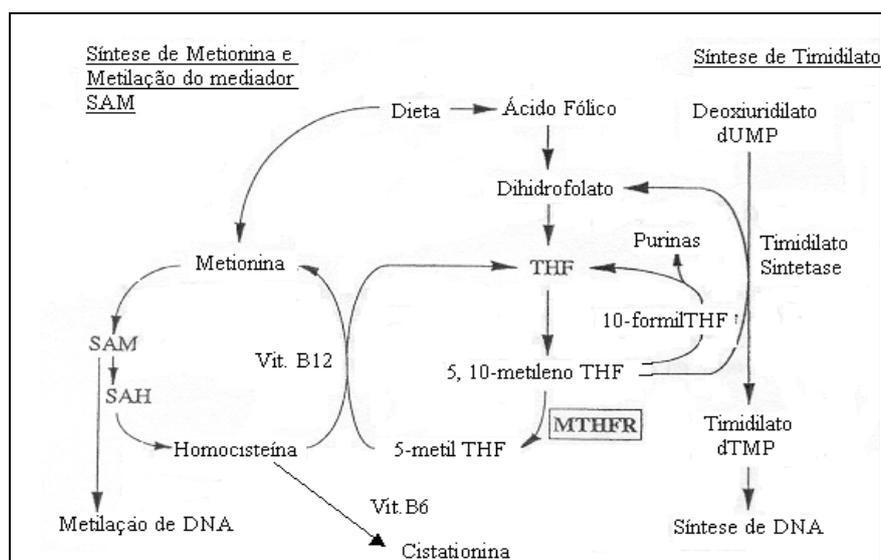


Figura 1. Ciclo do ácido fólico e metionina. Adaptado de (158).

Estudos recentes revelam que o polimorfismo C677T *MTHFR* pode modular o risco de CCR dependendo dos níveis de folato (159-161). Descrito em 1995, este é o polimorfismo mais frequentemente estudado e o que parece ter maior influência na actividade da enzima. O polimorfismo consiste numa substituição da base citosina por uma timidina no codão 677, que se traduz por uma substituição do aminoácido valina por alanina (GCC→GTC) (162). Este polimorfismo determina que a actividade desta enzima esteja reduzida a 30% em indivíduos homocigóticos para o polimorfismo (TT) quando comparados com indivíduos sem o alelo mutado (CC). A redução da actividade desta enzima tem efeitos nos níveis de folato sérico, com consequente aumento da homocisteína sérica bem como um aumento dos níveis de 5,10-MTHF (162). É sabido que os indivíduos com o genótipo homocigótico para a variante (TT) apresentam uma redução de 40-50% no risco de CCR por comparação com os wild type (CC) (163). No entanto a protecção conferida por esse genótipo homocigótico só foi observada maioritariamente em indivíduos com níveis de folato adequados; naqueles com reduzida ingestão de folato ou elevado consumo de álcool, foi abolido o efeito protector conferido pelo genótipo *MTHFR* 677TT (164,165).

#### **Exemplo do gene *Adenomatous Polyposis Coli***

Outro exemplo de nutrigenética no CCR está relacionado com um polimorfismo localizado no gene supressor tumoral *APC*, cuja inactivação é determinante para a iniciação do processo de carcinogénese colo-rectal (105). Este polimorfismo consiste numa substituição da base adenina por uma timidina no codão 1822 e caracteriza-se pela substituição do aminoácido aspartato pelo aminoácido valina (GAC→GTC) (166).

Até à data a influência dos hábitos alimentares e da variante deste gene no desenvolvimento do CCR foi avaliada em apenas dois estudos (167,168). O primeiro, um estudo caso-controlo realizado numa população americana, revelou que indivíduos homocigóticos para o polimorfismo (TT) na presença de uma dieta pobre em gordura, apresentavam menor risco de cancro do cólon quando comparado com os heterocigóticos ou indivíduos sem a variante (OR:0,2 IC95%=0,1-0,5). Concluiu-se assim que o genótipo homocigótico para o alelo mutado parece ter um efeito protector, mas apenas quando a dieta é pobre em gordura (167). No segundo estudo, também caso controlo, mas realizado numa população europeia, não foram observadas diferenças significativas no risco de CCR consoante o genótipo do polimorfismo D1822V *APC*. Observaram também que não existia qualquer interacção entre o genótipo e ingestão dietética (teor de gordura) e CCR (168).

## **5. DOENÇA DE CROHN**

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória do trato gastrointestinal que actualmente afecta milhões de indivíduos em todo o mundo (169). Foi inicialmente considerada uma doença de países desenvolvidos, como os do norte da Europa ou da América do Norte, mas recentemente tem-se verificado um aumento da taxa de incidência e prevalência de forma mais generalizada (170-172). Este aumento de incidência e prevalência tem vindo a crescer paralelamente ao desenvolvimento sócio-económico das populações e adaptação a um estilo de vida "industrializado" (173-175).

Nos EUA está descrita uma prevalência de DC de 4 a 50 casos por cada 10.000 habitantes, afectando na mesma proporção homens e mulheres (174,176). Na Europa, a tendência é semelhante no que respeita ao género, e actualmente a prevalência é de 10 a 40 casos por cada 10.000 habitantes (177). Em Portugal, são escassos os dados publicados; um estudo prospectivo multicêntrico realizado em 2005 registou 2491 doentes com DC em Portugal (178), inferindo-se uma prevalência estimada de 6 casos por cada 10.000 habitantes (179).

Embora ainda hoje se desconheça com clareza a sequência de eventos que desencadeiam a DC, é aceite que contribuam para este processo interações entre factores genéticos, ambientais e imunológicos (174). A DC é descrita por muitos como o resultado de uma alteração do sistema imunológico ao nível da mucosa intestinal, desencadeada por um determinado factor que, em indivíduos geneticamente predispostos, promove uma longa e inapropriada resposta inflamatória (174). Estes factores podem ter origem endógena, como os presentes na microflora entérica, mas também exógena, onde se incluem factores ambientais, nomeadamente os hábitos tabágicos, a actividade física ou a dieta (180).

## **5.1. FACTORES AMBIENTAIS**

### **Hábitos tabágicos**

A importância dos hábitos tabágicos no risco de desenvolver DC foi descrita pela primeira vez por Sommerville e colaboradores num estudo caso controlo, no qual se verificou um risco aumentado de desenvolver DC nos fumadores quando comparados com não fumadores (182). Vários estudos caso-controlo (183-187) e duas metanálises (188,189) publicadas com 17 anos de intervalo, mostraram resultados semelhantes aos obtidos por Sommerville e colaboradores. Os mecanismos associados ao consumo de tabaco e DC são ainda pouco conhecidos mas parecem estar associados a: a) os macrófagos dos fumadores apresentarem deficiência na capacidade para destruir bactérias intracelulares (190), b) a nicotina/tabaco poder alterar a motilidade do musculo liso intestinal bem como diminuir a permeabilidade celular (191), c) aumento dos radicais livres e capacidade antioxidante diminuída (192,193), d) aumento da produção de monóxido de carbono que pode alterar a capacidade de vasodilatação, resultando em isquémia, ulceração e fibrose (194).

Para além de ser reconhecida a sua importância como factor promotor de DC, o tabaco apresenta também consequências no comportamento da própria doença (193). Binreebach e colaboradores num artigo de revisão sobre o efeito do tabaco na DC descrevem uma associação entre o consumo de tabaco, gravidade da doença, aumento da necessidade de corticoterapia e terapia imunossupressora, menor taxa de resposta à terapêutica biológica (ex. anticorpo monoclonal TNF $\alpha$ ), maior incidência de fístulas e abscessos, e maior factor de risco de osteoporose em mulheres (192).

Por ser um factor deletério, nomeadamente para a DC, aconselha-se a cessação tabágica nos doentes com DC (193).

### **Actividade Física**

Alguns estudos avaliaram a influência da prática de exercício físico no risco de desenvolver DC. Em 1990, o primeiro revelou uma menor taxa de DC nos indivíduos com maior prática de actividade física por comparação com os que realizavam menor actividade nas tarefas diárias (195). Mais tarde um estudo caso-controlo realizado na Suécia veio comprovar essa mesma ideia: uma redução de 40-60% no risco de DC com a prática de actividade física diária/semanal (196). Apesar da associação revelada entre a prática de actividade física e um menor risco de DC, o reduzido número de estudos e a sua fraca qualidade, não permitem concluir acerca do papel protector da actividade física para a DC (197).

No entanto, por ser uma doença com manifestações extra intestinais como a osteoporose, nas quais é recomendada a prática de exercício físico com intensidade ligeira a moderada, será útil o aconselhamento personalizado da prática de exercício em indivíduos com DC (197).

### **Padrão Alimentar**

As variações geográficas na incidência da DC e o seu aumento nas últimas décadas, sugerem que entre os factores ambientais também a dieta possa ter influencia na patogénese da DC (198). Com base no aumento da incidência de DC e na prática de novos padrões alimentares em determinadas populações, nos últimos anos muitos estudos têm tentado esclarecer o papel do padrão alimentar (199,200). Um maior consumo de açúcares, maior consumo de gordura saturada, polinsaturada e trans surgem várias vezes referenciados como promotores de DC (175,181,199-202).

#### Açúcares

Em 1976 dois estudos caso-controlo revelaram um maior risco de DC em indivíduos que referiam elevado consumo de açúcar (203,204); na década de 80 e 90, vários artigos revelaram essa mesma tendência (205-207). A explicação para esta associação baseia-se no facto de o consumo elevado de açúcar poder levar a alterações na flora bacteriana com consequências deletérias na mucosa intestinal, ou pela reacção a alguns aditivos de alimentos açucarados ao nível da mucosa (203). Mais recentemente foram publicados outros estudos caso-controlo com resultados divergentes dos iniciais (201,202).

As limitações metodológicas relacionadas com a recolha retrospectiva de informação relativa ao consumo de açúcar, justificam diferenças nos resultados dos estudos mais antigos e os actuais. Os resultados publicados são pois inconsistentes para concluir acerca da relação entre a DC e o consumo de açúcares (208,209).

#### Gordura

Nos últimos anos tem sido dado especial destaque ao tipo de gordura da dieta e à sua relação com patologias com componente inflamatória (210,211). Os ácidos gordos polinsaturados (AGPI) têm sido alvo de investigação na DC por serem factores nutricionais com grande influência no estado inflamatório (212). A incapacidade do organismo humano

para sintetizar os AGPI n-6 e n-3 determina que sejam ácidos gordos essenciais. Estas duas classes, n-6 e n-3, distinguem-se entre si pela localização da primeira ligação dupla, que ocorre no terceiro carbono (n-3) ou no sexto carbono (n-6) a contar do grupo metilo da molécula do ácido gordo (213).

Os AGPI n-6 são o tipo de gordura mais abundante na dieta, em especial no padrão alimentar dos países industrializados (210). O AGPI n-6, ácido linoleico, encontra-se na maioria das sementes e óleos vegetais e é o precursor metabólico do ácido araquidónico (AA). Este último é metabolizado por enzimas e vai agir como substrato para a síntese de eicosanóides com características pro-inflamatórias, incluindo as series 2 e 4 de prostaglandinas e leucotrienos. Estas classes de eicosanóides apresentam um vasto número de efeitos pro-inflamatórios, incluindo indução de febre, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, produção de espécies reactivas de oxigénio e produção de citocinas pro-inflamatórias como a IL6, IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$  (214,215). O AGPI n-3,  $\alpha$ -linolénico, encontra-se essencialmente nas sementes de linhaça, de canola e também nas nozes. É o precursor metabólico para a síntese do ácido eicosapentaenóico (EPA) e do docosahexaenóico (DHA), que para além de poderem ser obtidos através da conversão do  $\alpha$ -linolénico podem também ser adquiridos através do consumo de peixes gordos, como o salmão ou a sardinha (213). Dado que a conversão do  $\alpha$ -linolénico em EPA e DHA se dá através das mesmas enzimas que convertem o ácido linoleico em AA, um aumento da ingestão de ácido linoleico vai contribuir para um ambiente mais pro-inflamatório por inibir a síntese e a incorporação do EPA e DHA nos fosfolípidos das membranas celulares (216). Os eicosanóides derivados do EPA e DHA são as prostaglandinas e leucotrienos das séries 3 e 5, que atenuam a resposta inflamatória por diminuírem a expressão de vários genes envolvidos na inflamação, incluindo os de codificação de certas moléculas de adesão endotelial, TNF $\alpha$ , IL1 e IL6 (217), Figura 2.

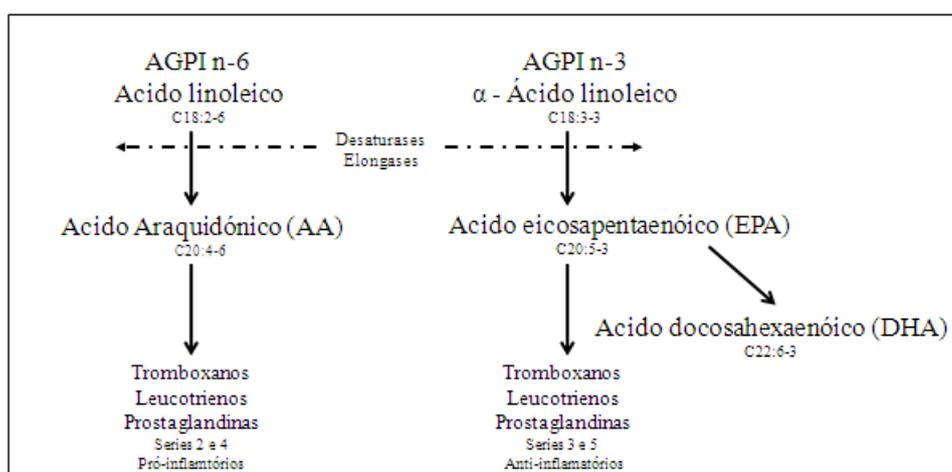


Figura 2. Vias metabólicas dos AGPI n-6 e n-3. Adaptado de (212).

Os ácidos gordos polinsaturados trans, resultantes dos processos de hidrogenação apresentam pelo menos uma ligação dupla com configuração trans (218). Têm efeitos deletérios sobejamente estudados (211), no entanto o seu efeito na doença inflamatória intestinal está ainda muito pouco estudado, existindo apenas a sugestão de que possam

interferir na dessaturação e alongação dos AGPI n-6 e n-3, alterando assim a biodisponibilidade de AA, EPA e DHA para as reacções metabólicas necessárias ao organismo (213). Sugere-se por isso que este tipo de ácidos gordos seja consumido na quantidade de máxima de 1% do valor energético total da dieta (219).

Dados epidemiológicos revelam a associação entre o consumo de gordura e DC (220,221). Um exemplo é proveniente da Gronelândia, onde se constatou que os esquimós, grandes consumidores de AGPI n-3 apresentavam uma baixa prevalência de Doença Inflamatória do Intestino (DII) (220); o Japão também revelava a mesma tendência. Este país historicamente apresentava um padrão alimentar rico em pescado (fonte de AGPI n-3 e pobre em AGPI n-6) e simultaneamente uma das taxas de incidência de DC mais baixas do mundo. Actualmente, com o crescimento económico passou a adoptar um padrão alimentar cada vez mais ocidentalizado, com maior consumo de n-6 e menor consumo de n-3, verificando-se simultaneamente um aumento da incidência de DC (221). Há inclusive alguns estudos epidemiológicos a atribuir um aumento significativo no risco de DC associado a uma dieta com elevado ratio n-6:n-3 (201,212). É reconhecida a importância dos n-3 e n-6 na dieta, sendo recomendada a ingestão de uma dieta com um ratio n-6:n-3 entre valores de 4:1 e 1:1 em detrimento do que se observa actualmente nas dietas ocidentais, 20:1 e 16:1 (213).

Em resumo, embora todos estes nutrientes apresentem um potencial efeito no risco de DC, o resultado global dos estudos é ainda questionável, não existindo evidência suficiente que comprove o papel da dieta no risco de DC (169,222).

## 5.2. FACTORES GENÉTICOS

De todos os genes conhecidos, o *NOD2* (*nucleotide-binding oligomerization domain-2*) também designado por *CARD15* (*caspase recruitment domain-15*), situado no cromossoma 16, é aquele que tem sido associado de forma mais consistente a um aumento da susceptibilidade para a DC (223-226). Este gene funciona como um receptor intracelular de bactérias invasivas, sendo um importante iniciador da resposta imunitária. Estudos demonstram que três polimorfismos deste gene (R702W, G908R, 1007Fs) estão associados ao aumento de susceptibilidade para DC (227). Numa recente metanálise europeia onde se avaliou o efeito dos 3 polimorfismos no risco de desenvolver DC, foi verificado que a presença de um alelo mutado conferia um risco 2,4 superior de desenvolver DC (IC 95%: 2,76-3,59) e a presença de 2 alelos aumentava o risco para 17,1 (IC 95%: 10,7-27,2) (228). Os mecanismos associados a estes polimorfismos não estão completamente esclarecidos mas os seus efeitos parecem resultar numa deficiência ao combate da invasão microbiana (227,228).

## 5.3. NUTRIÇÃO, GENES E DOENÇA DE CROHN

Tanto os factores ambientais como os genéticos são importantes na determinação não só da susceptibilidade à doença, mas também no fenótipo da própria doença de Crohn (174,229). A relação entre nutrição e DC é complexa pois para além de veículo de nutrientes que podem influenciar o risco de doença, a nutrição também apresenta um importante papel

no suporte nutricional de indivíduos desnutridos e poderá mesmo actuar como terapia primária na doença activa e na manutenção da remissão (180,230).

### **5.3.1. Nutrição e Doença de Crohn**

#### Estado nutricional

Dependendo da actividade da doença, da sintomatologia associada (dor abdominal, náuseas, vômitos, anorexia) e da natureza dos parâmetros nutricionais analisados, a desnutrição calórico proteica é referenciada em 20-85% dos pacientes com DC (231,232). São vários os mecanismos que podem promover a desnutrição no doente com DC; os de maior impacto são provavelmente a redução da ingestão, a presença de inflamação e a perda entérica de nutrientes (230,233). A redução da ingestão surge na consequência de múltiplos factores: como o receio da alimentação provocar agravamento da sintomatologia (dor abdominal ou diarreia) ou o inadequado aconselhamento alimentar feito por profissionais de saúde, que determinam desnecessárias restrições alimentares (180). São ainda factores agravantes a anorexia secundária ao aumento de citocinas pro-inflamatórias (TNF $\alpha$ , IL6) e de adipocinas (leptina, adiponectina, resistina) (234,235), e a toma de múltiplos fármacos que podem conduzir ao aparecimento de náuseas, vômitos, disgeusia e dispepsia (180). A inflamação da parede intestinal e a eventual presença de fístulas e/ou oclusões intestinais contribuem igualmente para a diminuição da ingestão e absorção de nutrientes (180). Como consequência destes factores, a perda de peso surge em aproximadamente 65-75% dos doentes, especialmente se com doença activa (169). Aqueles que se encontram hospitalizados apresentam uma maior percentagem de perda de peso (70-80%) quando comparados com doentes em ambulatório (20-40%) (230). Nos que apresentam períodos mais prolongados de doença activa verifica-se maior perda de massa muscular, diminuição da imunidade celular, aumento do risco de infecções e maior dificuldade de cicatrização (236).

Apesar de todo este cenário sugestivo de desnutrição, há actualmente estudos a revelar que a prevalência de desnutrição tem vindo a diminuir, especialmente nos doentes em remissão, chegando a observar-se casos que apresentam peso acima do adequado, embora com alterações significativas na composição corporal (230). Um estudo prospectivo multicêntrico de Valentini e colaboradores avaliou o estado nutricional, composição corporal, e força muscular de indivíduos com DC em remissão clínica. Este estudo revelou que apesar de uma elevada percentagem (74%) de indivíduos estarem aparentemente bem nutridos, apresentavam uma diminuição da massa muscular (237). Tem-se vindo a verificar que mesmo quando os doentes parecem ter um adequado estado nutricional, podem concomitantemente apresentar uma desnutrição específica em vitaminas e minerais (238). Estudos recentes revelam que apesar de os doentes referirem uma ingestão adequada em energia e macronutrientes, observam-se concentrações plasmáticas baixas de várias vitaminas e minerais (239,240).

Estes resultados revelam assim que a forma de malnutrição nestes doentes, em especial quando em remissão, tem vindo a sofrer uma evolução desde a desnutrição calórico proteica

para um estado normoponderal ou de excesso de peso, acompanhado de ingestão dietética desequilibrada de micronutrientes (230).

### Nutrição na terapêutica

Nos doentes com DC o papel da terapia nutricional, incluindo a nutrição artificial, assume-se como fundamental ao suprir as necessidades em macro e micronutrientes evitando as consequências das suas carências (176,181). A utilização da nutrição entérica é inclusive recomendada, nas guidelines de 2006 da Sociedade Europeia de Nutrição Clínica e Metabolismo, para indivíduos com DC desnutridos com o objectivo de atingir as necessidades nutricionais (241). Contudo apesar de permitir alcançar as necessidades nutricionais, a utilização deste tipo de nutrição como forma primária de tratamento em fases agudas da doença não é recomendada pelas guidelines do American College of Gastroenterology (176), pois é menos eficaz para a indução da remissão da DC quando comparada com terapêutica farmacocirúrgica (242).

Vários são os autores a estudar e questionar a importância de certos nutrientes, nomeadamente os ácidos gordos polinsaturados na modulação inflamatória desta doença. Na década de 90, Beluzzi e colaboradores avaliaram o efeito dos AGPI n-3 na manutenção da remissão da DC e demonstraram o efeito positivo da toma de suplementos (EPA + DHA) na manutenção da remissão da doença (OR:0,41; IC 95%: 0,24-0,70) (243). Seguiu-se a publicação de outros estudos com objectivos semelhantes que apresentaram a mesma tendência protectora, mas nalguns casos sem forte significado estatístico (244-247). Numa recente metanálise, Turner e colaboradores (248) concluem que tendo em conta os resultados e as características, e diferenças das populações estudadas (ex: população adulta e pediátrica, tipos de ácidos gordos, formas de administração, etc...), não existe suficiente evidência para recomendar suplementos de AGPI n-3 para manutenção da remissão (248).

O efeito dos AGPI na indução da remissão da doença são ainda mais questionáveis. Apesar de serem conhecidos os efeitos anti e pro-inflamatórios dos n-3 e n-6, têm sido obtidos resultados contraditórios (249). Em 2005, Nielsen e colaboradores revelaram num estudo com suplementação de AGPI em humanos que a suplementação com n-3 poderá ser benéfica no alcance da remissão da doença, ao contrário do que acontece com a suplementação com os n-6 (250). Em 2002, Gassul e colaboradores haviam comparado o efeito de um AGPI n-6 e de um ácido gordo monoinsaturado n-9 na indução da remissão da DC. Ao contrário do esperado, os indivíduos com doença activa quando alimentados com nutrição entérica rica em n-6 apresentaram taxas de remissão significativamente superiores à de uma formulação rica em n-9 (251). Mais recentemente, Remarkers e colaboradores compararam em modelos animais a suplementação de ácido oleico (n-9), AA (n-6) e EPA +DHA (n-3) no grau de inflamação dos colonócitos, e também não verificaram níveis mais elevados de inflamação após a suplementação com AA quando comparado com o ácido oleico ou o EPA+DHA (252).

São várias as metanálises/revisões a revelar que apesar da ausência de efeitos secundários na toma destes nutrientes, não há ainda evidência científica suficiente para a suplementação de n-3 na indução ou manutenção da remissão na DC (248,249,253).

### 5.3.2. Polimorfismos genéticos e influência no fenótipo da Doença de Crohn

Alterações genéticas que ocorrem no gene *CARD15* são importantes para o risco de DC; contudo existem estudos que revelam outras associações entre alguns polimorfismos de genes e o fenótipo da DC, diferentes dos polimorfismos responsáveis pela predisposição para a doença (254). A DC é caracterizada por um marcado processo inflamatório resultante da activação de citocinas pro-inflamatórias. Verifica-se uma super produção de citocinas como as interleucinas IL6, IL8, IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$  e simultaneamente uma diminuição de citocinas anti-inflamatórias como a IL10 (255,267); este desequilíbrio tem consequências na perpetuação da inflamação da parede intestinal aumentando a duração e intensidade da resposta inflamatória (255). Assim, vários estudos que avaliaram a importância das citocinas como marcador da actividade da DC (256,257) sugerem que o desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias parece poder contribuir para a sua patogénese.

Assumindo que de entre os diversos mediadores inflamatórios as citocinas são os mais importantes, questiona-se se as diferenças nos seus níveis poderão ser resultantes da presença de polimorfismos genéticos, e de que forma estes poderão ter influência na resposta inflamatória e com isso influenciar a fisiopatologia da DC (127,258). Alguns estudos preliminares sugerem a associação entre DC e alterações genéticas no gene codificador do TNF $\alpha$  (259,260). Este gene localiza-se no cromossoma 6, e parece ser um gene candidato à relação genótipo-fenótipo na DC (261,262). O TNF $\alpha$  é uma importante citocina pró-inflamatória que estimula a resposta de fase aguda (263,264); alguns polimorfismos como o C857T e o G308A localizados no gene codificador do TNF $\alpha$  parecem afectar a sua expressão. Os estudos publicados na DC revelam que apesar de o mecanismo não estar ainda completamente clarificado, estes polimorfismos poderão protagonizar um papel importante na relação genótipo-fenótipo (254,265,266). Outra das citocinas mais frequentemente estudada na DC é a IL6, cuja expressão se apresenta elevada nestes doentes, estando os seus níveis circulantes directamente relacionados com a actividade da doença (267,268). O polimorfismo mais frequentemente estudado é o G174C *IL6* descrito por Fishman e colaboradores, cuja variante leva a uma diminuição da produção da IL6 (269).

### 5.3.3. Nutrigenética no desenvolvimento da Doença de Crohn

Apesar dos vários estudos que avaliam a dieta como factor de risco para a DC, são escassos os que pesquisam a potencial interacção entre dieta e genes no comportamento da DC (229,254).

O estudo de Grimbale e colaboradores em 2002 foi pioneiro ao avaliar interacções entre gordura e polimorfismos genéticos de citocinas; os autores exploraram em indivíduos saudáveis a hipótese de a presença de polimorfismos nos genes TNF $\alpha$  e TNF $\beta$  (ou LT $\alpha$ ), influenciarem a eficácia de óleos de peixe, ricos em EPA e DHA, na supressão da produção da citocina TNF $\alpha$  (270). Os resultados obtidos confirmaram a hipótese levantada, ao revelarem que o efeito dos AGPI n-3 na produção de TNF $\alpha$  era influenciado pelas variações genéticas (polimorfismos) dos genes TNF $\alpha$  e  $\beta$ , assistindo-se assim a um exemplo de nutrigenética no contexto associado à inflamação. Os autores sugerem a hipótese de existir

uma marcada heterogeneidade genética das populações, responsável por grande variação na resposta ao óleo de peixe.

Este estudo serve de base ao trabalho por nós realizado, ao explorar exemplos de nutrigenética agora numa doença, como a DC.

Concluindo, alguns autores sugerem que a DC seja um bom exemplo, no qual a incidência e a gravidade da doença possam ser moduladas por recomendações nutricionais de acordo com o genótipo. Com o conhecimento profundo da patogénese e das implicações das variações genéticas, o estudo da nutrigenética e nutrigenómica poderá permitir a aplicação de uma dieta “anti-inflamatória” eficaz na terapêutica nutricional desta doença (271).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Camilo E. Description of the unit center of nutrition and metabolism: texto inédito.1997. Localizado em Centro de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa.
2. Jew S, AbuMweis SS, Jones PJ. Evolution of the human diet: linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic disease prevention. *J Med Food* 2009;12(5):925-34.
3. World Health Organization Food and Agriculture Administration. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Genova: World Health Organization; 2003. Report No.: 916.
4. Ferro-Luzzi A, Martino L. Obesity and physical activity. *Ciba Found Symp* 1996;201:207-21.
5. Drewnowski A, Popkin B. The nutrition transition: new trends in the global diet. *Nut Rev* 1997;55(2):31-43.
6. Popkin BM. Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *Am J Clin Nutr* 2006;84(2):289-98.
7. World Health Organization. Healthy nutrition. Copenhagen: World Health Organization; 1988.
8. Subirade M. Report on Functional Foods, Food Quality and Standards Service. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations; 2007.
9. World Health Organization. Dietary recommendations/Nutritional requirements. (2004, 2007, 2009).
10. Department of Health and Human Services Department of Agriculture (USDA). Dietary Guidelines for Americans. 2010.
11. Fletcher B, Berra K, Ades P, Braun LT, Burke LE, Durstine JL, et al. Managing abnormal blood lipids: a collaborative approach. *Circulation* 2005;112(20):3184-209.
12. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860-921.
13. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291(5507):1304-51.
14. Tamarin RH. Genetics and the scientific method. In: University of Massachusetts Lowell, editor. *Principles of Genetics*. 7 ed. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 2-14.
15. Kelada SN, Eaton DL, Wang SS, Rothman NR, Khoury MJ. The role of genetic polymorphisms in environmental health. *Environ Health Perspect* 2003;111(8):1055-64.
16. Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000;405(6788):847-56.
17. Subramanian G, Adams MD, Venter JC, Broder S. Implications of the human genome for understanding human biology and medicine. *JAMA* 2001;286(18):2296-307.
18. National Coalition for Health Professional Education in Genetics. Principles of genetics in the context of common disease [Internet]. 2006 [acedido em 12 de Novembro de 2010]. Disponível em: <http://www.nchpeg.org/>.
19. Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science* 2002;296(5568):695-98.
20. Kaput J, Ordovas JM, Ferguson L, van Ommen B, Rodriguez RL, Allen L, et al. The case for strategic international alliances to harness nutritional genomics for public and personal health. *Br J Nutr* 2005;94(5):623-32.
21. Debusk R. Assessment: Nutritional Genomics. In: Alexopoulos Y, editor. *Krauses Food and Nutrition Therapy*. 12ª ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2008. p. 364-82.

22. Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J* 2005;19(12):1602-16.
23. Ordovas J, Corella D. Nutritional Genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004;5:71-118.
24. Stover P. Influence of human genetic variation on nutritional requirements. *Am J Clin Nut* 2006;83(2):436S-42S.
25. Costa V, Casamassimi A, Ciccodicola A. Nutritional genomics era: opportunities toward a genome-tailored nutritional regimen. *J Nutr Biochem* 2010;21(6):457-67.
26. Kaput J, Rodriguez RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics* 2004;16(2):166-77.
27. Garcia-Canas V, Simo C, Leon C, Cifuentes A. Advances in nutrigenomics research: novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. *J Pharm Biomed Anal* 2010;51(2):290-304.
28. Simopoulos AP. Nutrigenetics/Nutrigenomics. *Annu Rev Public Health* 2010;31:53-68.
29. Gillies PJ. Nutrigenomics: the Rubicon of molecular nutrition. *J Am Diet Assoc* 2003;103(12 Suppl 2):S50-5.
30. Arab L. Individualized nutritional recommendations: do we have the measurements needed to assess risk and make dietary recommendations? *Proc Nutr Soc* 2004;63(1):167-72.
31. Stover PJ, Caudill MA. Genetic and epigenetic contributions to human nutrition and health: managing genome-diet interactions. *J Am Diet Assoc* 2008;108(9):1480-87.
32. Arkadianos I, Valdes AM, Marinou E, Florou A, Gill RD, Grimaldi KA. Improved weight management using genetic information to personalize a calorie controlled diet. *Nutr J* 2007;6:29.
33. Ferguson LR, Shelling AN, Lauren D, Heyes JA, McNabb WC. Nutrigenomics and gut health. *Mutat Res* 2007;622(1-2):1-6.
34. Afman L, Muller M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc* 2006;106(4):569-76.
35. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Hao Y, Siegel RM, Yhun MJ. *Global Cancer Facts and Figures*. Atlanta: American Cancer Society; 2007.
36. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 2009;59(6):366-78.
37. International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN: Cancer incidence and Mortality worldwide in 2008 [Internet]. 2008 [acedido a 7 de Janeiro de 2010]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/colorectal.asp>
38. International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN: Cancer incidence and Mortality worldwide in 2008 [Internet]. 2008 [acedido a 7 de Janeiro de 2010]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp>
39. Alto Comissário de Saúde. *Indicadores e Metas do Plano Nacional de Saúde*. 2009.
40. Leitão CN. Prevenção do cancro do cólon e recto. *Jornal Português de Gastroenterologia* 2002;9:105-14.
41. Mendes V. Prevenir o cancro do colon e recto. *Jornal Português de Gastroenterologia* 2008;15(4):153-155.
42. Willet W. The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature* 1989;338(6214):389-93.
43. Campos FG, Waitzberg AGL, Kiss DR, Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J. Diet and colorectal cancer: current evidence for aetiology and prevention. *Nut Hosp* 2005;20(1):18-25.

44. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Cancers. In: AICR, editor. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A global perspective. Washington; 2007. p. 281-288.
45. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer* 2009;125(1):171-80.
46. Moghaddam AA, Woodward M, Huxley R. Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(12):2533-47.
47. Marques-Vidal P, Ravasco P, Camilo ME. É a obesidade um factor de risco para a o cancro colo-rectal? uma meta-análise. *Jornal Português de Gastrenterologia* 2005;12:251-56.
48. Gunter MJ, Leitzmann MF. Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. *J Nutr Biochem* 2006;17(3):145-56.
49. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 2001;60(3):329-39.
50. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(5):911-9.
51. Carmo I, Santos O, Camolas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, et al. Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obes Rev* 2008;9(1):11-9.
52. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr* 2001;131(11 Suppl):3109S-20S.
53. Hoda MR, Keely SJ, Bertelsen LS, Junger WG, Dharmasena D, Barrett KE. Leptin acts as a mitogenic and antiapoptotic factor for colonic cancer cells. *Br J Surg* 2007;94:346-54.
54. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2(4):301-10.
55. Johnson IT, Lund EK. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26(2):161-81.
56. Thune I, Lund E. Physical activity and risk of colorectal cancer in men and women. *Br J Cancer* 1996;73(9):1134-40.
57. Nielsen TI, Vatten L. Prospective study of colorectal cancer risk and physical activity, diabetes, blood glucose and BMI: Exploring the hyperinsulinemia hypothesis. *Br J Cancer* 2001;84:417-22.
58. Lund Nilsen TI, Vatten LJ. Colorectal cancer associated with BMI, physical activity, diabetes, and blood glucose. *IARC Sci Publ* 2002;156:257-8.
59. Friedenreich C, Norat T, Steindorf K, Boutron-Ruault MC, Pischon T, Mazuir M, et al. Physical activity and risk of colon and rectal cancers: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(12):2398-407.
60. Friedenreich CM, Orenstein MR. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr* 2002;132(11 Suppl):3456S-3464S.
61. Samad AK, Taylor RS, Marshall T, Chapman MA. A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2005;7(3):204-13.
62. Bartram HP, Wynder EL. Physical activity and colon cancer risk? Physiological considerations. *Am J Gastroenterol* 1989;84(2):109-12.
63. Bingham SA. Diet and colorectal cancer prevention. *Biochem Soc Trans* 2000;28(2):12-6.
64. Howe GR, Benito E, Castelleto R, Cornee J, Esteve J, Gallagher RP, et al. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(24):1887-96.

65. Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, Potvin C, Gravel D, Bernard D, et al. Nutritional factors and colon carcinoma. A case-control study involving French Canadians in Montreal, Quebec, Canada. *Cancer* 1997;80(5):858-64.
66. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, et al. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(7):525-33.
67. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 1994;54(9):2390-7.
68. Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, Potter JD. Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 1994;139(1):1-15.
69. Mai V, Flood A, Peters U, Lacey JV, Schairer C, Scatzkin A. Dietary fibre and risk of colorectal cancer in the Breast Cancer Detection Demonstration Project (BCDDP) follow-up cohort. *Int J Epidemiol* 2003;32(2):239-43.
70. Lin J, Zhang SM, Cook NR, Rexrode KM, Liu S, Manson JE, et al. Dietary intakes of fruit, vegetables, and fiber, and risk of colorectal cancer in a prospective cohort of women (United States). *Cancer Causes Control* 2005;16(3):225-33.
71. Michels KB, Fuchs CS, Giovannucci E, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, et al. Fiber intake and incidence of colorectal cancer among 76,947 women and 47,279 men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(4):842-9.
72. Bingham S. Mechanisms and experimental evidence relating dietary fibre and starch to protection against large bowel cancer. *Proc Nutr Soc* 1990;49(2):153-71.
73. Hassig CA, Tong JK, Schreiber SL. Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer. *Chem Biol* 1997;4(11):783-89.
74. American Gastroenterological Association. AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. 2000;118(6):1235-57.
75. Ishihara J, Inoue M, Iwasaki IM, Sasazuki M, Tsugane S. Dietary calcium, vitamin D, and the risk of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* 2008;88(6):1576-83.
76. Holt P. New insights into calcium, dairy and colon cancer. *World J Gastroenterol* 2008;14(28):4429-33.
77. Govers MJ, Van der Meet R. Effects of dietary calcium and phosphate, fatty acids, and bile acids. *Gut* 1993;34(3):365-70.
78. Govers MJ, Termont DS, Lapre JA, Kleibeuker JH, Vonk RJ, Van der Meer R. Calcium in milk products precipitates intestinal fatty acids and secondary bile acids and thus inhibits colonic cytotoxicity in humans. *Cancer Res* 1996;56(14):3270-75.
79. Lipkin M, Uehara K, Winawer S, Sanchez A, Bauer C, Phillips R, et al. Seventh-Day Adventist vegetarians have a quiescent proliferative activity in colonic mucosa. *Cancer Lett* 1985;26(2):139-44.
80. Kampman E, Giovannucci E, Veer P, Rimm E, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Calcium, Vitamin D, dairy foods, and the occurrence of colorectal adenomas among men and women in two prospective studies. *Am J Epidemiol* 1994;139(1):16-29.
81. Tseng M, Murray SC, Kupper LL, Sandler RS. Micronutrients and the risk of colorectal adenomas. *Am J Epidemiol* 1996;144(11):1005-14.
82. Terry P, Baron JA, Bergkvist L, Holmberg L, Wolk A. Dietary calcium intake and vitamin D intake and risk of colorectal cancer: a prospective cohort study in women. *Nutr Cancer* 2002;43(1):39-46.

83. McCullough ML RA, Rodriguez C, Jacobs EJ, Chao A, Carolyn J, Calle EE, Willett WC, Thun MJ. Calcium, vitamin D, dairy products, and risk of colorectal cancer in The Prevention Study II Nutrition Cohort (United States). *Cancer Causes Control* 2003;14(1):1-12.
84. Larsson SC BL, Rutegard J, Giovannucci E, Wolk A. Calcium and dairy food intakes are inversely associated with colorectal cancer risk in the Cohort of Swedish Men. *Am J Clin Nutr* 2006;83(3):667-73.
85. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med* 2004;140(8):603-13.
86. Treyzon L OG, Heber D. Nutritional Factors in Colon Cancer. In: Heber D, editor. *Nutritional Oncology*. 2nd ed. Los Angeles: Elsevier; 2006. p. 423-432.
87. Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamina D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3(8):601-16.
88. Cross HS, Pavelka M, Slavik J, Peterlik M. Growth control of human colon cancer cells by vitamin D and calcium in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(17):1355-7.
89. Zhao X, Feldman D. Regulation of vitamin D receptor abundance and responsiveness during differentiation of HT-29 human colon cancer cells. *Endocrinology* 1993;132(4):1808-14.
90. Martínez ME, Giovannucci EL, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Speizer FE, et al. Calcium, vitamin D, and the occurrence of colorectal cancer among women. *J Nat Cancer Inst* 1996;88(19):1375-82.
91. Kearney J GE, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Wing A, Kampman E, Willett WC. Calcium, vitamin D, and dairy foods and the occurrence of colon cancer in men. *Am J Epidemiol* 1996;143(9):907-17.
92. La Vecchia C, Braga C, Negri E, Franceschi S, Russo A, Conti E, et al. Intake of selected micronutrients and risk of colorectal cancer. *Int J Cancer* 1997;73(4):525-30.
93. Pritchard RS, Baron JA, Gerhardsson de Verdier M. Dietary calcium, vitamin D, and the risk of colorectal cancer in Stockholm, Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5(11):897-900.
94. Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, Lipkin M, et al. Vitamin D and prevention of colorectal cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;97(1-2):179-94.
95. Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Haughey BP, Cholewinski S, Wilkinson G. Folate intake and carcinogenesis of the colon and rectum. *Int J Epidemiol* 1991;20(2):368-74.
96. Sanjoaquin MA, Allen N, Couto E, Roddam AW, Key TJ. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Int J Cancer* 2005;113(5):825-8.
97. Flood A, Caprario L, Chatterjee N, Lacey JVJ, Schairer C, Schatzkin A. Folate, methionine, alcohol, and colorectal cancer in a prospective study of women in United States. *Cancer Causes Control* 2002;13(6):551-61.
98. Konings EJ, Goldbohm RA, Brants HA, Saris WH, van den Brandt PA. Intake of dietary folate vitamers and risk of colorectal carcinoma: results from The Netherlands Cohort Study. *Cancer* 2002;95(7):1421-33.
99. Glynn S, Albanes D, Pietinen P. Colorectal cancer and folate status: a nested case-control study among male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5(7):487-94.
100. Choi S, Mason J. Folate and carcinogenesis: An integrated scheme. *J Nutr* 2002;130(2):129-32.
101. Lucock M, Yates Z. Folic acid - vitamin and panacea or genetic time bomb? *Nat Rev Genet* 2005;6(3):235-40.

102. Blount BC, Ames BN. DNA damage in folate deficiency. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8(3):461-78.
103. Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2010.
104. Ryan BM, Weir DG. Relevance of folate metabolism in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Lab Clin Med* 2001;138(3):164-76.
105. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759-67.
106. Kim DH, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Colditz GA, Freudenheim JL, et al. Pooled analyses of 13 prospective cohort studies on folate intake and colon cancer. *Cancer Causes Control* 2010;21(11):1919-30.
107. Food and Nutrition Board. Recommended intakes for individuals. In: Institute of Medicine, editor. Washington DC: National Academy Press; 2002.
108. Beno I, Klvanova J, Magalova T, Brtkova A. Blood levels of natural antioxidants in gastric and colorectal precancerous lesions and cancers in Slovakia. *Neoplasma* 2000;47(1):37-40.
109. Fernandez-Banares F, Cabre E, Esteve M, Mingorance MD, Abad-Lacruz A, Lachica M, et al. Serum selenium and risk of large size colorectal adenomas in a geographical area with a low selenium status. *Am J Gastroenterol* 2002;97(8):2103-8.
110. Schober SE, Comstock GW, Helsing KJ, Salkeld RM, Morris JS, Rider AA, et al. Serologic precursors of cancer. I. Prediagnostic serum nutrients and colon cancer risk. *Am J Epidemiol* 1987;126(6):1033-41.
111. Wang HH, Wu CC. Clinical evaluation of serum trace elements in colorectal cancer. *Chinese J Gastroenterology* 1995;12:9-14.
112. Milde D, Novak O, Stuka V, Vysloulil K, Machacek J. Serum levels of selenium, manganese, copper, and iron in colorectal cancer patients. *Biol Trace Elem Res* 2001;79(2):107-14.
113. Samaha HS, Hamid R, el-Bayoumy K, Rao CV, Reddy BS. The role of apoptosis in the modulation of colon carcinogenesis by dietary fat and by the organoselenium compound 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6(9):699-704.
114. Combs G, Gray W. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacology Therapy* 1998;79(3):179-92.
115. Nelson RL. Dietary iron and colorectal cancer risk. *Free Radical Biology Medicine* 1992;12(2):161-8.
116. Huang X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutat Res* 2003;533(1-2):153-71.
117. Knekt P, Reunanen A, Takkunen H, Aromaa A, Heliövaara M, Hakulinen T. Body iron stores and risk of cancer. *Int J Cancer* 1994;56(3):379-82.
118. Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore RE, et al. Iron intake, body iron stores and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study. *Int J Cancer* 1999;80(5):693-8.
119. Senesse P, Meance S, Cottet V, Faivre J, Boutron-Ruault MC. High dietary iron and copper and risk of colorectal cancer: a case-control study in Burgundy, France. *Nutr Cancer* 2004;49(1):66-71.
120. Cross AJ, Pollock JRA, Bingham SA. Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal n-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res* 2003;63(10):2358-60.
121. Sesink AL, Termont bS, Kleibeuker JH, Van der Meer R. Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Res* 1999;59(22):5704-9.

122. Lakshmi VM, Clapper ML, Chang WC, Zenser TV. Hemin potentiates nitric oxide-mediated nitrosation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) to 2-nitrosoamino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Chem Res Toxicol* 2005;18(3):528-35.
123. Wynder E, Graham S, Eisenberg H. Conference on the etiology of cancer of the gastrointestinal tract. Report of the Research Committee, World Health Organization on Gastroenterology, New York, N.Y., June 10-11, 1965. *Cancer* 1966;19(11):1561-6.
124. Goldbohm R, Van den Brandt P, Van't Veer P, Brants H, Dorant E, Sturmans F, et al. A prospective cohort study on the relation between meat consumption and risk of colon cancer. *Cancer Res* 1994;54(3):718-23.
125. Willett WC, Stampfer M, Colditz GA, Rosner B, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990;13(24):1664-72.
126. Bostick RM, Potter JD, Kushi LH. Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States). *Cancer Causes Control* 1994;5(1):38-52.
127. Balding J, Livingstone WJ, Conroy J, Mynett-Johnson L, Weir DG, Mahmud N, et al. Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms. *Mediators Inflamm* 2004;13(3):181-7.
128. Sanjoaquin MA, Appleby PN, Thorogood M, Mann JI, Key TJ. Nutrition, lifestyle and colorectal cancer incidence: a prospective investigation of 10998 vegetarians and non-vegetarians in the United Kingdom. *Br J Cancer* 2004;90(1):118-21.
129. Nagengast FM, Grubben MJ, van Munster IP. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer* 1995;31A(7-8):1067-70.
130. Alexander DD, Cushing CA, Lowe KA, Scurman B, Roberts MA. Meta-analysis of animal fat or animal protein intake and colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* 2009;89(5):1402-9.
131. Bristol JB, Emmett PM, Heaton KW, Williamson RC. Sugar, fat, and the risk of colorectal cancer. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985;291(6507):1467-70.
132. Bruce W, Wolever T, Giacca A. Mechanisms linking diet and colorectal cancer: The possible role of insulin resistance. *Nutrition Cancer* 2000;37(1):19-26.
133. Terry PD, Jain M, Miller AB, Howe GR, Rohan TE. Glycemic load, carbohydrate intake, and risk of colorectal cancer in women: a prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(12):914-6.
134. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Dietary carbohydrate, glycemic index, and glycemic load in relation to risk of colorectal cancer in women. *Am J Epidemiol* 2007;165(3):256-61.
135. Mulholland HG, Murray LJ, Cardwell CR, Cantwell MM. Glycemic index, glycemic load, and risk of digestive tract neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2009;89(2):568-76.
136. Franceschi S, Dal Maso L, Augustin L, Negri E, Parpinel M, Boyle P, et al. Dietary glycemic load and colorectal cancer risk. *Ann Oncol* 2001;12(2):173-8.
137. Higginbotham S, Zhang ZF, Lee IM, Cook NR, Giovannucci E, Buring JE, et al. Dietary glycemic load and risk of colorectal cancer in the Women's Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(3):229-33.
138. Michaud DS, Fuchs CS, Liu S, Willett WC, Colditz GA, Giovannucci E. Dietary glycemic load, carbohydrate, sugar, and colorectal cancer risk in men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(1):138-47.
139. Mason JB, Choi SW. Effects of alcohol on folate metabolism: implications for carcinogenesis. *Alcohol* 2005;35(3):235-41.

140. Stickel F, Choi SW, Kim YI, Bagley PJ, Seitz HK, Russell RM, et al. Effect of chronic alcohol consumption on total plasma homocysteine level in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24(3):259-64.
141. Barak A, Beckenhauer H, Tuma D. Effects of prolonged ethanol feeding on methionine metabolism in rat liver. *Biochemistry Cellular Biology* 1987; 65: 230-233.
142. Barak AJ, Beckenhauer HC, Mailliard ME, Kharbanda KK, Tuma DJ. Betaine lowers elevated s-adenosylhomocysteine levels in hepatocytes from ethanol-fed rats. *J Nutr* 2003;133(9):2845-8.
143. Woutersen RA, Appelman LM, Van Garderen-Hoetmer A, Feron VJ. Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III. Carcinogenicity study. *Toxicology* 1986;41(2):213-31.
144. Feron VJ, Kruyssen A, Woutersen RA. Respiratory tract tumours in hamsters exposed to acetaldehyde vapour alone or simultaneously to benzo(a)pyrene or diethylnitrosamine. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1982;18(1):13-31.
145. Lieber CS. Hepatic and metabolic effects of ethanol: pathogenesis and prevention. *Ann Med* 1994;26(5):325-30.
146. Zhao W, Mosley BS, Cleves MA, Melnyk S, James SJ, Hobbs CA. Neural tube defects and maternal biomarkers of folate, homocysteine, and glutathione metabolism. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2006;76(4):230-6.
147. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2002;137(7):603-12.
148. Giardello FM, Brensinger JD, Petersen GM, Luce M, Hyland LM, Bacon JA, et al. The use and interpretation of commercial APC gene testing for familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1997;336(12):823-27.
149. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75(6):1215-25.
150. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75(5):1027-38.
151. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363(6429):558-61.
152. Castells A, Castellvi-bel S, Balaguer F. Concepts in familial colorectal cancer: Where do we stand and what is the future? *Gastroenterology* 2009;137(2):404-09.
153. Ferreira S, Lage P, Sousa R, et al. Familial colorectal cancer type X: clinical, pathological and molecular characterization. *Acta Medica Portuguesa* 2009;22(3):207-214.
154. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev* 2007;21(20):2525-38.
155. Hesketh J, Vasconcelos M, Bermanno G. Regulatory signals in messenger RNA: determinants of nutrient-gene interaction and metabolic compartmentation. *Br J Nutr* 1998;80(4):307-21.
156. Kussmann M, Krause L, Siffert W. Nutrigenomics: where are we with genetic and epigenetic markers for disposition and susceptibility? *Nutr Rev.* 2010;68 (S1):38-47.
157. Heavey PM, McKenna D, Rowland IR. Colorectal cancer and the relationship between genes and the environment. *Nutr Cancer* 2004;48(2):124-41.
158. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004;159(5):423-43.
159. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56(21):4862-4.

160. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(6):513-8.
161. Ulrich CM, Potter JD, Bigler J, Caan B, Slattery ML. Polymorphisms in the reduced folate carrier, thymidylate synthase, or methionine synthase and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(11):2509-16.
162. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10(1):111-3.
163. Kim YI. Folate, colorectal carcinogenesis, and DNA methylation: lessons from animal studies. *Environ Mol Mutagen* 2004;44(1):10-25.
164. Kim YI. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nut Rev* 2000;58:205-09.
165. Potter JD. Methyl supply, methyl metabolizing enzymes and colorectal neoplasia. *J Nut* 2002;132(8S):2410-12.
166. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359(6392):235-7.
167. Slattery M, Samowitz W, Ballard L, Schaffer D, Leppert M, Potter J. A molecular variant of the APC gene at codon 1822: its association with diet, lifestyle, and risk of colon cancer. *Cancer Res* 2001;61(3):1000-4.
168. Menendez M, Gonzalez S, Blanco I, Guinó E, Peris M, Peinado M, et al. Colorectal cancer risk and the APC D1822V variant. *Int J Cancer* 2004;112(1):161-63.
169. Yamamoto T, Nakahigashi M, Saniabadi A. Review article: diet and inflammatory bowel disease-epidemiology and treatment. *Alimen Pharmacol Ther* 2009;30(2):99-112.
170. Whelan G. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am* 1990;74(1):1-12.
171. Russeal M. Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean? *Eur J Intern Med* 2000;11(4):191-96.
172. Loftus CG, Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(3):254-61.
173. Loftus EJ. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126(6):1504-17.
174. Baumgart D, Sandborn W. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007;369(9573):1641-57.
175. Hanauer S. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(S1):S3-S9.
176. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 2009;104(2):465-83; quiz 464, 484.
177. Ferguson LR, Peterman I, Hubner C, Philpott M, Shellin AN. Uncoupling gene-diet interactions in inflammatory bowel disease (IBD). *Genes Nutr* 2007;2(1):71-3.
178. Magro F, Portela F, Lago P, Deus J, Vieira A, Peixe P, et al. Avaliação Nacional dos doentes com Doença de Crohn. *Jornal Português de Gastrenterologia* 2007;14:24.
179. Freitas J. Epidemiologia da Doença de Crohn. In: Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal, editor. *Doença inflamatória intestinal - Tópicos de relevância clínica*; 2008. p. 200-209.

180. Campos F, Waitzberg D, Teixeira M, Mucerino DR, Habr-Gama A, Kiss DR. Inflammatory bowel diseases. Principles of nutritional therapy. *Revista Hospital Clinicas Faculdade Medicina S. Paulo* 2002;57(4):187-98.
181. Lucendo AJ, De Rezende LC. Importance of nutrition in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009;15(17):2081-8.
182. Somerville KW, Logan RF, Edmond M, Langman MJ. Smoking and Crohn's disease. *Br Med J* 1984;289(6450):954-6.
183. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 1988;29(3):352-7.
184. Tobin MV, Logan RF, Langman MJ, McConnell RB, Gilmore IT. Cigarette smoking and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1987;93(2):316-21.
185. Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, et al. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int J Epidemiol* 1998;27(3):397-404.
186. Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Inflammatory bowel disease and tobacco smoke-a case-control study. *Gut* 1990;31(12):1377-81.
187. Franceschi S, Panza E, La Vecchia C, Parazzini F, Decarli A, Bianchi Porro G. Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking. *Am J Epidemiol* 1987;125(3):445-52.
188. Calkins B. A meta-Analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences* 1989;34(12):1841-54.
189. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2006;81(11):1462-71.
190. King TE, Jr., Savici D, Campbell PA. Phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by alveolar macrophages: smokers versus nonsmokers. *J Infect Dis* 1988;158(6):1309-16.
191. Suenart P, Bulteel V, Den Hond E, Hiele M, Peeters M, Monsuur F, et al. The effects of smoking and indomethacin on small intestinal permeability. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14(6):819-22.
192. Birrenchab T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(6):848-59.
193. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol* 2007;13(46):6134-9.
194. Hatoum OA, Binion DG, Otterson MF, Gutterman DD. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: Loss of nitric oxide-mediated vasodilation. *Gastroenterology* 2003;125(1):58-69.
195. Sonnenberg A. Occupational distribution of inflammatory bowel disease among German employees. *Gut* 1990;31(9):1037-40.
196. Persson PG, Leijonmarck CE, Bernell O, Hellers G, Ahlbom A. Risk indicators for inflammatory bowel disease. *Int J Epidemiol* 1993;22(2):268-72.
197. Narula N, Fedorak RN. Exercise and inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol* 2008;22(5):497-504.
198. Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol* 2006;12(38):6102-8.
199. D'Souza S, Levy E, Mack D, Israel D, Lambrette P, Ghadirian P, et al. Dietary patterns and risk for Crohn's disease in children. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(3):367-73.

200. Mahmud N, Weir DG. The urban diet and Crohn's disease: is there a relationship? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13(2):93-5.
201. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol* 2007;102(9):2016-25.
202. Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T, et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(2):154-63.
203. Martini GA, Brandes JW. Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease. *Klin Wochenschr* 1976;54(8):367-71.
204. Miller B, Fervers F, Rohbeck R, Strohmeyer G. Sugar consumption in patients with Crohn's disease. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 1976;82(1):922-4.
205. Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40(6):754-60.
206. Mayberry JF, Rhodes J, Newcombe RG. Increased sugar consumption in Crohn's disease. *Digestion* 1980;20(5):323-6.
207. Geerling BJ, Stockbrugger RW, Brummer RJ. Nutrition and inflammatory bowel disease: an update. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1999;230:95-105.
208. Cashman K, Shanahan F. Is nutrition an aetiological factor for inflammatory bowel disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15(6):607-13.
209. Riordan AM, Ruxton CH, Hunter JO. A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *Eur J Clin Nutr* 1998;52(4):229-38.
210. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 2002;21(6):495-505.
211. Galli C, Calder P. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: A critical review. *Annals Nutrition Metabolism* 2009;55(1-3):123-39.
212. Innis SM, Jacobson K. Dietary lipids in early development and Intestinal Inflammatory Disease. *Nutr Rev* 2007;65(12):S188-93.
213. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* 2008;233(6):674-88.
214. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997;92(12S):5-11.
215. Gewirtz A, Neish A, Madara J. Mechanisms of active intestinal inflammation and potential downregulation via lipoxins. *Adv Exp Med Biol* 2002;507:229-36.
216. Liou YA, King DJ, Zibrik D, Innis SM. Decreasing linoleic acid with constant alpha-linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men. *J Nutr* 2007;137(4):945-52.
217. Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, et al. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 2003;278(44):43807-17.
218. Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr* 2004;79(4):606-12.
219. Remig V, Franklin B, Margolis S, Kostas G, Nece T, Street JC. Trans fats in America: a review of their use, consumption, health implications, and regulation. *J Am Diet Assoc* 2010;110(4):585-92.

220. Bang HO, Dyerberg J, Sinclair HM. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am J Clin Nutr* 1980;33(12):2657-61.
221. Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N. Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *Am J Clin Nutr* 1996;63(5):741-5.
222. Dieleman LA, Heizer WD. Nutritional issues in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1998;27(2):435-51.
223. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):599-603.
224. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):603-6.
225. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70(4):845-57.
226. Hugot J, Zaccaria I, Cavanaugh J, Yang H, Vermeire S, Lappalainen M, et al. Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am J Gastroenterol* 2007;102(6):1259-67.
227. Cho JH, Abraham C. Inflammatory bowel disease genetics: Nod2. *Annu Rev Med* 2007;58:401-16.
228. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004;99(12):2393-404.
229. Lee G, Buchman AL. DNA-driven nutritional therapy of inflammatory bowel disease. *Nutrition* 2009;25(9):885-91.
230. Hartman C, Eliakim R, Shamir R. Nutritional status and nutritional therapy in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2009;15(21):2570-78.
231. Armada P, García-Mayor M, Larrañaga A, Seguíñ P, Pérez-Méndez LF. Tasa de desnutrición y respuesta al tratamiento nutricional específico en la enfermedad de Crohn. *Nut Hosp* 2009;24(2):161-66.
232. Cabré E, Gassul M. Nutrition in inflammatory bowel disease: impact on disease and therapy. *Curr Opin Gastroenterol* 2001;17:342-49.
233. Vaisman N DI, Halack A, Niv E. Malabsorption is a major contributor to underweight in Crohn's disease patients in remission. *Nutrition* 2006;22:855-859.
234. Grimble RF. Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition* 1998;14(7-8):634-40.
235. Karmiris K, Koutroubakis IE, Xidakis C, Polychronaki M, Voudouri T, Kouroumalis EA. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(2):100-5.
236. Seidaman E. Nutritional management of inflammatory bowel disease. *Surg Clin North Am* 1989;18(1):129-55.
237. Valentini L SL, Buning C, Hengstermann S, Koernicke T, Tillinger W, Guglielmi FW, Norman K, Buhner S, Ockenga J, Pirlich M, Lochs H. Malnutrition and impaired muscle strength in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis in remission. *Nutrition* 2008;24(7):694-702.
238. Van Hogezaand RA, Hamdy NA. Skeletal morbidity in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2006(243):59-64.

239. Vagianos K, Bector S, McConnell J, Bernstein CN. Nutrition assessment of patients with inflammatory bowel disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2007;31(4):311-9.
240. Filippi J, Al-Jaouni R, Wiroth J, Hébuterne X, Schneider S. Nutritional deficiencies in patients with Crohn's disease in remission. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(3):185-91.
241. Lochs H, Dejong C, Hammarqvist F, Hebuterne X, Leon-Sanz M, Schutz T, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Gastroenterology. *Clin Nutr* 2006;25(2):260-74.
242. Zachos M, Tondeur M, Griffiths AM. Enteral nutritional therapy for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2001(3):CD000542.
243. Belluzzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 1996;334(24):1557-60.
244. Feagan BG, Sandborn WJ, Mittmann U, Bar-Meir S, D'Haens G, Bradette M, et al. Omega-3 free fatty acids for the maintenance of remission in Crohn disease: the EPIC Randomized Controlled Trials. *JAMA* 2008;299(14):1690-7.
245. Lorenz-Meyer H, Bauer P, Nicolay C, Schulz B, Purrmann J, Fleig WE, et al. Omega-3 fatty acids and low carbohydrate diet for maintenance of remission in Crohn's disease. A randomized controlled multicenter trial. Study Group Members (German Crohn's Disease Study Group). *Scand J Gastroenterol* 1996;31(8):778-85.
246. Belluzzi A, Campieri M, Belloli C. A new enteric coated preparation of omega-3 fatty acids for preventing post-surgical recurrence in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;112:A930.
247. Romano C, Cucchiara S, Barabino A, Annese V, Sferlazzas C. Usefulness of omega-3 fatty acid supplementation in addition to mesalazine in maintaining remission in pediatric Crohn's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *World J Gastroenterol* 2005;11(45):7118-21.
248. Turner D, Shah PS, Steinhart AH, Zlotkin S, Griffiths AM. Maintenance of remission in inflammatory bowel disease using omega-3 fatty acids (Fish Oil): A systematic review and meta-analyses. *Inflamm Bowel Dis* 2010;17(1):336-45.
249. MacLean C, Mojica WA, Newberry SJ, Pencharz P, Garland RH, Tu W, et al. Systematic review of the effects of n3 fatty acids in inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nut* 2005;82:611-19.
250. Nielsen AA, Jorgensen LG, Nielsen JN, Eivindson M, Gronbaek H, Vind I, et al. Omega-3 fatty acids inhibit an increase of proinflammatory cytokines in patients with active Crohn's disease compared with omega-6 fatty acids. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22(11-12):1121-8.
251. Gassull MA, Fernandez-Banares F, Cabre E, Papo M, Giaffer MH, Sanchez-Lombrana JL, et al. Fat composition may be a clue to explain the primary therapeutic effect of enteral nutrition in Crohn's disease: results of a double blind randomised multicentre European trial. *Gut* 2002;51(2):164-8.
252. Ramakers J, Mensink R, Verstege M, Velde A, Plat J. An arachidonic acid-enriched diet does not result in more colonic inflammation as compared with fish oil- or oleic acid-enriched diets in mice with experimental colitis. *Br J Nutr* 2008;100(2):1-8.
253. Akobeng AK. Review article: the evidence base for interventions used to maintain remission in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27(1):11-8.
254. Louis E, Peeters M, Franchimont D, Seidel L, Fontaine F, Demolin G, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): influence on disease behaviour? *Clin Exp Immunol* 2000;119(1):64-8.
255. Szkaradkiewicz A, Marciniak R, Chudzicka-Strugala I, Wasilewska A, Drews M, Majewski P, et al. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009;57(4):291-4.

256. Mazlam MZ, Hodgson HJ. Interrelations between interleukin-6, interleukin-1 beta, plasma C-reactive protein values, and in vitro C-reactive protein generation in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1994;35(1):77-83.
257. Reinisch W, Gasche C, Tillinger W, Wyatt J, Lichtenberger C, Willheim M, et al. Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. *Am J Gastroenterol* 1999;94(8):2156-64.
258. Koss K, Satsangi J, Fanning G, Welsh K, Jewell D. Cytokine (TNFalpha, LTalpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000;1(3):185-90.
259. Plevy SE, Targan SR, Rotter J, Toyoda H. Tumor necrosis factor (TNF) microsatellite associations within HLADR2 + patients define Crohn's disease and ulcerative colitis (UC)-specific genotypes. *Gastroenterology* 1994;106:A754.
260. Plevy SE, Yang H, Carramanzana NM. The tumor necrosis factor (TNF) microsatellite haplotype a2blc2d4el correlates with increased TNF production in Crohn's disease (CD) *Gastroenterology* 1995;108:A895.
261. Dionne S, Hiscott J, D'agata I. Quantitative PCR Analysis of TNF-a and IL-1b mRNA Levels in Pediatric IBD Mucosal Biopsies. *Dig Dis Sciences* 1997;42(7):1557-66.
262. Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993;94(1):174-81.
263. Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985;230:630-632.
264. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104(4):487-501.
265. Negoro K, Kinouchi Y, Hiwatashi N, Takahashi S, Takagi S, Satoh J, et al. Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. *Gastroenterology* 1999;117(5):1062-68.
266. Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, López-Vázquez A, Fuentes D, Niño P, et al. TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98(5):1101-06.
267. Mahida YR, Kurlac L, Gallagher A, Hawkey CJ. High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Clinical Experimental Immunology* 1991;119(12):64-9.
268. Gross V, Andus T, Caesar I, Roth M, Scholmerich J. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992;102(2):514-9.
269. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102(7):1369-76.
270. Grimbé F, Howell WM, O'Reilly G, Turner SJ, Markovic O, Hirrell S, et al. The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor production. *Am J Clin Nut* 2002;76(2):454-59.
271. Ferguson L, Shelling A, Browning B, Huebner C, Petermann I. Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutation Research* 2007;622(1-2):70-83.



## II) OBJECTIVOS

O objectivo geral desta tese foi explorar a influência de variáveis nutricionais e genéticas no desenvolvimento de doenças intestinais, em concreto no cancro do cólon e recto (CCR) e na doença de Crohn (DC). Para tal foi avaliado o estado nutricional e o padrão alimentar de indivíduos portadores dessas patologias, bem como aspectos específicos da susceptibilidade genética. Foi igualmente estudada de que forma a interacção destas variáveis, nutricionais e genéticas, pode influenciar o risco de desenvolver doença e a sua actividade.

Para alcançar este objectivo foram desenvolvidos 4 estudos distintos, com grupo de doentes e grupo controlo, cujos objectivos específicos estão a seguir delineados:

### Cancro do Cólon e Recto

Através da análise de uma população com 196 indivíduos CCR e de uma população controlo, procedeu-se à execução de dois estudos caso controlo distintos que pretenderam dar resposta às seguintes questões:

1. Qual o estado nutricional e padrão alimentar dos indivíduos com CCR, e qual a influência que o padrão alimentar pode ter no risco de desenvolver doença?
2. Qual a prevalência dos polimorfismos *APC* D1822V, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G *metionina sintetase* e *SHMT* C1420T nos indivíduos com CCR?
3. Poderá a susceptibilidade genética, causada pela presença dos referidos polimorfismos influenciar a resposta aos factores nutricionais e com isso afectar o risco de desenvolver CCR?

Foram estabelecidos os seguintes objectivos:

#### Estudo 1

- Avaliar o estado nutricional e o padrão alimentar de doentes com CCR;
- Estudar a prevalência do polimorfismo D1822V situado no gene *APC*;
- Avaliar a influência das variáveis nutricionais e genéticas (polimorfismo D1822V *APC*) de forma isolada, e em interacção, no risco de desenvolver CCR.

#### Estudo 2

- Analisar o genótipo de três polimorfismos localizados em genes do ciclo da metilação e síntese de DNA (*MTHFR* C677T, *MTR* A2756G e *SHMT* C1420T) e sua associação com o risco de CCR;
- Avaliar a influência da interacção de variáveis da ingestão em nutrientes e variáveis genéticas no risco de CCR.

### Doença de Crohn

Através da análise de uma população de 99 indivíduos com DC e de uma população controlo, procedeu-se à execução de dois estudos distintos que pretenderam dar resposta às seguintes questões:

1. Qual o estado nutricional e padrão alimentar de indivíduos com DC?

2. Qual a prevalência dos polimorfismos *IL1 $\beta$*  C3953T e C511T, *TNF $\alpha$*  C857T e C308A, *LT $\alpha$*  A252G e *IL6* G174C nos indivíduos com DC? Qual a sua influência no risco de DC?

3. Estará a actividade da doença de Crohn dependente da dieta, dos factores genéticos ou da interacção entre estas variáveis?

Foram estabelecidos os seguintes objectivos:

Estudo 3 (n=78 casos)

- Avaliar o estado nutricional e padrão alimentar de doentes com DC.

Estudo 4 (n=99 casos)

- Avaliar a influência de factores nutricionais na actividade da doença;
- Determinar a incidência de polimorfismos localizados em genes de citocinas pro-inflamatórias (*TNF $\alpha$*  C857T, *TNF $\alpha$*  C308A, *LT $\alpha$*  A252G, *IL6*G174C) e anti-inflamatórias (*IL1 $\beta$*  C3953T, *IL1 $\beta$*  C511T), e avaliar a sua relação com o risco e actividade da doença;
- Avaliar a influência da interacção de variáveis da ingestão em nutrientes e variáveis genéticas na actividade da doença de Crohn.

## **CAPÍTULO 2**

---

## Estudo 1

---

### **O polimorfismo *D1822V APC* interage com a ingestão de gordura, cálcio e fibra na modulação do risco de cancro colo rectal em indivíduos portugueses**

*Catarina S Guerreiro, Marília L Cravo, Miguel Brito, Pedro M Vidal, Paulo O Fidalgo, e Carlos N Leitão*

---

The D1822V APC polymorphism interacts with fat, calcium, and fiber intakes in modulating the risk of colorectal cancer in Portuguese persons.

American Journal of Clinical Nutrition 2007;85(6):1592-7.

## RESUMO

**Introdução:** O risco de cancro colo rectal (CCR) é influenciado tanto por factores genéticos como por factores ambientais.

**Objectivo:** Avaliar a interacção do polimorfismo *D1822V* do gene *APC* e a ingestão nutricional em indivíduos com CCR.

**Desenho do estudo:** Estudo caso controlo em indivíduos com CCR (n=196) e em 200 voluntários saudáveis, com distribuição semelhante para a idade e género, que foram avaliados no que respeita ao estado nutricional, estilos de vida e polimorfismo *D1822V* do gene *APC*.

**Resultados:** Não foram observadas diferenças significativas na ingestão energética e de macronutrientes. Os casos apresentaram uma ingestão de carotenos, vitaminas C e E, folato e cálcio significativamente inferior aos controlos ( $P < 0,05$ ). A ingestão de fibra também foi significativamente inferior nos casos ( $P = 0,004$ ) relativamente aos controlos, enquanto que o consumo de álcool foi associado a um aumento de duas vezes no risco de CCR. Para além disso, os casos eram significativamente mais sedentários do que os controlos ( $P = 0,001$ ). A variante homozigótica do polimorfismo do gene *APC* (VV) foi identificada em 4,6% dos doentes e em 3,5% dos controlos. A avaliação da potencial interacção entre dieta e genótipo revelou que um consumo elevado de colesterol estava associado a um aumento do risco de CCR apenas nos indivíduos não portadores do alelo polimórfico (DD) do polimorfismo *D1822V* do gene *APC* (OR: 1,66; IC 95%: 1,00-2,76). Em contraste, o elevado consumo de fibra e de cálcio estavam particularmente associados a um menor risco de CCR nos doentes portadores do alelo polimórfico (DV/VV) (OR: 0,50; IC95%: 0,27-0,94 para a fibra e OR = 0,51; IC95%: 0,28-0,93 para o cálcio) quando comparado com indivíduos sem esse alelo.

**Conclusão:** Estes resultados sugerem uma significativa interacção entre o polimorfismo *D1822V* do gene *APC* e a ingestão de colesterol, cálcio, e fibra no risco de CCR.

**Palavras-Chave:** Cancro colo rectal, dieta, polimorfismo genético, estilos de vida.

## INTRODUÇÃO

O cancro colo rectal é uma causa major de mortalidade por cancro nos países industrializados que adoptaram um padrão alimentar ocidentalizado (1). Tanto factores ambientais como genéticos têm sido implicados na ocorrência de CCR (2). De entre os factores ambientais, a obesidade, a falta de actividade física, a elevada ingestão de energia, e uma dieta rica em carne vermelha e pobre em factores protectores como os frutos e vegetais têm sido consistentemente associados a um maior risco de CCR (3,4).

No entanto, diversos estudos revelam resultados contraditórios no que respeita aos factores que protegem, ou que promovem o CCR: enquanto a maioria dos estudos caso-controlo sustentam as associações acima referidas (5), os resultados obtidos nos estudos prospectivos, de intervenção são menos consistentes. As razões para estas discrepâncias podem estar relacionadas com viés no relato de informação passada, que ocorrem em estudos caso-controlo, já que, numa doença como o cancro, a ingestão nutricional num passado mais distante pode ser mais importante mas mais difícil de recordar (6). Para além deste facto, na avaliação do risco de cancro, existem complexas interacções dietéticas que ocorrem não só entre nutrientes, mas também com outras variáveis como: o tabagismo e hábitos alcoólicos, exercício físico ou composição corporal, que poderão dificultar a análise da importância de um único nutriente. Na maioria dos estudos analisados na revisão realizada por Marques Vidal e colaboradores (5), foi verificado que o consumo isolado de frutas ou vegetais não conferiam nenhuma protecção para o CCR, ao passo que o consumo de ambos em conjunto se tornava protector.

Acresce ainda que estas associações com a dieta são também complicadas por interacções com factores genéticos. Esta heterogeneidade genética da população em estudo poderá explicar o porquê de pessoas diferentes responderem de forma diferente a estímulos nutricionais semelhantes. Uma diferença na susceptibilidade é geralmente devida à presença de polimorfismos que consistem em mutações nas bases de DNA. Estes polimorfismos nem sempre afectam a função da proteína, mas podem ser responsáveis por variabilidades, tais como aumento de protecção ou susceptibilidade a determinada doença, especialmente em conjunto com estímulos ambientais, nomeadamente nutricionais (7).

Em relação ao CCR, foi estudado um polimorfismo no gene *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) que quando correlacionado com factores nutricionais, pode influenciar o risco de CCR. Este polimorfismo é caracterizado por uma substituição da base adenina por uma timidina no codão 1822 que resulta na substituição do aspartato por valina (GAC→GTC) (8). A interacção entre hábitos alimentares e este polimorfismo no desenvolvimento de CCR, foi avaliada em dois estudos, mas a análise para correlação nutricional foi restringida à ingestão de gordura (9,10). O objectivo do presente estudo foi avaliar a interacção entre o polimorfismo *D1822V* do gene *APC* e a ingestão nutricional num grupo de doentes portugueses com CCR.

## METODOLOGIA

### População

Este é um estudo caso controlo, realizado no Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Francisco Gentil EPE (IPOLFG). O grupo com cancro (isto é, casos) foi composto por 196 indivíduos (104 M, 92 F; média  $\pm$  DP: 64,2  $\pm$  11,3 anos), com um diagnóstico histológico de CCR, e o grupo controlo incluiu 200 indivíduos saudáveis, dadores de sangue ou voluntários recrutados do mesmo IPOLFG, com uma distribuição semelhante por género e idade (106M, 94 F; idade 62,2  $\pm$  12,1 anos) e sem história de cancro em nenhuma localização. Dos casos, 169 dos 196 (86,5%) tinham um diagnóstico recente de CCR, e os restantes 27 (13,5%) estavam sob tratamento por recidiva da doença. No que diz respeito a terapêuticas prévias, 119 dos 196 (60,7%) não tinham recebido nenhuma forma de tratamento, 28 dos 196 (14,3%) já tinham sido submetidos a cirurgia, 13 dos 196 (6,6%) tinham sido sujeitos a radioterapia pélvica, 11 dos 196 (5,6%) tinham sido submetidos a um ou mais ciclos de quimioterapia, e 25 dos 196 (12,8%) tinham sido sujeitos a uma combinação de tratamentos. Segundo a classificação TNM: 24 dos 178 (13,5%) no estágio I; 64 dos 178 (35,9%) no estágio II, 53 dos 178 (29,8%) no estágio III, e 37 dos 178 (20,8%) no estágio IV.

Todos os indivíduos deram o consentimento informado por escrito. O estudo foi aprovado pelo Comité Científico de Ética do IPOLFG.

### Recolha dos dados

A avaliação dietética foi realizada através de um questionário de frequência alimentar (11), validado para a população portuguesa. Foi pedido aos participantes que se recordassem dos seus hábitos alimentares no ano anterior ao diagnóstico de CCR (grupo caso) ou no ano anterior à entrevista (grupo controlo). O tipo e quantidade de alimentos ingeridos foram então analisados através da versão modificada da base de dados do *software* FOOD PROCESSOR (versão 7; Esha Reserach, Inc, Salem, OR) onde estão incluídos alguns itens de alimentos portugueses, o que permite a quantificação dos diferentes macro e micronutrientes. A actividade física no ano anterior ao diagnóstico de cancro (casos) ou no ano anterior à entrevista (controlos) foi avaliada através do questionário de Arrol e colaboradores (12), que permitiu agrupar os indivíduos em 3 categorias: baixa (0), intermédia (1) e elevada (2). Os hábitos tabágicos foram avaliados pelo número de cigarros/dia. Para o cálculo do índice de massa corporal (IMC: em kg/m<sup>2</sup>) foi utilizada uma balança digital (SECA, Hanover, MD) com uma precisão de  $\pm$ 0,1kg, e a altura foi obtida através da informação constante no bilhete de identidade dos participantes.

### Processo de Genotipagem

Foram colhidas amostras de sangue total e armazenadas em cartões Cards Kit 3-mm. A extracção de DNA foi realizada utilizando Generation Capture Card Kit-DNA Purification; DNA Elution (Gentra Systems Inc, Minneapolis, MN). O polimorfismo GAC/GTC no codão 1822 do gene *APC* foi genotipado utilizando Assays-by-Design TaqMan para análise de discriminação alélica (Applied Biosystems, Foster City, CA). A reacção em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com mistura de: 4  $\mu$ l de DNA genómico, 10  $\mu$ l de Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1  $\mu$ l de 20x assay mix e ddH<sub>2</sub>O até 20  $\mu$ l de volume final. Foi usado o seguinte protocolo de amplificação: desnaturação a 95°C durante 10 minutos, seguida de

40 ciclos de desnaturação a 92°C durante 15 segundos, hibridação e extensão a 60°C durante 1 min.

Todas as reações foram realizadas no iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hércules, CA). Após PCR, o genótipo de cada amostra foi atribuído automaticamente pelo software do equipamento, através da medida da fluorescência específica de cada alelo. Os indivíduos foram classificados em homozigóticos para a variante, caso possuíssem ambos os alelos valina e valina (VV), heterozigóticos caso possuíssem o genótipo aspartato e valina (DV), e por fim homozigóticos wild-type se apresentassem o genótipo aspartato e aspartato (DD).

### Tratamento estatístico

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS for WINDOWS (versão 12.0; SPSS Inc, Chicago, IL). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, como número (e percentagem) de indivíduos, e como odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC). A análise bivariada foi realizada utilizando teste *t*-Student ou teste Mann-Whitney para variáveis contínuas e o teste qui-quadrado para variáveis categóricas. Regressão logística múltipla foi usada para pesquisar associações utilizando OR e IC 95%. De forma breve: a ingestão nutricional foi categorizada em alta ou baixa consoante os valores de ingestão eram superiores ou inferiores ao valor da mediana e foram criados quatro grupos independentes em função do *APC D1822V* e dieta. O risco de desenvolver CCR foi avaliado através da análise do efeito combinado do genótipo *D1822V* e dieta, utilizando como categoria de referência (ie, risco standard) aqueles com baixa ingestão e sem variante do gene *APC*. Os restantes 3 grupos diziam respeito aos indivíduos: sem variante e elevado consumo, com variante (DV ou VV) e baixo consumo, e com variante e elevado consumo. A relação entre estes grupos e o risco de CCR foi realizada através de regressão logística; sempre que adequado foi realizado o ajuste tendo em conta algumas outras variáveis. O nível de significância foi estabelecido para um  $P < 0,05$ .

### RESULTADOS

Estilos de vida, história familiar, peso, e IMC de ambos os grupos em estudo estão apresentados no **Quadro 1**.

**Quadro 1**Características da amostra em estudo<sup>1</sup>

	Casos (n=196)	Controlos (n=200)	P
Actividade Física <sup>2</sup>			
Baixa [n (%)]	106 (54,1)	96 (48,0)	<0,001 <sup>3</sup>
Intermédia [n (%)]	78 (39,8)	66 (33,0)	
Elevada [n (%)]	12 (6,1)	38 (19,0)	
Fumadores [n (%)]	24 (12,2)	26 (13,0)	NS
Cigarros (nº/d)	7,0 ± 12,4 <sup>4</sup>	7,9 ± 13,6	NS
Bebedores [n (%)]	127 (64,8)	123 (61,5)	NS
Álcool (g/d)	25,2 ± 39,8	19,2 ± 43,4	NS
História familiar de CCR [n (%)] <sup>5</sup>	45 (23)	16 (8)	0,001
Altura (m)	1,63 ± 0,09	1,64 ± 0,09	NS
Peso (kg)	68,5 ± 13,9	72,3 ± 12,1	0,004
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,6 ± 4,2	27,0 ± 3,9	0,01

<sup>1</sup>CCR, cancro colo rectal. Para actividade física, bebedores, fumadores, e história familiar de CCR, foi utilizado o teste qui-quadrado para análise estatística; as diferenças no consumo de álcool foram analisadas utilizando o teste Mann-Whitney; e as diferenças na altura, peso, e IMC, entre grupos foram analisadas utilizando o teste t Student.

<sup>2</sup>Classificada segundo questionário Arrol e colaboradores (12).

<sup>3</sup>A prevalência de actividade física elevada foi significativamente maior nos controlos do que nos casos.

<sup>4</sup>Média ± DP (todos estes valores).

<sup>5</sup>História familiar de CCR em primeiro ou segundo grau.

No que respeita à actividade física, os casos apresentaram níveis inferiores de actividade intensa antes do diagnóstico do que após o diagnóstico de cancro, contudo o exercício por si só não influenciou o risco de CCR (OR: 0,78; IC 95%: 0,53-1,1). Não foram também observadas diferenças entre os dois grupos no que diz respeito aos hábitos tabágicos. Relativamente à ingestão de álcool, verificámos que 35,8% dos doentes e 38,5% dos controlos não consumiram álcool. Entre os participantes (casos e controlos) que referiram ter consumido álcool, os doentes apresentaram um consumo de álcool significativamente mais elevado do que os controlos (38,8 g/d comparado com 31,0 g/d; OR: 1,97; IC 95%:1,19-3,26). A existência de história familiar de CCR em familiares em primeiro ou em segundo grau também foi mais frequente nos doentes quando comparado com controlos (OR: 3,4; IC 95%: 1,85-6,29). No que respeita ao estado nutricional verificámos que tanto o peso como o IMC foram significativamente menores nos casos do que nos controlos (Quadro 1).

A ingestão diária de energia e macronutrientes está apresentada no **Quadro 2**.

**Quadro 2**Consumo diário de macronutrientes<sup>1</sup>

	Casos (n=196)	Controlos (n=200)	P <sup>2</sup>
Energia (kcal)	3113 ± 1178	2938 ± 1015	NS
Proteína (g)	133,5 ± 57,6	130,3 ± 50,4	NS
Glícidos (g)	285,6 ± 86,1	290,0 ± 95	NS
Gordura total (g)	134,0 ± 77,7	130,0 ± 95	NS
Gordura Polinsaturada (g)	21,2 ± 12,1	19,9 ± 9,5	NS
Gordura Monoinsaturada (g)	54,5 ± 28,5	54,5 ± 25,0	NS
Gordura Saturada (g)	47,6 ± 34,4	45,3 ± 30,9	NS
Colesterol total (mg)	507 ± 304,7	460 ± 250,3	NS
Fibra (g)	26,0 ± 9,3	28,9 ± 10,7	0,004

<sup>1</sup>Todos os valores referem-se à média ± DP.

<sup>2</sup>O teste Mann-Withney foi utilizado para analisar diferenças entre grupos.

Não se observaram diferenças significativas entre grupos no consumo de macronutrientes. Contudo, verificámos uma ingestão significativamente inferior de fibra nos casos do que nos controlos; globalmente aqueles que tinham um consumo diário superior à mediana (25,6 g) apresentaram um OR de 0,58 (IC 95%: 0,4-0,8) para o risco de desenvolver CCR quando comparados com aqueles que consumiam um valor inferior à mediana.

A ingestão de micronutrientes em ambos os grupos - incluindo a toma de suplementos que ocorreu em 11 casos e nenhum controlo - está apresentada no **Quadro 3**.

**Quadro 3**Consumo diário de micronutrientes<sup>1</sup>

	Casos (n = 196)	Controlos (n = 200)	P <sup>2</sup>	OR (IC 95%) <sup>3</sup>
Vitamina A (µg)	944,8 ± 890,0	925,4 ± 644	NS	ND
Carotenos (µg)	985,5 ± 59,9	1264,5 ± 1128,3	0,02	0,67 (0,44-0,99) <sup>4</sup>
Vitamina C (mg)	144,9 ± 60	168,4 ± 74,8	0,001	0,56 (0,38-0,84) <sup>4</sup>
Vitamina D (µg)	7,01 ± 4,7	7,2 ± 4,7	NS	ND
Vitamina E (mg)	10,8 ± 4,4	11,9 ± 5,1	0,03	0,75 (0,5-1,1)
Vitamina K (µg)	4353,8 ± 1363,7	4408,6 ± 1335,7	NS	ND
Folato (µg)	401,6 ± 161,9	433,4 ± 162,0	0,02	0,72 (0,49-1,1)
Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	2,83 ± 1,06	2,85 ± 0,98	NS	ND
Vitamina B <sub>12</sub> (µg)	14,54 ± 9,05	14,3 ± 8,21	NS	ND
Sódio (mg)	3961,9 ± 2847,3	3662,43 ± 2282,3	NS	ND
Potássio (mg)	4353,8 ± 1363,7	4408,6 ± 1335,7	NS	ND
Magnésio (mg)	416,6 ± 134,9	428,5 ± 131,1	NS	ND
Selénio (mg)	144,5 ± 56,3	143,5 ± 53,6	NS	ND
Ferro (mg)	22,2 ± 9,8	21,8 ± 8,7	NS	ND
Cálcio (mg)	1029,3 ± 410,7	1181,3 ± 626,4	0,01	0,59 (0,49-0,88) <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Todos os valores referem-se à média ± DP. OR, odds ratio; ND, não determinado.

<sup>2</sup>O teste Mann-Withney foi utilizado para analisar diferenças entre grupos.

<sup>3</sup>O OR foi determinado utilizando os valores acima ou abaixo da mediana de ingestão. A categoria referência - isto é, o risco standard para o cancro colo rectal - foi considerada a combinação do genótipo wild-type e a ingestão

baixa de vários nutrientes. Os *cut offs* foram: 873,4µg para carotenos, 147,5mg para vitamina C; 10,3 mg vitamina E, 406,7µg para o folato, e 1029mg cálcio.

<sup>4</sup>P<0,05

Observou-se um consumo significativamente menor de carotenos, vitamina C, vitamina E, folato, e cálcio, no grupo de doentes quando comparado com os controlos. Para estes micronutrientes foi calculado o risco de CCR, tendo em consideração um consumo superior ou inferior à mediana.

Não foram observadas diferenças no que diz respeito à distribuição do genótipo, e ambos os grupos estavam em equilíbrio *Hardy Weinberg*. Os homozigóticos para a variante representavam 4,6% dos casos e 3,5% dos controlos, enquanto os heterozigóticos representavam 30,1% e 33% dos casos e controlos, respectivamente. No grupo caso, não foram observadas correlações entre genótipo, género, localização do tumor, estágio da doença, ou história familiar de CCR. A interação entre a ingestão de vários macronutrientes e micronutrientes e genótipo *APC* está descrita no **Quadro 4**.

**Quadro 4**Odds ratio (ORs) para cancro colo rectal de acordo com *D1822T* APC e dieta<sup>1</sup>

Ingestão	<i>D1822T</i> APC				<i>P</i> para interacção
	Casos/controlos		OR (IC 95%) <sup>2</sup>		
	sem variante ( <i>DD</i> )	com variante ( <i>DV/VV</i> )	sem variante ( <i>DD</i> )	com variante ( <i>DV/VV</i> )	
	<i>N</i>				
Energia					
Elevado	54/62	27/37	1,29 (0,78-2,12)	0,90 (0,48-1,68)	0,21
Baixo	74/65	41/36	1	1,20 (0,67-2,16)	
Proteína					
Elevado	73/59	26/37	1,57 (0,95-2,60)	0,91 (0,49-1,71)	0,24
Baixo	55/68	42/36	1	1,42 (0,79-256)	
Glícidos					
Elevado	69/67	26/35	1,15 (0,70-1,90)	0,91 (0,48-1,71)	0,50
Baixo	59/60	42/38	1	1,06 (0,59-1,89)	
Gordura total					
Elevado	72/61	23/42	1,37 (0,83-2,27)	0,69 (0,37-1,3)	0,12
Baixo	56/66	45/31	1	1,59 (0,89-2,88)	
Gordura saturada					
Elevado	72/62	23/41	1,28 (0,78-2,12)	0,67 (0,36-1,26)	0,17
Baixo	56/65	45/32	1	1,51 (0,84-2,73)	
Gord. polinsaturada					
Elevado	76/63	21/38	1,48 (0,89-2,45)	0,74 (0,38-1,42)	0,14
Baixo	52/64	47/35	1	1,55 (0,87-2,78)	
Gord. monoinsaturada					
Elevado	72/61	27/38	1,40 (0,85-2,32)	0,89 (0,48-1,66)	0,10
Baixo	56/66	41/35	1	1,31 (0,73-2,35)	
Colesterol total					
Elevado	77/60	26/35	1,66 (1,00-2,76)	1,00 (0,53-1,89)	0,05
Baixo	51/67	42/38	1	1,40 (0,78-2,50)	
Fibra					
Elevado	61/73	23/41	0,7 (0,43-1,16)	0,50 (0,27-0,94)	0,03
Baixo	67/54	45/32	1	1,08 (0,60-1,95)	
Álcool					
Elevado	65/62	35/36	1,14 (0,69-1,88)	1,06 (0,58-1,91)	0,96
Baixo	63/65	33/37	1	0,9 (0,50-1,65)	
Folato					
Elevado	61/66	27/44	0,90 (0,54-1,48)	0,60 (0,33-1,09)	0,13
Baixo	67/61	41/29	1	1,28 (0,70-2,32)	
Vitamina B <sub>6</sub>					
Elevado	66/64	26/41	0,99 (0,59-1,62)	0,66 (0,35-1,21)	0,16
Baixo	62/63	42/32	1	1,23 (0,67-2,24)	
Vitamina B <sub>12</sub>					
Elevado	72/62	26/38	1,35 (0,82-2,22)	0,85 (0,45-1,58)	0,09
Baixo	56/65	42/35	1	1,31 (0,73-2,35)	
Cálcio					
Elevado	59/69	26/44	0,74 (0,45-1,21)	0,51 (0,28-0,93)	0,03
Baixo	69/58	42/29	1	1,21 (0,66-2,20)	

<sup>1</sup>*n* = 128 casos sem variante; *n* = 127 controlos sem variante, *n* = 68 casos com variante, *n* = 73 casos com variante.

<sup>2</sup> Os OR foram estimados analisando o efeito combinado do genótipo D1822V e ingestão dietética, utilizando os valores acima ou abaixo da ingestão mediana de cada nutriente. Os *cut offs* foram: 2827 Kcal para a energia, 121,1g para as proteínas, 270g para os glícidos, 110,9g para a gordura total, 32,7g para a gordura saturada, 48,3g para a gordura monoinsaturada, 40,4g para a gordura polinsaturada, 25,6g para a fibra, 3,4g/d para o álcool, 12,5µg para a vitamina B<sub>12</sub>, 406,7µg para o folato, 12,5 mg para a vitamina B<sub>6</sub>. A categoria referência – isto é, o risco standard para o cancro colo rectal - foi considerada a combinação do genótipo wild-type e a ingestão baixa de vários nutrientes.

Para aumentar o poder estatístico, o risco foi determinado agregando os heterozigóticos e a variante homozigótica por comparação com a categoria de referência de homozigotia para o alelo wild-type. Foram observadas associações significativas entre genótipo e o consumo de colesterol ( $P = 0,05$ ), de fibra ( $P = 0,03$ ), e de cálcio ( $P = 0,03$ ). Apenas para os indivíduos wild-type (DD), um consumo elevado de colesterol foi associado a um risco significativamente mais elevado de desenvolver CCR ( $P = 0,05$ ); enquanto que o consumo elevado de fibra ou cálcio diminuía em quase 50% o risco de desenvolver CCR dos indivíduos que apresentavam alelos polimorficos (DV e VV). Quando os 3 genótipos foram analisados separadamente, verificaram-se valores algo diferentes de  $P$  para a interacção, mas continuou a verificar-se uma interacção entre genótipo APC e ingestão de gordura, cálcio, e fibra.

## DISCUSSÃO

Vários estudos analisaram a relação entre dieta, estilos de vida, características genéticas e a prevalência de CCR, e os resultados obtidos variaram amplamente. O presente estudo teve como objectivo correlacionar a ingestão nutricional com o polimorfismo D1822V do gene APC num grupo de indivíduos Portugueses. Apesar desta mutação missense teoricamente não afectar a função da proteína, poderá resultar em ligeiras alterações de conformação que poderão interagir com factores ambientais e assim influenciar o risco de desenvolver CCR.

Observámos que a proporção de indivíduos com actividade física intensa era menor nos casos do que nos controlos. No entanto, contrariamente a estudos anteriores (13,14), não verificámos que os fumadores tivessem um maior risco de CCR. Este achado poderá estar relacionado com o facto deste estudo ter uma amostra menor do que os estudos anteriores. A análise ao consumo de álcool revelou que a ingestão diária > a 28,9g de álcool praticamente duplicava o risco de CCR. A este respeito, a literatura é algo confusa, uma vez que alguns estudos revelaram um efeito promotor do consumo de álcool (15), outros não (16), e há ainda estudos que revelaram um efeito promotor mas apenas para o cancro rectal (17).

Na avaliação do estado nutricional observou-se que os casos apresentavam um IMC menor que os controlos. Como referido anteriormente, esta avaliação foi realizada após o diagnóstico da doença, e 40% dos doentes tinham já recebido alguma forma de tratamento médico ou cirúrgico (ou ambos). É provável por isso que tanto os sintomas relacionados com o CCR ou com o tratamento (ou ambos) possam ter tido um impacto negativo no estado nutricional de alguns doentes. Kune e colaboradores (18) relataram resultados semelhantes aos nossos no que respeita ao IMC: num estudo caso-controlo de grande dimensão, compreendendo 715 casos e 727 controlos, os autores não observaram que o excesso de peso corporal fosse um factor do risco para CCR. Isto contrasta com vários estudos prospectivos, que identificam o IMC elevado como um factor de risco para CCR (19, 20); nesses estudos, o excesso de peso corporal foi detectado muito tempo antes do diagnóstico

ou do tratamento (ou ambos) ocorrerem.

Não se observaram diferenças no consumo de macronutrientes, mas algumas foram identificadas no que respeita à ingestão de micronutrientes. Detectámos que o consumo de carotenos, vitamina C, vitamina E, folato, cálcio e fibra foi significativamente inferior nos casos do que nos controlos. O cálculo do OR revelou um significativo efeito protector do consumo de fibra, cálcio, e carotenos. A maioria dos estudos confirma os nossos resultados no que respeita ao consumo de cálcio, revelando um efeito protector da ingestão de cálcio na recorrência de adenomas (21) e no desenvolvimento de CCR (22). Numa meta-análise que envolveu 10 estudos com o objectivo de avaliar o efeito da ingestão de cálcio no risco de CCR, Eunyoung e colaboradores (23) observaram que um consumo superior a 1100 mg de cálcio/dia reduzia o risco de desenvolver CCR em 25% (OR: 0,74; IC 95%: 0,62-0,88). No presente estudo, observámos uma redução de 40% no risco de desenvolver CCR para aqueles que consumiam mais do que 1029 mg de cálcio/dia.

O efeito protector dos antioxidantes na carcinogénese colo rectal foi demonstrado em alguns estudos (24,25), mas nem em todos (26). O mesmo se aplica para o efeito protector da fibra que foi observado neste estudo: os nossos resultados confirmam a maioria dos estudos de caso controlo (27,28), mas divergem dos resultados apresentados nos estudos prospectivos (29-31). Estas discrepâncias podem estar relacionadas com o facto das fontes alimentares desses nutrientes serem frutos e vegetais, e por isso a análise do efeito de um único nutriente poder ser ilusória. Esta hipótese é reforçada por uma revisão recente (5), na qual os autores observaram que o consumo de frutas e vegetais em conjunto exercia um maior efeito protector do que o consumo isolado de cada um desses alimentos.

Relativamente ao polimorfismo do gene *APC*, a percentagem de heterozigóticos, wild type, e homozigóticos para a variante era semelhante entre grupos caso e controlo, dados similares aos de 2 estudos já publicados (9,10). Este facto permite-nos concluir que o polimorfismo por si só não modifica o risco de desenvolver CCR. Alguns resultados interessantes foram observados no que respeita à interacção entre factores nutricionais e genéticos. Que seja do nosso conhecimento, apenas 2 estudos prévios examinaram a interacção entre este polimorfismo, nutrição, e risco de CCR (9,10). Slattery e colaboradores (9) observaram que indivíduos homozigóticos para a variante tinham menor risco se consumissem uma dieta com reduzido teor de gordura (OR: 0,2; IC 95%: 0,1-0,5). Num outro estudo, Menéndez e colaboradores (10) não observaram nenhuma interacção entre nutrientes e o alelo polimórfico. No presente estudo, observámos que uma elevada ingestão de colesterol resultava num maior risco de desenvolvimento de CCR apenas nos indivíduos homozigóticos para o alelo wild type (*DD*). Este efeito promotor não foi observado nos indivíduos com alelo polimórfico. Além disso, verificámos para os heterozigóticos e homozigóticos com alelo mutado que o consumo de fibra ou de cálcio era especialmente protector (OR: 0,50; IC 95%: 0,27-0,94; OR: 0,51; IC 95%: 0,28-0,93, respectivamente). Nenhum dos dois estudos anteriores encontrou alguma interacção significativa com qualquer nutriente para além da gordura.

Nesta altura apenas podemos especular sobre os possíveis mecanismos pelos quais a ingestão de gordura, cálcio, ou fibra poderá interagir com o polimorfismo do *APC* para

modificar o risco de desenvolver CCR. O APC codifica uma proteína multifuncional apesar da sua maior função supressora tumoral residir na capacidade de reduzir a expressão da  $\beta$ -catenina na via de sinalização WNT. Na presença de mutações truncantes do APC, a  $\beta$ -catenina não pode ser fosforilada; acumula-se no citoplasma, de onde é translocada para o núcleo, o que permite a activação de genes alvo da via WNT (32). Até à data, só duas variações missense do gene APC – as variantes I1307K e a E1317Q - foram associadas a um maior risco de CCR, no entanto esta associação mantém-se controversa (33). Embora as variantes missense no gene APC não sejam potencialmente patogénicas, até à data nada foi citado relativamente à variante D1822V. No entanto, não podemos excluir a possibilidade de a alteração deste aminoácido localizado entre o 4º e 5º domínio de regulação da  $\beta$ -catenina, poder induzir algumas alterações configuracionais na proteína APC, que poderá determinar uma redução da expressão da  $\beta$ -catenina ligeiramente menos eficiente. Supõe-se que a presença desta variante, não seja só por si suficiente para a iniciação do tumor; contudo, na presença de factores dietéticos promotores de cancro (ex. consumo elevado de gordura), poderá resultar numa maior produção de diacilglicerol. Elevadas concentrações de diacilglicerol promovem maior activação da proteína C cinase, que pode aumentar a activação da via WNT, promovendo assim o crescimento do tumor.

No presente estudo, também mostramos que os portadores do alelo mutado eram os que mais beneficiavam de uma elevada ingestão de cálcio. É sabido que a proteína APC também interage com a proteína transmembranar E-caderina, outra molécula de adesão celular (34). Porque a E-caderina é uma proteína cálcio-dependente, podemos especular que uma concentração elevada de cálcio pode reforçar as junções intercelulares, e assim inibir a transformação e o crescimento do tumor maligno. O mesmo foi observado em relação à ingestão de fibra. Um consumo elevado de fibra resultará numa maior concentração de butirato. O butirato é considerado a fonte primária de energia para os colonócitos, ao estimular o normal crescimento celular, e também inibe o desenvolvimento do tumor, essencialmente por promover a apoptose celular (35). Esses efeitos anti-proliferativos e pro-apoptóticos do consumo de fibra poderão de alguma forma ser amplificados pelo genótipo do polimorfismo D1822V.

Com a conclusão do Projecto do Genoma Humano, existem óptimas oportunidades para investigar o efeito da variação genética do hospedeiro na utilização e metabolismo de nutrientes. Que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado no Sul da Europa a revelar interacções positivas entre os já conhecidos factores dietéticos promotores e protectores da carcinogénese colo rectal e um polimorfismo do gene APC. O objectivo *major* desta área de investigação será o de criar conhecimentos precisos para sustentar um melhor aconselhamento ao nível da saúde pública no que respeita à ingestão dietética, uso de suplementos, e testes genéticos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Wilmink AB. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1997; 40(4): 483-93.
2. Campos FG, Waitzberg AGL, Kiss DR, Waitzberg DL, Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J. Diet and colorectal cancer: current evidence for aetiology and prevention. *Nutr Hosp* 2005;XX(1):18-25.
3. Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, Potter J, Ma K. Eating patterns and risk of colon cancer. *Am J Epidemiol* 1998;148(1):4-16.
4. Turner F, Smith G, Sachse C, Lightfoot T, Garner C, Wolf C, et al. Vegetable, fruit and meat consumption and potential risk modifying genes in relation to colorectal cancer. *Int J Cancer* 2004; 112(2):259-64.
5. Marques Vidal, Ravasco P, Camilo ME. Foodstuffs and colorectal cancer risk: a review. *Clinical Nut* 2006;25(1):14-36.
6. Willett Walter. Diet and cancer. An evolving picture. *JAMA* 2005;293(2);233-4.
7. Patterson RE, Eaton DL, Potter JD. The genetic revolution: change and challenge for the dietetics profession. *J Am Diet Assoc* 1999;99(11):1412-20.
8. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359(6392):235-7.
9. Slattery ML, Samowitz W, Ballard L, Schaffer D, Leppert M, Potter JD. A molecular variant of the APC gene at codon 1822: its association with diet, lifestyle, and risk of colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61(3):1000-4.
10. Menendez M, Gonzalez S, Blanco I, Guinó E, Peris M, Peinado MA, et al. Colorectal cancer risk and the APC D1822V variant. *Int J Cancer* 2004;112(1):161-63.
11. Lopes CM. Reprodutibilidade e validação do questionário semiquantitativo de frequência alimentar. In: Alimentação e Enfarte agudo do miocárdio: Estudo de caso-controlo de base comunitária. Tese de doutoramento. Porto 2000; 78-115.
12. Arroll B, Jackson R, Beaglehole. Validation of a three-month physical activity recall questionnaire with a seven-day food intake and physical activity diary. *Epidemiology* 1991;2(4):296-99.
13. Terry P, Ekbohm A, Lichtenstein P, Feychting M, Wolk A. Long-term tobacco smoking and colorectal cancer in a prospective cohort study. *Int J Cancer* 2001;91(4):585-7.
14. Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2001;10(7):725-31.
15. Eunyoung C, Smith Warner A, Ritz J, Brant P, Colditz G, Folsom A. Alcohol intake and colorectal cancer: A pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med* 2004;140(8):603-13.
16. Longnecker MP, Orza MJ, Adams ME, Chalmers TC. A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk colorectal cancer. *Cancer Causes Control* 1990;1(1):59-68.
17. Pedersen A, Johansen C, Gronbaek M. Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut* 2003;52(6):861-7.
18. Kune GA, Kune S, Watson LF. Body weight and physical activity as predictors of colorectal cancer risk. *Nutr Cancer* 1990;13(1-2):9-17.
19. Ford ES. Body Mass Index and colon cancer in a national sample of adult US men and women. *Am J Epidemiol* 1999;150(4):390-8.
20. Lin J, Zhang SM, Cook NR, Rexrode KM, Lee IM, Buring JE. Body mass index and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Causes Control* 2004;15(6):581-9.

21. Baron JA, Beach M, Mandel JS, Stolk RU, Haile RW, Sandler RS. Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. *N Engl J Med* 1999;340(2):101-7.
22. McCullough ML, Robertson AS, Rodriguez C, Jacobs EJ, Chao A, Carolyn J, et al. Calcium, vitamin D, dairy products, and risk of colorectal cancer in The Prevention Study II Nutrition Cohort (United States). *Cancer Causes Control* 2003;14(1):1-12.
23. Eunyoung C, Smith-Warner S, Spiegelman D, Beeson WL, Brandt P, Colditz G. Dairy foods, calcium, and colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 10 Cohort Studies. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(13):1015-22.
24. Benito E, Stiggelbout A, Bosch FX, Obrador A, Kaldor K, Mulet M, et al. Nutritional factors in colorectal cancer risk: A case-control study in Majorca. *Int J Cancer* 1991;49:161-7.
25. Murtaugh MA, Ma KN, Benson J, Curtin K, Caan B, Slattery ML. Antioxidants, carotenoids, and risk of rectal cancer. *Am J Epidemiol* 2004;159(1):32-41.
26. Slattery ML, Edwards SL, Anderson K, Caan B. Vitamin E and colon cancer: is there an association? *Nutr and Cancer* 1998;30(3):201-6.
27. Jansen MCJF, Bueno-de Mesquita HB, Buzina R, Fidanza F, Menotti A, Blackburn H, et al. Dietary fiber and plant foods in relation to colorectal cancer mortality: the seven countries study. *Int J Cancer* 1999; 81(2):174-79.
28. Howe GR, Benito E, Castelletto R, Cornée J, Esteve J, Gallagher R, et al. Dietary intake of fibre and decreased risk of cancer of the colon and rectum: evidence from the combined analyses of 13 case-control studies. *J Nat Cancer Inst* 1992; 84(24): 1887-96.
29. Terry P, Giovannucci E, Michels K, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, et al. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Nat Cancer Inst* 2001;93(7):525-33.
30. Mai V, Flood A, Peters U, Lacey JV, Schairer C, Scatzkin A. Dietary fibre and risk of colorectal cancer in the Breast Cancer Detection Demonstration Project (BCDDP) follow-up cohort. *Int J Epidemiol* 2003;32(2):239-43.
31. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DV, Stampfer MJ, Rosner B, et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Eng J Med* 1999; 340: 169-7679.
32. Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer* 2003;2(3):41.
33. Frayling IM, Beck NE, Ilyas M, Dove-Edwin I, Goodman P, Pack K, Bell JA, Williams CB, Hodgson SV, Thomas HJ, Talbot IC, Bodmer WF, Tomlinson IP: The APC variants 11307 K and E1317Q are associated with colorectal tumours, but not always with family history. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(18):10722-27.
34. Geiger B, Ayalon O. Cadherins. *Annu. Rev. Cell Biol* 1992;8:307-32.
35. Gaudier E, Jarry A, Blottière HM, Coppet P, Buisin PM, Aubert JP, et al. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287(6):G1168-74.

## Estudo 2

---

**O risco de cancro colo rectal associado ao polimorfismo C677T na 5,10-metilenotetrahidrofolato reductase depende, em doentes Portugueses, da ingestão de nutrientes dadores de grupos metilo.**

*Catarina Sousa Guerreiro, Bruno Carmona, Susana Gonçalves, Elisabete Carolino, Paulo Fidalgo, Miguel Brito, Carlos Nobre Leitão, e Marília Cravo*

---

Risk of colorectal cancer associated with the 677 polymorphism in 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients.

American Journal of Clinical Nutrition 2008;88(5):1413-8.

## RESUMO

**Introdução:** Os polimorfismos localizados em genes envolvidos no metabolismo do folato e alguns nutrientes relacionados com o metabolismo do grupo metilo estão implicados no cancro colo rectal (CCR).

**Objectivo:** Investigámos a associação de 3 polimorfismos genéticos *MTHFR* C677T (metilenotetrahidrofolato reductase), *MTR* A2756G (metionina sintase), e *SHMT* C1420T (serina hidroximetiltransferase) com a ingestão de nutrientes dadores de grupos metilo no risco de CCR.

**Metodologia:** A ingestão de nutrientes dadores de grupos metilo e os 3 polimorfismos foram estudados em indivíduos com CCR ( $n=196$ ) e controlos saudáveis ( $n=200$ ), com distribuição semelhante para a idade e género.

**Resultados:** Com excepção para a ingestão de folato, que foi significativamente inferior nos doentes ( $P = 0,02$ ), não se observaram diferenças entre os grupos na ingestão de outros nutrientes dadores de grupos metilo. O elevado consumo de folato ( $>406,7 \mu\text{g}/\text{dia}$ ) foi associado a um risco significativamente menor de CCR (odds ratio: 0,67; IC 95%: 0,45-0,99). O polimorfismo *MTR* A2756G não estava associado ao risco de desenvolver CCR. Em contraste, a homozigotia para a variante (TT) do *MTHFR* C677T, apresentou um risco 3 vezes superior de CCR (IC 95%: 1,3-6,7). Do mesmo modo, a homozigotia para o polimorfismo *SHMT* C1420T também revelou um aumento de 2,6 vezes no risco de desenvolver CCR (IC 95%: 1,1-5,9). Quando foram estudadas as interacções entre variáveis, o consumo reduzido de todos os nutrientes dadores de grupos metilo estava associado a um aumento de risco de CCR nos participantes homozigóticos para o polimorfismo *MTHFR* C677T, mas apenas foi observada uma interacção estatisticamente significativa no folato (odds ratio: 14,0; IC 95%: 1,8-108,5). Não se verificou nenhuma associação significativa com os polimorfismos *MTR* ou *SHMT*.

**Conclusão:** Estes resultados revelam uma associação entre a variante *MTHFR* C677T e a ingestão de folato no risco de CCR.

## INTRODUÇÃO

O cancro colo rectal (CCR) é uma patologia complexa que envolve múltiplos factores genéticos e nutricionais (1). No que se refere aos factores nutricionais, foi demonstrado que o folato desempenha um papel preventivo na carcinogénese colo rectal, provavelmente pelo seu envolvimento no processo de metilação e síntese de DNA (2). Outros nutrientes como a metionina, a vitamina B<sub>6</sub>, e a vitamina B<sub>12</sub>, que interagem metabolicamente com o folato neste processo, também poderão influenciar o risco de CCR (3). Nalguns desses estudos, a associação inversa observada entre os níveis de folato e o risco de CCR era modificada pelos polimorfismos genéticos das enzimas envolvidas no metabolismo do folato, em especial na metilenoetetrahidrofolato reductase (MTHFR). A frequente substituição C677T no gene *MTHFR*, que converte a alanina em valina, resulta numa enzima termo lábil com reduzida actividade (4). Vários estudos demonstraram que esta variante (TT) está associada a um risco diminuído de CCR, mas apenas quando o nível de folato está normal ou elevado. Tal como descrito por Crott e Mason (4), o polimorfismo da *MTHFR* é possivelmente o único polimorfismo genético conhecido que alterna entre ser factor de risco ou protector, dependendo dos níveis de nutrientes. Para além disso, porque o metabolismo do folato envolve a interacção de diferentes formas co-enzimáticas da vitamina em múltiplos ciclos, assim como mecanismos de feedback entre ciclos, é também importante estudar a influência conjunta que outros polimorfismos de genes envolvidos nestes ciclos possam exercer. A metionina sintetase requer, como co-factor, a presença de vitamina B<sub>12</sub>, na forma de metilcobalamina. Foi descrita uma variante neste gene, A2756G, que resulta na substituição do aspartato por glicina. São inconsistentes os resultados de estudos na neoplasia colo rectal; alguns revelam que o genótipo GG está associado a uma diminuição do risco de CCR (5,6), outros mostram um possível aumento no risco de adenomas colo rectais (7). Nestes estudos não foram analisadas associações com a dieta. A serina hidroximetiltransferase (SHMT) é uma enzima dependente da piridoxina (B<sub>6</sub>). Foi identificado um polimorfismo, o C1420T, que resulta da substituição do aminoácido leucina por fenilalanina. O significado funcional deste polimorfismo é ainda desconhecido. Apenas um único estudo avaliou a influência que este polimorfismo possa ter no risco de CCR, e nenhuma associação foi encontrada. Mais uma vez, não foi examinada a associação com a ingestão dietética (8). Por isso, o objectivo deste estudo caso-controlo foi avaliar o papel destes polimorfismos no risco de CCR tanto de forma isolada ou em associação com a ingestão de nutrientes específicos e outros genótipos.

## MÉTODOS E POPULAÇÃO

### População em estudo

Os participantes do estudo foram anteriormente descritos (9). De forma resumida, tratou-se de um estudo caso-controlo, realizado no Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil EPE. Este estudo foi aprovado pelo Comité Científico de Ética do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil EPE, e todos os doentes e controlos forneceram o seu consentimento informado por escrito para participarem no estudo.

O grupo de doentes incluiu 196 indivíduos com diagnóstico histológico de CCR [104

homens, 92 mulheres; idade (média  $\pm$  desvio padrão): 64,2  $\pm$  11,3 anos)], enquanto o grupo controlo incluiu 200 indivíduos saudáveis, dadores de sangue ou voluntários recrutados do mesmo Instituto, com distribuição semelhante por género e idade (106 homens, 94 mulheres; idade média: 62,2  $\pm$  12,1 anos), e sem história prévia de cancro em nenhuma localização. Não foi realizada colonoscopia aos controlos para excluir hipótese de CCR, mas nenhum indivíduo apresentava sintomas nem anemia. Dos casos, 169 dos 196 (86,5%) tinham um diagnóstico recente de CCR, e os restantes 27 (13,5%) estavam sob tratamento por recidiva da doença. No que diz respeito a terapêuticas anteriores, 119 dos 196 (60,7%) não tinham recebido nenhuma forma de tratamento, 28 dos 196 (14,3%) já tinham sido submetidos a cirurgia, 13 dos 196 (6,6%) tinham sido sujeitos a radioterapia pélvica, 11 dos 196 (5,6%) tinham sido submetidos a um ou mais ciclos de quimioterapia, e 25 dos 196 (12,8%) tinham sido sujeitos a uma combinação de tratamentos. Segundo a classificação Tumor – nódulos – metástases, os estádios eram: estágio I, 24 de 178 (13,5%); estágio II, 64 de 178 (35,9%); estágio III, 53 de 178 (29,8%); estágio IV, 37 de 178 (20,8%).

### **Avaliação da ingestão nutricional**

Para quantificação da ingestão de folato, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, glicina, metionina, serina, e álcool, foi utilizado o questionário de frequência alimentar validado para a população portuguesa (10). Foi solicitado aos participantes que recordassem os seus hábitos alimentares, no caso dos doentes relativamente ao ano anterior ao diagnóstico de CCR, ou no caso dos controlos relativamente ao ano anterior à entrevista. Imagens coloridas da maioria dos itens alimentares, revelando 3 porções diferentes, assim como medidas práticas de chávenas e colheres foram utilizadas para facilitar a quantificação da ingestão. O tipo e quantidade de alimentos ingeridos foram então analisados através da versão modificada da base de dados do SOFTWARE FOOD PROCESSOR, versão 7 (ESHA Research, Inc, Salem, OR) onde estão incluídos alguns itens de alimentos portugueses, o que permite a quantificação dos diferentes macro e micronutrientes. Os valores de nutrientes foram calculados a partir de alimentos e suplementos (11 dos 196 doentes e nenhum dos controlos tomavam suplementos). A actividade física no ano anterior ao diagnóstico de cancro, nos doentes, ou no ano anterior à entrevista, nos controlos, foi avaliada através do questionário de Arroll (11), que permitiu agrupar os indivíduos em 3 níveis diferentes: baixa (0), intermédia (1) e elevada (2). Os hábitos tabágicos foram avaliados pelo número de cigarros/dia.

### **Processo de Genotipagem**

Foram colhidas amostras de sangue total e armazenadas em cartões Cards Kit 3-mm. A extracção de DNA foi realizada utilizando Generation Capture Card Kit-DNA Purification, DNA Elution (Gentra Systems Inc, Minneapolis, MN). O polimorfismo GAC/GTC no codão 677 do gene *MTHFR* e o polimorfismo A2756G do gene *MTR* (5,10-metilenotetrahidrofolato reductase) foram genotipados utilizando Assays-by-Design TaqMan para análise de discriminação alélica (Applied Biosystems, Foster City, CA). O polimorfismo C1420T do gene *SHMT* foi genotipado com sondas TaqMan desenhadas com o software BEACON DESIGNER 5,0 (Premier Biosoft, Palo Alto, CA). Foram utilizadas sondas para o alelo C

(CAGAGGGAAGAGAGAGGCGAAGC), para o alelo T (CAGAGGGAAGAAAGAGGCGAAGC), para o primer forward (GAAAGAGTTCAAGGAGAGACT), e para o primer reverse (CTCCTTTAGAAGTCAGGCAG). A reacção em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com a mistura de: 4 µl de DNA genómico, 10 µl de Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de 20x assay mix e ddH<sub>2</sub>O até perfazer 20 µl de volume final. Foi usado o seguinte protocolo de amplificação: desnaturaçãõ a 95°C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturaçãõ a 92°C durante 15 s, e hibridaçãõ e extensãõ a 60°C durante 1 min. Todas as reacções foram realizadas no iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). Após PCR, o genótipo de cada amostra foi atribuído automaticamente pelo software do equipamento, através da medida da fluorescência específica de cada alelo.

Os indivíduos foram classificados em homozigóticos para a variante se possuísem 2 alelos mutados, heterozigóticos se possuísem apenas um alelo mutado, e por fim homozigóticos wildtype quando não tinham qualquer alelo mutado. Quando analisada a interacção entre as variáveis genéticas e nutricionais, foi utilizado o valor da mediana para cada nutriente. Para a maioria dos nutrientes, a percentagem de indivíduos (casos e controlos) que ingeriu a dose recomendada de ingestão foi superior a 80%, pelo que não utilizámos os valores da dose recomendada de ingestão mas sim da mediana de consumo.

### Métodos estatísticos

A análise estatística foi realizada através do software SPSS versão 15.0 para WINDOWS (SPSS Inc, Chicago, IL). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, como número (e percentagem) de indivíduos, ou como odds ratio (OR) com IC de 95%. A análise bivariada foi realizada utilizando o teste *t* de Student ou teste Mann-Whitney para variáveis contínuas, e o teste qui-quadrado para variáveis categóricas. Foi usada regressão logística múltipla para avaliar as variáveis relacionadas com o risco de CCR. A significância das interacções foi calculada através do teste likelihood ratio comparando o modelo de interacção com outro contendo apenas o efeito de 2 variáveis. O nível de significância foi estabelecido para um  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Características da população e estilos de vida

Ambos os grupos eram semelhantes na idade e género. Alguns doentes (23%) apresentaram história familiar positiva de CCR em primeiro ou segundo grau, contrastando com apenas 8% da população controlo ( $P < 0,001$ ; OR: 3,4; IC 95%: 1,85-6,29). Não foram identificadas diferenças nos hábitos tabágicos entre os grupos ( $P > 0,05$ ); mas os doentes, quando comparados com os controlos, apresentaram um índice de massa corporal significativamente inferior (em kg/m<sup>2</sup>: 25,6±4,2 comparado com 27,0±3,9,  $P = 0,01$ ) e eram significativamente menos activos ( $P = 0,001$ ). Contudo, o exercício de *per si* não influenciou o risco de desenvolver CCR (OR: 0,78; IC 95%: 0,53-1,1).

### Avaliação da ingestão nutricional

A ingestão nutricional diária de folato, vitamina B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub>, glicina, metionina, serina e álcool é apresentada no **Quadro 1**. Não se verificaram diferenças significativas entre casos e controlos, excepto no consumo de folato que foi significativamente inferior nos doentes ( $P=0,02$ ). Analisando o risco associado à ingestão deste nutriente, observámos um risco (OR) de 0,67 (IC 95%: 0,45-0,99) para os indivíduos com elevada ingestão de folato (> 406,7 µg/dia). O consumo de álcool foi superior nos doentes, mas a diferença não atingiu significado estatístico, uma vez que 35,2% dos doentes e 38,5% dos controlos não consumia qualquer tipo de bebida alcoólica. No entanto, se considerarmos apenas os consumidores de ambos os grupos, observámos que a ingestão média diária era significativamente superior nos doentes do que nos controlos: 38,8g/d vs 31,0 g/d, respectivamente (OR: 1,97; IC 95%: 1,19-3,26). Ao analisarmos a influência conjunta de 2 ou mais nutrientes na modulação do risco de CCR, não foi verificada nenhuma interacção entre variáveis, excepto para o elevado consumo de álcool que em combinação com baixa ingestão de folato, foi associado a um aumento marginal no risco de desenvolver CCR (OR: 1,47; IC 95%: 0,94-2,30;  $P=0,08$ ).

### Quadro 1

Ingestão nutricional diária dos participantes<sup>1</sup>

	Casos (n=196)	Controlos (n=200)	P	OR (IC 95%) <sup>2</sup>
Vitamina B <sub>6</sub> (mg/d)	2,83 ± 1,06 <sup>3</sup>	2,85 ± 0,98	NS	0,77 (0,50-1,14)
Vitamina B <sub>12</sub> (µg/d)	14,5 ± 9,1	14,3 ± 8,23	NS	0,98 (0,66-1,45)
Folato (µg /d)	401,6 ± 161,9	434,3 ± 161,3	0,02	0,67 (0,45-0,99)
Glicina (mg/d)	5,39 ± 2,8	5,10 ± 2,34	NS	1,00 (0,68-1,50)
Metionina (mg/d)	2,85 ± 1,28	2,78 ± 1,13	NS	0,99 (0,67-1,50)
Serina (mg/d)	5,15 ± 2,20	5,14 ± 1,95	NS	0,89 (0,59-1,30)
Álcool (g/d)	25,17 ± 39,8	19,14 ± 43,42	NS	1,08 (0,73-1,61)

<sup>1</sup> As diferenças em nutrientes foram determinadas utilizando o teste Mann-Whitney ajustado para idade, sexo e história familiar de cancro colo rectal. OR, odds ratio.

<sup>2</sup> O OR foi determinado utilizando valores acima e abaixo do valor da mediana de consumo. Os cut-offs utilizados foram: vitamina B<sub>6</sub>, 2,7mg; vitamina B<sub>12</sub>, 12,5µg; folato, 406,7µg; metionina, 2,58mg; serina, 4,86mg; glicina, 4,68mg; e álcool: 3,4g/d.

<sup>3</sup> média ± desvio padrão (para todos os valores).

### Genótipos dos Polimorfismos

As frequências dos genótipos dos polimorfismos encontram-se descritas no **Quadro 2**. Nos controlos, as distribuições dos genótipos encontravam-se em equilíbrio Hardy Weinberg com excepção para o polimorfismo *MTHFR* C677T. Nos controlos, as frequências das variantes alélicas dos genótipos *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G, e *SHMT* C1420T foram respectivamente 31,2%, 16,7%, e 26,5%, e nos casos 32,7%, 15,1% e 28,6%, respectivamente. O polimorfismo *MTR* A2756G *per se* não foi associado a um aumento do risco de CCR (Quadro 2). Pelo contrário, indivíduos homocigóticos para a variante *MTHFR* 677 (TT) apresentaram um risco 3 vezes superior de CCR (OR: 3,01; IC 95%: 1,3-6,7). Da mesma forma, a homocigotia para o polimorfismo *SHMT* C1420T revelou um risco 2,6 vezes

superior de desenvolver CCR (IC 95%: 1,1-5,9). Nenhuma das variantes alélicas dos três polimorfismos foi associada ao risco de CCR.

Analisando apenas o grupo de doentes, não verificámos nenhuma correlação entre o genótipo e sexo, localização do tumor (cólon ou recto), estadio da doença, ou história familiar de CCR. Também avaliámos a interacção dos 3 polimorfismos na modulação do risco de CCR. Para cada género não se observou haver interacção com os genótipos (dados não apresentados).

## Quadro 2

Frequências de genótipos e associações com risco de cancro colo rectal<sup>1</sup>

	Casos (n=196)	Controlos (n=200)	P <sup>2</sup>	OR (IC 95%) <sup>3</sup>
	% (n)	% (n)		
<i>MTHFR</i>				
CC/CT	86,7 (170)	95,5 (191)	0,002	1
TT	13,3 (26)	4,5 (9)		3,01 (1,3-6,7)
Alelo C	67,3 (264)	68,8 (275)	NS	1
Alelo T	32,7 (128)	31,2 (125)		1,07 (0,79-1,44)
<i>MTR</i>				
AA/AG	98,0 (192)	98,0 (196)	NS	1
GG	2,0 (4)	20,0 (4)		0,77 (0,18-3,3)
Alelo A	84,8 (333)	84,9 (339)	NS	1
Alelo G	15,1 (59)	16,7 (67)		0,90 (0,61-1,32)
<i>SHMT</i>				
CC/CT	90,0 (177)	95,5 (191)	0,04	1
TT	10,0 (19)	4,5 (9)		2,6 (1,1-5,9)
Alelo C	71,4 (280)	73,5 (294)	NS	1
Alelo T	28,6 (112)	26,5 (106)		1,11 (0,81-1,52)

<sup>1</sup>MTHFR, metilenoetetrahidrofolato reductase; MTR metionina sintetase; SHMT, serina hidroximetiltransferase; OR, odds ratio.

<sup>2</sup>Calculados com teste de qui-quadrado.

<sup>3</sup>O genótipo wild type/heterozigótico foi a categoria de referência para o cálculo do OR (regressão múltipla). OR foi ajustado para idade, sexo, e história de cancro colo rectal.

## Interacção entre dieta e polimorfismos

A interacção entre a ingestão de vários nutrientes dadores de grupos metilo e álcool, e do polimorfismo *MTHFR* C677T é apresentada no **Quadro 3**. Curiosamente, observámos que um consumo reduzido de todos os nutrientes dadores de grupos metilo estava associado a um aumento do risco de desenvolver CCR nos indivíduos TT, mas apenas foi observada uma interacção significativa para o folato (OR: 14,0; IC 95%: 1,8-108,5). A ingestão de álcool não mostrou nenhum efeito na modulação do risco. Relativamente aos polimorfismos *MTR* A2756G e *SHMT* C1420T não foram observadas interacções significativas com nenhum dos nutrientes estudados.

**Quadro 3**

Odds ratio (OR) do cancro colo rectal dependendo do genótipo *MTHFR* C677T (metilenotetrahidrofolato reductase) e a dieta<sup>1</sup>

	<i>MTHFR</i> C677T		<i>P</i> para a interacção
	CC/CT	TT	
Vitamina B <sub>6</sub>			
Elevado	0,83 (0,55-1,26) <sup>2</sup>	1,77 (0,67-4,68)	NS
Baixo	1	7,22 (1,6-32,6)	
Vitamina B <sub>12</sub>			
Elevado	1,01 (0,67-1,53)	2,71 (0,9-8,0)	NS
Baixo	1	3,95 (1,2-12,4)	
Folato			
Elevado	0,77 (0,51-1,17)	1,50 (0,59-3,8)	0,05
Baixo	1	14,0 (1,8-108,5)	
Glicina			
Elevado	1,1 (0,7-1,6)	2,0 (0,7-5,3)	NS
Baixo	1	8,2 (1,8-36,9)	
Metionina			
Elevado	1,1 (0,75-1,76)	2,1 (0,8-6,2)	NS
Baixo	1	5,9 (1,6-1,3)	
Serina			
Elevado	0,92 (0,6-1,4)	1,79 (0,63-5,14)	NS
Baixo	1	5,7 (1,6-20,4)	
Álcool			
Elevado	1,1 (0,72-1,6)	3,5 (1,1-11,3)	NS
Baixo	1	3,2 (1,1-9,5)	

<sup>1</sup>A combinação do genótipo wild type/heterozigotico (CC/CT) e baixo consumo foi a categoria de referência para o cálculo do OR (regressão múltipla). O OR foi ajustado para idade, sexo, história de cancro colo rectal e determinado utilizando os valores acima ou abaixo do valor mediano de consumo. Os cut-offs foram: vitamina B<sub>6</sub>, 2,7 mg; vitamina B<sub>12</sub>, 12,5µg; folato, 406,7µg; metionina, 2,58mg; serina, 4,86mg; glicina: 4,68mg e álcool: 3,4g/d.

<sup>2</sup>OR; IC 95% dentro de parêntesis (para todos os valores).

**DISCUSSÃO**

O presente estudo caso-controlo avaliou, numa população Portuguesa, o risco de CCR e a interacção entre a ingestão de folato e de outros nutrientes relacionados com o metabolismo do grupo metilo, e polimorfismos genéticos de enzimas do ciclo de metabolização do folato. Um número de estudos epidemiológicos, clínicos, e em animais realizados nas últimas 2 décadas sustentam a ideia de que baixos níveis de folato predispõem à carcinogénese colo rectal (12). Os mecanismos biológicos associados à depleção de folato e carcinogénese colo rectal incluem a alteração na síntese de nucleótidos, na metilação do DNA, ou em ambos, já que o folato é o intermediário principal para a maioria das reacções de metilação no metabolismo celular (2, 12-15).

Apesar da maioria dos estudos se focarem apenas no folato, existem outros nutrientes, como vitamina B<sub>6</sub> ou a vitamina B<sub>12</sub>, que são importantes co-enzimas necessárias à actividade de diferentes enzimas envolvidas nestes ciclos de metilação, como a MTR ou SHMT, ou certos aminoácidos essenciais e não essenciais que desempenham igualmente importantes funções no ciclo da metilação do DNA. Por estas razões, no presente estudo avaliámos a influência destes nutrientes relacionados com o metabolismo do grupo metilo de forma isolada e também em interacção com as enzimas do ciclo da metabolização do folato, *MTHFR*, *MTR*, e *SHMT*, no risco de CCR.

Os nossos dados revelam que, excepto para o folato, nenhum dos outros nutrientes que analisámos de forma isolada ou conjuntamente, influenciou o risco de CCR. Para o folato, observámos que uma ingestão superior a 406,7 µg/dia reduzia o risco de CCR em mais de 30% (OR: 0,67; IC 95%: 0,45-0,99). Estes resultados estão de acordo com a maioria dos estudos epidemiológicos prospectivos publicados (16,17), apesar de recentemente ter sido levantada a hipótese de um consumo elevado de folato, nos indivíduos possuidores de lesões premalignas, adenomas colorectais por exemplo, poder na realidade aumentar o risco de CCR (7,18). Contudo, gostaríamos de destacar que este aumento no risco de CCR é observado quando são utilizadas doses farmacológicas de ácido fólico (a forma sintética de folato, com melhor biodisponibilidade) e não com a ingestão de apenas folato dietético. No que respeita à influência que os polimorfismos exercem no risco de CCR, o polimorfismo C677T do gene da *MTHFR* é provavelmente o mais estudado, mas a sua relação com o CCR mantém-se incerta. A presença desta variante polimórfica (TT) revelou reduzir *in vitro* a actividade da enzima a 30% (19), o que pode resultar numa redução significativa da metilação do DNA nos indivíduos TT em comparação com os indivíduos CC e CT (20).

Contrariamente à maioria dos estudos previamente publicados que revelam uma redução de 50% no risco de CCR nos indivíduos detentores do genótipo TT, nós observámos que o genótipo TT estava associado a um aumento no risco CCR (OR: 3,01; IC 95%: 1,3-6,7). No entanto, uma análise crítica aos estudos anteriormente publicados sugere que o efeito protector do genótipo TT parece estar fortemente dependente do consumo de folato. Assim, nos primeiros estudos realizados nos países da América do Norte, Chen e colaboradores (21) verificaram que o genótipo TT poderia mesmo aumentar o risco de CCR em homens com um elevado consumo de álcool (OR: 1,56; IC 95%: 0,65-3,81). O álcool é um conhecido antagonista do metabolismo do folato, e de forma semelhante à depleção de folato, foi demonstrado que um abuso crónico de álcool resulta numa hipometilação do DNA (22). Num estudo posterior, Ma e colaboradores (23), revelaram que o genótipo TT conferia um efeito protector no risco de CCR, mas apenas nos indivíduos com um consumo elevado de folato. Nos homens com consumo reduzido de folato, o genótipo TT estava na verdade associado a um aumento do risco de desenvolver CCR (OR: 1,33; IC 95%: 0,34-5,17). Destaca-se que todos os estudos desde então realizados na América do Norte (que inequivocamente revelam um efeito protector do genótipo TT) foram efectuados depois da política legislativa de fortificação dos cereais com ácido fólico. Finalmente, é preciso ter em conta que até 35-50% dos adultos americanos consomem regularmente suplementos vitamínicos, a maioria dos quais fornecem 400 µg de ácido fólico por comprimido. Todas as considerações acima mencionadas, são possíveis explicações para o facto de todos os estudos realizados nos EUA desde 1998-2000, que examinam o efeito do polimorfismo *MTHFR* C677T, observarem um efeito protector do genótipo TT, porque a ingestão de folato era elevada na grande maioria, se não mesmo em todos os indivíduos (23,24). No estudo publicado por Le Marchand e colaboradores (25) os autores observaram um consumo total de folato entre 500 e 600 µg/dia, enquanto no presente estudo observámos um consumo perto dos 400µg/dia. Esta diferença de consumo, poderá ser uma explicação plausível, para a divergência de resultados obtidos em estudos oriundos da Europa (26-28), México (29), ou mesmo da

Austrália (30), onde o genótipo TT foi na realidade associado a um risco aumentado de CCR. A fortificação não foi implementada nem na Europa nem na Austrália; é por isso muito provável que os níveis de folato sejam substancialmente mais baixos do que em países onde a fortificação já foi implementada. A sustentar esta hipótese, quando analisámos a interacção entre a ingestão de folato e o polimorfismo da *MTHFR*, observámos que um consumo reduzido de folato era especialmente deletério nos indivíduos TT (OR: 14,0; IC 95%: 1,8-108,5). A razão para não termos observado um efeito protector do folato nos indivíduos TT, deve-se provavelmente ao facto de na nossa população o consumo de folato não alcançar os níveis necessários, para transformar o genótipo TT num factor protector.

No presente estudo avaliámos igualmente o efeito do recentemente descrito polimorfismo na *MTR*, o A2756G (31). Tal como nós, Ma e colaboradores (5) e Marchand e colaboradores (25) observaram que o polimorfismo do *MTR* não estava associado ao risco de CCR, nem se verificou interacção significativa com nenhum dos nutrientes dadores de grupos metilo analisados.

Finalmente, também estudámos o polimorfismo *SHMT1* C1420T. Que seja do nosso conhecimento, existe apenas um estudo até à data que examinou a relação entre o genótipo do *SHMT1* e o risco de CCR, não tendo sido observada qualquer interacção (7). Recentemente, Van den Donk e colaboradores (32) estudaram a relação entre este polimorfismo, dieta e adenomas colorectais e concluíram que o polimorfismo *SHMT1* C1420T não desempenhava qualquer papel na carcinogénese colo rectal. Uma das hipóteses para esta falta de interacção, segundo Chen e colaboradores (8), é que a *SHMT2* (outra isoforma da mesma enzima) poderá também fornecer o grupo carbono necessário para o metabolismo do folato. Nos nossos dados observámos que este polimorfismo estava associado a um aumento no risco de desenvolver CCR, no entanto o significado das nossas observações é limitada dado o reduzido número de indivíduos homozigóticos para a variante ( $n = 9$ ). Uma vez que a significado funcional deste polimorfismo não é ainda conhecido, e devido ao número reduzido de indivíduos homozigóticos, estes resultados necessitam de confirmação.

Em conclusão, o presente estudo demonstra que o polimorfismo *MTHFR* C677T modifica o risco de desenvolver CCR dependendo dos níveis de folato consumidos. Que seja do nosso conhecimento, a influência deste polimorfismo genético nunca foi examinado nos países da Europa do Sul, onde o consumo de folato, e outros nutrientes dadores de grupos metilo, bem como o de álcool é certamente diferente dos países do Norte da Europa ou da América. Uma vez que a politica de fortificação de ácido fólico nunca foi implementada no nosso País, e o consumo de suplementos vitamínicos não é frequente, é expectável que a nossa população apresente níveis relativamente baixos de ingestão folato. Esta é uma explicação plausível para o facto, de na nossa população, o genótipo TT estar associado a um risco aumentado de desenvolver CCR, particularmente nos indivíduos com baixa ingestão de folato (Quadro 3).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L, e cols. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in Americans and whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(12):1611-21.
2. Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002;132(8S): 2412S-2418S.
3. Kune G, Watson L. Colorectal Cancer Protective Effects and the Dietary Micronutrients Folate, Methionine, Vitamins B6, B12, C, E, Selenium, and Lycopene. *Nutrition and Cancer* 2006;56(1):11-21.
4. Crott J, Mason J. MTHFR polymorphisms and colorectal neoplasia. MTHFR polymorphisms and disease. Eds: Per Magne Ueland and Rima Rozen. Landes Bioscience, 2004.
5. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, e col. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(9):825-9.
6. Ulvik A, Vollset SE, Hansen S, Gislefoss R, Jellum E, Ueland PM. Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C -> T and methionine synthase 2756A -> G polymorphisms: a study of 2,168 case-control pairs from the JANUS Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(12):2175-80.
7. Luebeck EG, Moolgavkar SH, Liu AY, et al. Does folic acid supplementation prevent or promote colorectal cancer? Results from model-based predictions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(6): 1360-7.
8. Chen J, Kyte C, Valcin M, et al. Polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway, plasma folate levels and colorectal cancer in a prospective study. *Int J Cancer*. 2004; 110(4): 617-20.
9. Guerreiro CS, Cravo ML, Brito M, Vidal PM, Fidalgo PO, Leitão CN. The D1822V APC polymorphism interacts with fat, calcium, and fiber intakes in modulating the risk of colorectal cancer in Portuguese persons. *Am J Clin Nutr* 2007;85(6):1592-7.
10. Lopes CM. Reprodutibilidade e validação do questionário semi quantitativo de frequência alimentar. In: *Alimentação e Enfarte agudo do miocárdio: Estudo de caso-controlo de base comunitária*. PhD thesis. Porto 2000; 78-115.
11. Arroll B, Jackson R, Beaglehole. Validation of a three-month physical activity recall questionnaire with a seven-day food intake and physical activity diary. *Epidemiology* 1991;2(4):296-99.
12. Kim YI. Folate and carcinogenesis: Evidence, mechanisms and implications. *J Nut Biochem* 1999;10(2):66-85.
13. Fenech, M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2001;475(1-2):57-67.
14. Ames, BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2001;475:7-20.
15. Duthie, SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999;55(3):578-92.
16. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine, low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(4):265-73.

17. Su LJ, Arab L. Nutritional status of folate and colon cancer risk: evidence from NHANES I epidemiologic follow-up study. *Ann Epidemiol* 2001;11(1):65-72.
18. Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, Haggarty P, Selhub J, Dallal G, Rosenberg IH. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(7):1325-9.
19. Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genetics* 1995; 10(1):111-3
20. Friso S, Choi S, Girelli D, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(8):5606-11.
21. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56(21):4862-64.
22. Cravo, L. Glória, ME Camilo, M. Resende et al. DNA methylation and subclinical vitamin deficiency of folate, pyridoxal-phosphate and vitamin B12 in chronic alcoholics. *Clinical Nutrition* 1997;16:29-33.
23. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, et al. Methyltetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57(6):1098-102.
24. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999;8(6): 513-18.
25. Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Seifreid A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal cancer risk (United States). *Cancer Causes Control* 2002;13(3):239-48.
26. Ryan BM, Molloy AM, McManus R, Arfin Q, Kelleher D, Scott JM, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in colorectal cancer: role in tumour development and significance of allelic loss in tumor progression. *Int J Gastrointest Cancer* 2001;30(3):105-11.
27. Sachse C, Smith G, Wilkie M, Wilkie MJV, Barrett JH, Waxman R, et al. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2002;23(11):1839-50.
28. Plaschke J, Schwanebeck U, Pistorius S, Saeger HD, Schackert HK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of sporadic and hereditary colorectal cancer with or without microsatellite instability. *Cancer Lett* 2003;10;191(2):179-85.
29. Delgado-Enciso I, Martinez-Garza SG, Rojas-Martinez A, Ortiz-Lopes R, Bosques-Padilla F, Calderon-Garciduenase AL, et al. 677T mutation of MTHFR gene in adenomas and colorectal cancer in a population sample from the Northeastern Mexico. Preliminary results. *Rev Gastroenterol Mex* 2001;66(1): 32-7.
30. Shannon B, Gnasampanthan S, Beilby J, Lacopetta BA. Polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut* 2002;50(4):520-4.
31. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 17;95(6):3059-64.

32. Van den Donk M, Visker MH, Harryvan JL, Kok FJ, Kampman E. Dietary intake of B-vitamins, polymorphisms in thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase 1, and colorectal adenoma risk: a Dutch case-control study. *Cancer Lett.* 2007; 250(1):146-53.

### **Estudo 3**

---

#### **Uma Abordagem Global na Avaliação do Estado Nutricional de Doentes de Crohn na Era da Terapia Biológica: Um Estudo Caso-Controlo**

Catarina Sousa Guerreiro, Marília Cravo, Ana Raimundo Costa, Ana Miranda, Lourdes Tavares, Paula Moura-Santos, Pedro Marques-Vidal, e Carlos Nobre Leitão.

---

A Comprehensive Approach to Evaluate Nutritional Status in Crohn's Patients in the Era of Biologic Therapy: A Case- Control Study

American Journal of Gastroenterology 2007;102(11):255-56

## RESUMO

**Objectivos:** Avaliar o estado nutricional de doentes com doença de Crohn (DC) inactiva ou ligeira e identificar possíveis causas para potenciais deficiências.

**Métodos:** Foram avaliados 78 doentes com Crohn e 80 controlos saudáveis no que respeita ao estado nutricional, ingestão dietética e estilos de vida.

**Resultados:** Dos 78 doentes com DC, 73 estavam sujeitos a terapia imunomodulatória. O índice de massa corporal (IMC) era inferior nos doentes quando comparado com o dos controlos ( $P=0,006$ ), mas 32% dos doentes e 33,8% dos controlos apresentaram um IMC > 25, em cada grupo 8% e 23,8%, respectivamente, eram obesos (IMC > 30Kg/m<sup>2</sup>). A massa livre de gordura estava significativamente reduzida em ambos os géneros ( $P<0,05$ ), enquanto a massa gorda estava diminuída apenas nos homens ( $P=0,01$ ). Nos doentes com DC, a ingestão energética era significativamente inferior ( $P <0,0001$ ) e observámos uma ingestão média diária ajustada significativamente mais baixa de glícidos, gordura monoinsaturada, fibra, cálcio, e vitaminas C, D, E e K ( $P<0,05$ ). Dos doentes, 29% havia excluído da dieta habitual os cereais, 28% o leite, 18% os vegetais, e 11% a fruta. A exclusão de leite resultou numa ingestão significativamente mais baixa de cálcio e vitamina K ( $P<0,001$ ) e a exclusão de vegetais estava associada a uma reduzida ingestão de vitaminas C e E ( $P<0,05$ ). A actividade física era significativamente mais baixa nos doentes com DC ( $P=0,01$ ), e esta falta de exercício estava inversamente relacionada com o aumento da percentagem de massa gorda ( $r = -0,315$ ;  $P=0,001$ ).

**Conclusões:** Os resultados demonstram que o tipo de malnutrição mais prevalente nestes doentes com DC é um excesso de peso corporal, concomitante com uma ingestão dietética inadequada, nomeadamente de micronutrientes, claramente relacionada com a exclusão de determinados alimentos da dieta.

## INTRODUÇÃO

A doença inflamatória do intestino (DII) tem sido classicamente associada à desnutrição (1). As potenciais causas incluem a redução da ingestão alimentar, a malabsorção de determinados nutrientes, assim como o aumento de perdas através do trato gastrointestinal (2,3). Além disso, os corticosteróides, frequentemente utilizados no tratamento da DC, podem contribuir para a deterioração do estado nutricional (4-6).

Muitos dos estudos prévios que referem elevada incidência de desnutrição nos doentes com DII foram realizados nas décadas de 70 e 80, e focaram maioritariamente doentes hospitalizados com DC activa grave (7-9). Nestes doentes, a desnutrição era certamente agravada pelo intenso hipermetabolismo associado à resposta de fase aguda (10), sendo dada prioridade à síntese proteica. São provavelmente estas as razões pelas quais estudos recentes, que examinaram o estado nutricional de doentes com DC em remissão, revelaram uma prevalência de desnutrição substancialmente inferior em relação a estudos anteriores (11). Contudo, entre os estudos mais recentes existem ainda algumas discrepâncias, alguns revelam grandes diferenças entre doentes com DII e controlos (12), enquanto outros não (1, 11,13).

Outro aspecto que pode explicar algumas das divergências entre os vários estudos está relacionado com o facto da terapia da DC se ter alterado dramaticamente nas últimas décadas. A imunossupressão com azatioprina ou 6-mercaptopurina é actualmente uma prática comum em doentes cortico-dependentes ou em doentes que apresentem mais de duas exacerbações por ano (14). Esta prática não só evitará os efeitos deletérios da inflamação crónica no estado nutricional, como também efeitos derivados do uso crónico de corticosteróides (15,16). Mais importante, durante a última década a terapia biológica com anticorpos monoclonais contra TNF-alfa tem sido utilizada com crescente frequência em doentes com DC, o que pode modificar esse cenário de actividade da doença e desnutrição.

No presente estudo caso-controlo apenas foram incluídos doentes com DC não hospitalizados com actividade da doença ligeira a moderada. O nosso objectivo foi avaliar o estado nutricional, incluindo a composição corporal e a ingestão nutricional, e identificar possíveis causas para potenciais deficiências, incluindo alterações recentes nos hábitos alimentares.

## METODOLOGIA

### População

O protocolo do estudo foi aprovado pelos Comitês Científico de Ética do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil (IPOFG) e do Hospital Universitário de Santa Maria, ambos na área de Lisboa. Todos os participantes deram o seu consentimento informado por escrito antes do início do estudo.

Setenta e oito doentes em ambulatório com um diagnóstico confirmado de DC (47F: 31M, idade média de  $40,4 \pm 14,1$  anos), seguidos na consulta externa de rotina entre o período de Setembro de 2004 a Março de 2005, foram solicitados a participar no estudo. O diagnóstico foi baseado em critérios previamente definidos (17) e a actividade da doença foi avaliada de acordo com o Índice de Harvey-Bradshaw (IHB) (18), calculado no momento da inclusão do

doente no estudo. Foram excluídos do presente estudo os doentes com um IHB>5 (N=5). As características dos doentes com DC encontram-se no Quadro 1. A maior parte dos doentes estava submetido a terapia com Azatioprina (N=59), ou Metotrexato (N=5) ou Infliximab (N=12). Destes últimos, 10 doentes encontravam-se também sob terapia com Azatioprina. Apenas 5 dos 78 doentes estavam medicados unicamente com preparações de 5-ASA. Nenhum dos doentes incluídos neste estudo estava ou tinha estado sob corticoterapia nos 3 meses anteriores. Nesses 3 meses, todos os doentes tinham mantido um peso corporal estável.

Oitenta dadores de sangue e voluntários saudáveis recrutados do IPOFG, com distribuição semelhante no género e idade (39F: 41M, idade média de  $41,5 \pm 12,6$  anos) e sem história prévia de DII, foram usados como grupo controlo.

Gestantes (N=1) e doentes com pacemakers (N=1) foram excluídos do estudo por constituírem contra-indicações à realização de análise de bioimpedância eléctrica.

## Métodos

Para a avaliação do estado nutricional foram utilizados os seguintes métodos:

- a. Composição corporal: A composição corporal foi avaliada através de medidas antropométricas e bioimpedância eléctrica (BIA). A altura foi medida ao milímetro utilizando um estadiómetro vertical de parede (SECA<sup>®</sup>, Hanover, Germany), enquanto o peso corporal foi medido através de uma balança electrónica de leitura digital (SECA<sup>®</sup>, Hanover, Germany), com uma precisão de 0,1 kg. O IMC foi calculado utilizando o peso e a altura ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). A prega cutânea tricípital (PCT) foi medida com um lipocalibrador (JAMAR 12 1110J<sup>®</sup>, Preston, MI). As percentagens de massa gorda (%MG) e de massa livre de gordura (%MLG) foram determinadas pela utilização de BIA (Bodystat Quadscan 4000<sup>®</sup>, Tampa, FL, Filadélfia, PA).
- b. Avaliação subjectiva global (SGA): Foi utilizado um questionário de SGA para proceder a uma avaliação qualitativa do estado nutricional (19). Os doentes foram classificados como bem nutridos (A), moderadamente desnutridos (B) ou gravemente desnutridos (C).
- c. Ingestão dietética: A ingestão dietética foi avaliada através da utilização de um questionário semi-quantitativo de frequência alimentar, validado para a população Portuguesa (20), constituído por 86 itens alimentares, com 9 possíveis respostas relativamente à frequência média de consumo (nunca ou menos de 1 vez por mês até 6 ou mais vezes por dia); e com três hipóteses de resposta quanto à quantidade da porção (menor, igual ou maior que a porção média). A ingestão dietética foi analisada numa base de dados modificada do software Food Processor Plus, versão 7 (ESHA Research, Inc, Salem, OR), que inclui alguns itens de alimentos Portugueses e permite a quantificação dos diferentes macro e micronutrientes. Aos doentes foi solicitado que descrevessem os seus hábitos alimentares durante o ano anterior à entrevista. Um total de 33/78 doentes estava a tomar suplementos vitamínicos: 13 tomavam folato (1mg/3 vezes/semana) e os outros 20 doentes tomavam suplementos multivitamínicos. Estes foram também consideradas no cálculo da ingestão. Foi também determinada a percentagem de indivíduos que atingiu a as DRI para os diferentes nutrientes. Os doentes foram também questionados

relativamente à exclusão específica e sistemática de alimentos após o diagnóstico da doença. Um alimento foi considerado excluído se o doente negasse a sua ingestão de forma habitual (menos de 3 vezes/ano).

- d. Actividade física: A actividade física foi avaliada através da aplicação do questionário de Arroll (21), que categorizou os indivíduos em três níveis diferentes de actividade: baixo (0), intermédio (1) e elevado (2). Para aumentar o poder estatístico e uma vez que a actividade física não foi avaliada em alguns doentes e controlos, considerámos a actividade física em dois níveis: sedentários versus intermédio/activo.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS® 12.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e como número de indivíduos e (percentagem). As comparações de dados quantitativos foram realizadas utilizando o teste t de Student e análise de variância (ANOVA), e o teste de qui-quadrado foi usado para comparação de dados categóricos; as relações bivariadas foram avaliadas através dos testes de correlação de Pearson ou Spearman. A significância estatística foi estabelecida para um nível de significância  $P < 0,05$ .

### **RESULTADOS**

O Quadro 2 revela os dados do estado nutricional e da composição corporal dos dois grupos em estudo.

De acordo com a SGA e o IMC, a desnutrição afectou 5% ou menos dos doentes com DC, e nenhum dos controlos. Embora o IMC médio tenha sido menor nos doentes com DC ( $P=0,01$ ), observámos que mais de 30% dos doentes e controlos tinham excesso de peso corporal ( $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ ) e que 8% e 24% em cada grupo, respectivamente, foram considerados obesos ( $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ ).

**Quadro 1. Características dos Doentes com DC\***

Anos de doença <sup>†</sup>	11,4 ± 8,6
Localização da doença	
Íleo % (N)	29,7 (22)
Cólon % (N)	14,9 (11)
Íleo + Cólon % (N)	55,4 (41)
Forma de apresentação	
Inflamatória % (N)	28,9 (22)
Estenosante % (N)	35,5 (27)
Fistulizante % (N)	35,5 (27)
Terapêuticas	
Corticoterapia prévia % (N)	76,6 (59)
Metotrexato % (N)	6,6 (5)
Azatioprina % (N)	77,6 (59)
Infliximab % (N)	15,6 (12)
Cirurgia prévia % (N)	46,8 (36)
Manifestações extra-intestinais % (N)	33,8 (26)
Hábitos tabágicos % (N)	34,2 (26)

\*N=78 doentes

†Média ± desvio padrão

Os dados relativos à composição corporal foram analisados separadamente por género. Nos homens observámos que tanto a %MG e a PCT, como a %MLG, foram significativamente inferiores nos casos, quando comparados com os controlos (Quadro 2). Pelo contrário, nas mulheres foram observadas diferenças significativas apenas na %MLG, com os doentes a apresentarem valores mais baixos que os controlos (Quadro 2).

**Quadro 2.** Caracterização do Estado Nutricional, Composição Corporal e Actividade Física\*

	Doentes de Crohn	Controlos	P
SGA % (N)			
A –	94,7 (72)	100 (80)	
B –	5,3 (4)	0	NS
C –	0	0	
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>†</sup>	24,7 ± 4,4	26,8 ± 5,0	0,01
Baixo peso % (N)	2,6 (2)	1,2 (1)	
Peso normal % (N)	57,3 (43)	41,3 (33)	
Excesso de peso % (N)	32 (24)	33,8 (27)	
Obesidade % (N)	8 (6)	23,8 (19)	
PCT (mm) <sup>2</sup>			
Homens	17,8 ± 8,5	28,0 ± 12,8	0,001
Mulheres	25,5 ± 8,9	27,6 ± 7,5	NS
BIA			
% MG <sup>‡</sup>			
Homens	19,3 ± 6,4	25,4 ± 11,2	0,01
Mulheres	27,8 ± 10,9	31,6 ± 7,6	NS
% MLG <sup>‡</sup>			
Homens	72,7 ± 13,4	81,8 ± 15,9	0,02
Mulheres	61,3 ± 11,5	67,3 ± 9,8	0,01
Actividade física <sup>‡</sup>			
Sedentários % (N)	60 (30)	33,8 (27)	0,003
Activos % (N)	40 (20)	66,2 (53)	

\* N=78 no grupo caso e N=80 no grupo controlo.

<sup>†</sup> Média ± desvio padrão.

<sup>‡</sup> Apenas 50 doentes com DC foram avaliados relativamente à actividade física.

Para o IMC, PCT, %MG, e %MLG, o valor de P resulta do teste t de student.

Para a actividade física, o valor de P resulta do teste de qui-quadrado.

NS = Não significativo.

Não foram encontradas correlações entre a composição corporal e a localização da doença, recessões intestinais anteriores, forma de apresentação da doença ou Índice Harvey Bradshaw. A percentagem de mulheres submetida a corticoterapia durante o ano anterior foi significativamente mais elevada do que a de homens ( $P=0,006$ ), e foi observada uma correlação positiva entre o uso de corticoterapia durante o ano anterior e o aumento da %MG ( $r=0,47$ ;  $P=0,001$ ).

Os níveis de actividade física foram também significativamente mais baixos nos doentes com DC do que nos controlos ( $P=0,01$ ), e esta falta de exercício estava também inversamente associada ao aumento da %MG ( $r= -0,315$ ;  $P=0,001$ ).

O estado nutricional foi também avaliado através da avaliação da ingestão dietética. No Quadro 3 encontra-se descrita a ingestão de macro e micronutrientes dos doentes e dos controlos. Uma vez que a ingestão energética foi significativamente inferior nos doentes com DC ( $P<0,0001$ ), a ingestão de macro e micronutrientes foi ajustada para a ingestão energética. Em comparação com os controlos, os doentes apresentaram uma ingestão diária média significativamente inferior de glícidos, gordura monoinsaturada, fibra, cálcio e vitaminas

C, D, E e K. Não foram encontradas diferenças significativas relativamente à ingestão de proteína, gordura total e polinsaturada, e ratio de ácidos gordos n-6/n-3.

**Quadro 3.** Ingestão Média Diária de Macro e Micronutrientes

	Doentes de Crohn	Controlos	P
Energia (kcal/d)	2225 ± 693	2932 ± 993	<0,001
Proteínas (g/d)	97,0 ± 36,1	124,5 ± 41,4	NS
Glícidos (g/d)	279,1 ± 106,6	336,8 ± 136,7	0,03
Gordura total (g/d)	81,6 ± 28	117,0 ± 46,8	NS
Gordura saturada (g/d)	26,4 ± 10,5	36,7 ± 17,2	NS
Gordura monoinsaturada (g/d)	35,9 ± 13,0	53,8 ± 23,3	0,02
Gordura polinsaturada (g/d)	12,6 ± 5,2	17,4 ± 6,7	NS
Fibra (g/d)	21,0 ± 10,5	32,2 ± 13,7	0,02
Açúcares simples (g/d)	127,8 ± 65,9	155,8 ± 84,4	NS
Cálcio (mg/d)	885 ± 401,6	1496,4 ± 676,9	<0,001
Selénio (mg/d)	143,5 ± 59,9	110,2 ± 51,5	NS
Vitamina A (µg/d)	645,5 ± 739,3	947,3 ± 861,8	NS
Vitamina C (mg/d)	107,8 ± 79,9	195,9 ± 109,4	<0,001
Vitamina D (µg/d)	3,3 ± 1,8	5,4 ± 3,1	0,002
Vitamina E (mg/d)	8,3 ± 3,6	13,7 ± 5,4	<0,001
Vitamina K (µg/d)	14,8 ± 13,1	25,7 ± 16,5	0,01
Ácidos gordos n-3 (g/d)	1,3 ± 0,5	1,7 ± 0,6	0,02
Ácidos gordos n-6 (g/d)	9,4 ± 4,1	13,6 ± 5,8	0,002
Ácidos gordos n-9 (g/d)	30,6 ± 11,4	47,6 ± 21,6	<0,001
Ratio n-6/n-3	7,4 ± 2,3	7,8 ± 2,1	NS

Os dados relativos à ingestão nutricional estão expressos como média ± desvio padrão.  
 Teste de análise univariada comparando casos e controlos, ajustados para IMC e calorias.  
 NS = Não significativo.

A ingestão nutricional foi também avaliada de acordo com a localização da doença (íleo, cólon, e íleo-cólon) ou idade do doente (inferior ou superior a 40 anos). Relativamente à ingestão de macronutrientes, observámos que a ingestão de proteínas e gordura saturada foi significativamente mais elevada ( $P=0,04$  e  $P=0,01$ , respectivamente) nos doentes com doença íleo-cólica em comparação com as outras localizações da doença. Também a ingestão de cálcio e vitamina K foi superior nos doentes com doença íleo-cólica ( $P=0,01$  e  $P<0,001$ , respectivamente). No que respeita às diferenças na ingestão de nutrientes de acordo com a idade, verificámos que os doentes com idade inferior a 40 anos consumiam mais gordura saturada ( $P=0,01$ ), mais fibra ( $P=0,03$ ), assim como mais vitamina A ( $P=0,04$ ) e mais vitamina D ( $P=0,02$ ).

Quanto às DRI's para micronutrientes, também observámos que os doentes com DC apresentavam uma dieta significativamente menos equilibrada no que respeita ao cálcio e vitaminas A, C, D e E, em comparação com os controlos (Quadro 4).

**Quadro 4.** Percentagem de Doentes que Atingiram as DRI\*

	Casos	Controlos	P <sup>†</sup>
Proteínas <sup>‡</sup> (N)	100 (78)	100 (80)	NS
Gordura total <sup>‡</sup> (N)	93,9 (73)	96,6 (78)	NS
Glícidos <sup>‡</sup> (N)	55 (44)	74,4 (58)	0,01
Fibra (N)	19,7 (15)	52,5 (38)	<0,001
Cálcio (N)	32,9 (25)	77,2 (61)	<0,001
Selénio (N)	7,7 (6)	100 (80)	0,01
Vitamina A (N)	26,9 (21)	50 (40)	0,003
Vitamina C (N)	60,3 (47)	92,4 (73)	<0,001
Vitamina D (N)	13,3 (10)	32,5 (26)	0,005
Vitamina E (N)	6,4 (5)	30,0 (24)	<0,001
Vitamina K (N)	0	0	NS

\*DDI – Dietary Reference Intake de acordo com idade e género – Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies, 2002.

<sup>‡</sup> Relativamente aos macronutrientes, a DRI é definida por um intervalo (Acceptable Macronutrient Distribution Range); assumiu-se que a DRI foi atingida se o limite mínimo do intervalo foi alcançado.

<sup>†</sup> O *P-value* foi obtido pelo teste de qui-quadrado.

NS = Não significativo.

Quando questionados acerca dos alimentos excluídos após o diagnóstico de DC, 29% dos doentes tinham excluído os cereais da sua dieta habitual, 28% o leite, 18% os vegetais, e 11% a fruta. Mais ainda, quando correlacionada a exclusão destes alimentos com a ingestão de nutrientes, observámos que a exclusão de leite estava associada a um consumo significativamente inferior de cálcio ( $1010,3 \pm 47,3\text{mg}$  vs  $695,3 \pm 70,9\text{ mg}$   $P<0,001$ ) e vitamina K ( $22,3 \pm 1,8\text{ mg}$  vs  $5,88 \pm 2,7\text{mg}$   $P<0,001$ ) e que a exclusão de vegetais estava associada a um menor consumo de vitamina C ( $121,2 \pm 10,1\text{mg}$  vs  $79,8 \pm 20,2\text{ mg}$ ;  $P=0,01$ ) e vitamina E ( $8,7 \pm 0,5\text{mg}$  vs  $8,2 \pm 0,9\text{mg}$   $P=0,04$ ).

Não foram encontradas diferenças na ingestão dietética relativamente à actividade da doença, recessões intestinais anteriores, e a presente medicação. Foram investigadas possíveis causas para o excesso de peso (ingestão dietética, localização da doença e/ou actividade física), mas não foram observadas associações significativas.

## DISCUSSÃO

No presente estudo observámos que, contrariamente ao que tem sido descrito em doentes com DC (13,16,22), a forma de malnutrição mais comum neste grupo de doentes foi um excesso de peso corporal ou mesmo obesidade. A desnutrição que tradicionalmente afecta mais de 50% destes doentes foi observada nesta amostra em menos de 5%. Vários factores podem explicar estas diferenças. Em estudos anteriores, os doentes incluídos estavam maioritariamente hospitalizados, com doença activa grave, nos quais o repouso intestinal era de extrema importância (7-9). Além disso, a maior parte dos doentes estaria sob terapêutica com elevada dosagem de corticosteróides orais ou IV com consequências negativas no estado nutricional (4,6).

Para evitar a interferência destas variáveis de confundimento, os estudos realizados durante a última década incluíram essencialmente doentes em remissão. Assim, em 1998

Capristo e colaboradores (12) realizaram um estudo que incluiu doentes com colite ulcerosa (CU) e com DC em remissão e verificaram que os últimos apresentavam peso corporal significativamente mais baixo do que os doentes com CU ou controlos, com menos %MG, mas sem diferenças na %MLG. Estes resultados diferem dos publicados por Geerling e colaboradores (1,13), que descreveram a não existência de diferenças significativas no peso ou IMC dos doentes com DC, em comparação aos doentes com CU e controlos, mas sim uma redução na %MG corporal nos doentes com DC do género masculino. No último destes estudos (13), os autores verificaram que apesar da ausência de sinais geralmente reconhecidos como indicadores de desnutrição, os doentes com DC apresentavam menos força e resistência nos músculos flexores. Mais tarde, Jahnsen e colaboradores (23) observaram essencialmente uma redução da %MLG nos doentes do género masculino, com preservação da %MG. Mais recentemente, Filippi e colaboradores (11) não encontraram quaisquer diferenças no que respeita à altura, peso corporal ou IMC de 54 doentes com DC em comparação com 25 controlos saudáveis, no entanto os doentes tinham significativamente menos MG, com tendência para um aumento na MLG.

No presente estudo, realizado em 78 doentes não hospitalizados com doença ligeira a moderada e 80 controlos com características demográficas semelhantes, observámos que o peso e o IMC foram mais baixos nos doentes. Os dados da composição corporal também diferiram entre doentes e controlos, e em concordância com outros estudos (13,23), estas diferenças foram específicas em função do género. A %MLG foi significativamente inferior em ambos os géneros, enquanto a %MG apenas estava reduzida nos homens. Podemos especular se estas diferenças estarão relacionadas com diferentes factores. Embora os estudos recentes tendam a incluir unicamente doentes em remissão, no estudo de Geerling (13), quase 50% dos doentes estudados tinha um CDAI (Crohns disease activity index) >150, o que indica que estes doentes apresentavam pelo menos algum grau de actividade de doença. Para além disso, alguns dos doentes estavam sob corticoterapia (13/32), e a maioria tinha sido já submetida a recessões intestinais apresentando síndrome do intestino curto (27/32). Todas estas variáveis obviamente influenciarão o peso corporal assim como a composição corporal.

É também de enfatizar que no presente estudo o tipo de malnutrição mais prevalente, observado tanto nos doentes como nos controlos, não foi a desnutrição, mas antes um excesso de peso corporal ou mesmo obesidade presente em mais de um terço dos indivíduos. Este facto foi já descrito num estudo publicado recentemente (24) e pode ser atribuído a diferentes factores. Em primeiro lugar, um grande número de estudos epidemiológicos demonstra que a obesidade atingiu proporções epidémicas ao longo das últimas décadas, principalmente no Mundo Ocidental (25,26). É também de realçar que no presente estudo a percentagem de indivíduos sedentários, não activos, foi significativamente mais elevada no grupo de doentes e, como seria de esperar, foi encontrada uma correlação inversa entre esta variável e o aumento da %MG. Consequentemente, considerando que este grupo de doentes se encontra num elevado risco de desenvolver excesso de peso, os médicos devem estar alerta e recomendar a prática de exercício físico de forma a evitar esta co-morbilidade. Adicionalmente, na era da terapia imunossupressiva e biológica, a

percentagem de doentes com doença activa crónica, para os quais uma reduzida dose de corticosteróides seria frequentemente prescrita de forma crónica, é actualmente uma minoria. Para além das reconhecidas complicações da obesidade, é crescente a evidência a sugerir a obesidade como um estado de inflamação crónica (27,28). Parece assim que, pelo menos em alguns doentes, a obesidade poderá estar associada a um reduzido grau de inflamação do tecido branco adiposo (TBA), resultado de uma activação crónica do sistema imunitário inato (29). Estudos recentes demonstraram que o TBA é caracterizado por um aumento da produção e secreção de uma variedade de moléculas inflamatórias, incluindo TNF-alfa e IL-6, que nestes doentes, podem contribuir para um aumento na actividade da doença (30). Embora neste estudo não tenha sido observada nenhuma correlação entre o IMC e a actividade da doença, seria interessante explorar, em estudos futuros com maior número de doentes e com doença activa e activa grave, se o excesso de peso poderá ser um factor de prognóstico negativo. A suportar esta hipótese, Hass e colaboradores no estudo recentemente publicado (24) observaram que os doentes com DC e IMC > 25 Kg/m<sup>2</sup> necessitavam de intervenção cirúrgica mais precoce e, possivelmente, de terapia médica mais agressiva.

Relativamente à ingestão de nutrientes, e em contraste com estudos anteriores que incluíram maioritariamente doentes com doença inactiva (11), neste estudo a ingestão de macronutrientes foi significativamente menor nos doentes do que nos controlos. De notar, que embora a ingestão de gordura total e gordura polinsaturada tenha sido semelhante em ambos os grupos, doentes e controlos, a ingestão de gordura monoinsaturada foi significativamente mais reduzida nos casos. Foram também observadas algumas diferenças de acordo com a localização da doença ou idade do doente, no entanto as razões para estas diferenças não são óbvias.

Tal como em estudos anteriores (11,31,32), a ingestão de micronutrientes, nomeadamente antioxidantes estava bastante diminuída nos doentes relativamente aos controlos. Quando tentámos clarificar as causas para esta ingestão diminuída, os nossos resultados indicaram que algumas destas deficiências estavam claramente relacionadas com a exclusão dietética de determinados alimentos. Depois do diagnóstico de DC, uma elevada proporção de doentes tende a evitar fibra, vegetais, e leite. Deste estudo, não podemos concluir se esta exclusão foi feita com base nas recomendações dos profissionais de saúde, ou se dependeu unicamente das crenças dos doentes. De facto, alguns médicos ainda prescrevem uma dieta com baixo teor de resíduos, principalmente durante os períodos de doença activa e, por isso, os doentes tendem a prolongar esta dieta por um período de tempo indeterminado. Mais importante, observámos uma relação directa entre a exclusão destes alimentos e a ingestão reduzida de certos nutrientes, nomeadamente entre a exclusão de leite e a ingestão reduzida de cálcio e vitamina K. Estes últimos são seguramente importantes na patogénese da doença óssea metabólica (33), uma condição frequentemente negligenciada neste grupo de doentes. Em concordância com Fillipi e colaboradores (11), consideramos que as dietas com baixo teor de resíduos devem ser evitadas durante longos períodos e que deve ser encorajado o consumo de frutas e vegetais. Por isso, acreditamos que é muito importante desmistificar determinadas ideias acerca das recomendações dietéticas nestes doentes, para as quais não existem

dados que suportem tais restrições e que certamente podem conduzir a deficiências nutricionais. Adicionalmente, tendo em conta a ingestão reduzida de determinados micronutrientes verificada no presente estudo, os suplementos multivitamínicos devem ser sistematicamente recomendados.

Em suma, os nossos dados encontram-se em concordância com estudos mais recentes (1,11-13,24), os quais demonstram que a prevalência de erros nutricionais observados em doentes com DC permanece elevada. Embora as alterações do estado nutricional observadas nos doentes com DC possam ser menos óbvias comparadas com estudos mais antigos, elas ainda existem pelo que é recomendado um elevado grau de alerta que permita que estas deficiências não passem despercebidas. De salientar, que também demonstrámos que o excesso de peso estava presente em mais de um terço dos doentes e que, de acordo com o que foi sugerido por um estudo anterior (24), o excesso de resposta inflamatória observada em doentes obesos pode afectar negativamente o decurso da doença de DC.

### **EM DESTAQUE**

#### **O QUE JÁ É CONHECIDO**

- A malnutrição é comum nos doentes com Doença de Crohn (DC).
- As dietas restritivas são frequentes nestes doentes.
- A terapia da DC influencia o estado nutricional.

#### **O QUE É NOVO**

- A forma de malnutrição mais prevalente nos doentes com DC é o excesso de peso corporal.
- O excesso de massa gorda está associado à toma recente de corticoesteróides e falta de actividade física.
- As alterações na composição corporal dependem do género.
- As alterações nos hábitos alimentares resultam em deficiências nutricionais específicas.
- Foram identificadas alterações no tipo de gordura ingerida entre casos e controlos.
- O excesso de resposta inflamatória nos doentes obesos pode afectar a doença.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Geerling B, Badart-Smook A, Stockbrügger RW, et al. Comprehensive nutritional status in recently diagnosed patients with inflammatory bowel disease compared with population controls. *Eur J Clin Nutr* 2000;54(6):514-21.
2. Campos FG, Waitzberg DL, Teixeira MG et al. Inflammatory bowel diseases. Principles of nutritional therapy. *Rev Hosp Clín Fac Med S. Paulo* 2002; 57(4):187-98.
3. Bannerman E, Davidson I, Conway C, et al. Altered subjective appetite parameters in Crohn's disease patients. *Clin Nutr* 2001;20(5):399-405.
4. Card T, West J, Hubbard R, et al. Hip fractures in patients with inflammatory bowel disease and their relationship to corticosteroid use: a population based cohort study. *Gut* 2004; 53(2): 251-55.
5. Natsui K, Tanaka K, Suda M, et al. High- dose glucocorticoid treatment induces rapid loss of trabecular bone mineral density and lean body mass. *Osteoporos Int* 2006;17(1):105-8.
6. Mingrone G, Benedetti G, Capristo E, et al. Twenty-four-hour energy balance in Crohn disease patients: metabolic implications of steroids treatment. *Am J Clin Nut* 1998;67(1): 118-23.
7. Harries AD, Heatley RV. Nutritional disturbances in Crohn's disease. *Postgrad Med J* 1983;59(697):690-7.
8. Fernandez-Banares F, Abad-Lacruz A, Xiol X, Gine JJ, et al. Vitamin status in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1989;84(7):744-8.
9. Fernandez-Banares F, Mingorance MD, Esteve M, et al. Serum zinc, copper, and selenium levels in inflammatory bowel disease: effect of total enteral nutrition on trace element status. *Am J Gastroenterol* 1990; 85(12):1584-9.
10. Gassull M. Nutrition and inflammatory bowel disease: Its relation to pathophysiology, outcome and therapy. *Dig Dis* 2003;21:220-27.
11. Filippi J; Al-Jaouni R, Wiroth JB, et al. Nutritional deficiencies in patients with Crohn's disease in remission. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(3): 185-91.
12. Capristo E, Addolorato G, Mingrone G, et al. Effect of disease localization on anthropometric and metabolic features of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1998;93(12):2411-9.
13. Geerling B, Badart-Smook A, Stockbrügger RW, et al. Comprehensive nutritional status in patients with long-standing Crohn disease currently in remission. *Am J Clin Nutr* 1998;67(5):919-26.
14. Carter MJ, Lobo AJ, Travis SPL. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004;53(5):v1-v16.
15. Campieri M. New corticoesteroids and new salicylates in inflammatory bowel disease: a critical appraisal. *Gut* 2002;50 Suppl:iii43-iii46.
16. Head K, Jurenka J. Inflammatory bowel disease. Part II: Crohn's disease – Pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 2004;9(4):360-89.
17. Lennard Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scan J Gastroenterol* 1989;24(suppl):2-6.
18. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* 1980;1(8167):514.
19. Detsky AS, Mclaughlin JR, Baker JP, et al. What is subjective global assessment of nutritional status? *JPEN* 1987;11(1):8-13.
20. Lopes CM. Reprodutibilidade e validação do questionário semiquantitativo de frequência alimentar. In: *Alimentação e Enfarte agudo do miocárdio: Estudo de caso-controlo de base comunitária*. Tese de doutoramento. Porto 2000: 78-115.
21. Arroll B, Jackson R, Beaglehole. Validation of a three-month physical activity recall questionnaire with a seven-day food intake and physical activity diary. *Epidemiology* 1991;2(4):296-99.

22. Jahnsen J, Falch JA, Mowinckel P, et al. Body composition in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2003;98(7):1556-62.
23. Jahnsen J, Falch JA, Mowinckel P, et al. Body composition in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2003;98(7):1556.
24. Hass D, Brensinger C, Lewis J, et al. The impact of increased body mass index on the clinical course of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4(4):482-8.
25. Van Dijk L, Otters HB, Schuit AJ. Moderately overweight and obese patients in general practice: a population based survey. *BMC Fam Pract* 2006;(7):43.
26. Jafar TH, Chaturvedi N, Pappas G. Prevalence of overweight and obesity and their association with hypertension and diabetes mellitus in an Indo-Asian population. *CMAJ* 2006;175(9):1071-7.
27. Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, et al. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg* 2004;14(5):589-600.
28. Canello R, Clement K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 2006;113(10):1141-7.
29. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006;17(1):4-12.
30. Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, et al. Inflammatory Process in Type 2 Diabetes: The Role of Cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1084:9-117.
31. Fernandez-Banares F, Cabre E, Gonzalez-Huix F, et al. Enteral nutrition as primary therapy in Crohn's disease. *Gut* 1994;35:S56-S59.
32. Duggan P, O'Brien M, Kiely M, et al. Vitamin K status in patients with Crohn's disease and relationship to bone turnover. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(11):2178-85.
33. Schoon EJ, Müller MCA, Vermeer C, et al. Low serum and bone vitamin K status in patients with longstanding Crohn's disease: another pathogenetic factor of osteoporosis in Crohn's disease? *Gut* 2001;48:473-77.

## **Estudo 4**

---

### **Ácidos Gordos e Polimorfismos da IL6 e TNF $\alpha$ : Um Exemplo de Nutrigenética na Doença de Crohn**

Catarina Sousa Guerreiro, Paula Ferreira, Lourdes Tavares, Paula Moura Santos, Manuela Neves, Miguel Brito, e Marília Cravo

---

Fatty Acids, IL6, and TNF $\alpha$  Polymorphisms: An Example of Nutrigenetics in Crohn's Disease

American Journal of Gastroenterology 2009;104(9):2241-49.

## RESUMO

**Objectivos:** O objectivo deste trabalho foi estudar a interacção entre polimorfismos genéticos (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) de citocinas pró e anti-inflamatórias e a ingestão de gordura no risco de desenvolver doença de Crohn (DC) e na modificação da actividade da doença.

**Métodos:** Foram analisados 7 SNPs nos genes interleucina 1 (IL1), factor de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), linfotóxina alfa (LT $\alpha$ ) e IL6 em 116 controlos e 99 doentes com DC. Foi avaliado o tipo de gordura consumida, e foi analisada a interacção entre os SNPs e a gordura da dieta na modulação da actividade da doença.

**Resultados:** Os indivíduos homocigóticos para o polimorfismo IL6-174G/C tinham um risco seis vezes superior de DC (odds ratio (OR)=6,1; intervalo de confiança 95% (IC 95%)= 1,9-19,4) enquanto o genótipo TT do polimorfismo TNF $\alpha$ -857C/T estava associado a doença mais activa (OR=10,4; IC 95%=1,1-94,1). Um consumo elevado de gordura total, saturada, e monoinsaturada, assim como um elevado rácio de ácidos gordos polinsaturados (AGPI) n-6/n-3 estavam associados a um fenótipo mais activo ( $P<0,05$ ). Para além disso, verificou-se uma interacção entre a ingestão de gordura e os polimorfismos, com o consumo elevado de gordura saturada e monoinsaturada a estarem associados à actividade da doença, principalmente nos indivíduos possuidores das variantes alélicas dos polimorfismos TNF $\alpha$ -857 (OR=6,0, IC95%= 1,4-26,2; OR=5,17; IC95%=1,4-19,2, respectivamente) e IL6-174 (OR=2,95; IC95%=1,0-9,1; OR=3,21; IC95%=1,0-10,4, respectivamente). Por fim, nos doentes com polimorfismo TNF $\alpha$ -857, um baixo consumo de AGPI n-3 e um rácio elevado n-6/n-3 estava associado a uma maior actividade da doença (OR=3,6; IC 95%=1,0-13,0; OR=5,92; IC 95%=1,3-26,5, respectivamente).

**Conclusão:** Estes resultados revelam que diferentes tipos de gordura poderão interagir com o genótipo de citocinas, modulando a actividade da doença.

## INTRODUÇÃO:

A doença de Crohn (DC) traduz uma situação inflamatória crónica, predominantemente caracterizada por uma resposta tipo T-helper 1, que resulta numa produção excessiva de citocinas pro-inflamatórias, como as interleucinas (IL) 6, IL8, e factor de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (1,2). Por esta razão, para o tratamento desta doença são alvo de investigação agentes capazes de reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Para além dos esteróides e outros imunossuppressores, e dos recentes agentes anti-TNF $\alpha$ , alguns estudos têm focado a manipulação nutricional da inflamação, nomeadamente através da administração dos ácidos gordos polinsaturados (AGPI) n-3. Diferentes fontes alimentares de gordura com diferentes perfis de ácidos gordos, parecem ter efeitos na expressão de diferentes citocinas (3). Em alguns estudos, nos quais o efeito anti-inflamatório do ácido gordo n-3 (óleo de peixe) foi examinado nos doentes com DC, têm sido observadas algumas discrepâncias (4,5). Quando Gassull e colaboradores (6) tentaram estudar o efeito do AGPI n-6 vs AGMI (ácidos gordos monoinsaturados) n-9, verificaram uma maior taxa de remissão nos doentes alimentados com AGPI n-6, ao contrário do que seria expectável. As razões para estas inconsistências não são óbvias, mas poderão resultar de respostas individuais diferentes devido a diferentes polimorfismos genéticos (7). De facto, para a DC mais de 10 *loci* de susceptibilidade genética foram identificados, os quais na presença de certos estímulos ambientais, nomeadamente estímulos nutricionais, podem promover respostas diferentes (8). Que seja do nosso conhecimento, nenhum estudo anterior tentou até à data examinar o efeito conjunto que génotipos e nutrientes podem exercer na susceptibilidade e actividade da DC.

O objectivo deste estudo foi investigar se os polimorfismos genéticos de citocinas pró e anti-inflamatórias estariam relacionados com a susceptibilidade ou actividade da DC. Estudámos igualmente se existiam algumas interacções entre estes polimorfismos de genes de citocinas e o tipo de gordura da dieta na modulação da actividade da DC.

## MÉTODOS

### População

O protocolo do estudo foi aprovado pelos Comités Científico de Ética do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil (IPOFG) e do Hospital Universitário de Santa Maria, ambos na área de Lisboa. Todos os participantes deram o seu consentimento informado por escrito antes do início do estudo.

Doentes com diagnóstico confirmado de DC, seguidos na consulta externa de rotina entre o período de Setembro de 2004 e Novembro de 2007, foram solicitados para participar no estudo. O diagnóstico foi baseado em critérios previamente definidos (9) e a actividade da doença foi avaliada de acordo com o Índice Harvey-Bradshaw (IHB) (10). Nenhum dos doentes tomava esteróides no momento do estudo e nenhum estava hospitalizado. Porque o nosso objectivo era o de explorar a associação entre a ingestão nutricional durante o último ano e a actividade da doença durante o mesmo período apenas foram incluídos doentes com doença ligeira a moderada. Uma vez que queríamos estudar esta relação com base num longo período de tempo, conduziria a um viés incluir doentes hospitalizados com doença

grave. De acordo com o IHB, 36/99 (36,4%) dos participantes tinham doença moderadamente activa com IHB  $\geq 4$ , enquanto os restantes 63 (63,6%) apresentavam doença inactiva. Os índices de actividade referem-se aos valores de pelos menos 3 das últimas consultas durante o período de 1 ano. Foram excluídos do estudo os participantes que no momento de inclusão apresentavam doença muito activa (IHB $>7$ ), ou com necessidade de toma de esteróides por via sistémica ( $n=7$ ). Todos os doentes tinham um peso estável nos últimos 3 meses anteriores ao estudo. Todos os participantes que preenchiam os critérios de inclusão e que foram convidados a participar no estudo, aceitaram e foram incluídos. Um total de 116 dadores de sangue ou voluntários do IPOFG, sem história prévia de doença inflamatória do intestino, constituíram um grupo controlo para estudo do genótipo. Apesar de os controlos serem ligeiramente mais velhos comparado com os doentes de DC ( $49,7 \pm 11,8$  vs.  $40,4 \pm 14,6$ ;  $P < 0,01$ ) a distribuição de género foi similar entre grupos.

### Ingestão dietética

A ingestão dietética foi avaliada através da utilização de um questionário semi-quantitativo de frequência alimentar (QFA), validado para a população Portuguesa (11), constituído por 86 itens alimentares, com 9 possíveis respostas relativamente à frequência média de consumo (nunca ou menos de 1 vez por mês até 6 ou mais vezes por dia), e com três hipóteses de resposta quanto à quantidade da porção (menor, igual ou maior que a porção média). A ingestão dietética foi analisada numa base de dados modificada do software Food Processor Plus, versão 7 (ESHA Research, Salem, OR), que inclui alguns itens de alimentos Portugueses e permite a quantificação dos diferentes macro e micronutrientes. Foi solicitado aos participantes que descrevessem os seus hábitos alimentares durante o ano anterior à entrevista. Na análise da interacção entre as variáveis genéticas e nutricionais, foi utilizado o valor da mediana uma vez que o consumo de gordura não apresentava uma distribuição normal. No nosso estudo, consumos abaixo ou acima da mediana foram definidos como baixo ou elevado.

### Processo de Genotipagem

Nos doentes com DC foram colhidas amostras de sangue total e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas; a extracção de DNA foi realizada com fenol-clorofórmio. Nos controlos a extracção de DNA do sangue total foi realizada utilizando Generation Capture Card Kit - DNA Purification/DNA Elution (Gentra Systems, Minneapolis, MN). Foram utilizadas as técnicas de PCR e Restriction Fragment Length Polymorphism para analisar os polimorfismos nos genes *IL1*, *TNF $\alpha$* , *LT $\alpha$*  e *IL6*. Para a solução de mistura a utilizar no PCR com um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  de solução tampão (Taq buffer +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$  10x), 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 2  $\mu\text{L}$  dNTPs (desoxinucleótido trifosfato; Fermentas, St Leon-Roth, Germany) (2 mM), 0,66  $\mu\text{L}$  de cada primer (6 $\mu\text{m}$ ), 0,1  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase, e 1-4  $\mu\text{L}$  de DNA variando conforme este tenha sido obtido da amostra sanguínea total ou através dos cartões Generation Capture Card Kit, e  $\text{H}_2\text{O}$  até obter o volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Os primers utilizados foram: *IL1 $\beta$ -511C/T*:(forward(F):5'-CCCAGCCAAGAAAGGTCAAT-3' e reverse (R):5'-GTGGGACAAAGTGGAAGACA-3'), para *IL1 $\beta$ +3,953C/T* (F:5'-

TCCCAGCTTCATCCCTACTG-3' e R:3'-TGGAGGTGGAGAGCTTTCAG-3'), para TNF $\alpha$ -857C/T (F:5'-GTCGAGTATGGGGACCCCGTTAA-3' e R:5'-TTTCATTCTGACCCGGAGAC-3'), para TNF $\alpha$ -308G/A (F:5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' e R:5'-AAAGTTGGGGACACACAAGC-3'), para LT $\alpha$ +252A/G (F:5'-GCTTCGTGCTTTGGACTACC-3' e R:5'-AAGGTGAGCAGAGGGAGACA-3'), e IL6-174G/C (F:5'-TGCACTTTTCCCCCTAGTTG-3' e R:5'-GCCTCAGACATCTCCAGTCC-3'). O IL1Ra é uma variação de repetições de DNA (VNTR) com 86 pares de bases. Para análise deste último, foi utilizado o seguinte protocolo de amplificação: desnaturação a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 45 s, hibridação a 60°C durante 30 s e extensão a 72°C durante 1 min, com uma extensão final a 72°C durante 10 min.

A mistura para Restriction Fragment Length Polymorphism, com um volume final de 30  $\mu$ L, consistiu em 3  $\mu$ L de solução tampão apropriada (10x) (New England Biolabs, Frankfurt, Germany), 0,5  $\mu$ L de *DdeI* (IL1 $\beta$  -511C/T), *NcoI* (TNF $\alpha$  -308G/A), *HincII* (TNF $\alpha$ -857C/T), *Hinfl* (LT $\alpha$ +252A/G) e *NlaIII* (IL6), 1  $\mu$ L de *BseYI* (LT $\alpha$ +80C/A) e 0,25  $\mu$ L de *TaqI* (IL1 $\beta$ +3,953C/T), 0,3  $\mu$ L de albumina de soro bovino (ASB) para enzimas específicas (*TaqI*, *HincII*, e *NlaIII*) e H<sub>2</sub>O até perfazer o volume final de 30  $\mu$ L. A reacção demorou 2 horas a 37°C em todos os polimorfismos, excepto no IL1 $\beta$  +3953C/T que foi realizado a 65°C. Após a digestão, o produto correu num gel a 4% e foram registados os genótipos de cada participante.

### Análise estatística

O tratamento estatístico foi realizado com recurso ao SPSS para Windows, versão 16,0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, número de participantes e (percentagem) ou como odds ratio (OR), e um intervalo confiança de 95% (IC 95%). A análise bivariada foi realizada recorrendo aos testes t de Student e Mann-Whitney para variáveis contínuas e teste de qui-quadrado para as variáveis categóricas. Foi utilizada regressão logística múltipla para estudar a associação entre variáveis relacionadas com actividade da doença.

O nível de significância estatístico estabelecido foi  $P < 0,05$ .

### RESULTADOS

As características dos 99 doentes com DC (60 mulheres, 39 homens, idade média 40,4 $\pm$ 14,6 anos) encontram-se descritas no **Quadro 1**. Apesar dos controlos serem ligeiramente mais velhos que os casos (49,7 $\pm$ 11,8 vs. 40,4 $\pm$ 14,6;  $P < 0,01$ ), a distribuição do género foi similar entre os grupos.

**Quadro 1. Características dos participantes<sup>a</sup>**

Idade	40,4±14,6
<i>Género</i>	
Masculino	39,3 (39)
Feminino	60,6 (60)
Anos de doença <sup>b</sup>	11,2±8,9
<i>Localização da doença</i>	
Íleon % (n)	29,3 (29)
Cólon % (n)	17,2 (17)
Íleon + Cólon % (n)	53,5 (53)
<i>Forma de apresentação</i>	
Inflamatória % (n)	27,3 (24)
Fistulizante % (n)	34,3 (34)
Estenosante % (n)	38,4 (38)
<i>Índice de Harvey-Bradshaw</i>	
IHB <4 % (n)	63,7 (63)
IHB ≥ 4 % (n)	36,3 (36)
<i>Medicação actual e anterior</i>	
Corticoterapia % (n)	80,8 (80)
Metotrexato % (n)	6,2 (6)
Azatioprina % (n)	78,4 (76)
Infliximab % (n)	1,0 (1)
Cirurgia prévia % (n)	49,5 (49)
<i>Manifestações extra-intestinais % (n)</i>	38,4 (38)
<i>Hábitos tabágicos % (n)</i>	14,2 (30)
<i>Percentagem de energia<sup>p</sup> proveniente de:</i>	
Gordura Total	32,9 ± 5,9
Gordura Polinsaturada	5,1 ± 2,5
Gordura Monoinsaturada	14,4 ± 5,9
Gordura Saturada	10,6 ± 3,5
Rácio AGPI n-6/n-3	7,7 ± 2,8

DC, Doença de Crohn; IHB, Índice Harvey-Bradshaw; AGPI, ácidos gordos polinsaturados.

<sup>a</sup>n=99 doentes. <sup>b</sup>Média ± desvio padrão.

O **Quadro 2** mostra os diferentes genótipos dos doentes e dos controlos. Excepto para os indivíduos homocigóticos para o polimorfismo *IL6-174G/C*, que apresentaram um risco seis vezes maior de DC (OR=6,1; IC 95%=1,9-19,4), quando comparado com os controlos, nenhum dos outros polimorfismos analisados teve influência no risco de desenvolver doença.

**Quadro 2. Risco de DC<sup>a</sup> de acordo com os polimorfismos**

	Casos % (n)	Controlos % (n)	P <sup>b</sup>	OR IC 95%
<i>IL6-174</i>				
GG	44,4 (44)	51,7 (60)		1
GC	37,4 (37)	44,8 (52)	0,002	0,97 (0,5-1,7)
CC	18,2 (18)	3,4 (4)		6,1 (1,9-19,4)
<i>TNF<math>\alpha</math>-857</i>				
CC	75,8 (75)	77,6 (90)		1
CT	18,1 (18)	20,7 (24)	NS	0,9 (0,5-1,8)
TT	6,1 (6)	1,7 (2)		3,6 (0,7-18,4)
<i>IL1Ra</i>				
AA	55,1 (55)	51,0 (59)		1
AB/AC/AD	32,1 (31)	40,2 (47)	NS	0,74 (0,3-1,4)
BB/CB	12,8 (13)	8,8 (10)		1,34 (0,5-3,6)
<i>IL1<math>\beta</math>+3,953</i>				
CC	48,7 (48)	42,2 (49)		1
CT	43,6 (43)	50,0 (58)	NS	0,75 (0,4-1,4)
TT	7,7 (8)	7,8 (9)		0,85 (0,3-2,7)
<i>IL1<math>\beta</math>-511</i>				
CC	47,4 (47)	48,0 (56)		1
CT	41,1 (41)	39,1 (45)	NS	1,10 (0,6-2,0)
TT	11,5 (11)	12,7 (15)		0,92 (0,4-18,4)
<i>TNF<math>\alpha</math>-308</i>				
GG	76,9 (76)	72,5 (84)		1
GA	23,1 (23)	25,5 (30)	NS	0,85 (0,5-1,8)
AA	0 (0)	2,0 (2)		0,01 (NS)
<i>LT<math>\alpha</math>+252</i>				
AA	62,8 (62)	56,1 (65)		1
AG	29,5 (29)	40,5 (47)	NS	0,65 (0,3-1,2)
GG	7,7 (8)	3,4 (4)		1,75 (0,5-6,5)

DC, Doença de Crohn; IC, intervalo de confiança; IL, interleucina; LT $\alpha$ , linfotóxina alfa; NS, não significativo; OR; odds ratio; TNF, factor de necrose tumoral.

<sup>a</sup>n=99 no grupo caso e n=116 no grupo controlo. <sup>b</sup>Os valores de P são resultado do teste de q-quadrado. O genótipo wild type foi a categoria de referência para o cálculo do OR (regressão múltipla). OR ajustado para idade e género.

No que respeita à actividade da doença, a amostra com DC foi estratificada em doença activa e doença inactiva, em função do IHB  $\geq 4$  ou  $<4$ , respectivamente. Ao comparar o consumo de gordura destes dois grupos de doentes, verificámos que estava associado a um maior risco de doença activa um consumo elevado de gordura total, saturada, e monoinsaturada (OR=2,56; IC 95%=1,1-6,0; OR=3,6; IC 95%=1,5-8,6; OR=3,3; IC 95%=1,4-7,9, respectivamente). Para além disto, os participantes com um elevado rácio n-6/n-3 apresentaram igualmente uma actividade de doença significativamente mais elevada (OR=2,3; IC 95%=1,0- 5,3) (**Quadro 3**).

**Quadro 3. Influência da ingestão de gordura<sup>a</sup> na actividade da doença<sup>b</sup>**

	Doença inactiva % (n)	Doença activa % (n)	P <sup>c</sup>	OR IC 95% <sup>d</sup>
<i>Gordura Total</i>				
Elevada	42,9 (27)	65,7 (23)	<0,01	2,56 (1,1-6,0)
Baixa	57,1 (36)	34,3 (12)		1
<i>Gordura Saturada</i>				
Elevada	41,3 (26)	71,4 (25)	<0,01	3,6 (1,5-8,6)
Baixa	58,7 (37)	28,6 (10)		1
<i>Gordura Monoinsaturada</i>				
Elevada	39,7 (25)	68,6 (24)	<0,01	3,3 (1,4-7,9)
Baixa	60,3 (38)	31,4 (11)		1
<i>Gordura Polinsaturada</i>				
Elevada	46 (29)	57,1 (20)	NS	1,6 (0,7-3,6)
Baixa	54 (34)	42,9 (15)		1
<i>Gordura Trans</i>				
Elevada	44,4 (28)	60 (21)		1,9 (0,8-4,3)
Baixa	55,6 (35)	40 (14)	NS	1
<i>AGPI n-3</i>				
Elevado	47,6 (30)	48,6 (17)	NS	1,0 (0,4-2,4)
Baixo	52,4 (33)	51,4 (18)		1
<i>AGPI n-6</i>				
Elevado	44,4 (28)	60 (21)	NS	1,9 (0,8-4,3)
Baixo	55,6 (35)	40 (14)		1
<i>Rácio n6/n3</i>				
Elevado	47,6 (30)	57,1 (20)	0,04	2,3 (1,0-5,3)
Baixo	52,4 (33)	42,9 (15)		1

DC, Doença de Crohn; IC, intervalo de confiança; NS, não significativo; OR; odds ratio; AGPI, ácido gordo polinsaturado.

<sup>a</sup> Elevado ou baixo consoante a ingestão foi superior ou inferior à mediana. <sup>b</sup> Definiu-se doença activa se Índice Harvey Bradshaw  $\geq 4$ . <sup>c</sup> Os valores de P são resultantes do teste de q-quadrado. <sup>d</sup> O OR foi ajustado para a idade e género.

Os cut offs foram: gordura total=76,7g; gordura saturada=24,7g; gordura monoinsaturada=33,3g, gordura polinsaturada=11,5g; gordura trans=0,7g; AGPI n-3 =1,2g; AGPI n-6 =7,6g, e n-6/n-3=7,3.

O **Quadro 4** descreve a associação entre os génotipos de genes de citocinas e a actividade de doença. Observámos que genótipo TT do *locus TNF $\alpha$ -857* foi o único polimorfismo associado a uma maior actividade da doença (OR=10,4; IC 95%=1,1-94,1). Nenhum dos outros polimorfismos genéticos analisados revelou qualquer associação com a actividade da doença.

**Quadro 4. Influência do genótipo dos polimorfismos na actividade da DC<sup>a</sup>**

	Doença inactiva % (n)	Doença activa % (n)	P <sup>b</sup>	OR
<i>IL6-174</i>				
GG	46,0 (29)	42,9 (15)		1
GC	38,1 (24)	34,3 (12)	NS	0,97 (0,4-2,5)
CC	15,9 (10)	22,9 (8)		1,55 (0,5-4,7)
<i>TNF<math>\alpha</math>-857</i>				
CC	79,4 (50)	68,6 (24)		1
CT	19,0 (12)	17,1 (6)	0,04	1,04 (0,3-3,1)
TT	1,6 (1)	14,3 (5)		10,4 (1,1-94,1)
<i>IL1Ra</i>				
AA	51,5 (51)	60,7 (70)		1
AB/AC/AD	36,4 (36)	25,0 (29)	NS	0,57 (0,2-1,7)
BB/CB	12,1 (12)	14,3 (17)		0,98 (0,2-4,0)
<i>IL1 -3953</i>				
CC	53,5 (53)	42,9 (50)		1
CT	38,4 (38)	50,0 (58)	NS	0,60 (0,6-4,2)
TT	8,1 (8)	7,1 (8)		1,1 (0,2-6,8)
<i>IL1<math>\beta</math>-511</i>				
CC	41,3 (41)	56,9 (66)		1
CT	46,5 (46)	32,8 (38)	NS	0,49 (0,2-1,3)
TT	12,2 (12)	10,3 (12)		0,63 (0,1-2,9)
<i>TNF<math>\alpha</math>-308</i>				
GG	77,8 (77)	75,0 (87)		1
GA	22,2 (22)	25,0 (29)	NS	1,15 (0,4-3,4)
AA	0	0		0
<i>LT<math>\alpha</math>+252</i>				
AA	63,6 (63)	61,2 (71)		1
AG	30,3 (30)	28,4 (33)	NS	0,97 (0,3-2,8)
GG	6,2 (6)	10,4 (12)		1,80 (0,3-10,0)

DC, Doença de Crohn; IL, interleucina; LT $\alpha$ , linfocina alfa; OR; odds ratio NS, não significativo; TNF, factor de necrose tumoral.

<sup>a</sup> Considerou-se doença activa se IHB $\geq$ 4. <sup>b</sup> Os valores de p são resultantes do teste q-quadrado. O genótipo *wild type* foi a categoria referência para o cálculo do Odds Ratio (regressão múltipla). O OR foi ajustado para idade e género

Uma vez que nenhum outro polimorfismo genético revelou associação significativa com a susceptibilidade à doença ou com a sua actividade, apenas os polimorfismos *TNF $\alpha$ -857C/T* e *IL6-174G/C* foram incluídos na análise das interações entre genótipo e ingestão de gordura (**Quadro 5**).

Quadro 5. Influência da gordura<sup>a</sup> e polimorfismos na actividade da doença<sup>b</sup>

	IL6-174		TNF $\alpha$ -857	
	Wild type (GG)	Com variante (GC/CC)	Wild type (CC)	Com variante (CT/TT)
<i>Gordura Total</i>				
Elevada	1,10 (0,3-3,7)	2,30 (0,8-6,9)	3,5 (0,9-13,9)	4,7 (1,0-21,4)
Baixa	1,0	0,40 (0,1-1,6)	1,0	3,8 (1,3-11,2)
<i>Gordura Saturada</i>				
Elevada	1,62 (0,5-5,7)	2,95 (1,0-9,1)	4,3 (1,0-19,0)	6,0 (1,4-26,2)
Baixa	1,0	0,36 (0,1-1,6)	1,0	5,7 (1,8-17,7)
<i>G. Monoinsaturada</i>				
Elevada	0,75 (1,2-2,9)	3,21 (1,0-10,4)	1,66 (0,3-7,9)	5,17 (1,4-19,2)
Baixa	1,0	2,46 (0,7-8,8)	1,0	3,26 (1,2-9,1)
<i>G. Polinsaturada</i>				
Elevada	0,82 (0,2-2,9)	1,56 (0,5-4,6)	1,39 (0,5-3,7)	2,86 (0,8-10,5)
Baixa	1,0	0,59 (0,2-2,0)	1,0	1,40 (0,3-5,8)
<i>Gordura Trans</i>				
Elevada	1,61 (0,5-5,7)	2,14 (0,6-7,3)	3,6 (0,9-14,4)	5,17 (1,4-19,2)
Baixa	1,0	1,0 (0,3-3,5)	1,0	3,26 (1,2-9,1)
<i>AGPI n-3</i>				
Elevado	0,54 (0,1-2,0)	1,1 (0,4-3,4)	1,64 (0,6-4,4)	1,16 (0,2-5,4)
Baixo	1,0	0,67 (0,2-2,1)	1,0	3,6 (1,0-13,0)
<i>AGPI n-6</i>				
Elevado	1,41 (0,4-4,9)	1,98 (0,6-6,3)	1,93 (0,7-5,2)	2,90 (0,8-10,3)
Baixo	1,0	0,84 (0,2-2,9)	1,0	1,93 (0,5-8,3)
<i>Rácio n-6/n-3</i>				
Elevado	1,75 (0,5-6,5)	2,33 (0,8-7,2)	1,6 (0,6-4,4)	5,92 (1,3-26,5)
Baixo	1,0	0,85 (0,3-2,6)	1,0	1,01 (0,3-3,8)

IL, interleucina; AGPI, ácidos gordos polinsaturados; TNF, factor de necrose tumoral.

<sup>a</sup> Elevado ou baixo refere-se a ingestão superior ou inferior à mediana. <sup>b</sup> Definiu-se doença activa se Índice Harvey Bradshaw $\geq$ 4.

Analisado por regressão múltipla. OR, ajustado para a idade e género, foi determinado utilizando os valores abaixo e acima da mediana de consumo. Os cut offs foram: gordura total=76,7g; gordura saturada=24,7g; gordura monoinsaturada=33,3g, gordura polinsaturada=11,5g; gordura trans=0,7g; AGPI n-3 =1,2g; AGPI n-6 =7,6g, e n-6/n-3=7,3. A combinação do genótipo IL6-174GG e TNF $\alpha$ -857CC e a ingestão reduzida foi considerada a categoria referência.

Todas as interacções revelaram um  $P > 0,05$ .

Observámos que um elevado consumo de gordura saturada e monoinsaturada, assim como um elevado rácio AGPI n-6/n-3 estavam associados a doença mais activa, em especial nos indivíduos portadores das variantes alélicas do polimorfismo *TNF $\alpha$ -857* (OR=6,0; IC 95%=1,4-26,2; OR=5,17; IC 95%=1,4-19,2; OR=5,92; IC 95%=1,3-26,5). Apesar de não atingir significado estatístico, já que o IC 95% inclui o valor 1,0 o que apenas revela uma forte tendência, observámos também uma associação entre o elevado consumo de gordura saturada e monoinsaturada e o polimorfismo *IL6-174* (OR=2,95; IC 95%=1,0-9,1; OR=3,21; IC 95%=1,0-10,4) e entre o consumo reduzido de AGPI n-3 e o alelo polimórfico do *TNF $\alpha$ -857* (OR=3,6; IC 95%=1,0-13,0). Não se verificaram quaisquer diferenças na pesquisa de relações entre o comportamento da doença, terapêuticas anteriores com esteroides, Azatioprina,

Metotrexato ou cirurgia, e os polimorfismos genéticos, ou o tipo e quantidade de gordura ingerida.

## DISCUSSÃO

Os factores ambientais e genéticos têm vindo a ser mais claramente aceites como factores importantes não só na determinação da susceptibilidade à DC como também no comportamento da doença e na resposta terapêutica (7). Neste estudo, avaliámos o efeito de alguns polimorfismos de citocinas pró e anti-inflamatórias na modificação da susceptibilidade para a DC e sua actividade. No que respeita à susceptibilidade da doença, observámos que os indivíduos homozigóticos para o polimorfismo *IL6-174G/C* apresentavam maior risco de desenvolver DC. Este é um novo achado, nunca antes observado por nenhum autor (12,13). Dados de estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que o genótipo GG (wild type) está associado a uma maior produção de IL6 comparado com os genótipos GC ou CC (14). A IL6 é uma citocina multifuncional que estimula a resposta hepática de fase aguda, assim como a diferenciação e activação dos macrófagos e células T (15). Contrariamente ao que poderia ser esperado, observámos um maior risco de DC nos indivíduos homozigóticos para este polimorfismo, mas não foi observada associação com a actividade da doença. Apesar da associação com o aumento da susceptibilidade à doença ser inesperada, é importante lembrar que embora o polimorfismo CC possa determinar uma reduzida produção de IL6, muitos outros polimorfismos estão localizados no mesmo gene e não foram analisados neste estudo embora possam modular a transcrição génica e influenciar a actividade da doença. Esta hipótese é suportada pelos achados de Terry e colaboradores (15), que analisaram o efeito do haplotipo promotor da IL6 na transcrição da IL6. Os autores concluíram que os polimorfismos não existem isolados, e que deverá ser a combinação de alterações de bases em vários locais que influenciam a transcrição do gene e a função da proteína.

No que respeita ao polimorfismo *TNF $\alpha$*  é interessante verificar que à semelhança de Peeters e colaboradores (16), embora o polimorfismo por nós estudado tenha sido outro, também verificámos que apesar de não aumentar a susceptibilidade para desenvolver doença, o polimorfismo *TNF $\alpha$ -857C/T* estava associado a um aumento de actividade da doença.

Mais interessantes foram as interacções observadas entre os factores genéticos e nutricionais. Na década de 80, O'Morain e colaboradores (17) foram os primeiros a referir que uma dieta elementar poderia ser tão eficaz quanto os esteróides na indução de remissão da DC. Os autores colocaram a hipótese de o mecanismo da acção deste tipo de nutrição entérica poder estar relacionado com a sua reduzida alergenicidade, uma vez que as proteínas eram fornecidas como dipeptidos ou aminoácidos. No entanto na década de 90, três meta-análises de estudos controlados e randomizados que comparavam esteróides e nutrição entérica não revelaram diferenças na resposta quando foram utilizadas dietas com aminoácidos vs dietas com proteína completa (18-20). De acordo com a hipótese de Gassull e colaboradores (6) o mecanismo pelo qual a nutrição entérica poderia promover a remissão da DC estaria relacionado com o teor de gordura da dieta (21,22). Para além da quantidade

de gordura, as diferenças no tipo de gordura parecem também ser importantes na modulação da inflamação do intestino (6).

Muitos dos estudos que avaliaram a ingestão de gordura exploraram o efeito anti-inflamatório dos ácidos gordos n-3. Estes ácidos gordos essenciais parecem ter importantes efeitos imunomodulatórios, mediados principalmente através da modulação da síntese de eicosanoídes, e também por alteração da fluidez da membrana celular, da transdução da sinalização celular, alteração do conteúdo bacteriano intra-luminal, bem como da expressão génica (23). Talvez a evidência mais convincente que os AGPI n-3 poderão ter um papel protector na doença inflamatória do intestino por oposição aos AGPI n-6, que predominam na dieta Ocidental, provem do estudo epidemiológico publicado por Shoda e colaboradores (24) no qual os autores referem a associação entre o aumento na incidência de DC e um aumento do consumo de gordura, especialmente de AGPI n-6, verificados nas últimas décadas. No mesmo ano, Belluzzi e colaboradores (25), num estudo clínico com doentes com DC, mostraram que a suplementação com cápsulas com um preparado de óleo de peixe era mais eficaz na manutenção da remissão da doença do que o placebo. Contudo, subsequentes estudos experimentais e clínicos examinaram o efeito anti-inflamatório dos ácidos gordos n-3 na doença inflamatória do intestino, em especial na DC, revelando resultados divergentes. Numa meta-análise recentemente publicada (26), os autores concluíram que os dados disponíveis são insuficientes para se delinear qualquer conclusão definitiva.

Em geral, os nossos resultados estão de acordo com outros estudos, já que um elevado consumo de gordura total, saturada, e monoinsaturada estava associado a doença mais activa. A relação entre gordura, em especial a saturada, e a inflamação não é nova. Tem sido descrito que uma dieta rica em gordura saturada, particularmente trans, aumenta a produção de monócitos de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, e de todas as citocinas pro-inflamatórias (27). Por oposição, um consumo elevado de AGPI, particularmente de n-3, têm mostrado diminuir os níveis circulantes de citocinas pro-inflamatórias (28).

No que respeita à gordura monoinsaturada é interessante observar que os nossos resultados apoiam o estudo desenvolvido por Gassull e colaboradores (6). Nesse estudo randomizado e controlado os autores estudaram os efeitos de uma dieta rica em n-6 vs. n-9 e uma terapia convencional com esteróides no tratamento da DC activa. O estudo foi interrompido prematuramente, pois os doentes submetidos a uma dieta com n-9 apresentaram uma taxa de resposta muito inferior ao verificado nos outros dois grupos, ao contrário do expectável. Que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em humanos que sustenta a observação de Gassull e colaboradores (6) que indicam que uma dieta rica em gordura monoinsaturada pode ser deletéria para doentes com DC, uma vez que essa dieta parece estar associada a um fenótipo mais activo.

Outra razão para as discrepâncias observadas relativamente ao efeito benéfico ou deletério de vários tipos de gordura na actividade da DC, poderá estar relacionada a polimorfismos de genes de citocinas. Assim, em concordância com o nosso estudo, Van Heel e colaboradores (29) revelaram que a presença de pelo menos uma cópia do alelo *TNF $\alpha$ -857C/T* estava associada a uma maior tendência para produzir mais TNF $\alpha$  na mucosa inflamada ao nível do cólon, promovendo aumento de inflamação. A apoiar este conceito,

Grimble e colaboradores (4) mostraram, num grupo de indivíduos saudáveis, que os diferentes genótipos do TNF $\alpha$  não estavam apenas associados a diferentes níveis de produção de TNF $\alpha$ , mas também a diferentes sensibilidades para o efeito anti-inflamatório do óleo de peixe. A capacidade do óleo de peixe em suprimir a produção de TNF $\alpha$  era mais elevada quando a produção basal desta citocina era também superior. Neste estudo também observámos que existia um sinergismo entre os polimorfismos estudados e os tipos de gordura ingerida. O efeito deletério da gordura saturada ou monoinsaturada foi ainda maior nos detentores dos alelos polimórficos dos genes TNF $\alpha$ -857C/T ou nos com IL6-174G/C. Para além disso o alelo polimórfico do TNF $\alpha$  agiu também como factor promotor na presença de uma dieta pobre em ácidos gordos n-3.

Uma limitação importante deste estudo refere-se ao viés da recordação associado ao uso do QFA, uma vez que a quantificação da ingestão alimentar no último ano pode não ser muito precisa. No entanto, num estudo recente (30) que teve como objectivo avaliar qual o método mais apropriado para quantificar a ingestão alimentar, em situações de interacção dieta-gene, os autores reconheceram que o registo múltiplo de 24 horas *recall* forneceria excelente informação sobre os hábitos dietéticos, porém reconhecem que seriam necessários vários dias de registo o que se tornaria economicamente insustentável. Concluem que, quando está disponível um QFA validado para a população, verdadeiro no nosso caso, o QFA continua a ser a ferramenta com melhor custo benefício.

Outra limitação do nosso estudo está relacionada com o reduzido número de doentes incluídos. No entanto, todos os nossos doentes têm um fenótipo bem caracterizado e uma avaliação extensa do ponto de vista nutricional (31), e que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar as interacções entre polimorfismos genéticos de citocinas pró e anti-inflamatórias e o tipo de gordura da dieta na modulação da actividade doença em doentes com DC. A compreensão desta interacção poderá explicar inconsistências na literatura e permitir recomendações nutricionais mais personalizadas nos doentes com DC.

## **EM DESTAQUE**

### **O QUE JÁ É CONHECIDO**

- Factores ambientais e factores genéticos são importantes na determinação não só da susceptibilidade para a doença de Crohn (DC) como também no comportamento da doença.
- Diferenças no tipo de gordura poderão ser importantes na modulação da inflamação intestinal.
- Ácidos gordos polinsaturados (AGPI) n-3 poderão ter papel protector na doença inflamatória intestinal em oposição aos AGPI n-6.

### **O QUE É NOVO**

- Indivíduos homocigóticos para o polimorfismo IL6-174G/C têm um aumento no risco de desenvolver DC.
- Uma dieta rica em gordura monoinsaturada parece estar associada a uma doença mais activa.

- Existe um sinergismo entre os polimorfismos e ingestão de gordura. O efeito deletério/promotor de um consumo elevado/baixo de gordura depende dos polimorfismos *TNF $\alpha$ -857C/T* e *IL6-174G/C*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Balding J, Livingstone W, Conroy J, et al. inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms. *Mediators of inflammation* 2004;13(3):181-7.
2. Koss K, Satsangi J, Fanning G, et al. Cytokine (TNF- $\alpha$ , LT- $\alpha$  and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes and Immunity* 2000; 1(3):185-90.
3. Sadeghi S, Wallace FA, Calder PC. Dietary lipids modify cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. *Immunology* 1999;96(3):404-10.
4. Grimble R, Howell W, Reilly G, et al. The ability of fish oil to suppress tumour necrosis factor  $\alpha$  production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumour necrosis factor  $\alpha$  production. *Am J Clin Nutr* 2002;76(2):454-9.
5. Markovic O, O'Reilly G, Fussell H, et al. Role of single nucleotide polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes in the relationship between serum lipids and inflammatory parameters, and the lipid-lowering effect of fish oil in healthy males. *Clin Nutr* 2004;23(5):1084-95.
6. Gassull MA, Fernandez- Banares F, Cabre E, et al. Fat composition may be a clue to explain the primary therapeutic effect of enteral nutrition in Crohn's disease: results of a double blind randomized multicentre European trial. *Gut* 2002;51(2):164-68.
7. Baumgart D, Carding D. Inflammatory bowel disease: Cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369(9573):1627-40.
8. Satsangi J, Morecroft J, Shah N, et al. Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 2003;17(1):3-18.
9. Lennard Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scan J Gastroenterol* 1989;24(suppl):2-6.
10. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* 1980;1(8167):514.
11. Lopes CM. Reprodutibilidade e validação do questionário semiquantitativo de frequência alimentar. In: *Alimentação e Enfarte agudo do miocárdio: Estudo de caso-controlo de base comunitária*. Tese de doutoramento. Porto 2000; 78-115.
12. Sawczenko A, Azooz O, Paraszczuk J, et al. Intestinal inflammation – induced growth retardation acts through IL-6 in rats and depends on 174 IL-6 G/C polymorphism in children. *PNAS* 2005;102(37):13260-65.
13. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102(7):1369-76.
14. Klein W, Tromm A, Griga T, et al. The polymorphism at position-174 of the IL-6 gene is not associated with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13(1):45-47.
15. Terry C, Loukaci A, Green F. Cooperative Influence of genetic polymorphism on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275(24):18132-44.
16. Peters EL, Franchimont D, Seidel L, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): Influence on disease behavior? *Clin Exp Immunol* 2000;119(1):64-68.
17. O'Morain, Segal AW, Levi A. Elemental diet as primary treatment of acute Crohn's disease: a controlled trial. *Brit Med J* 1984;288(23):1859-84.

18. Fernandez-Banares F, Cabre E, Esteves-Comas M, et al. How effective is enteral nutrition in inducing clinical remission in active crohn's disease. A meta-analysis of randomized clinical trials. *JPEN* 1995;19:356-63.
19. Griffiths AM, Ohlsson A, Sherman Pm, et al. Meta-analysis of enteral nutrition as a primary treatment of active Crohn disease. *Gastroenterology* 1995;108(4):1056-67.
20. Messori A, Trallori G, D'Albasio G, et al. Defined-formula diets versus steroids in the treatment of active Crohn's disease: a meta-analysis. *Scand J Gastroenterology* 1996; 31(3): 267-72.
21. Fernandez-Banares F, Cabré E, González-Huix F, et al. Enteral nutrition as primary therapy in Crohn's disease. *Gut* 1994;25:SS55-9.
22. Middleton SJ, Rucker JT, Kirby GA. Long-chain triglycerides reduce the efficacy of enteral feeds in patients with active Crohn Disease. *Clin Nut* 1995;14:229-36.
23. Teitelbaum JE, Walker WA. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. *J Nutr Biochem* 2001;12(1):21-32.
24. Shoda R, Metsueda K, Yamoto S, et al. Epidemiologic analysis of Crohns disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohns Disease in Japan. *Am J Clin Nut* 1996;63(5):741-5.
25. Belluzzi A, Bringole C, Campieri M, et al. Effects of an enteric coated fish oil preparation on relaps in Crohns disease. *New Eng J Med* 1996; 334(24):1557-60.
26. Mac Lean CH, Mojica W, Newberry SJ, et al. Systematic review of effects of n-3 fatty acids in inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nut* 2005;82:611-9.
27. Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nut* 2004;79(4):606-12.
28. Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, et al. Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation* 2003;108(2):155-60
29. Van Heel D, Udalova I, De Silva A. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF-KB transcription factors. *Hum Mol Genetics* 2002;11(11):1281-89.
30. Tucker KL. Assessment of usual dietary intake in population studies of gene-diet interaction. *Nut Metab Cardiovascular Dis* 2007;17(2):74-81.
31. Guerreiro CS, Cravo M, Costa AR, et al. A comprehensive approach to evaluate nutritional status in Crohn's Disease in the era of biologic therapy: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(11): 2551-6.



## **CAPÍTULO 3**

---



## I) DISCUSSÃO

Em todas as patologias que afectam o tracto gastrointestinal, nomeadamente o cancro do cólon e recto e a doença de Crohn, é muito importante o padrão alimentar e consequente ingestão nutricional (1). Reflexo disso é o elevado número de publicações existentes sobre esta temática que, embora com resultados discordantes, revelam associações entre o padrão alimentar e o risco e/ou comportamento destas doenças (2-7). Segundo alguns autores, a diferença de resultados encontrada na literatura resulta de múltiplas causas (8-10). Uma das mais referenciadas está relacionada com a componente genética do indivíduo, dado que a heterogeneidade genética das populações em estudo poderá justificar respostas diferentes a estímulos nutricionais idênticos (9,11). Com o conhecimento completo do genoma humano foi descoberto um novo leque de possibilidades para o estudo da potencial interacção entre factores ambientais, em particular a nutrição, e factores genéticos (12). O conhecimento do padrão alimentar e estado nutricional dos indivíduos, associado ao estudo do perfil genético, tem vindo a despoletar interesse na comunidade científica ao poder vir a possibilitar um aconselhamento nutricional mais personalizado (13).

O conjunto dos quatro artigos anteriormente apresentados permite dar a conhecer de forma mais pormenorizada o padrão e estado nutricional de duas populações distintas, com doenças distintas, que em comum afectam o tracto gastrointestinal. Nessas populações foram também estudados exemplos de nutrigenética cujos resultados, a serem confirmados, poderão a longo prazo permitir a realização de recomendações nutricionais mais individualizadas.

### **Cancro do cólon e recto**

A etiologia desta neoplasia tem sido amplamente estudada e sabe-se que nela estão implicados múltiplos factores, nomeadamente os nutricionais (14). Em Portugal existem até à data apenas dois estudos publicados que reconhecem os factores nutricionais como potenciadores ou protectores de CCR (4,5). Embora com pequenas diferenças, os resultados obtidos por esses autores são semelhantes aos por nós encontrados. No nosso estudo observámos que os nutrientes mais associados à protecção de CCR são os carotenos, vitamina C, vitamina E, folato, cálcio e fibra (15). Os nossos resultados sugerem que um consumo de fibra superior a 26 g/dia e um consumo de cálcio superior a 1030 mg/dia promovem uma redução no risco de CCR; também o consumo de vitamina C superior a 150 mg/dia e de carotenos superior a 870 µg/dia estavam associados a uma redução significativa no risco de CCR (15). Estes valores apontados como protectores coincidem ou estão muito próximos das DRI estabelecidas pela National Academy of Sciences, que traduzem a quantidade mínima necessária de nutrientes para assegurar as necessidades nutricionais de um indivíduo saudável (16). Verificámos pois a importância da ingestão das doses mínimas necessárias de nutrientes, sem qualquer necessidade acrescida. Porém, o consumo de nutrientes foi avaliado a partir da ingestão alimentar e devemos realçar a reduzida evidência que apoie a importância de um único nutriente específico a favor da importância dada ao

consumo de determinados alimentos como os frutos, legumes ou cereais, importantes veículos de vários nutrientes como vitamina C, fibra ou carotenos, todos reconhecidos como protectores para a carcinogénese colorectal (17). Ainda a respeito do padrão alimentar, os nossos dados revelam uma associação deletéria entre o consumo de álcool e o risco de CCR (15), tal como tem sido referenciado nalguma literatura (18).

Neste estudo foi igualmente avaliado o estado nutricional, sem o intuito de esclarecer a sua importância como potenciador ou protector de CCR, uma vez que a avaliação nutricional foi realizada já após o diagnóstico; o objectivo foi antes descrever o estado nutricional da amostra estudada. Segundo o IMC, o excesso de peso foi o estado nutricional mais prevalente nesta população: mais de 50% da amostra apresentou excesso de peso ou obesidade, existindo desnutrição em apenas 5% dos indivíduos (15). Chaves e colaboradores no seu recente estudo de numa população portuguesa de 457 doentes oncológicos, incluindo 61 doentes com CCR, observaram esta mesma tendência; segundo o IMC mais de 60% da amostra apresentava excesso de peso e menos de 5% desnutrição, e os factores que mais contribuíram para o desenvolvimento de desnutrição foram a idade dos doentes e duração da doença (19). O facto de mais de 2/3 da população por nós estudada (86%) ter um diagnóstico recente de CCR e mais de 60% não ter sido ainda sujeita a qualquer tipo de tratamento (cirurgia, quimio ou radioterapia), cujos danos no estado nutricional estão já documentados (20), pode justificar o facto de não termos verificado uma elevada percentagem de doentes desnutridos. Se por um lado a percentagem de indivíduos desnutridos foi reduzida, por outro a percentagem de indivíduos com excesso de peso e obesidade foi elevada; assim, a população por nós estudada segue a mesma tendência da população Portuguesa em geral (21). É ainda necessário realçar que a obesidade, é não só um factor de risco para o desenvolvimento de diferentes tumores, nomeadamente o CCR, mas está também associada a uma maior taxa de recidiva de cancro após tratamentos antineoplásicos e/ou cirurgia; e, uma vez instalado o tumor, a taxa de sobrevivência dos doentes obesos é menor quando comparada com doentes com peso adequado (22,23).

Além da análise da ingestão e estado nutricionais, pretendemos também estudar dois exemplos de nutrigenética no CCR. O primeiro (15) avaliou uma das variantes do gene *APC*, um importante supressor tumoral. O polimorfismo D1822V *APC* só por si não alterou a susceptibilidade de desenvolver CCR, tal como já verificado noutros estudos (24,25). Contudo com os nossos dados verificámos que nos indivíduos com um consumo alimentar rico em colesterol, a ausência deste polimorfismo aumentou o risco de CCR. Também para o cálcio e fibra, o efeito protector destes foi mais evidente nos indivíduos cujo genótipo apresentava a variante alélica (15). A confirmarem-se estes resultados, poderá ficar esclarecido um dos motivos pelo qual certos nutrientes parecem desempenhar funções protectoras em certas populações ao passo que esse efeito não é identificado noutras geneticamente diferentes. O segundo exemplo (26), bastante mais estudado pela comunidade científica, diz respeito a genes envolvidos no ciclo da metilação do DNA. Entre os polimorfismos por nós estudados, o polimorfismo C677T *MTHFR* foi aquele que revelou maior associação com o CCR; a presença da variante polimórfica estava associada a um menor risco de desenvolver CCR. Analisando os diferentes subgrupos da população, agrupados consoante o genótipo e o

padrão alimentar, apenas se verificou um maior risco de CCR nos indivíduos com a variante polimórfica e uma dieta com baixo teor de folato. Em resumo, no que respeita à interacção de factores alimentares e genéticos, os nossos resultados sugerem que indivíduos possuidores da variante do polimorfismo D1822V do gene *APC* estão mais protegidos para CCR caso consumam uma dieta com elevado teor de fibra ou de cálcio. Pelo contrário, se não possuírem essa variante, será importante que pratiquem uma dieta com baixo teor de colesterol, de modo a reduzir o risco de CCR (15). No caso de possuírem um genótipo com alelo mutado no C677T *MTHFR*, o elevado consumo de folato apresenta-se como protector para o CCR (26). Os nossos dados parecem assim revelar a existência de um maior ou menor risco de CCR em subgrupos da população geneticamente susceptíveis a determinado padrão alimentar.

### **Doença de Crohn**

Os dois estudos apresentados com enfoque na doença de Crohn tiveram como objectivos: descrever o padrão alimentar e estado nutricional dos doentes de Crohn (27), bem como estudar um exemplo de nutrigenética (28).

A maioria da população estudada apresentava DC com reduzida actividade, e todos os doentes se encontravam em ambulatório sem terapêutica com corticoesteroides. No que respeita ao estado nutricional, a forma mais prevalente de malnutrição foi o excesso de peso observado em mais de um terço dos doentes; contrariamente ao descrito na literatura (29), no nosso estudo a malnutrição por défice energético não foi muito prevalente, pelo contrário. No estudo da composição corporal observámos nos nossos doentes uma %MLG significativamente menor do que nos controlos, e no caso dos homens as diferenças na %MG eram também significativamente inferiores (27). A destacar que, de acordo com o que foi sugerido por Hass e colaboradores, o excesso de massa gorda pode conduzir a uma resposta inflamatória excessiva ao ser responsável pela produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias como a IL6, e com isso afectar negativamente o desenvolvimento da doença (30). Observámos também que o padrão alimentar dos doentes cumpria na generalidade as recomendações em macronutrientes, mas que o consumo de micronutrientes, nomeadamente antioxidantes, estava bastante diminuída. Esta inadequada ingestão de micronutrientes era consequência de exclusões alimentares, cuja causa não foi por nós estudada, mas é sabido que os doentes restringem frequentemente o consumo de certos alimentos pela sugestão de associação a agravamento da sintomatologia (31); além disso, alguns profissionais de saúde aconselham a realização de longos períodos de dietas restritivas com vista ao repouso intestinal (32). A evidência mostra no entanto que não existe qualquer associação entre a iniciação/activação da doença e o consumo de determinado nutriente/alimento (33). Fará parte do papel do profissional da área da Dietética e Nutrição esclarecer os doentes sobre as recomendações nutricionais a adoptar nas diferentes fases da doença. O doente deve compreender o importante papel da dieta na DC, para além de conhecer como minimizar a sintomatologia gastrointestinal, a dieta assume um papel fundamental na prevenção e correcção de carências nutricionais. Fornecer um aconselhamento dietético adequado,

promovendo assim o bom estado nutricional, ajuda a minimizar os efeitos negativos da reactivação da doença no estado nutricional dos doentes (34).

É consensual que tanto os factores genéticos como os ambientais são relevantes não apenas para a susceptibilidade à doença, como também para o perfil e actividade da própria doença (35). No presente estudo avaliámos o efeito de alguns polimorfismos de citocinas pró e anti-inflamatórias, e a sua relação com a dieta na actividade da doença (28). As citocinas são importantes mediadores inflamatórios, e alterações na sua produção como resultado da presença de polimorfismos genéticos poderão ter influência na resposta inflamatória e com isso influenciar o decurso da DC (36,37). Observámos que a presença do polimorfismo *IL6-174* aumenta o risco de DC enquanto o polimorfismo *TNF $\alpha$ -857* não influencia a susceptibilidade de desenvolver doença, mas sim de possuir uma doença mais activa. Mais uma vez neste estudo foi demonstrado haver sinergismo entre os polimorfismos e a dieta, em especial a gordura consumida. O efeito deletério da gordura saturada e monoinsaturada foi superior nos indivíduos detentores dos alelos polimórficos dos genes *TNF-857 $\alpha$*  e *IL6-174*, e pelo contrário uma dieta pobre em AGPI n-3 era mais deletéria nos indivíduos com o alelo polimórfico do *TNF $\alpha$ -857*.

Em resumo, apesar destas interessantes associações, o resultado de estudos como estes que publicámos, cujo objectivo principal foi avaliar a interacção dieta-gene (15,26,28), são na maioria das vezes limitados devido às interacções dinâmicas e evolutivas entre genes e ambiente (9,38,39). Só quando os mecanismos envolvidos na interacção gene-nutriente-doença estiverem esclarecidos poderá fazer sentido equacionar ferramentas para a personalização alimentar com base na componente genética (38).

Dos nossos estudos podemos destacar a importância da prática de uma dieta saudável, equilibrada nos diferentes macro e micronutrientes, da manutenção de adequado peso corporal e da prática de exercício físico regular em situações de CCR e de DC. Na abordagem à nutrigenética, os nossos resultados parecem revelar a importância dos factores nutricionais em indivíduos geneticamente susceptíveis, fazendo crer que nalguns subgrupos da população (geneticamente susceptíveis) a nutrição pode assumir um papel preponderante no risco de doença.

## II) CONSIDERAÇÕES FINAIS

Especula-se na comunidade científica se a aplicação e interpretação de *testes nutrigenéticos* permitirão num futuro mais ou menos próximo melhorar significativamente o tratamento de doenças (9). A capacidade de identificar a susceptibilidade genética individual para uma determinada doença fornece uma ferramenta eficaz na promoção da saúde de forma nunca antes possível (40); o interesse por esta temática tem vindo a ganhar relevo entre investigadores, indústria e o público em geral (41). A confirmarem-se alguns dos resultados já publicados, indicadores de que uma intervenção nutricional pode colmatar deficiências e potenciar atributos geneticamente delineados, várias questões a seguir enunciadas são colocadas à aplicação do aconselhamento nutrigenético (40,42-44). Sabendo

que em geral a maioria das doenças resulta da interacção de vários polimorfismos e diferentes factores ambientais que condicionam a sua evolução, fará sentido realizar aconselhamento nutricional com base no efeito de um ou outro polimorfismo? Será o conhecimento actual sobre nutrigenética suficiente para ajustar individualmente as recomendações nutricionais? Como se contornam as questões éticas associadas a um aconselhamento que tem por base o material genético? Como se garante que a informação é utilizada de uma forma social e moralmente correcta? Quem deverá ter acesso à informação? Deverão os testes genéticos estar directamente disponíveis ao consumidor? Estará o consumidor seguro? Como reagirão os consumidores à informação que lhes é facultada? Qual o custo/benefício associado ao estudo dos polimorfismos? Estas questões, na maioria ainda sem resposta, são alvo de estratégias internacionalmente desenvolvidas, como acontece com a Nutrigenomics for Dietitian Initiative, cujo intuito é aumentar o conhecimento genético dos profissionais de dietética e nutrição para que estes se tornem conhecedores credíveis e autónomos em nutrigenética (45). Para este fim, continuam a ser desenvolvidas várias iniciativas: a) plataformas de comunicação entre profissionais interessados na área que permitem a troca e partilha de conhecimento ou mesmo b) o desenvolvimento de instrumentos de trabalho que incidem na genética humana e sua relação com a dieta.

Para que no futuro a informação obtida pelos modelos nutrigenéticos possa ser efectivamente utilizada na promoção da saúde, Subbiah e colaboradores propõem algumas estratégias de actuação (39):

- Aumentar o conhecimento nutrigenético junto dos clínicos em especial os envolvidos em doenças crónicas;
- Aumentar conhecimento/treino ao nível da genómica, proteómica, metabolómica, e nutrigenómica/nutrigenética junto dos profissionais de dietética e nutrição e conselheiros genéticos;
- Acrescentar disciplinas que abordem estas temáticas nos planos de estudo de estudantes de medicina, de dietética e/ou nutrição e também de genética;
- Desenvolver guidelines de actuação e regulamentação no que respeita à certificação de testes nutrigenéticos e aspectos legais associados;
- Promover apoio financeiro para estudos de larga escala com intervenção nutrigenética.

Em conclusão, como qualquer outra ciência, a nutrigenética requer tempo, investigação e dedicação para a sua implementação. Só com sólidos conhecimentos baseados na evidência será possível promover a saúde e controlar a doença tendo por base ciências inovadoras como a nutrigenética (40,46)

É possível afirmar que a nutrição no século XXI se apresenta como um fascinante campo de investigação e aplicação, no qual diariamente surgem novos avanços no modo como percebemos a interacção entre estilos de vida, genótipo e a doença (47).

***“Do not expect benefits in the near future – nutrigenetics is very much an emerging field”***

(Susan Aldridge, 2007)

### III) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Planas M. Relationship between the bowel and clinical nutrition. *Nutrition Hospitalaria* 2007;22(2):1.
2. Marshall J. Prevention of Colorectal Cancer: Diet, Chemoprevention and Lifestyle. *Gastroenterology Clin North America* 2008;37(1):73-82.
3. Courtney ED, Melville DM, Leicester RJ. Review article: chemoprevention of colorectal cancer. *Alimentary Pharmacology Therapy* 2004;19(1):1-24.
4. Amaral T, Almeida M, Barros H. Diet and colorectal cancer in Portugal. *IARC Sci Publ* 2002;156:549-52.
5. Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Marques-Vidal P, Camilo E. Nutritional risks and colorectal cancer in a portuguese population. *Nutrition Hospitalaria*. 2005;10(3):165-72.
6. Ryan-Harshman M, Aldoori W. Diet and colorectal cancer. *Can Fam Physician* 2007;53(11):1913-20.
7. Pomar M, Casariego A, Fernandez A, Gómez J, Fondo A, Rodríguez I. Impacto de la nutrición en la evolución de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Nutrition Hospitalaria* 2010;25(2):181-92.
8. Kaput J, Ordovas JM, Ferguson L, van Ommen B, Rodriguez RL, Allen L, et al. The case for strategic international alliances to harness nutritional genomics for public and personal health. *Br J Nutr* 2005;94(5):623-32.
9. Ordovas J, Corella D. Nutritional Genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:71-118.
10. Cocozza S. Methodological aspects of the assessment of gene-nutrient interactions at the population level. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17(2):82-8.
11. Patterson RE, Eaton DL, Potter JD. The genetic revolution: change and challenge for the dietetics profession. *J Am Diet Assoc* 1999;99(11):1412-20.
12. Ferguson L. Nutrigenomics approaches to functional foods. *J Am Diet Assoc* 2009;109(3):452-58.
13. German JB, Watkins SM, Fay LB. Metabolomics in practice: emerging knowledge to guide future dietetic advice toward individualized health. *J Am Diet Assoc* 2005;105(9):1425-32.
14. Willet W. The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature* 1989;338(6214):389-93.
15. Guerreiro CS, Cravo ML, Brito M, Vidal PM, Fidalgo PO, Leitao CN. The D1822V APC polymorphism interacts with fat, calcium, and fiber intakes in modulating the risk of colorectal cancer in Portuguese persons. *Am J Clin Nutr* 2007;85(6):1592-7.
16. Food and Nutrition Board. Recommended intakes for individuals. In: Institute of Medicine, editor. Washington DC: National Academy Press; 2002.
17. Marques-Vidal P, Ravasco P, Ermelinda Camilo M. Foodstuffs and colorectal cancer risk: a review. *Clin Nutr* 2006;25(1):14-36.
18. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med* 2004;140(8):603-13.
19. Chaves M, Boleo-Tome C, Monteiro-Grillo I, Camilo M, Ravasco P. The diversity of nutritional status in cancer: new insights. *Oncologist* 2010;15(5):523-30.
20. Ravasco P. Aspects of taste and compliance in patients with cancer. *Eur J Oncol Nurs* 2005;9(2):S84-91.
21. Carmo I, Santos O, Camolas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, et al. Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obes Rev* 2008;9(1):11-9.

22. Meyerhardt JA, Catalano PJ, Haller DG, Mayer RJ, Benson AB, Macdonald JS, et al. Influence of body mass index on outcomes and treatment-related toxicity in patients with colon carcinoma. *Cancer* 2003;98(3):484-95.
23. Schlienger J, Luca F, Vinzio S, Pradignac A. Obesity and cancer. *Rev Med Interne* 2009;30(9):776-82.
24. Slattery M, Samowitz W, Ballard L, Schaffer D, Leppert M, Potter J. A molecular variant of the APC gene at codon 1822: its association with diet, lifestyle, and risk of colon cancer. *Cancer Res* 2001;61(3):1000-4.
25. Menendez M, Gonzalez S, Blanco I, Guinó E, Peris M, Peinado M, et al. Colorectal cancer risk and the APC D1822V variant. *Int J Cancer* 2004;112(1):161-63.
26. Guerreiro CS, Carmona B, Goncalves S, Carolino E, Fidalgo P, Brito M, et al. Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients. *Am J Clin Nutr* 2008;88(5):1413-8.
27. Sousa Guerreiro C, Cravo M, Costa AR, Miranda A, Tavares L, Moura-Santos P, et al. A comprehensive approach to evaluate nutritional status in Crohn's patients in the era of biologic therapy: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007;102(11):2551-6.
28. Guerreiro CS, Ferreira P, Tavares L, Santos PM, Neves M, Brito M, et al. Fatty acids, IL6, and TNFalpha polymorphisms: an example of nutrigenetics in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009;104(9):2241-9.
29. Hartman C, Eliakim R, Shamir R. Nutritional status and nutritional therapy in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2009;15(21):2570-78.
30. Hass DJ, Brensinger CM, Lewis JD, Lichtenstein G. The impact of increased body mass index on the clinical course of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4(4):482-88.
31. Cravo M. Doença de Crohn. *GE-Jornal Português de Gastrenterologia* 2007;14:102-3.
32. Campos F, Waitzberg D, Teixeira M, Mucerino DR, Habr-Gama A, Kiss DR. Inflammatory bowel diseases. Principles of nutritional therapy. *Revista Hospital Clinicas Faculdade Medicina S. Paulo* 2002;57(4):187-98.
33. Yamamoto T, Nakahigashi M, Saniabadi A. Review article: diet and inflammatory bowel disease-epidemiology and treatment. *Alimen Pharmacol Ther* 2009;30(2):99-112.
34. Filippi J, Al-Jaouni R, Wiroth J, Hébuterne X, Schneider S. Nutritional deficiencies in patients with Crohn's disease in remission. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(3):185-91.
35. Baumgart D, Sandborn W. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007;369(9573):1641-57.
36. Balding J, Livingstone WJ, Conroy J, Mynett-Johnson L, Weir DG, Mahmud N, et al. Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms. *Mediators Inflamm* 2004;13(3):181-7.
37. Koss K, Satsangi J, Fanning G, Welsh K, Jewell D. Cytokine (TNFalpha, LTalpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000;1(3):185-90.
38. Afman L, Muller M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc* 2006;106(4):569-76.
39. Subbiah MTR. Understanding the Nutrigenomic Definitions and Concepts at the Food-Genome Junction. *OMICS Journal of Integrative Biology* 2008;12(4):229-35.
40. Costa V, Casamassimi A, Ciccociola A. Nutritional genomics era: opportunities toward a genome-tailored nutritional regimen. *J Nutr Biochem* 2010;21(6):457-67.

41. Burton H, Stewart A. Nutrigenomics: Report of the Workshop Hosted by the Nuffield Trust and Organized by the Public Health Genetics Unit. London: Public Health Genetics Unit; 2005.
42. Arab L. Individualized nutritional recommendations: do we have the measurements needed to assess risk and make dietary recommendations? *Proc Nutr Soc* 2004;63(1):167-72.
43. Gilbride J. Make genetics part of your world. *J Am Diet Assoc* 2007;107(1):17.
44. Gorman U. Ethical issues raised by personalized nutrition based on genetic information. *Genes Nutr* 2006;1(1):13-22.
45. American Dietetic Association. What is Nutritionomics for Dietitians Initiative? [Internet]. 2005 [acedido em 30 de Novembro de 2010]. Disponível em: <http://www.complementarynutrition.org/>
46. DeBusk RM, Fogarty CP, Ordovas JM, Kornman KS. Nutritional genomics in practice: where do we begin? *J Am Diet Assoc* 2005;105(4):589-98.
47. Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J* 2005;19(12):1602-16.

## **AGRADECIMENTOS**

Em meados do ano de 2006 iniciei o projecto que veio a ser a essência da minha Tese. Mais tarde, com o início das publicações surgiu o desafio de fazer a sua compilação, sustentando esta Tese de Doutoramento.

Durante todo este processo, desde a génese e planeamento dos estudos até ao final da sua publicação, muitos foram os que me apoiaram, ensinaram e estimularam, permitindo-me crescer do ponto de vista pessoal e científico.

Destaco a Prof. Doutora Marília Cravo, a quem faço um agradecimento sincero, pela sua disponibilidade e atitude pedagógica, a sua dinâmica e o seu permanente gosto pelo desafio. Obrigada pela confiança que em mim depositou.

Ao Prof. Doutor Miguel Brito, à Dr.<sup>a</sup> Lourdes Tavares, à Dr.<sup>a</sup> Paula Moura Santos, ao Dr. Bruno Carmona e à Dr.<sup>a</sup> Paula Ferreira, muito obrigada também pela ajuda que sempre me prestaram durante este processo de trabalho.

E porque ao longo destes anos de trabalho intenso, questões profissionais foram por vezes relegadas para segundo plano, agradeço a preciosa colaboração dos meus colegas e amigos de trabalho da ESTeSL: Lino, Catarina, Joana, Marisa e Rute, o facto de me ampararem em muitos momentos, permitindo a minha concentração e dedicação a este projecto.

No campo familiar foram também alguns (espero que não muitos(!)) os momentos em que estive menos presente, para conseguir tornar este Doutoramento possível. Agradeço aos Pais pelo apoio, disponibilidade e paciência para ouvir. Um agradecimento profundo ao João pela serenidade que me transmitiu ao longo de todo este processo.

Uma palavra final de agradecimento para a Prof. Doutora Ermelinda Camilo pela sua disponibilidade para ser minha orientadora da Tese desde a formalização dessa intenção em 2007. O seu rigor, capacidade crítica e perseverança representaram importantes mais valias, não só no resultado final deste trabalho, como para mim enquanto pessoa.

A todos, muito obrigada!

## ANEXOS

- Catarina S Guerreiro, Marília Cravo, Miguel Brito, Pedro M Vidal, Paulo O Fidalgo, e Carlos N Leitão  
The D1822V APC polymorphism interacts with fat, calcium, and fiber intakes in modulating the risk of colorectal cancer in Portuguese persons.  
American Journal of Clinical Nutrition 2007; 85(6):1592-97.
- Catarina Sousa Guerreiro, Bruno Carmona, Susana Gonçalves, Elisabete Carolino, Paulo Fidalgo, Miguel Brito, Carlos Nobre Leitão, e Marília Cravo  
Risk of colorectal cancer associated with the 677 polymorphism in 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients.  
American Journal of Clinical Nutrition 2008; 88(5):1413-18.
- Catarina Sousa Guerreiro, Marília Cravo, Ana Raimundo Costa, Ana Miranda, Lourdes Tavares, Paula Moura-Santos, Pedro Marques Vidal, e Carlos Nobre Leitão  
A comprehensive approach to evaluate nutritional status in Crohn's patients in the era of biologic therapy: a case-control study.  
American Journal of Gastroenterology 2007;102(11):2551-56.
- Catarina Sousa Guerreiro, Paula Ferreira, Lourdes Tavares, Paula Moura-Santos, Manuela Neves, Miguel Brito, e Marília Cravo  
Fatty acids, IL-6 and TNF- $\alpha$  polymorphisms: An example of nutrigenetics in Crohn's disease.  
American Journal of Gastroenterology 2009;104(9):2241-49.