Diego Mateus de Souza

Análise de polimorfismos da enzima metilenotetrahidrofolato redutase no câncer colorretal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior

São Paulo

2016

Diego Mateus de Souza

Análise de polimorfismos da enzima metilenotetrahidrofolato redutase no câncer colorretal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Diego Mateus de

Análise de polimorfismos da enzima metilenotetrahidrofolato redutase no câncer colorretal / Diego Mateus de Souza -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Ulysses Ribeiro Júnior.

Descritores: 1.Neoplasias 2.Neoplasias colorretais 3.Metilenotetra-hidrofolato redutase (NADPH2) 4.Genes 5.Polimorfismo genético 6.Polimorfismo de nucleotídeo único 7.Sobrevida

USP/FM/DBD-461/16

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Devanir** e **Aparecida**, pelo amor incondicional e incentivo.*

Aos meus irmãos e amigos, pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior, modelo de profissional e ser humano, não tenho palavras para agradecer a oportunidade, incentivo, apoio e paciência. Eterna admiração e gratidão.

Aos pacientes que participaram da pesquisa.

Aos meus pais e irmãos, pelo afeto, apoio, compreensão e incentivo.

Aos meus verdadeiros amigos que sempre se fizeram presentes e me deram apoio.

Ao Prof. Dr Ivan Cecconello, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado no departamento de Gastroenterologia.

Ao Prof. Dr Luiz Augusto Carneiro D'Alguquerque, por ter aberto as portas do LIM 37 e tornar possível a realização desse trabalho.

À Dra. Marcia Saldanha Kubrusly, pela paciência, atenção e carinho que sempre demonstrou quando precisei, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Sergio Carlos Nahas, chefe do setor de cólon e reto, pela oportunidade de trabalhar com o grupo com câncer colorretal e possibilitar a realização desse estudo.

Aos Médicos do grupo da Coloproctologia, que colaboraram no atendimento dos pacientes do projeto Genoma.

Ao gupo Genoma Clínico do Câncer Colorretal, pelo excelente trabalho no qual sem ele este trabalho não poderia acontecer.

Aos funcionários do departamento de Gastroenterologia e da pós graduação, Fabiana, Myrtes, Priscila, Tainah, Essy, Débora, Vilma, Marta, Jô, Roberto e Leandro, pelo profissionalismo.

Àos membros do LIM 37, Dra Ana Maria Coelho, Alcione, Nilza, Carol, Sandra, Alessandra, Mariliza, Roberto, Vitor, Genilton, Leandro, Genivaldo, Dna Maria e Isa, por cederem equipamentos, reagentes e contribírem direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

À Michele Tatiana Pereira Tomitão, pela ajuda, atenção e amizade durante toda a jornada do mestrado sem o qual não teria conseguido concluir, meus sinceros agradecimentos.

À Professora Beatriz Conde Tumenas pelo apoio, ajuda e amizade durante todo o período do trabalho, sempre incentivando e me ensinando, meus agradecimentos.

Aos amigos do ICESP, Caroline Velane Adão, Vanessa Eckert Klockner, Giovanna Leite, Evelise Pellegrinelli Zaidan, pelo apoio diário e por fazerem o dia a dia de trabalho mais feliz.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS
LISTA DE SÍMBOLOS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
RESUMO
ABSTRACT
1. INTRODUÇÃO 2
1.1 Câncer colorretal: aspectos Epidemiológicos 2
1.2 Polimorfismos Genéticos 4
1.3 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação (DL) 5
1.4 A enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) 6
1.5 Polimorfismos do gene da enzima MTHFR 8
2 OBJETIVOS 11
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS 13
3.1 Casuística 13
3.2 Método 13
3.2.1 Coleta de Sangue e Armazenamento 13
3.2.2 Extração e purificação de DNA genômico 14
3.2.3 Seleção dos SNPs (single nucleotidepolimorphisms) 15
3.2.4 Genotipagem por TaqMan ® SNP Genotyping Assays 15
3.3 Levantamento de dados 17
3.4 Análise Estatística 18
3.4.1 Casos clínicos 18
3.4.2 Sobrevida 18
3.4.3 Programas utilizados e nível descritivo 19
4. RESULTADOS 21
4.1 Características dos casos 21
4.2 Análise da frequência de Genótipos e Haplótipos 22

4.3 Teste de Associação das variáveis com os genótipos..... 24
4.4 Análise de sobrevida 27
4.4.1 Seguimento dos pacientes 27
4.4.2 Análise de sobrevida global..... 28
5. DISCUSSÃO..... 32
6. CONCLUSÕES..... 38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 40
8. ANEXOS..... 52
Anexo 1 – Parecer do Cômitê de Ética em Pesquisa CAPPesq..... 52
Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do grupo de estudo. 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR - Unidade não traduzida 3'

5'UTR - Unidade não traduzida 5'

A - Adenina

APC - Adenomatose polipose coli

BAX - *Bcl-2 associated protein X*

C – Citosina

CAP - *College of American Pathologists*

CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CCR – Câncer colorretal

CIMP - Metilação de citocinas das ilhas CpG

CIN - Instabilidade cromossômica

dbSNP - Base de dados pública de polimorfismos de base única

DP – Descio padrão

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

DL - Desequilíbrio de ligação

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP - Desvio padrão

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

dUMP – Monofosfato de Desoxiuridina

G - Guanina

HNPCC - Câncer Colorretal Hereditário não Polipóide

IC - Intervalo de confiança

Kb – kilobase

KRAS- *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

MLH1 - *mutL homolog1*

MSH2 - *mutS homolog 2*

MSI - Instabilidade de microssatélite

MSS - Estabilidade em microssatélite

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato redutase

NCBI - National Center for Biotechnology Information

OR - odds ratio

PAF – Polipose adenomatosa familar

Pb – Par de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RFLP - Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição

RNA – Ácido ribonucléico

RNAm - RNA mensageiro

RR - Razão de risco

Rs - *SNP ID number*

SIGH - Sistema Integrado de Gestão Hospitalar

SNP - Polimorfismos de nucleotídeo único

T - Timina

TGF-β - Fator de transformação do crescimento beta

TP53 - *tumor protein 53*

TS – Timidilato Sintetase

LISTA DE SÍMBOLOS

ng nanograma

µL microlitro

mL mililitro

< menor que

≤ menor e igual

= igual a

> maior que

≥ maior e igual

ºC graus Celsius

mL mililitro

% por cento

nm nanômetro

min minuto

seg segundo

$\chi 2$ Qui-quadrado

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA SIMPLIFICADO DO METABOLISMO DO FOLATO ENVOLVENDO A ENZIMA MTHFR. 7

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (DL) ENTRE OS POLIMORFISMOS DO GENE MTHFR. 24

FIGURA 3. CURVAS DE SOBREVIDA PELO MÉTODO DE KAPLAN-MEIER DOS INDIVÍDUOS COM CCR EM RELAÇÃO AOS POLIMORFISMOS MTHFR 677 C>T E MTHFR 1298 A>C. 29

FIGURA 4. CURVA DE SOBREVIDA GERAL PELO MÉTODO DE KAPLAN-MEIER DOS INDIVÍDUOS COM CCR COMPARANDO OS HOMOZIGOTOS SELVAGENS CC E AA VERSUS OS DEMAIS GENÓTIPOS DOS POLIMORFISMOS MTHFR 677 C>T E MTHFR 1298 A>C. 30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPONENTES DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL. 17

TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO (225 PACIENTES) CONFORME: IDADE, SEXO, TABAGISMO, ETILISMO, LOCALIZAÇÃO E TIPO HISTOLÓGICO. 22

TABELA 3. DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS ENTRE OS CASOS. 23

TABELA 4. EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG, % DE AMOSTRAS GENOTIPADAS, MAF (MINOR ALELLE FREQUENCY) E ALELOS ANALISADOS PARA CADA POLIMORFISMO. 23

TABELA 5. FREQUÊNCIA GENOTÍPICA ENTRE AS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E CLINICOPATOLÓGICAS DOS 225 PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL.. 25

TABELA 6. ASSOCIAÇÕES ENTRE O POLIMORFISMO MTHFR 677 C>T (MODELO DOMINANTE E MODELO RECESSIVO) E AS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E CLINICOPATOLÓGICAS DOS 225 PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL..... 26

TABELA 7. ASSOCIAÇÕES ENTRE O POLIMORFISMO MTHFR 1298 A>C (MODELO DOMINANTE E MODELO RECESSIVO) E AS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E CLINICOPATOLÓGICAS DOS 225 PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL. 27

TABELA 8. STATUS VITAL DOS PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL. 28

TABELA 9. RESULTADO DA ANÁLISE DE RISCO DE ÓBITO E SEUS INTERVALOS DE CONFIANÇA (95%) DOS POLIMORFISMOS DA MTHFR EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL. 28

TABELA 10. RAZÃO DE RISCO DE ÓBITO EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS SELVAGENS E POLIMÓRFICOS. 29

RESUMO

Souza DM. ***Análise de polimorfismos da enzima metilenotetrahidrofolato redutase no câncer colorretal*** **[Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.**

Estudos de polimorfismos podem auxiliar na detecção de pessoas com maior risco de desenvolver câncer, caracterização de evolução diferenciada e resposta distinta ao tratamento quimioterápico ou radioterápico. O conhecimento de como estão distribuídas as frequências genotípicas é relevante quando se estuda uma população específica. Neste trabalho foi analisado os polimorfismos da enzima metilenotetrahidrofolatoredutase (MTHFR) em pacientes com Câncer Colorretal (CCR). A MTHFR tem papel importante no metabolismo do folato, metilação e síntese do DNA. A metilação do DNA desempenha um papel crítico no controle da atividade gênica. As vias de metilação e variações do gene MTHFR podem afetar o desenvolvimento do câncer e prognósticos de doenças, com isso seus efeitos precisam ser monitorados de perto no tratamento do câncer. Os genótipos variantes dos polimorfismos MTHFR677 C>T e MTHFR1298 A>C do gene da MTHFR estão associados à diminuição importante da atividade desta enzima. Este trabalho teve como objetivo verificar a frequência dos polimorfismos *MTFR* (677C>T e 1298A>C) em pacientes com adenocarcinomacolorretal e analisar estas frequências com os dados clinicopatológicos, incluindo-se: sexo, idade, localização tumoral, tipo histológico, antecedentes de tabagismo e alcoolismo e sobrevida dos pacientes. Duzentos e vinte cinco pacientes com o diagnóstico de adenocarcinomacolorretal, histologicamente confirmado, admitidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo formam o grupo caso. Utilizou-se a análise do PCR em Tempo Real para determinar os genótipos os polimorfismos através dos ensaios TaqMan ® SNP GenotypingAssay. Os resultados encontrados foram associados aos dados epidemiológicos e clinicopatológicos dos pacientes. As populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Determinaram-se as frequências dos polimorfismos *MTFR* (677C>T e 1298A>C) em pacientes com adenocarcinomacolorretal onde foram levantadas e agrupadas por genótipos assim como a

significância. Na análise das razões de risco de óbito por CCR na presença dos genótipos estudados não foram encontrada associações estatisticamente significativas. A curva de sobrevida comparando os genótipos no teste de Long Rank para os SNPs MTHFR 677C>T e 1298A>C não mostraram diferenças significativas na sobrevida global para pacientes com CCR. Conclui-se que as frequências dos polimorfismos *MTFR* (677C>T e 1298A>C) em pacientes com adenocarcinoma colorretal foram levantadas e metade dos indivíduos apresentaram frequências genotípicas de homozigotos selvagens nos dois polimorfismos estudados (CC e AA), após as associações dos polimorfismos mencionados com os dados clinicopatológicos, sexo, idade, localização tumoral, tipo histológico, antecedentes de tabagismo e alcoolismo e sobrevida não houve associações estatisticamente significativas.

Descritores: neoplasias; neoplasias colorretais; metilenotetra-hidrofolato redutase (NADPH2); genes; polimorfismo genético; polimorfismo de nucleotídeo único; sobrevida.

ABSTRACT

Souza DM. ***Analysis of the methylenotetrahydrofolate reductase enzyme polymorphism in colorectal cancer*** **[Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.**

Polymorphism studies may help to detect people at higher risk of developing cancer, characterization of differentiated evolution, distinct response to chemotherapeutic or radiotherapeutic treatment, knowledge of how genotype frequencies are distributed becomes necessary for any work with a specific population. In this work, the polymorphisms of the enzyme methylenetetrahydrofolatoreductase (MTHFR) were analyzed in patients with Colorectal Cancer (CRC). MTHFR plays an important role in folate metabolism, methylation and DNA synthesis. DNA methylation plays a critical role in the control of gene activity. Methylation pathways and variations of the MTHFR gene may affect the development of cancer and prognosis of diseases, so their effects need to be closely monitored in the treatment of cancer. The variant genotypes of the MTHFR677 C> T and MTHFR1298 A> C polymorphisms of the MTHFR gene are associated with a significant decrease in the activity of this enzyme. The aim of this study was to verify the frequency of MTFR polymorphisms (677C> T and 1298A> C) in patients with adenocarcinomes and to analyze these frequencies with clinicopathological data, including: sex, age, tumor location, histological type, history of smoking and alcoholism and patient survival. Two hundred and twenty five patients with the diagnosis of histologically confirmed adenocarcinomes were admitted to the Hospital das Clínicas of the Faculty of Medicine of the University of São Paulo, forming the case group. Real-time PCR analysis was used to determine the genotype polymorphisms through the TaqMan ® SNP Genotyping Assay assays. The results were associated with the epidemiological and clinicopathological data of the patients. The populations are in Hardy-Weinberg equilibrium. The frequencies of the MTFR polymorphisms (677C> T and 1298A> C) were determined in patients with adenocarcinoma-choroid where they were raised and grouped by genotypes as well as significance. The analysis of death risk ratios by RCC in the

presence of the studied genotypes, there was no statistically significant associations were found. The survival curve comparing the genotypes in the Long Rank test for MTHFR 677C> T and 1298A> C SNPs did not show significant differences in overall survival for CRC patients. It was concluded that the frequencies of MTFR polymorphisms (677C> T and 1298A> C) in patients with colorectal adenocarcinoma were raised and half of the individuals presented genotype frequencies of wild homozygotes in the two polymorphisms studied (CC and AA), after associations of polymorphisms mentioned, there was no statistically significant association between these polymorphisms and the variables studied: sex, age, tumor location, histological type, history of smoking and alcoholism and survival.

Descriptors: neoplasms; colorectal neoplasms; methylenetetrahydrofolatereductase (NADPH2); genes; polymorphism; genetic; polymorphism, single nucleotide; survival.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O Câncer colorretal (CCR) configura-se como problema de saúde pública de escala mundial, e é a quarta causa de incidência de câncer e a quinta causa de morte por câncer no mundo[1].

Na última estimativa mundial, o CCR representou o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens, com 746 mil novos casos e o segundo nas mulheres, com 614 mil novos casos. Mais da metade dos casos são provenientes de regiões mais desenvolvidas do mundo[1].

No Brasil, o câncer colorretal ocupa em termos de incidência o terceiro lugar entre homens e segundo entre as mulheres. O risco estimado é de 16,84 novos casos a cada 100 mil homens e 17,10 a cada 100 mil mulheres para o ano de 2016. O Estado de São Paulo tem a maior incidência, com estimativa de 11.600 novos casos entre homens e mulheres[2].

O desenvolvimento desta neoplasia pode levar anos e existem vários fatores envolvidos que condicionam o seu aparecimento, sendo a história familiar e a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino os mais importantes. Cerca de 20% a 25% dos casos ocorrem em indivíduos com estas características.

Ao lado de mecanismos puramente hereditários, hábitos de vida e o meio ambiente podem induzir ou talvez prevenir a carcinogênese colorretal. A neoplasia resulta de efeitos interativos adicionais aos gênicos e fatores ambientais, e isto pode variar entre as diversas regiões do mundo. A transformação no fenótipo maligno através de ordem sequencial de mutações tem múltiplas causas pouco definidas, e a expressão gênica pode variar em diferentes etapas desde a mucosa normal até tumores metastáticos[3;4;5].

Existem outros fatores que podem contribuir para o aumento do risco de desenvolvê-lo incluindo o tabagismo, sedentarismo, obesidade, sobrepeso, consumo excessivo de bebidas alcoólicas e ingestão de alimentos ricos em gorduras saturadas. Uma boa alimentação pode contribuir como fator protetor para seu desenvolvimento. Segundo a Sociedade Americana de Câncer (American Cancer Society – ACS) uma dieta variada com

verduras, legumes e frutas frescas e redução da ingestão de alimentos ricos em gorduras saturadas podem ajudar na prevenção do aparecimento desta neoplasia[6].

O processo que envolve a transição do epitélio normal em adenomas e, posteriormente, a carcinomas, implica na acumulação progressiva de alterações genéticas e epigenéticas na célula tumoral em desenvolvimento, e podem durar de 1 a 15 anos[7]. Na carcinogênese as alterações genéricas mais frequentes acontecem nos genes APC, KRAS, SMAD4 e TP53, e nos genes de reparo do DNA, MLH1 e MSH2[8;9].

De acordo com as alterações gênicas moleculares conhecidas, caracterizaram-se três vias moleculares principais que levam à tumorigênese colorretal: 1. Tumores com instabilidade cromossômica (CIN), principal via de carcinogênese, tendem a ser mais frequentes no cólon esquerdo, mostram aneuploidia de DNA, com determinadas mutações características incluindo K-*ras*, *APC*, e *p53*; comportam-se agressivamente, sendo a polipose adenomatosa familiar (PAF) um exemplo[9;8;10]. 2. Tumores que apresentam instabilidade de microssatélite (MSI), que ocorrem mais frequentemente no cólon direito, tem diploidia de DNA, e tem mutações características incluindo-se receptores para TGF-β tipo II e *BAX*; comportam-se indolentemente, e a Síndrome de tumores colorretais hereditários não polipóides (HNPCC) é um exemplo[8;11;12] e mais recentemente, 3. Via serreada de carcinogênese, caracterizada pela presença de lesões precursoras serreadas, metilação de citocinas das ilhas CpG (CIMP) de genes supressores de tumor, como o *MLH1*, frequentemente associados aos tumores MSI positivos, e mutações do gene BRAF[13;14;15;16].

Grande parte dos pacientes diagnosticados com cânceres colorretais tem idade acima de 60 anos de idade, sem qualquer história prévia pessoal ou familial da doença. O maior fator de risco para os casos esporádicos é a idade avançada (superior a 55 anos) e exposição ambiental (principalmente dieta), porém 25% das neoplasias colorretais acometem indivíduos jovens, sugerindo susceptibilidade hereditária[5].

O prognóstico em geral é bom, e definido pelas taxas de sobrevida após cinco anos, que estão relacionadas ao estádio da doença no momento do diagnóstico[17].

1.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

No genoma humano ocorrem variações no DNA que são consideradas normais para a espécie, uma vez que nem todas as sequências de DNA codificam proteínas. Estas variações, quando presentes na população em frequência superior a 1%, são chamadas de polimorfismos[18].

A maioria dos polimorfismos não tem repercussão funcional e alguns podem influenciar a expressão gênica, diminuindo ou aumentando a quantidade da proteína codificada pelo gene. Existem alterações que podem criar ou destruir locais de ação das enzimas de restrição, resultando em fragmentos maiores ou menores de DNA que podem ser detectados por RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)[18].

Os genes polimórficos podem estar envolvidos no metabolismo de determinados alimentos, toxinas, resposta inflamatória, interação medicamentosa, entre outros[18].

Estudos mostram que a presença de outros fatores pode modular o comportamento do polimorfismo, como tabaco, exposição ao sol, uso de drogas e, principalmente a grande variação genética entre diferentes etnias[19].

Os polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) é caracterizado pela substituição de apenas um nucleotídeo, e esta variação na genética humana é muito comum e pode contribuir para a suscetibilidade ao câncer[19]. A base de dados pública de polimorfismos de base única (dbSNP) tem catalogados 149.735.377 SNPs em seres humanos, até junho de 2015[20].

Acredita-se que ocorra um SNP a cada 1000 pares de bases. Estas variações são geralmente decorrentes de mutações ocorridas em ancestrais e podem ser detectadas em qualquer célula do organismo[47]. Alguns polimorfismos surgem de erros de duplicação e recombinação do DNA, mas a principal fonte é a falha no reparo da molécula[21].

Os polimorfismos mais comuns são as transições, onde ocorrem trocas de uma purina por outra purina (A>G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C>T). Menos frequentes, as transversões ocorrem quando há troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa (C/T >A/G). Normalmente, os SNPs são bi-alélicos, ou seja, geralmente são encontradas apenas duas variantes em uma espécie[22]. Na maior parte das vezes são

encontrados em espaços intergênicos ou em componentes não codificadores de genes, sem função determinada[23].

Os SNPs em regiões regulatórias/promotoras, podem afetar a regulação ou estabilidade do mRNA e consequentemente a eficiência de tradução. Quando a modificação do nucleotídeo ocorre em regiões do gene (éxons), que não modificam a sequência codificadora, resulta em novo códon que codifica os mesmos aminoácidos, não havendo alteração na proteína resultante, neste caso, são chamados de SNPs sinônimos, já os chamados SNPs não sinônimos, podem modificar a sequência codificadora, resulta em um novo códon que codifica aminoácidos diferentes, gerando portanto proteínas com sequência de aminoácidos alteradas. Cerca de 20% a 30% dos SNPs acarretam danos na função proteica[24].

Os SNPs que ocorrem em sítios de *splicing* podem mudar o padrão de *splicing* e gerar proteínas modificadas, pois podem resultar na inserção ou exclusão, modificando o tamanho de éxons, podendo alterar a proteína[24].

Os genes polimórficos podem estar envolvidos no metabolismo de determinados alimentos ou toxinas, resposta inflamatória, interação medicamentosa, entre outros[25]. Estes genes podem variar de acordo com diferenças étnicas, explicando algumas discrepâncias entre os resultados encontrados nos diversos estudos sobre este assunto. A variação genética inter-individual pode constituir um fator importante na suscetibilidade para o desenvolvimento de câncer, na resposta distinta ao tratamento quimioterápico, radioterápico e prognóstico[26].

1.3 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (DL)

Entende-se por equilíbrio de Hardy-Weinberg quando numa população mendeliana as frequências alélicas são constantes através de gerações, ou seja são mantidas as mesmas condições, alelos raros não se tornam cada vez mais raros, a frequência genotípicas permanecem estáveis. Quando a amostra analisada se encontra neste equilíbrio, significa que é representativa desta mesma população em escala maior[27].

O desequilíbrio de ligação (DL) são associações não aleatórias entre alelos de diferentes loci em uma população, isto é, a diferença entre as proporções haplotípicas

observadas e aquelas esperadas se os alelos segregam independentemente. Os alelos dos SNPs, que não estão em desequilíbrio de ligação, localizados em regiões próximas no cromossomo, migram juntos na divisão celular[27].

1.4 A ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)

A enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) tem papel importante no metabolismo do folato, seu substrato 5,10-metileno-tetra-hidrofolato (THF) é doador do grupo metil para a conversão do desoxiuridilato (dUMP) a desoxitimidilato (dTMP), necessário para síntese do DNA[28;29;30].

A enzima MTHFR catalisa irreversivelmente a redução do 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-CH_2FH_4) intracelular para a 5-metiltetraidrofolato (5-CH_3FH_4), que é a principal forma de folato na corrente sanguínea[21] que é doador de metil para a conversão de homocisteína para metionina, precursor imediato da S-adenosil metionina (SAM), o doador do grupo metil para reações de metilação do DNA. A redução na concentração de SAM, possibilita a redução da metilação do DNA diminuindo a síntese de timidina para uracila, resultando em incorporação de uracila no local de timina, levando a quebra de cadeia de DNA[31].

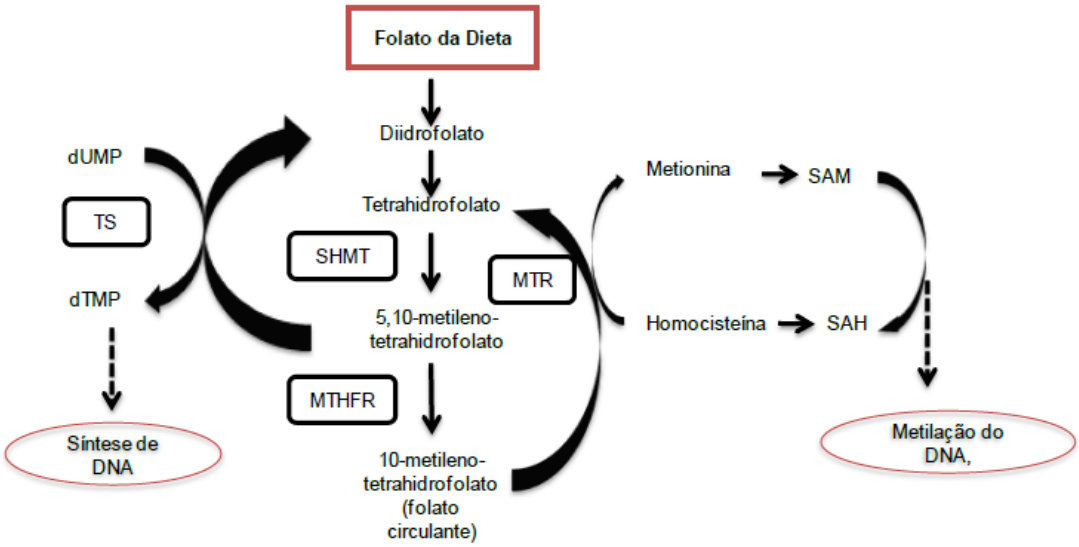

Figura 1. Esquema simplificado do metabolismo do folato envolvendo a enzima MTHFR.

TS: Timidilato Sintase; SHMT: Hidroximetiltransferase; MTR: Metionina Sintase; MTHFR: Metilenotetrahidrofolato Redutase.

Fonte: Modificado de Larsson, *SC.et al* (2006)

A metilação do DNA desempenha um papel crítico no controle da atividade gênica. Essa metilação ocorre quase exclusivamente com a adição de um grupo metil ao carbono 5' do anel de citosina, especificamente aquelas citosinas que precedem guaninas (fazem partem de dinucleótidos CpG), formando a 5-metilcitosina. Os dinucleótidos CpG rendem a se agrupar-se em regiões chamadas ilhas de CpG que estão localizadas em aproximadamente 60% dos genes promotores ou em regiões que contem grande quantidade de sequencias repetitivas no DNA[32].

As vias de metilação e variações do gene MTHFR podem afetar o desenvolvimento do câncer e prognósticos de doenças, com isso seus efeitos precisam ser monitorados ativamente no tratamento do câncer[33].

1.5 POLIMORFISMOS DO GENE DA ENZIMA MTHFR

O gene da MTHFR contém uma região codificadora com 11 éxons e está localizado no cromossomo 1p36.3[28]. Aproximadamente 60 polimorfismos foram descritos no gene MTHFR34.

Os genótipos variantes dos polimorfismos MTHFR677 C>T e MTHFR1298 A>C do gene da MTHFR estão associados à diminuição importante de sua atividade [34].

A variante MTHFR677 C>T (rs1801133) é a transição C para T no éxon 4 no nucleotídeo 677, resultando na conversão da alanina para valina na posição 222 da sequência de aminoácidos[29;30;28].

Comparados ao subtipo homozigoto selvagem (CC), o heterozigoto (CT) expressa a enzima com 65% de atividade, já o homozigoto (TT) expressa a enzima com 30% da atividade enzimática.

Outro polimorfismo que altera a atividade da MTHFR é a substituição do *A* pelo *C* no nucleotídeo 1298 (rs1801131). Isso resulta numa alteração do aminoácido glutamato por alanina no éxon 7, o que reduz a atividade enzimática. Esta variante é menos grave que a 677[46]. Indivíduos com genótipo *CC* no resíduo 1298 tem 60% da capacidade enzimática comparada ao genótipo AA[29;30].

A frequência do polimorfismo A1298C em caucasianos homozigotos CC é de aproximadamente 12%[35].

Os polimorfismos na MTHFR podem regular a quantidade de folato na corrente sanguínea, a deficiência do mesmo altera o equilíbrio dos nucleotídeos necessários para a síntese de novas moléculas de DNA, levando à acumulação de dUMP. Como resultado, dUMP é fixado ao DNA, podendo acarretar nos processos subsequentes de reparo, rupturas na cadeia de DNA e danos cromossômicos, resultando na ativação de processos carcinogênicos[36].

A associação entre os polimorfismos da MTHFR e o CCR tem sido estudada extensivamente, e vários fatores têm influenciado a relação entre as variáveis MTHFR e o risco de câncer[37].

Recentes literaturas mostram que parâmetros etiológicos tais como, mutações pontuais cromossômica, polimorfismos do gene, fatores ambientais, estilo de vida e alterações epigenéticas pode causar CCR, o status do folato também foi relatado como risco de CCR[38].

A diminuição da função da enzima MTHFR pode causar hipometilação do DNA devido a falta de fonte de metila intracelular e iniciar o processo carcinogênico[38].

Há resultados conflitantes na literatura que dizem ter forte ligação ou nenhuma associação entre estes polimorfismos com o risco de CCR[33].

Elevados níveis de homocisteína estão também associados ao desenvolvimento de doenças neurológicas[33].

Indivíduos com variações genéticas nesta via de metilação e disfunção na regulação da metilação do DNA, tem um problema com o processamento de agentes tóxicos ambientais como a poluição do ar , muito comum nos dias atuais, causando danos à via de metilação semelhante a causada pelo tabagismo[33].

Recentemente evidências crescentes indicam, que o álcool pode induzir alterações epigenéticas, em particular os padrões de metilação do DNA, que também podem ser um fator importante para carcinogênese induzida pelo álcool[32].

Um estudo mostrou que o risco de Câncer de Cólon em homozigotos era dependente da localização do câncer. Os pesquisadores observaram que o genótipo TT estava associado a um risco aumentado de câncer nas regiões mais proximais do intestino[32].

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Verificar a frequência dos polimorfismos da MTHFR (677C>T e 1298A>C) em pacientes com adenocarcinoma colorretal.

- Verificar a associação dos polimorfismos mencionados com os dados clinicopatológicos, incluindo-se: sexo, idade, localização tumoral, tipo histológico, antecedentes de tabagismo e alcoolismo e sobrevida dos pacientes com CCR.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Duzentos e vinte e cinco pacientes com o diagnóstico de adenocarcinoma colorretal, histologicamente confirmados, admitidos no Projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP, tratados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo formam o grupo caso do presente estudo. Todos os pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica, no período de junho de 2001 a janeiro de 2006. Este grupo apresentou uma idade média de 61,93 (com variação de 22 a 87 anos) com um desvio padrão (DP) 13,86.

Os dados clínicos e patológicos foram revistos dos prontuários e foi realizado um Banco de Dados para análise comparativa dos resultados.

Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido do projeto Genoma Clinico do Câncer "Perfil da expressão gênica no câncer colorretal e suas aplicações clínicas", aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo nº 886/01.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, registro on-line nº 11488.

3.2 MÉTODO

3.2.1 COLETA DE SANGUE E ARMAZENAMENTO

Coletaram-se amostras de sangue periférico dos pacientes durante as consultas de acompanhamento ambulatorial no Hospital das Clínicas da FMUSP, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Realizou-se a venoclise de veia periférica e coletou-se 10 a 15 mL, em tubo contendo anticoagulante EDTA.

O material coletado foi processado por centrifugação refrigerada e o volume contendo as células nucleadas (creme leucocitário), foi armazenado em tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml a – 20ºC para posterior extração de DNA.

3.2.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi isolado do creme leucocitário utilizando-se o kit de extração e purificação PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, EUA) de acordo com instruções do fabricante, listadas a seguir. Após o descongelamento das amostras, foram transferidos 200 µL do creme leucocitário para um tubo de microcentrífuga estéril e adicionados 20 µL de Proteinase K e 20 µL de RNase A. Essa solução foi agitada em vórtex e incubada a temperatura ambiente por 2 minutos.

Em seguida, foram adicionados 200 µL de PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer. Para se obter uma solução homogênea, foi efetuada agitação vigorosa em vórtex. A mistura foi incubada por 10 minutos a 55ºC para promover a digestão protéica. Ao término da incubação, foram adicionados ao lisado 200 µL de etanol 96-100%, seguido de agitação em vórtex. O lisado foi transferido para uma coluna de sílica, acoplada a um tubo coletor de 2,0 mL, e centrifugado a 10000 × g por 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida, o tubo coletor foi descartado. A coluna contendo o DNA genômico fixado foi transferida para um novo tubo coletor de 2,0 mL. Foram adicionados à coluna 500 µl de *Wash Buffer* 1, preparado previamente com etanol. A seguir, foi centrifugada a 10000 × g por 1 minuto à temperatura ambiente. Novamente, o tubo coletor foi descartado e substituído. Foram adicionados à coluna 500 µl de *Wash Buffer* 2, preparado previamente com etanol. A mistura foi centrifugada à velocidade máxima por 3 minutos à temperatura ambiente. Ao término do processamento, o tubo coletor foi descartado e substituído por um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL. Para a eluição do DNA, a solução foi incubada à temperatura ambiente por 1 minuto, acrescida de 100 a 200 µl de água ultrapura estéril livre de DNase/RNase (*Invitrogen*) e por fim, centrifugada a velocidade máxima por 1 minuto à temperatura ambiente. A coluna foi descartada e o tubo de microcentrífuga continha o DNA genômico purificado.

A concentração das amostras de DNA foram determinadas por quantificação em espectrofotômetro *NanoDrop™ ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, EUA*) pela absorbância em luz ultravioleta a 260 nm, utilizando-se como valor padrão 1 DO_{260} = 50µg/mL de DNA. O grau de pureza foi avaliado pela razão 260/280 nm, utilizando-se apenas os DNAs cuja razão esteja entre 1,8 e 2,0.

A integridade das amostras foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 3,0 µg/mL e visualizado em transluminador de luz UV em comprimento de onda 203 nm.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental – LIM37 Setor de Biologia Molecular, Disciplina de Transplante de Fígado - Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2.3 Seleção dos SNPs (single nucleotidepolimorphisms)

Pra este estudo utilizou-se os bancos de dados dbSNP do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp) e International HapMap Project (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/) para auxiliar na seleção dos SNPs. A distribuição dos haplótipos foi identificada com o objetivo de selecionar os SNPs mais informativos. Devido aos dados do HapMap Project e dbSNP serem derivados de populações de não-brasileiros, os genótipos gerados no nosso estudo servirão para uma primeira análise da distribuição dos haplótipos na nossa população, o que, certamente, poderá beneficiar futuros estudos.

3.2.4 Genotipagem por TaqMan ® SNP Genotyping Assays

Utilizou-se a técnica de identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos TaqMan ® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, EUA), amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise em tempo real.

Os kits TaqMan ® contém primers (oligonucleotídeos) que flanqueiam a região polimórfica para amplificação dos produtos por PCR, além de duas sondas (fragmento de DNA de oligonucleotídeos de 18-22 pb) complementares à seqüência alvo, sendo cada uma especifica para um dos alelos descritos (polimórfico e tipo selvagem). Esta sonda apresenta

na extremidade 5' um fluoróforo (dye reporter) e extremidade 3' um quencher (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor).

Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os dye reporters e os quenchers impede que a fluorescência seja emitida. Durante a atividade exonuclease 5’ --> 3’ da Taq DNA polimerase, a sonda ligada ao fragmento é clivada, causando a liberação do dye reporter e a emissão de fluorescência. Como apenas a sonda específica para um determinado alelo é capaz de se ligar a ele, apenas a fluorescência emitida por ela foi detectada. Como cada sonda é marcada com uma fluorescência diferente, através da leitura da fluorescência emitida é possível determinar o genótipo da amostra. Esse processo se repete em cada ciclo e não interfere com o acúmulo de produto da PCR.

Além do dye repórter e da molécula quencher, uma molécula denominada MGB (Minor Groove Binder) também está afixada a sonda, tendo a função de elevar a sua temperatura de anelamento, permitindo ligação mais especifica, e evitando que ela se ligue inespecificamente a seqüência correspondente ao outro alelo.

A genotipagem dos polimorfismos do MTHFR foram determinadas através dos kits TaqMan ® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Foram adquiridos os kits prontos para uso e validados TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assay dos SNPs *MTHFR* C677T (rs1801133) e *MTHFR* A1298C (rs1801131), cujos códigos de identificação para compra são, respectivamente, “C_1202883_20” e “C_850486_20”.

Detectou-se a fluorescência emitida na reação em Real Time PCR Step One Plus (*Applied Biosystem, Life Technologies, Foster City*, EUA), que faz a discriminação alélica através da emissão de luz em comprimento de onda característico. Os genótipos foram determinados de acordo com o perfil de emissão das fluorescências ao final da reação de PCR. Para amplificação dos fragmentos desejados utilizou-se as seguintes condições de reação: 5,0 µL do master mix , 0,5 µL de Taqman Genotyping 20X, 3,5 µL de água RNase DNase Free e 1,0 µL contendo 10 ng de DNA, somando um total de 10 µL para cada reação. Foram utilizados os seguintes parâmetros de ciclagem: 30 seg a 60°C, 10 min a 95°C, seguidos por 50 ciclos a 92°C por 15min e 60°C por 1 min. Vinte por cento das amostras foram escolhidas aleatoriamente e re-genotipadas e os resultados mostraram 100% de similaridade.

Tabela 1. Componentes da reação de PCR em tempo real.

Componentes da reação	Qtid.
Master MIX	**5,0µL**
AmpliTaq Gold® DNA Polimerase	
Desoxirribonucleotideo trifosfato (dNTPs)	
ROX™ Referência Passiva	
Tampão de reação	
Taqman 2x	**0,5 µL**
Água RNase DNase Free	**3,5 µL**
Amostra de DNA	**10ng /1µL**

3.3 LEVANTAMENTO DE DADOS

Os dados dos pacientes foram inseridas no *Clinical Genomics*, banco de dados do Projeto Genoma Clínico do Câncer, onde já havia sido realizado um extenso trabalho de revisão de dados e das informações de todos os pacientes, que foram revisadas e confrontadas com os dados anotados em formulários físicos do mesmo projeto.

Também com a finalidade de revisar e coletar dados adicionais, foram apuradas informações epidemiológicas, clínicas, cirúrgicas, anatomopatológicas e de seguimento em prontuários físicos do Hospital das Clínicas-HC, Prontuário Médico Eletrônico (HCMED), Sistema Integrado de Gestão Hospitalar (SIGH), prontuários digitalizados do Instituto de Radiologia-INRAD (Sistema Laserfiche), prontuário eletrônico do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo-ICESP (Sistema Tasy), banco de dados de óbitos da Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (SEADE) e contato direto com pacientes, por telefone ou abordagem em retorno ambulatorial. Estas informações foram analisadas em associação com o perfil genotípico e haplotípico dos polimorfismos estudados.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.4.1 CASOS CLÍNICOS

Aplicou-se o teste Qui-Quadrado e exato de Fisher para verificar a associação entre os polimorfismos estudados e as variáveis categóricas do estudo. Verificou-se a associação entre os polimorfismos e os dados clinicopatológicos, incluindo-se: sexo, idade, localização tumoral, tipo histológico, antecedentes de tabagismo, alcoolismo dos pacientes com CCR.

3.4.2 SOBREVIDA

Definiu-se a sobrevida global dos pacientes com câncer colorretal como o período entre a data do diagnóstico e a data do óbito ou a data do último contato com o paciente em ambulatório ou por contato telefônico.

O tempo de sobrevida global associado a cada um dos polimorfismos assim como a comparação dos homozigotos selvagens versos genótipos que tem efeito de redução na ação da enzima, foram estimados pelo método Kaplan-Meier e o teste de log-rank, aplicado na comparação do grupo.

Realizou-se a análise das razões de risco de óbito pela doença em funções dos genótipos pelo modelo de regressão de Cox simples[39]. Obtiveram-se os respectivos valores de risco associados aos genótipos pelo cálculo da razão de risco (RR) e intervalos de confiança (95%).

Verificou-se o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos do MTHFR pelo valor do D’, coeficiente de desequilíbrio de ligação, através do software Haploview. Assim como a avaliação do desequilíbrio de Hardy-Weinberg.

3.4.3 PROGRAMAS UTILIZADOS E NÍVEL DESCRITIVO

As Análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS – Statistical Package for Social Sciences (v18.0). Foi adotado nível de significância de 0,05 (5%) e valores descritivos (*p*) inferiores a este foram considerados significantes.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS CASOS

O presente estudo é composto por 225 pacientes. Dentre os indivíduos, cinquenta e três por cento eram homens e quarenta e seis por cento mulheres. A média de idade dos participantes foi de 61,93 anos (variação de 22 a 87 anos).

A análise de alguns fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento deste tipo de câncer revelou que mais da metade dos pacientes referiram nunca terem fumado (56%), a categorização desde dados ocorreu da seguinte forma: foram considerados não tabagistas os participantes que referiram nunca terem fumado ou eram tabagistas esporádicos; ex-tabagistas, os que referiram já terem fumado regularmente, mas pararam há mais de 12 meses; e tabagistas, os que referiram fumar em média um cigarro, charuto ou cachimbo diariamente por pelo menos 1 ano. Da mesma forma foram considerados não etilistas aqueles que referiram nunca terem ingerido bebida alcoólica ou eram etilistas esporádicos; ex-etilistas, aqueles que referiram já terem ingerido regularmente bebida alcoólica, mas pararam há mais de 12 meses; e foram considerados etilistas aqueles que ingeriam uma dose de bebida alcoólica (vinho, cerveja e destilados) uma vez ao mês.

Considerando a localização dos tumores, 25,4% apresentam câncer na região do cólon direito, 45,5% no cólon esquerdo e 29% no reto. Quanto ao tipo histológico, prevaleceram os tumores não-mucinosos (75,6%). Aqueles com até 40% de componente de mucina e mucinosos ocorreram em, respectivamente, 14,7% e 9,8%. Os tumores moderadamente diferenciados foram mais frequentes (84,7%) do que os bem diferenciados (9,9%) e pouco diferenciados (5,4%).

A tabela 2 mostra a descrição da amostra em relação a todas as variáveis categóricas estudadas: idade ao diagnóstico (categorizada: ≤60 anos e >60 anos sexo, tabagismo, etilismo, localização e tipo histológico.

Tabela 2. Distribuição da população de estudo (225 pacientes) conforme: idade, sexo, tabagismo, etilismo, localização e tipo histológico.

Variável		**Casos (n=225)**	
		N	**%**
Idade	≤ 60	98	43,6
	> 60	127	56,4
Sexo	Masculino	121	53,8
	Feminino	104	46,2
Tabagismo	Não-tabagista	126	56
	Tabagista ativo	30	13,3
	Ex-tabagista	69	30,7
Etilismo	Não-etilista	136	60,4
	Etilista	57	25,3
	Ex-etilista	32	14,2
Localização	Cólon direito	57	25,4
	Cólon esquerdo	102	45,5
	Reto	65	29
Tipo Histológico	Com componente mucinoso	33	14,7
	Mucinoso	22	9,8
	Não-mucinoso	170	75,6

4.2 Análise da frequência de Genótipos e Haplótipos

A frequência dos polimorfismos foi avaliada nos 225 casos. A distribuição e frequência dos polimorfismos da MTHFR 677C>T e 1298A>C, estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Distribuição das frequências genotípicas entre os casos.

Polimorfismos		Casos (n=225)	
		N	%
MTHFR 677C>T	CC	106	47,1
	CT	87	38,7
	TT	32	14,2
MTHFR 1298A>C	AA	120	53,2
	AC	89	39,7
	CC	16	7,1

A posição dos polimorfismos da MTHFR no cromossomo, frequências esperadas e observadas, informações sobre o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e MAF (*Minor Alelle Frequency*) estão descritas na tabela 4. No presente estudo, as frequências genotípicas observadas e esperadas dos SNPs da MTHFR foram consistentes com o Equilíbrio de Hardy Weinberg, com valor de *p* superior a 0,05 para todas as análises.

Tabela 4. Polimorfismos estudados, posição no cromossomo, frequências esperadas e observadas, informações sobre o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, % de amostras genotipadas, MAF (Minor Alelle Frequency) e alelos analisados para cada polimorfismo.

Polimorfismos	Posição no Cromossomo	Obs HET	PredHET	Hwpval	MAF	Alelos avaliados
MTHFR 677C>T **(RS1801133)**	11796321	0,387	0,446	0,0615	0,336	C:T
MTHFR 1298A>C **(RS1801131)**	11794419	0,397	0,394	1,0	0,27	A:C

SNP: polimorfismos de nucleotídeo único, Obs HET: frequências observadas; PredHET: frequências esperadas; HwpVal: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; MAF: *Minor Alelle Frequency*.

Avaliou-se também a segregação alélica dos polimorfismos estudados, com o objetivo de verificar se os mesmos estão em desequilíbrio de ligação (DL). DL é a associação não-aleatória de alelos em dois ou mais loci em um cromossomo. A análise foi feita através do software Haploview. O estudo mostrou elevado desequilíbrio de ligação

entre os polimorfismos MTHFR 677C>T e 1298A>C, que distam entre si em 01 kilobases (Kb), com D'=72. Os dois SNPs foram agrupados em um único bloco, como mostra a figura 2 (A).

Os haplótipos formados por este bloco estão representados na figura 2 (B). Os agrupamentos com frequência inferior a 1% não são mostrados na análise. As frequências encontradas são: AC 42%, AT 31%, CC 24,5% e CT 2,5%.

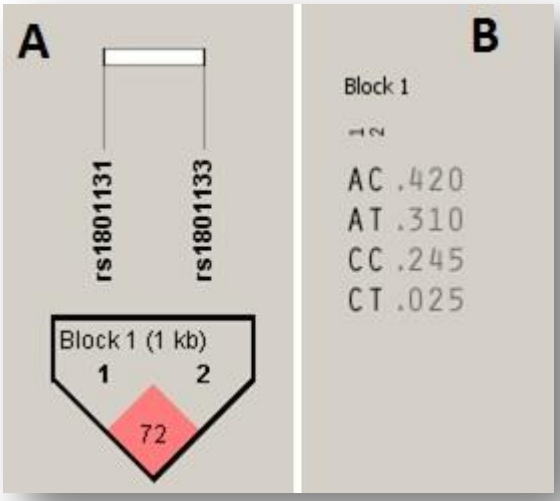

Figura 2. Representação da estrutura de desequilíbrio de ligação (DL) entre os polimorfismos do gene MTHFR (A). A parte superior do painel mostra a localização dos dois polimorfismos e a inferior os resultados do Haploview. Os valores de D' são indicados nos quadrados de intersecção e representam a relação de DL entre os SNPs. Cores mais escuras de vermelho indicam forte desequilíbrio de ligação (D'=100, segregação não aleatória dos alelos) e as mais claras e brancas mostram fraco desequilíbrio (D'<100) ou ausente (D'=0, segregação independente dos alelos). Os blocos gerados estão marcados sob intervalo algorítmico do Haploview). Haplótipos formados por este bloco e respectivas frequências (B).

4.3 Teste de Associação das variáveis com os genótipos

A distribuição e frequência genotípicas dos polimorfismos MTHFR 677C>T e 1298A>C, estão representados na tabela 5. Para as análises foram utilizados os testes do Qui-Quadrado e Exato de Fisher.

Não foram detectadas diferenças na distribuição dos alelos de ambos os SNPs entre casos (p>0,05).

Tabela 5. Frequência genotípica entre as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas dos 225 pacientes operados por câncer colorretal. São Paulo, Brasil, 2001-2006.

MTHFR – 677 C>T (rs1801133)						
Variável		**Genótipo (n,%)**			x^2	*p*
		CC	**CT**	**TT**		
Idade	≤ 60	46 (46,9)	38 (38,8)	14(14,3)	0,02	1
	> 60	60 (47,2)	49 (38,6)	18(14,2)		
Sexo	Masculino	65 (53,7)	38 (31,4)	18 (14,9)	6,08	0,048
	Feminino	41 (39,4)	49 (47,1)	14 (13,5)		
Tabagismo	Não-tabagista	57 (45,2)	55 (43,7)	14 (11,1)	5,58	0,23
	Tabagista ativo	12 (40)	12 (40)	6 (20)		
	Ex-tabagista	37 (53,6)	20 (29)	12 (17,4)		
Etilismo	Não-etilista	60 (44,1)	58 (42,6)	18 (13,2)	2,78	0,6
	Etilista	28 (49,1)	20 (35,1)	9 (15,8)		
	Ex-etilista	18 (56,3)	9 (28,1)	5 (15,6)		
Localização	Cólon direito	20 (35,1)	31 (54,4)	6 (10,5)	8,89	0,06
	Cólon esquerdo	52 (51)	32 (31,4)	18 (17,6)		
	Reto	33 (50,8)	24 (36,9)	8 (12,3)		
Tipo Histológico	Com componente mucinoso	15 (45,5)	13 (39,4)	5 (15,2)	**2,5**	**0,65**
	Mucinoso	10 (45,5)	11 (50)	1 (4,5)		
	Não-mucinoso	81 (47,6)	63 (37,1)	26 (15,3)		
MTHFR – 1298 A>C (rs1801131)						
Variável		**Genótipo (n,%)**			x^2	*p*
		AA	**AC**	**CC**		
Idade	≤ 60	55 (56,7)	38 (39,2)	4 (4,1)	2,61	0,27
	> 60	64 (50,4)	51 (40,2)	12 (9,4)		
Sexo	Masculino	61 (50,8)	46 (38,3)	13 (10,8)	5,31	0,07
	Feminino	58 (55,8)	43 (41,3)	3 (2,9)		
Tabagismo	Não-tabagista	61 (48,4)	55 (43,7)	10 (7,9)	5,04	0,28
	Tabagista ativo	19 (65,5)	10 (34,5)	0 (0,0)		
	Ex-tabagista	39 (56,5)	24 (34,8)	6 (8,7)		
Etilismo	Não-etilista	77 (56,6)	49 (36)	10 (7,4)	8,21	0,08
	Etilista	29 (51,8)	21 (37,5)	6 (10,7)		
	Ex-etilista	13 (40,6)	19 (59,4)	0 (0,0)		
Localização	Cólon direito	24 (42,9)	25 (44,6)	7 (12,5)	4,95	0,29
	Cólon esquerdo	57 (55,9)	40 (39,2)	5 (4,9)		
	Reto	37 (56,9)	24 (36,9)	4 (6,2)		
Tipo Histológico	Com componente mucinoso	18 (56,3)	10 (31,3)	4 (12,5)	2,36	0,67
	Mucinoso	12 (54,5)	9 (40,9)	1 (4,5)		
	Não-mucinoso	89 (52,4)	70 (41,2)	11 (6,5)		

Utilizado teste de Qui-Quadrado. [a] Teste de Fisher, correção do valor de *p* do teste Qui-quadrado quando o número de observação é pequeno (N<5).

Realizou-se teste de associação com os genótipos no modelo dominante (comparação da frequência de homozigotos para o alelo selvagem versus de heterozigoto + homozigoto para o alelo polimórfico entre os grupos estudados), modelo recessivo (comparação da frequência de homozigotos para o alelo selvagem + heterozigotos versus homozigotos para o alelo polimórfico entre os grupos estudados) e modelo de alelos (em que comparamos as frequências do alelo selvagem e alelo polimórfico entre os grupos estudados). Os resultados das associações dos polimorfismos MTHFR 677C>T e 1298A>C estão descritos na tabela 6 e 7.

Foram encontradas associações significativas entre as frequências genotípicas no modelo dominante e recessivo no polimorfismo rs1801133 e a variável sexo.

Tabela 6. Associações entre o polimorfismo MTHFR 677 C>T (modelo dominante e modelo recessivo) e as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas dos 225 pacientes operados por câncer colorretal. São Paulo, Brasil, 2001-2006.

MTHFR – 677 C>T (rs1801133)							
Variável		**Modelo Dominante**	x^2	*p*	**Modelo Dominante**	x^2	*p*
		Genótipo (n,%)			**Genótipo (n,%)**		
		CT + TT			**CT + TT**		
Idade	≤ 60	52 (53,1)	0,002	0,96	84 (85,7)	0,00	0,98
	> 60	67 (52,8)			109 (85,8)		
Sexo	Masculino	56 (46,3)	4,59	0,032	103 (85,8)	0,09	0,762
	Feminino	63 (60,6)			90 (86,5)		
Tabagismo	Não-tabagista	69 (54,8)	1,96	0,38	112 (88,9)	2,39	0,30
	Tabagista ativo	18 (60)			24 (80)		
	Ex-tabagista	32 (46,4)			57 (82,6)		
Etilismo	Não-etilista	76 (55,9)	1,65	0,44	118 (86,8)	0,28	0,87
	Etilista	29 (50,9)			48 (84,2)		
	Ex-etilista	14 (43,8)			27 (84,4)		
Localização	Cólon direito	37 (64,9)	4,27	0,12	51 (89,5)	1,81	0,41
	Cólon esquerdo	50 (49,0)			84 (82,4)		
	Reto	32 (49,2)			57 (87,7)		
Tipo Histológico	Com componente mucinoso	18 (54,5)	0,08	0,96	28 (84,8)	1,87	0,39
	Mucinoso	12 (54,5)			21 (95,5)		
	Não-mucinoso	89 (52,4)			144 (84,7)		

Utilizado teste de Qui-Quadrado. [a] Teste de Fisher, correção do valor de *p* do teste Qui-quadrado quando o número de observação é pequeno (N<5).

Tabela 7. Associações entre o polimorfismo MTHFR 1298 A>C (modelo dominante e modelo recessivo) e as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas dos 225 pacientes operados por câncer colorretal. São Paulo, Brasil, 2001-2006.

MTHFR – 1298 A>C (rs1801131)							
Variável		**Modelo Dominante** **Genótipo (n,%)** **AC + CC**	x^2	*p*	**Modelo Dominante** **Genótipo (n,%)** **AA + AC**	x^2	*p*
Idade	≤ 60	42 (43,3)	0,88	0,35	93 (95,9)	2,35	0,13
	> 60	63 (49,6)			115 (90,6)		
Sexo	Masculino	59 (49,2)	0,55	0,46	107 (89,2)	5,31	0,02
	Feminino	46 (44,2)			101 (97,1)		
Tabagismo	Não-tabagista	65 (51,6)	3,23	0,20	116 (92,1)	2,60	0,27
	Tabagista ativo	10 (34,5)			29 (100,0)		
	Ex-tabagista	30 (43,5)			63 (91,3)		
Etilismo	Não-etilista	59 (43,4)	2,71	0,26	126 (92,6)	3,55	0,17
	Etilista	27 (48,2)			50 (89,3)		
	Ex-etilista	19 (59,4)			32 (100,0)		
Localização	Cólon direito	32 (57,1)	3,05	0,22	49 (87,5)	3,28	0,19
	Cólon esquerdo	45 (44,1)			97 (95,1)		
	Reto	28 (43,1)			61 (93,8)		
Tipo Histológico	Com componente mucinoso	14 (43,8)	0,18	0,91	28 (87,5)	1,72	0,42
	Mucinoso	10 (45,5)			21 (95,5)		
	Não-mucinoso	81 (47,6)			159 (93,5)		

Utilizado teste de Qui-Quadrado. [a] Teste de Fisher, correção do valor de p do teste Qui-quadrado quando o número de observação é pequeno (N<5).

4.4 Análise de sobrevida

4.4.1 Seguimento dos pacientes

O *status* da casuística ao final de 5 anos de seguimento está descrito na tabela 6. Após 60 meses de acompanhamento, 68,89% dos pacientes estavam vivos e 31,11% morreram.

Tabela 8. Status vital dos pacientes operados por câncer colorretal.

Status Vital (n=225)		n	%
Vivos		155	68,89
Óbitos		70	31,11
	Óbitos por CCR	16	23,11
	Óbitos por outras causas	54	76,89

4.4.2 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL

Avaliaram-se as razões de risco de óbito por CCR na presença dos genótipos dos genes MTHFR 677C>T e MTHFR 1298A>C. As curvas de sobrevida obtidas pelo método de Kaplan-Meier com os respectivos valores de *p* de log rank estão representados na figura 3.

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa dos genótipos da MTHFR. Os dados estão representados nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Resultado da análise de risco de óbito e seus intervalos de confiança (95%) dos polimorfismos da MTHFR em pacientes com câncer colorretal.

Genótipos		RR	95% IC		*P*
MTHFR 677C>T	CC		Referência		
(RS1801133)	CT	1,43	0,88	2,33	0,153
	TT	0,58	0,24	1,39	0,22
MTHFR 1298A>C	AA		Referência		
(RS1801131)	AC	1,24	0,76	2,01	0,388
	CC	0,55	0,17	1,78	0,316

Os resultados são expressos em razão de risco (RR) intervalo de confiança de 95% (IC). Foi utilizada a regressão simples de Cox.

Tabela 10. Razão de Risco de Óbito em relação aos Genótipos Selvagens e Polimórficos.

Genótipo		RR	95%IC		*P*
MTHFR 677C>T	CC	Referência			
(RS1801133)	CT + TT	0,49	0,21	1,14	0,097
MTHFR 1298A>C	AA	Referência			
(RS1801131)	TC + CC	0,5	0,16	1,58	0,237

Os resultados são expressos em razão de risco (RR) intervalo de confiança de 95% (IC). Foi utilizada a regressão simples de Cox.

As curvas de sobrevida comparando os genótipos dos polimorfismos MTHFR 677C>T e MTHFR 1298A>C, pelo teste de Long Rank para o SNP MTHFR 677C>T o Qui-quadrado foi de 4,10 e o valor de *p*=0,12, no SNP MTHFR 1298A>C o Qui-quadrado foi de 1,04 e o valor de *p*=0,592, ambos não mostraram diferenças estatísticas significativas na sobrevida global para os pacientes com CCR.

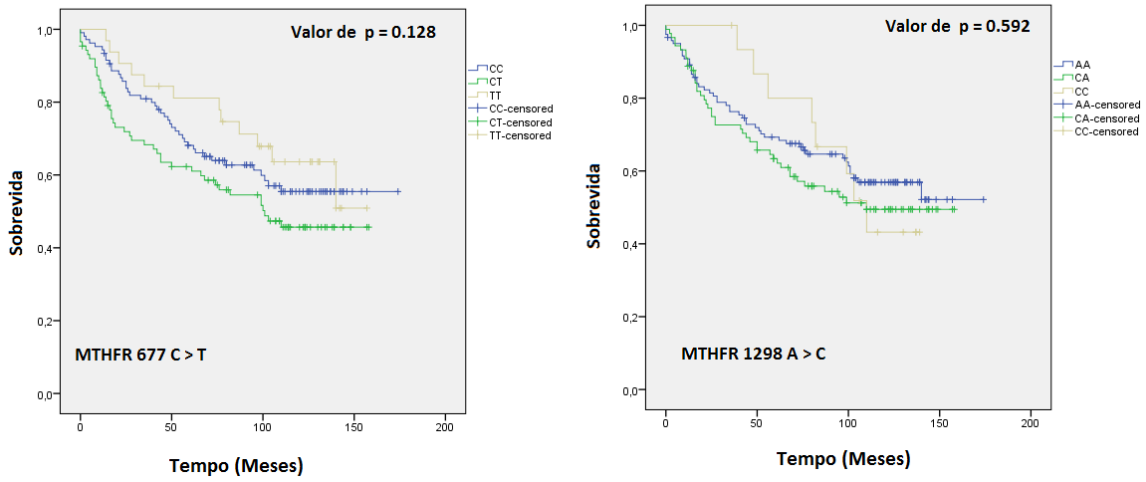

Figura 3. Curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier dos indivíduos com CCR em relação aos polimorfismos MTHFR 677 C>T e MTHFR 1298 A>C.

A curva de sobrevida comparando os homozigotos selvagens CC e AA versus os demais genótipos dos polimorfismos MTHFR 677 C>T e MTHFR 1298 A>C foi feita pelo teste de Long Rank o Qui-quadrado foi de 2,44 e o valor de *p*=0,11 não mostrou diferença estatística.

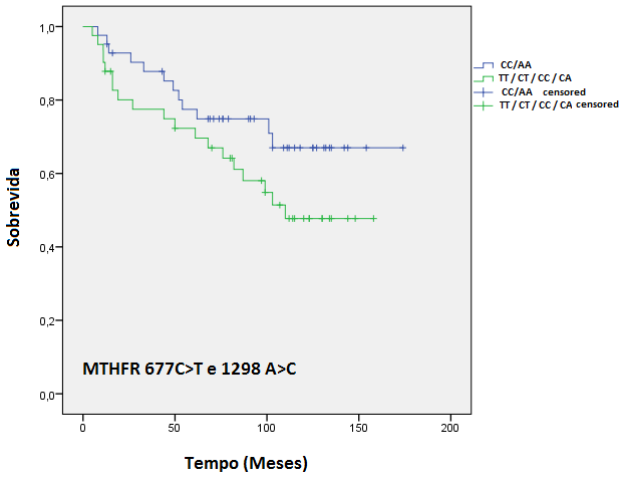

Figura 4. Curva de sobrevida geral pelo método de Kaplan-Meier dos indivíduos com CCR comparando os homozigotos selvagens CC e AA versus os demais genótipos dos polimorfismos MTHFR 677 C>T e MTHFR 1298 A>C.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os objetivos deste estudo foram investigar a frequência dos polimorfismos em pacientes com câncer colorretal, a distribuição dos genótipos e haplótipos e associá-los aos fatores clinicos, epidemiológicos, patológicos e a sobrevida global.

A incidência foi semelhante em ambos os sexos 53,8% foram homens e 46,2%, mulheres, com média de idade de 61,93 anos. Segundo dados do INCA apesar de o padrão da incidência ser semelhante entre os sexos, as maiores taxas foram do sexo masculino na maioria das regiões geográficas. Em outro estudo nacional mostrou a mesma característica, 69,2% foram homens e 51,4% mulheres [40].

As informações sobre tabagismo e etilismo foram coletadas a partir de questionários aplicados aos participantes do projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP. O etilismo foi considerado como consumo de bebidas alcoólicas pelo menos uma vez ao mês e o tabagismo como hábito de fumar em média um cigarro, cachimbo ou charuto, diariamente, pelo menos um ano.

Apenas 13,3% declaram ser fumantes ativos e 30,7% ex-tabagistas, já no etilismo 25,3% se declararam etilistas e 14,2% ex-etilistas. Segundo estudo realizado na coreia mostrou uma frequência parecida sendo 13,8% se declararam fumantes[41].

Em relação ao tipo histológico, a maioria foi do tipo não- mucinoso com 75,6% dos casos, sobre a localização 45,5% se localizava no cólon esquerdo e 29% no reto.

Nesta casuística 23% dos pacientes foram a óbito pelo CCR.

Selecionou-se a técnica de genotipagem *TaqMan ® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster city, EUA)*,em PCR em tempo real para este estudo levando-se em consideração que esta metodologia garante maior precisão e eficiência, com resultados num período de tempo consideravelmente curto, amplifica gene pequenos o que possibilitou a genotipagem de amostras antigas e parcialmente degradadas, pois por se tratar de um estudo retrospectivo, havia pequena quantidade de DNA extraído disponível. Os protocolos utilizados e seguidos requerem menor quantidade de DNA, e neste caso utilizou-se apenas 1,0µL contendo 10 ng de DNA, o que foi suficiente para as análises.

Outro fator importante para a escolha do método é a facilidade de análise do resultado, o qual o software mostra claramente o gráfico com os genótipos de acordo com o perfil de emissão das fluorescências.

O número dos casos neste presente trabalho, foram de duzentos e vinte e cinco, analisados quanto à distribuição genotípica e alélica dos SNPs dos polimorfismos MTHFR 677C>T e MTHFR 1298A>C.

As frequências encontradas nos casos foram para MTHFR677 C>T – CC 47,1%; CT 38,7%; TT 14,2% e MTHFR 1298A>C – AA 53,2%; AC 39,7%; CC 7,1%. Levando-se em consideração a população geral, as frequências do alelo polimórfico obtidas na genotipagem dos SNPs MTHFR677C>T e MTHFR1298A>C foram, respectivamente, de 0,33 e 0,27.

Segundo um estudo da associação dos SNPs com o risco de CCR na população da Turquia, as frequências foram semelhantes para o MTHFR677C>T, sendo CC 41,9%; CT 37,2% e TT 20,9% já para o SNP MTHFR1298 A>C as frequências foram AA 31,4%; AC 54,6% e CC 14% (38). Em chineses as frequências do SNP MTHFR 677C>T foram CC 33,5%; CT 45,1% e TT 21,4% (42). Em outro estudo com uma população australiana e polonesa as frequências para o SNP MTHFR 677C>T foram: CC 50,9%; CT 40,2%; TT 8,7% já para o SNP MTHFR1298 A>C as frequências foram AA 44,6%; AC 43,2% e CC 12,1% [43].

No presente estudo, as frequências genotípicas observadas e esperadas dos SNPs da MTHFR foram consistentes com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na população, considerando o nível de significância de 5%. As frequências, diferentes das esperadas em equilíbrio, podem ocorrer devido ao intercruzamento, estratificação populacional, seleção ou fatores desconhecidos de erros de determinação do genótipo(44). Ademais, não existe na literatura um consenso quanto aos valores descritivos de EHW. Alguns pesquisadores tem descartado *loci* que desviem do EHW em controles ao nível de significância $p=10^{-3}$ ou 10^{-4} [45].

A maioria dos casos de CCR são esporádicas, aproximadamente 25% dos pacientes têm história familiar. A variação genética, a epigenética, a diversidade socioeconômica, demográfica, racial e étnica tem impacto sobre os resultados da doença e devem ser cuidadosamente considerados na avaliação CCR[46;47]. No entanto, os mecanismos de

ativação molecular do CCR ainda não foram completamente definidos. O gene funcional da MTHFR é uma das moléculas ativadoras de doenças complexas incluindo CCR[48]. O gene tem um efeito pluripotente no metabolismo do folato, na regulação de outros genes, na metilação do DNA, na manutenção da integridade e estabilidade do DNA[48]. Os achados da literatura mostram resultados conflitantes sobre o papel da MTHFR na oncogênese. Em vários estudos, o genótipo MTHFR677 TT foi associado a um risco aumentado de CCR[49;50]. Em outro artigo foi constatado que o genótipo TT está associado a um risco aumentado de CCR na população portuguesa [51], porém não foi relatada qualquer relação na população Turca [52]. Os resultados sobre o SNP da MTHFR1298A>C com risco de CCR são também conflitantes [53;52;54]. Para o genótipo MTHFR1298 CC, dois estudos relataram um aumento no risco [55;56], enquanto outras meta-análises sugerem que os genótipos MTHFR1298 CC podem estar associados a uma diminuição no risco do CCR na população chinesa[57;58;59]. Segundo artigo publicado em 2013 onde citam que os SNPs no gene MTHFR associado ao CCR podem ser usados como uma ferramenta potencial de marcador genético para melhorar o diagnóstico e tratamento do câncer[60].

A distribuição das frequências dos polimorfismos também foram relacionada aos dados clínicos, epidemiológicos e patológicos dos pacientes com câncer colorretal.

Não foi encontrada associação entre os polimorfismos da MTHFR 677C>T e MTHFR1298A>C relacionados as variáveis descritas neste trabalho com o câncer colorretal.

Como é conhecido o consumo excessivo de bebidas alcoólicas e o tabagismo estão relacionados como fatores de risco para o CCR, nossos achados não mostraram interações entre os polimorfismos e estas variáveis.

Em relação aos etilistas, também não foram encontradas associações significativas entre os polimorfismos estudados. Conforme artigo publicado em 2013 [32], o álcool pode interferir com o metabolismo do carbono de várias maneiras, gerando deferentes padrões de metilação do DNA.

Em uma coorte de 609 pacientes, o consumo excessivo de álcool foi associado ao aumento do risco de CCR por hipometilação do DNA[61]. Além disso, uma baixa ingestão de folato associado à alta ingestão de álcool mostram uma maior frequência de metilação do promotor de genes envolvidos na carcinogênese do CCR em comparação a pessoas que tem

um alto consumo de folato associado com baixo consumo de álcool [62]. Um estudo publicado pela American Journal Clinial Nutrition mostrou que a ingestão baixa de folato juntamente com alta ingestão de álcool aumentou o risco de CCR em pessoas com o genótipo CC ou o genótipo CT [63].

No estudo foram encontradas as seguintes frequências com relação a localização para o polimorfismo MTHFR 667 C>T foram encontradas as seguintes frequências: Cólon direito CC 35,1%; CT 54,4%; TT 10,5%; Cólon esquerdo CC 51%; CT 31,4%; TT 17,6%; Reto CC 50,8%; CT 36,9%; TT 12,3%; para o MTHFR 1298 A>C foram encontrado as seguintes frequências: Cólon direto AA 42,9%; AC 44,6%; CC 12,5%; Cólon esquerdo AA 55,9%; AC 39,2%; CC 4,9%; Reto AA 56,9%; AC 36,9%; 6,2%.

Um estudo mostrou que o risco de CCR em portadores homozigotos era dependente da localização do CCR. Foi observado no estudo que o genótipo TT estava associado a um risco aumentado de câncer nas regiões do cólon mais próximo do intestino delgado, mas com um risco reduzido de câncer nas regiões mais próximas do reto. Mais importante ainda, o risco aumentado de câncer proximal foi altamente prevalente em indivíduos com alto consumo de álcool[64]. A instabilidade de microssatélites também tem sido relacionada com o risco de CCR em pessoas com o genótipo TT[65]. Finalmente, a ingestão dietética de folato e álcool também tem sido associada com risco de CCR em pessoas portadoras da variante MTHFR C. Um subconjunto de CCR exibem metilação do promotor em múltiplos genes; estes tumores são referidos como fenótipo de metilador de ilha CpG [66]. A frequência desses tumores depende da localização do câncer. Assim, 30 a 40 % estão na região do cólon proximal, em comparação com 3 a 12 % que estão na região distal e retal[67].

Não houve diferença estatisticamente significante na sobrevivência entre os dois SNPs, observando as curvas de sobrevivência na figura 3 podemos verificar que para o genótipo MTHFR677 CC e MTHFR1298 AA parece ter uma sobrevida maior que os demais genótipos. Em um artigo foi verificado que portadores do homozigoto CC tinham uma sobrevida mais curta [68], há outras conclusões onde se verificou que a sobrevida era maior para pacientes com genótipos AA comparados aos pacientes com genótipos AC [69]. Em um estudo com 51 pacientes com CCR fase III, no subgrupo de pacientes que tinham câncer do reto-sigmoide com genótipo MTHFR677 CC tiveram uma sobrevivência mais longa do que os que tinham o genótipo CT e TT[70]. No entanto, em outro estudo com 94

pacientes com CCR metastático os autores não encontraram correlação significativa entre os dois polimorfismos com a sobrevida dos pacientes [71].

Uma das principais limitações do nosso estudo foi a coleta de dados retrospectivamente de prontuários, laudos de exames e questionários, outra limitação foi não incluir mais fatores dietéticos ou de estilo de vida, níveis de folato. O folato mostrou-se fortemente ligado em muitos estudos, com baixos níveis de folato encontrados aumentam o risco pela hipometilação com isso folato também influencia a atividade da enzima MTHFR tornando importante estas informações para futuros estudos.

A capacidade em detectar polimorfismos no nível do DNA vem modificando profundamente os estudos de genética humana. Um dos maiores impactos da detecção de polimorfismos do DNA tem sido o seu emprego para analisar marcadores para mapeamento, identificação de genes causadores de doenças, entre outros.

A compreensão dos polimorfismos da MTHFR e outro envolvidos no CCR permitirá o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes assim como o desenvolvimento de novas drogas melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir dentro das condições de realização desta pesquisa que:

- As frequências dos polimorfismos *MTFR* (677C>T e 1298A>C) em pacientes com adenocarcinoma colorretal foram levantadas e agrupadas por genótipos assim como a significância, metade dos indivíduos apresentaram frequências genotípicas de homozigotos selvagens nos dois polimorfismos estudados (CC e AA).

- Não houve associações estatisticamente significativas dos polimorfismos mencionados com os dados clinicopatológicos, sexo, idade, localização tumoral, tipo histológico, antecedentes de tabagismo e alcoolismo e sobrevida dos pacientes com CCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zealand N. Cancers Fact Sheets : **Colorectal Cancer 2012** [on-line] p.1-10 [citado 22 de outubro de 2016]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx>

2. INCA - Instituto Nacional de Câncer - **Estimativa 2016**. p. 124 Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>

3. Karahalios A., Simpson J A. Weight Change and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Am J Epidemiol** v. 181, p 832–45, 2015 Disponível em: <http://aje.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/aje/kwu357>

4. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: The European prospective investigation into cancer and nutrition. **J Natl Cancer Inst**. v. 97, p 906-16, 2005.

5. Willett WC. Diet and Cancer : One View at the Start of the Millennium. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v 1, p 3-8, 2001.

6. Cancerno Brasil 2010 [Internet]. [citado 5 de novembro de 2016]. p. 462. Disponível em : <http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2010>

7. SJ W. Natural history of colorectal cancer. **Am J Med** [Internet]. v 106, p 3S-6S, 1999. Disponível em : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089106>

8. In Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA LL. **The Molecular Basis of Cancer.** v. 1 p 289-312, 2001.

9. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell.** v. 87, p159-70,1996.

10. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka a, Nakajima T, et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology.** v. 121, p 599+611, 2001.

11. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. **N Engl J Med** [Internet]. v. 10, p 919-32, 2003 Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12621137

12. Marra, G.; boland C.R. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. **J Natl Cancer Inst** [Internet]. v. 87 p. 1114–25, 1995. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7674315

13. Jass J.R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. **Histopathology**. v. 50, p. 113-30, 2007.

14. O'Brien M.J et al. Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype. **Am J Surg Pathol** [Internet]. v. 28, p. 423–34, 2004. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087661

15. O'Brien M.J, et al. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. **Am J Surg Pathol** [Internet]. v. 30, p. 491–501, 2006. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17122504

16. Mäkinen M.J. Colorectal serrated adenocarcinoma. **Histopathology**. v. 50, p. 131-50, 2007.

17. Howlader N., Noone A.M., Krapcho M. et al. SEER Cancer Statistics Review; Bethesda (MD): **National Cancer Institute.** 2012.

18. Matthew P. et al. Primer on Medical Genomics: Part XII: Pharmacogenomics—General Principles With Cancer as a Model. **Mayo Clin Proc** [Internet]. v. 79, p. 376–84,2004. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008610

19. Canova C.,Hashibe M., Simonato L., Nelis M., Metspalu A., Lagiou P., et al. Genetic associations of 115 polymorphisms with cancers of the upper aerodigestive tract across 10 european countries: The ARCAGE project. **Cancer Res**.v. 69, p. 2569-65, 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008610

20. NCBI Variation Viewer Homo sapiens [Internet]. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

21. Kristensen M.H, Pedersen P.L, Melsen G. V., Ellehauge J., Mejer J. Variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes predict early toxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. **J Int Med Res**. v. 38, p. 870-83,2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20819423

22. Caetano A.R. Marcadores SNP: Conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Rev Bras Zootec**. v. 38, p. 64-71,2009.

23. Guimarães, P.E.M.; Costa M.C.R. SNPs: Sutis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. p 24-7, 2002.

24. Tabor H.K., Risch N.J., Myers R.M. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: Practical considerations. **Nat Rev Genet**. v.3 ,p. 391-7, 2002. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988764

25. Houlston R.S., Tomlinson I.P. Polymorphisms and colorectal tumor risk. **Gastroenterology**. v. 121 p. 282-301, 2001. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487538

26. Shields, P. G.; Harris C.C. Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer. **JAMA** [Internet]. v. 266 p. 681–7, 1991. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2072479

27. Terwilliger J.D.; Weiss K. Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality? **Curr opin Biotechnol**. v. 9, p. 578-94, 1998. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9889136

28. Langevin S.M., Lin D., Matsuo K., Gao C.M., Takezaki T., Stolzenberg-Solomon R.Z., et al. Review and pooled analysis of studies on MTHFR C677T polymorphism and esophageal cancer. **Toxicol Lett**. v. 30, p73-80, 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840514

29. Druesne-Pecollo N., Tehard B., Mallet Y., Gerber M., Norat T., Hercberg S., et al. Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. **Lancet Oncol** [Internet]. v. 10, p. 173-80, 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185835

30. Yang C.X., Matsuo K., Ito H., Shinoda M., Hatooka S., Hirose K., et al. Gene-environment interactions between alcohol drinking and the MTHFR C677T polymorphism impact on esophageal cancer risk: results of a case-control study in Japan. **Carcinogenesis**. v.26, p.1285-90, 2005.

31. Fang X.Y., Xu W.D., Huang Q., Yang X.K., Liu Y.Y., Leng R.X., et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and colon cancer risk: a meta-analysis. **Asian Pac J Cancer Prev** [Internet]. v.15, p. 8245-50, 2014. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339013

32. Varela-Rey M., Woodhoo A., Martinez-Chantar M. L., Mato J. M., Lu S.C. Alcohol, DNA methylation, and cancer. **Alcohol Res** [Internet]. v. 35, p. 25-35, 2013. Disponível em: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3860423&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

33. Shiao S.P.K., Yu C.H. Meta-Prediction of MTHFR Gene Polymorphism Mutations and Associated Risk for Colorectal Cancer. **Biol Res Nurs**. v. 18, p. 357-69, 2016. Disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26858257

34. Miao X., Xing D., Tan W., Qi J., Lu W., Lin D. Susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma and genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase in an at-risk Chinese population. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 11, p. 1454-8, 2002. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433726

35. Urano W., Taniguchi A., Yamanaka H., Tanaka E., Nakajima H., Matsuda Y., et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. **Pharmacogenetics**. v. 12, p. 183-190, 2002. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927833

36. Varela-Rey M., Woodhoo A., Martinez-Chantar M. L., Mato J.M., Lu S.C., Davis C.D., et al. Nutritional Epigenetics: Impact of Folate Deficiency on DNA Methylation and Colon Cancer Susceptibility. **Alcohol Res** [Internet]. v. 35, p. 25-

35, 2005. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251634

37. Sharp L. J., Polymorphisms in genes involvedin folate metabolism and colorectal neoplasia: a hugereview. **Am J Epidemiol**. v. 159, p. 423-43, 2004. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977639

38. Ozen F., Sen M., Ozdemir O., Methylenetetrahydrofolate reductase gene germ-line C677T and A1298C SNPs are associated with colorectal cancer risk in the turkish population. **Asian Pacific J Cancer Prev**. v. 15, p. 7731-5, 2014. Disponibilidade em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25292054

39. COX D.R. Regression models and life-tables. **J R Stat Soc**. v. 34, p. 187-220, 1972.

40. Angelo S.N., Lourenço G.J., Magro D.O., Nascimento H., Oliveira R.A., Leal R.F., et al. Dietary risk factors for colorectal cancer in Brazil: a case control study. **Nutr J** [Internet]. v.15, p. 20, 2015. Disponível em: http://www.nutritionj.com/content/15/1/20

41. Kim J., Cho Y.A., Kim D., Lee B., Hwang D., Jeong J., et al. Dietary intake of folate and alcohol , MTHFR C677T polymorphism , and colorectal cancer risk in Korea. v. 95, p. 405-12, 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22218157

42. Yin G., Ming H., Zheng X., Xuan Y., Liang J., Jin X., Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and colorectal cancer risk: A case-control study. **Oncol Lett** [Internet]. v. 4, p. 365-369, 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844384

43. Reeves S.G., Meldrum C., Groombridge C., Spigelman A.D., Suchy J., Kurzawski G., et al. MTHFR 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms and the age of onset of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Eur J Hum Genet**

[Internet]. v. 17, p. 629-635, 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2986255/

44. XU J et al. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? Hum Genet [Internet]. 111(0340–6717):573–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516594

45. Balding D.J., A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nat Rev Genet** [Internet]. v.7, p. 781,91, 2006. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983374

46. Kono S CK. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma. **Cancer Sci.** v. 96, p. 535-42, 2005. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16128738

47. Cheah P.Y. Recent advances in colorectal cancer genetics and diagnostics. **Crit Rev Oncol Hematol**. v. 69, p.45-55, 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18774731

48. Ge H., Zheng X., Zhao E., et al. Letter to the editor: a meta-analysis of association between polymorphism of MTHFR A1298C and colorectal cancer risk. **Int J Color Dis**.v. 27, p.1987-8, 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22350268

49. Gallegos-Arreola MP, García-Ortız JE, Fıguera LE et al. Association of the 677C>T polymorphism in the MTHFR gene with colorectal cancer in Mexican patients. Cancer Genomics Proteomics. 2009;6:183–8.

50. Sameer A.S., Shah Z.A., Nissar S., et al. Risk of colorectal cancer associated with the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in the

Kashmiri population. **Genet Mol Res**. v. 10, p. 1200-10, 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21732284

51. Guerreiro C.S., Carmona B, Gonçalves S 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**. v. 88, p. 1413-8, 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996879

52. Zeybek U, Yaylim I, Yilmaz H et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with gastric and colorectal cancer. **Cell Biochem Funct**. v. 25, p. 419-22, 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16927418

53. Chang S.C., Lin P.C., Lin J.K., et al. Role of MTHFR polymorphisms and folate levels in different phenotypes of sporadic colorectal cancers. **Int J Color Dis**. v. 22, p. 483,9, 2007.

54. Cao H.X., Gao C.M., Takezaki T., et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and susceptibility to colorectal cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 9, p. 203-8, 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18712959

55. Kury S., Buecher B., Robiou-du-Pont S., et al. Low-penetrance alleles predisposing to sporadic colorectal cancers: a French case-controlled genetic association study. **BMC Cancer**. v. 8, p 326, 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992148

56. Lightfoot T.J., Barrett J.H., Bishop T., et al. Methylene tetrahydrofolate reductase genotype modifies the chemopreventive effect of folate in colorectal adenoma, but not colorectal cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**.v 14, p. 2421-30, 2008.

Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703816

57. Huang Y., Han S., Li Y., et al. Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis. **J Hum Genet**. v. 52, p. 73-85, 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17089070

58. Fernandez-Peralta A.M., Daimiel L., Nejda N., et al. Association of polymorphisms MTHFR C677T and A1298C with risk of colorectal cancer, genetic and epigenetic characteristic of tumors, and response to chemotherapy. **Int J Color Dis**. v.25, p. 141-51,2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19669769

59. Li H., Xu W.L., Shen H.L., et al. Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and haplotypes associated with susceptibility to colorectal cancer in an eastern Chinese Han population. **Genet Mol Res**. v. 10, p. 3738-46, 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194208

60. Nassiri M., Kooshyar M.M., Roudbar Z., et al. Genes and SNPs associated with non-hereditary and hereditary colorectal cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**. v.14, p. 5609-14, 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24289550

61. Schernhammer E.S., Giovannucci E., Kawasaki T., Rosner B., Fuchs C.S., Ogino S. Dietary folate, alcohol and B vitamins in relation to line-1 hypomethylation in colon cancer. **Gut**. v. 59, p. 749-9, 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828464

62. Vanengeland, M.; WeiJenBerg, M.P.; Roemen G. M., et al. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: The netherlands cohort study on diet and cancer. **CancerResearch**. v. 63, p. 3133-7, 2003. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810640

63. Kim J., Cho Y.A., Kim D.H., Lee B.H., et al. Dietary intake of folateand alcohol, MTHFR C677T polymorphism, and colorectal cancer risk in korea. **Am J Clin Nutr.** v. 95, p. 405-12, 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22218157

64. Iacopetta, B.; heyworth, J.; girschik J. et al. The MThFrC677T and DeltaDNMT3B C-149T polymorphisms conferdifferent risks for right- and left-sided colorectal cancer. **Int J Cancer**. v. 125, p. 84-90, 2009. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19326430

65. Shannon B.; Gnanasampanthan S., Beilby J.; Lacopetta B., A polymorphism in the methylenetetrahydrofolatereductase gene predisposes to colorectal cancers withmicrosatellite instability. **Gut**. v.50, p. 520-4, 2002.

66. Toyota M. A. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. **Semin Cancer Biol**. v. 9, p. 349-57, 1999. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547343

67. Curtin K., Slattery M.L., Ulrich C.M., Bigler J., et al. Genetic poly-morphisms in one-carbon metabolism: associations with CpG island methylator phenotype (CIMP) in colon can-cer and the modifying effects of diet. **Carcinogenesis**. v. 28, p. 1672-9, 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449906

68. Zhu L., Wang F., Hu F., Wang Y., Li D., Dong X., et al. Association between MTHFR polymorphisms and overall survival of colorectal cancer patients in Northeast China. **Med Oncol**. v. 30, p.467, 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23392576

69. Zhang W., Press O.A., Haiman C.A., Yang D.Y., et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and sex-specific survival in patients with metastatic colon cancer. **J Clin Oncol**. v. 25, p. 3726-31, 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17704422

70. Wisotzkey J.D., Toman J., Bell T., Monk J.S., Jones D., MTHFR (C677T) polymorphisms and stage III colon cancer: response to therapy. **Mol Diagn.** v4, p 95-9, 1999. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462625

71. Marcuello E., Altes A., Menoyo A., Rio E.D. Baiget M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy? **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 57, p. 835-40, 2006. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16187112

ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER DO CÔMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA CAPPESQ.

MEDICINA
USP

São Paulo, 01 de novembro de 2013.

Ilmos. Srs.
Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Junior
Sr. Diego Mateus de Souza

Prezado Prof. Ulysses,

Atendendo á solicitação V.Sa., **a Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP**, em sua **185ª Reunião Ordinária de 31 de outubro de 2013**, **analisou** o seu projeto de pesquisa, intitulado: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DAS ENZIMAS MTHFR E MUTAÇÃO DA DPD EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL SUBMETIDOS Á TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO COM 5-FLUOROURACIL (5-FU). **Cadastro on line: 11488**

Co-autores: Evelise Pelegrinelli Zaidan, Michele Tatiana Pereira Tomitão, Márcia Saldanha Kubrusly, Venâncio Avancini Ferreira Alves, Sergio Carlos Nahas, Ivan Cecconello.

Situação: Aprovado

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Herman
Presidente da Comissão Ético-Científica do
Departamento de Gastroenterologia da FMUSP

FMUSP - MOD.

IMPRENSA OFICIAL DO ESTADO S.A. - IMESP

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO GRUPO DE ESTUDO.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

GRUPO DE ESTUDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE .:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M Ž F Ž

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL ……

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M Ž F Ž

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **"Perfil Genético do Câncer Colorretal e suas Aplicações Clínicas."**

PESQUISADOR: Profª Dra. Angelita Habr-Gama

CARGO/FUNÇÃO:. Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 8.345

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo e Colo-proctologia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO Ž **RISCO MÍNIMO X** RISCO MÉDIO Ž

RISCO BAIXO Ž RISCO MAIOR Ž

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como conseqüência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : Cinco anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO

1. **Justificativa e os Objetivos da Pesquisa –** A pesquisa se intitula "Perfil Genético do Câncer Colorretal e suas aplicações clínicas". O objetivo deste estudo é auxiliar na elucidação da importância de exames genéticos no diagnóstico e no tratamento de pacientes portadores de neoplasias de colon e de reto.

2. **Procedimento que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que serão experimentais –** Os exames usados são basicamente o estudo do material retirado durante uma cirurgia e/ou colonoscopia e de sangue coletado antes da operação. Todo este material será identificado através de números, e o nome dos pacientes não será revalado, para que se possa assegurar sua privacidade e de seus familiares. Não será realizado nenhum tipo de procedimento experimental no paciente.

3. **Descofortos e riscos esperados –** O descorforto e o risco deste procedimento serão os advindos normalmente durante os procedimentos cirúrgicos.

4. **Benefícios que poderão ser obtidos –** Acredita-se que, entendendo melhor o câncer, os médicos poderão ter condições de fazer o diagnóstico e o tratamento de maneira mais segura e eficiente do que vem sendo realizada até este momento.

5. **Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo**.

Esta pesquisa não envolve nenhum tipo de procedimen to clínico sobre os doentes.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO

1. **Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas** – A qualquer tempo o paciente, responsáveis ou familiares poderão receber esclarecimentos sobre dúvidas a respeito dos procedimento, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados ao tratamento e ao protocolo em questão.

2. **Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição –** O paciente poderá deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que haja prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

3. **Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade –** As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros resultados, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Há o direito de se manter atualizado sobre resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

4. **Disponibilidade de assistência no HC-FMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa –** Não há despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames ou consultas. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado) o participante tem direito a tratamento médico na instituição, bem como os indenizações legalmente estabelecidas.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS

Profª Dra. Angelita Habr-Gama

Prof. Dr. Desidério Kiss

Prof. Dr. Venâncio A.F. Alves

Prof. Dr. José Eduardo Krieger

Prof. Dr. José Hypólito da Silva

Uana Maria Miguel Jorge

Katia Adriana Tessima Franco

Dr. Ulysses Ribeiro Jr.

Dr. Osmar Kenji Yagi

Dr. Marcelo Eidi Nita

Dr. Rodrigo Perez

Gladis Wilner

Helena Scavone Paschoale

Secretaria da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo e Coloproctologia

Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)

Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 255 - 9º Andar – CEP 04619-035 São Paulo, SP. Telefone: 0xx 11 3069 7561

Prof. José Eduardo Krieger - Diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular - INCOR - TEL: 3069-5068

Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 CEP 05403-000 Bairro Cerqueira César, São Paulo – SP

VI - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200__.

_____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)