Michele Tatiana Pereira Tomitão

**Análise de polimorfismos do gene ciclooxigenase-2
(COX-2) 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

2015

Michele Tatiana Pereira Tomitão

**Análise de polimorfismos do gene ciclooxigenase-2
(COX-2) 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

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tomitão, Michele Tatiana Pereira

Análise de polimorfismos do gene ciclooxygenase-2 (COX-2) no câncer
colorretal / Michele Tatiana Pereira Tomitão. -- São Paulo, 2015.

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.Ciclo-oxigenase 2
4.Genes 5.Polimorfismo genético 6.Polimorfismo de nucleotídeo único
7.Sobrevida

USP/FM/DBD-472/15

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **José e Ilka**, aos meus irmãos **Fabio, Eduardo e Gisele** e aos meus avós (in memoriam) **Renovato e Aurelina...**
... pelo amor e incentivo...*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que iluminou o meu caminho durante esta caminhada e possibilitou que tudo isso acontecesse.

Aos pacientes que participaram da pesquisa.

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

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

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

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Jr. pelo apoio, incentivo e paciência. Eterna admiração e gratidão.

À Dra. Marcia Saldanha Kubrusly, por todo o carinho, incentivo, e amizade desde o início da minha jornada como aluna de mestrado. Eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Sergio Carlos Nahas, pelo apoio, pelos ensinamentos e pelo cuidado que sempre teve comigo. Eterna gratidão.

Ao estatístico Dr. Marcio Augusto Diniz, pelo excelente trabalho e pela amizade que surgiu neste período.

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

Ao gupo Genoma Clínico do Câncer Colorretal, em especial à Uana Maria Miguel, pela oportunidade concedida de ingressar no departamento.

Aos amigos do departamento de Gastroenterologia, Fabiana, Myrtes, Priscila, Tainah, Elci, Débora, Vilma, Marta, Jô, Antonio e Marcos (*in memoriam*), pelo apoio e pela amizade.

Às enfermeiras do ambulatório de Gastroenterologia por toda a ajuda. Em especial à Maria, pelo carinho que sempre teve por mim e pela amizade.

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 contribuírem direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Evandro Sobroza de Melo pela participação na banca de qualificação.

Aos amigos do LIM-25, pela grande ajuda ao esclarecer as muitas dúvidas técnicas que surgiram no início do trabalho e por disponibilizarem o equipamento Step One Plus.

À Tatiane Katsue Furuya, pela acessoria na etapa final do trabalho e pelas análises estatísticas complementares.

Aos amigos do ICESP, Marina, Denise, Paulo, Maiara, Evelise, Diego, Tharcisio, Gabriela, Valdeci e Evelin, pelo apoio diário e por fazerem o dia a dia de trabalho mais feliz.

Àos amigos do cursinho, pelo companheirismo e palavras de conforto dadas nos momentos difíceis.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa (Auxílio Regular Nº 2011/23181-5).

"Qualquer coisa que você aprende se torna sua riqueza, uma riqueza que não pode ser tomada de você; seja se você aprende em um prédio chamado escola ou na escola da vida. Aprender algo novo é um prazer sem fim e um tesouro valioso. E nem todas as coisas que você aprende são ensinadas a você, mas muitas coisas que aprende, você percebe ter ensinado a si mesmo."

C. JoyBell

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	1
1.1 Câncer colorretal: aspectos Epidemiológicos	1
1.2 Ciclooxigenase-2 (COX-2): biossíntese de prostaglandinas e regulação	3
1.3 Polimorfismos Genéticos	4
1.4 Gene COX-2 e variantes genéticas	5
1.5 A enzima COX-2 e os tumores colorretais	7
1.6 Significância.....	9
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	16
3.3 Levantamento de dados	18
3.4 Análise Estatística	19

3.4.1 Modelos	19
3.4.2 Casos x Controles.....	19
3.4.3 Casos clínicos	20
3.4.4 Sobrevida	20
3.4.5 Programas utilizados e nível descritivo	21
4. RESULTADOS	23
4.1 Estudo Casos x Controles	23
4.1.1 Características dos grupos de estudo.....	23
4.1.2 Análise da frequência de Genótipos e Haplótipos	25
4.1.3 Análise de risco entre Casos e Controles	27
4.2 Associação dos polimorfismos com as variáveis clinicopatológicas em pacientes com CCR	30
4.2.1 Características do grupo de estudo.....	30
4.2.2 Teste de associação das variáveis com os genótipos	35
4.3 Análise de sobrevida.....	45
4.3.1 Seguimento dos pacientes.....	45
4.3.2. Análise da sobrevida global e progressão livre de doença	46
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
8. ANEXOS.....	86
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa CAPPesq.	86
Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do grupo de estudo.	87
Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do grupo controle.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR - unidade não traduzida 3'

5'UTR - unidade não traduzida 5'

5-FU – 5-Fluoracil

A - adenina

AA - ácido araquidônico

AIC - critério de Informação de Akaike

AINEs – antio-inflamatórios não-esteroidais

Ala – alanina

AP1 - proteína ativadora 1

APC - adenomatose polipose coli

BAX - *Bcl-2 associated protein X*

CAP - *College of American Pathologists*

CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CCR – Câncer colorretal

CEA – antígeno carcinoembrionário

CIMP - metilação de citocinas das ilhas CpG

CIN - instabilidade cromossômica

COX-2 - ciclooxigenase 2

dbSNP - base de dados pública de polimorfismos de base única

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

DL - desequilíbrio de ligação

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP - Desvio padrão

EP – receptor de prostaglandina

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

G - guanina

HeLa - Henrietta Lacks

HNPCC - Câncer Colorretal Hereditário não Polipóide

IC - Intervalo de confiança

IMC - índice de massa corpórea

INRAD - Instituto de Radiologia

Kb – kilobase

KRAS- *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LPS - lipopolissacarídeos

MGB - *Minor Groove Binder*

MGMT - O6-metilguanina-DNA metiltransferase

mirRNA – micro RNA

MLH1 - *mutL homolog 1*

MSH2 - *mutS homolog 2*

MSI - Instabilidade de microssatélite

MSS - estabilidade em microssatélite

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NF-kB - Fator nuclear kappa B

OR - odds ratio

PAF – polipose adenomatosa familiar

Pb – par de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PGE₂, - prostaglandina E₂

PGG₂ - prostaglandina G₂

PGH₂ - prostaglandina H₂

PGTS2 – prostaglandina G/H Sintase

PLA₂ - fosfolipase A₂

RFLP - Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição

RNA_m - RNA mensageiro

RR - razão de risco

Rs - *SNP ID number*

SEADE - Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados

SIGH - Sistema Integrado de Gestão Hospitalar

SMAD4 - *SMAD family member 4*

SNP - polimorfismos de nucleotídeo único

Sp1 - proteína estimulatória 1

T - timina

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

TP53 - *tumor protein 53*

UV - ultravioleta

Val - valina

LISTA DE SÍMBOLOS

ng nanograma

μL microlitro

mL mililitro

< menor que

$\leq$ menor e igual

= igual a

> maior que

$\geq$ maior e igual

$^{\circ}\text{C}$ graus Celsius

mL mililitro

% por cento

nm nanômetro

min minuto

seg segundo

χ^2 Qui-quadrado

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA GRÁFICO DA DISCRIMINAÇÃO GENOTÍPICA PELO STEPONE PLUS.	18
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (DL) ENTRE OS POLIMORFISMOS DO GENE COX-2.	27
FIGURA 3. FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DO POLIMORFISMO COX-2 -1195A>G ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS DO GRUPO CASO.	37
FIGURA 4. FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DO POLIMORFISMO COX-2 -1195A>G ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS DO GRUPO CASO.	37
FIGURA 5. FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DO POLIMORFISMO COX-2 8473T>C ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS DO GRUPO CASO.	41
FIGURA 6. FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DO POLIMORFISMO COX-2 8473T>C ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS DO GRUPO CASO.	42
FIGURA 7. FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DO POLIMORFISMO COX-2 8473T>C ENTRE INDIVÍDUOS COM E SEM INVASÃO ANGIOLINFÁTICA..	43
FIGURA 8. CURVAS OBTIDAS PELO MÉTODO DE KAPLAN-MEIER PARA SOBREVIDA GLOBAL (A) E SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA (B) DOS PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL.	46
FIGURA 9. CURVAS OBTIDAS PELO MÉTODO DE KAPLAN-MEIER PARA SOBREVIDA GLOBAL DO POLIMORFISMO COX-2 -1195A>G..	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPONENTES DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL.	17
TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO (CASOS E CONTROLES) SEGUNDO IDADE, SEXO, ETNIA, ESCOLARIDADE, ETILISMO E TABAGISMO..	25
TABELA 3. POLIMORFISMOS ESTUDADOS, POSIÇÃO NO CROMOSSOMO, FREQUÊNCIAS ESPERADAS E OBSERVADAS, INFORMAÇÕES SOBRE O EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG, % DE AMOSTRAS GENOTIPADAS, MAF (MINOR ALELE FREQUENCY) E ALELOS ANALISADOS PARA CADA POLIMORFISMO.	26
TABELA 4. DISTRIBUIÇÃO, FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E TESTE DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs DO COX-2 ENTRE CASOS E CONTROLES.	28
TABELA 5. TESTE DE ASSOCIAÇÃO (χ^2) DOS ALELOS DE CADA POLIMORFISMO DO COX-2 ENTRE CASOS E CONTROLES.	29
TABELA 6. TESTE DE ASSOCIAÇÃO (χ^2) DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELO BLOCO SELECIONADO COM O CÂNCER COLORRETAL.	29
TABELA 7. DISTRIBUIÇÃO, FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS E TESTE DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs DO COX-2 ENTRE CASOS E CONTROLES.	30
TABELA 8. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS DOS 230 PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL. HCFMUSP, 2001-2006.	32
TABELA 9. CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DOS 230 PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL. HCFMUSP, 2001-2006.	34
TABELA 10. DISTRIBUIÇÃO, FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO SNP COX-2 -1195A>G E TESTE DE ASSOCIAÇÃO COM AS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS EM 230 PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL.	36
TABELA 11. DISTRIBUIÇÃO, FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO SNP COX-2 -1195A>G E TESTE DE ASSOCIAÇÃO COM AS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS EM 230 PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL.	38
TABELA 12. DISTRIBUIÇÃO, FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO SNP COX-2 8437T>C E TESTE DE ASSOCIAÇÃO COM AS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS EM 230 PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL.	40

TABELA 13. DISTRIBUIÇÃO, FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO SNP COX-2 8437T>C E TESTE DE ASSOCIAÇÃO COM AS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS EM 230 PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL.	44
TABELA 14. STATUS VITAL DOS PACIENTES OPERADOS POR CÂNCER COLORRETAL.	45
TABELA 15. RESULTADO DA ANÁLISE DE RISCO DE ÓBITO E RECIDIVA DAS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS COM SEUS INTERVALOS DE CONFIANÇA (95%), DE 230 PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL.	47
TABELA 16. RESULTADO DA ANÁLISE DE RISCO DE ÓBITO E RECIDIVA DAS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS COM SEUS INTERVALOS DE CONFIANÇA (95%), DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL.	49
TABELA 17. RESULTADO DA ANÁLISE DE RISCO DE ÓBITO E SEUS INTERVALOS DE CONFIANÇA (95%) DOS POLIMORFISMOS DO COX-2 EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL.	50
TABELA 18. RESULTADO DA ANÁLISE DE RISCO DE RECIDIVA E SEUS INTERVALOS DE CONFIANÇA (95%) DOS POLIMORFISMOS DO COX-2 EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL.	52
TABELA 19. RESULTADO DA ANÁLISE DE RISCO DE ÓBITO E SEUS INTERVALOS DE CONFIANÇA (95%) DOS HAPLÓTIPOS DO COX-2 EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL.	52
TABELA 20. RESULTADO DA ANÁLISE DE RISCO DE RECIDIVA E SEUS INTERVALOS DE CONFIANÇA (95%) DOS HAPLÓTIPOS DO COX-2 EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL.	53

RESUMO

Tomitão MTP. *Análise de polimorfismos do gene ciclooxigenase-2 (COX-2) no câncer colorretal* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A População brasileira apresenta elevada diversidade genética devido à multiétnica, que têm implicações clínicas/genéticas importantes. O estudo de genes polimórficos pode auxiliar na detecção de pessoas com maior risco de desenvolver câncer, caracterização de evolução diferenciada, resposta distinta ao tratamento quimioterápico ou radioterápico e prognóstico. A ciclooxigenase-2 (COX-2) é induzida em resposta ao fator de crescimento e citocinas, sendo expressa nas doenças inflamatórias, lesões pré-malignas e tumores colorretais. Este trabalho teve como objetivos avaliar a influência dos polimorfismos -1195A>G e 8473T>C do gene COX-2 como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer colorretal e investigar o impacto dos polimorfismos na progressão e sobrevida de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico por câncer colorretal. Avaliaram-se SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) em 230 pacientes submetidos à ressecção cirúrgica no Hospital das Clínicas (SP), seguidos por 5 anos e 196 controles, operados por doença benigna na mesma instituição, pareados quanto ao sexo e idade, sem histórico individual ou familiar de câncer. Isolou-se o DNA dos leucócitos utilizando-se do kit de extração e purificação PureLink DNA Minikit, seguido de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Utilizou-se a análise do PCR em Tempo Real para determinar os genótipos os polimorfismos através dos ensaios TaqMan® SNP Genotyping Assay. Os resultados encontrados foram associados aos dados epidemiológicos e clinicopatológicos dos pacientes. Determinaram-se as frequências genóticas, alélicas e estimaram-se as frequências de haplótipos dos polimorfismos do COX-2 -1195A>G e 8473T>C. As populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a exceção do grupo controle para o polimorfismo 8473T>C ($p=0,02$). As frequências foram similares nos grupos caso e controle para genótipos e haplótipos, portanto, não há associação entre esses polimorfismos e risco de CCR. Em

relação às variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas do grupo caso, demonstraram-se associação das mesmas com alguns perfis genotípicos. Encontrou-se frequência elevada do genótipo polimórfico -1195GG na população oriental, grupo constituído em sua maioria por japoneses, e dos genótipos 8473TC e CC em afrodescendentes ($p < 0,05$). Neste grupo, o genótipo -1195GG é ausente. Foi encontrada. Encontrou-se associação entre invasão angiolinfática e genótipo polimórfico 8473 CC ($p < 0,05$). Na análise de sobrevida, houve associação, no modelo codominante e dominante, do genótipo *COX-2* -1195GG com menor sobrevida global (AAxGG: RR = 2,78; IC95% = 1,13-6,84; $p < 0,020$ e AA/AG x GG: RR = 2,59; IC95% = 1,07-6,27; $p < 0,04$), utilizando o modelo de regressão múltipla, ajustado para as variáveis de confusão. Assim, pode-se concluir que as variantes -1195A>G e 8473T>C não participam da suscetibilidade genética ao CCR na população brasileira. O polimorfismo -1195A>G, associado à menor sobrevida, pode atuar como marcador prognóstico nestes pacientes.

Descritores: neoplasias; neoplasias colorretais; ciclo-oxigenase 2; genes; polimorfismo genético; polimorfismo de nucleotídeo único; sobrevida.

ABSTRACT

Tomitão MTP. Analysis of the cyclooxygenase-2 (COX-2) gene polymorphisms in colorectal cancer [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Brazilian population displays very high levels of genomic diversity due to the multi-ethnicity, which have important clinical/genomic implications. Polymorphic genes' study may aid in the detection of people at higher risk of developing cancer, characterization of differentiated outcome, distinctive response to chemotherapy or radiotherapy and prognosis. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is induced in response to growth factor and cytokines, and it is expressed in inflammatory diseases, precancerous lesions and colorectal tumors. This study aimed to evaluate the influence of *COX-2* -1195A> G and 8473T> C gene polymorphisms as a risk factor for developing colorectal cancer and to investigate the impact of polymorphisms on progression and survival in patients who have undergone surgical treatment for colorectal cancer. We evaluated SNPs (Single nucleotide Polymorphism) of 230 colorectal cancer resected patients admitted at the Hospital das Clínicas (SP), followed by 5 years, and 196 controls, operated for benign disease at the same institution, matched for age and sex, and no individual or familial history of cancer. DNA was isolated from leukocyte using PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, followed by amplification by polymerase chain reaction (PCR). Real-time analysis was used for genotyping of polymorphisms, through the TaqMan® SNP Genotyping Assay. The results of the polymorphisms were associated to epidemiological, clinicopathological and immunohistochemical features of the patients. Were determined genotype and allelic frequencies, and were estimated the haplotype frequencies of *COX-2* -1195A> G and 8473T> C polymorphisms. The populations are in Hardy-Weinberg equilibrium, except for the control group to the 8473T> C polymorphism ($p = 0,02$). The frequencies were similar in case and control groups for genotypes and haplotypes, therefore, there is no association between these polymorphisms and risk of CCR. Regarding the epidemiological and pathological variables in the case group, we demonstrate their association with some genotypic profiles. A high frequency of the polymorphic

genotype -1195GG was found in an Asiatic population, group composed in its majority by Japanese, and 8473TC and CC genotypes in African descent ($p<0,05$). In this group, the -1195GG genotype is absent. Association was found between angiolymphatic invasion and polymorphic genotype 8473 CC ($p<0,05$). In survival analysis, there was an association, in co-dominant and dominant model, of the COX-2 genotype -1195GG with decreased overall survival (AAxGG: RR = 2,78, 95% CI 1,13-6,84; $p<0,020$ and AA / AG x GG: RR = 2,59, 95% CI 1,07-6,27; $p<0,04$), using the multiple regression model, adjusted for confounding variables. Therefore, -1195A variants > G and 8473T > C does not appear participate in genetic susceptibility to CCR in the Brazilian population, but the polymorphism -1195A > G, associated with decreased survival, may act as a prognostic marker in these patients.

Descriptors: neoplasms; colorectal neoplasms; cyclooxygenase-2; genes; polymorphysm, genetic; polymorphysm, single nucleotide; survivorship (public health).

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer colorretal (CCR) configura-se como um problema de saúde pública de escala mundial. Foi a terceira neoplasia mais comumente diagnosticada em 2012, com 1.360.602 novos casos. Este valor corresponde a 9,7% de todos os casos de câncer registrados. No ano de 2012, ocorreram 694.000 mortes em decorrência dessa malignidade, 8,5% do total de mortes por câncer. Quase 55% dos registros ocorrem em regiões mais desenvolvidas. Existe uma grande variação geográfica em incidência no mundo, mas os padrões geográficos entre homens e mulheres são similares¹.

No Brasil, representa a quarta causa de morte entre as neoplasias malignas, e a incidência da doença foi estimada em 15.070 homens e 17.530 mulheres para o ano de 2014. O Estado de São Paulo tem a maior incidência, com estimativa de 11.560 novos casos na totalização de homens e mulheres². Esta neoplasia decorre da somatória de mutações e alterações epigenéticas em oncogenes e genes supressores de tumor, que participam da regulação do ciclo celular, controlando a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose.

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 ^{3; 4; 5}. 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 metastáticos⁶.

Mais de 90% dos casos de CCR são provenientes de adenomas colorretais, fato que deu origem à sequência clássica de carcinogênese adenoma-carcinoma por Fearon e Vogelstein, em 1990 ⁶. O processo envolve a transição do epitélio normal em adenomas e, posteriormente, a carcinomas, o que implica em acumulação progressiva de alterações genéticas e epigenéticas no interior da célula do tumor em desenvolvimento, por um período de 1 a 15 anos⁷. As mudanças genéticas mais frequentes e características da carcinogênese

incluem as alterações nos genes APC, KRAS, SMAD4 e TP53, e nos genes de reparo do DNA MLH1 e MSH2^{6; 8}.

Baseado nas alterações gênicas moleculares conhecidas, foram caracterizadas 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^{8; 9; 10} 2. Tumores que apresentam instabilidade de microsatélite (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;^{9; 11; 12} e, mais recentemente, 3. Via serrada de carcinogênese, caracterizada pela presença de lesões precursoras serradas, 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}.

Jass *et al.*¹³ propôs uma nova classificação por parâmetros patológicos e moleculares, o qual dividiu os tumores colorretais em 5 subgrupos distintos: 1. CIMP-*high*, metilação de *MLH1*, mutação do *BRAF*, estabilidade cromossômica; origem em pólipos serrilhados, normalmente conhecido como esporádico MSI-*high* (12%); 2. CIMP-*high*, metilação parcial de *MLH1*, mutação do *BRAF*, estabilidade cromossômica, estabilidade de microsatélite (MSS) ou MSI-*Low*, origem em pólipos serrilhados (8%); 3. CIMP-*low*, mutação em *KRAS*, metilação de O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), instabilidade cromossômica, MSS ou MSI-*Low*, origem em adenomas ou pólipos serrilhados (20%); 4. CIMP-negativo, instabilidade cromossômica, estabilidade em microsatélite, origem em adenomas (pode ser esporádico ou polipóide associado à PAF ou *MUTYH*¹⁷ (57%); e 5. Síndrome de Lynch, CIMP-negativo, ausência de mutação de *BRAF*, estabilidade cromossômica, MSI elevada, origem em adenomas (3%).

A maioria dos cânceres colorretais ocorre em indivíduos acima de 60 anos de idade, sem história prévia pessoal ou familiar da doença. Apesar de a idade avançada ser o maior fator de risco para os casos esporádicos (superior a 55 anos) e exposição ambiental,

principalmente dieta, aproximadamente 25% das neoplasias colorretais acometem indivíduos jovens, sugerindo susceptibilidade hereditária⁵. O perfil gênico pode talvez diferenciar estes pacientes com distinto fenótipo tumoral.

1.2 CICLOOXIGENASE-2 (COX-2): BIOSSÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS E REGULAÇÃO

As ciclooxigenases, também conhecidas como Prostaglandina G/H Sintase (PTGS), são enzimas-chave do processo inflamatório, por converterem o ácido araquidônico (AA) em prostaglandina H₂ (PGH₂), precursores de moléculas como as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos^{18; 19}. Em resposta a hormônios e a outros estímulos, o AA é lançado da membrana fosfolipídica numa reação catalisada pela fosfolipase A₂ (PLA₂). A COX catalisa a inserção do oxigênio molecular no AA para formar o intermediário instável prostaglandina G₂ (PGG₂), que rapidamente é convertido em PGH₂ pela atividade peroxidase da enzima. A PGH₂ é então convertida por isomerases específicas em uma variedade de eicosanóides²⁰. Estes produtos ativos são importantes reguladores de diversos processos biológicos, tais como a inflamação, função imune, proliferação celular e angiogênese^{21; 22}.

A família COX é composta por três isoenzimas, com funções distintas. A COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos e participa de diversas funções fisiológicas, tais como a homeostase vascular e regulação da agregação plaquetária^{18; 23}. A COX-2, indetectável em condições normais, é rapidamente induzida em resposta a fatores de crescimento e inflamatórios, e expressa em doenças inflamatórias, lesões pré-malignas e tumores colorretais²⁴. A COX-3 é uma variante da COX-1 por *splicing* diferencial, e está relacionada a processos de febre e dor. É encontrada em alguns compartimentos incluindo cérebro e medula espinhal^{25; 26}.

A COX-2 é expressa precocemente no compartimento estromal na tumorigênese. A sua expressão por células do estroma e do epitélio produzem uma série de prostaglandinas, como a PGE₂, a mais importante delas. Estes lipídios bioativos exercem as suas funções celulares por receptores de proteínas transmembrana. Os receptores para a PGE₂ são denominados EP (EP1, EP2, EP3, e EP4)²⁷. Uma vez que a PGE₂ pode difundir-se de célula a célula, é provável que durante a progressão tumoral a expressão da COX-2 em células

inflamatórias do estroma resulte na liberação dessa prostaglandina, na qual atua de maneira parácrina para induzir alterações pré-neoplásicas em células epiteliais próximas. Conforme avança a progressão tumoral, os níveis de COX-2 aumentados nos enterócitos permitem que eles produzam sua própria PGE₂ a qual estimula sua proliferação de forma autócrina e, uma vez mais, possibilita a eles assumir vários traços associados com a transformação celular, como a perda por inibição de contato, a aquisição de taxas aumentadas de proliferação e o crescimento aumentado independente de ancoragem ²⁸.

1.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

No genoma humano ocorrem variações no DNA que são consideradas normais para a espécie, uma vez que nem todas as sequências são codificadoras. Estas variações, quando presentes na população em frequência superior a 1%, são chamadas de polimorfismos. Polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) são as variantes intra-espécies mais comuns²⁹. A base de dados pública de polimorfismos de base única (dbSNP) tem catalogados 149.735.377 SNPs em seres humanos, até junho de 2015³⁰.

Os SNPs podem ser definidos como regiões pontuais do DNA onde uma base nucleotídica é variável na população. 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 organismo²⁹. Alguns polimorfismos surgem de erros de duplicação e recombinação do DNA, mas a principal fonte é a falha no reparo da molécula³¹.

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 freqüentes, 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.³²

Os SNPs podem ocorrer em regiões promotoras, codificadoras ou regulatórias do genoma, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos ou em componentes não codificadores de genes, sem função determinada. Em regiões codificadoras, quando resultam na alteração do aminoácido da sequência protéica, são

denominados não-sinônimos. Quando a modificação do nucleotídeo não altera a sequência codificadora, são chamados de polimorfismos sinônimos. Embora não alterem o transcrito e a sequência protéica, a presença de SNPs em regiões promotoras na unidade não traduzida 5' (5'UTR) pode afetar a expressão gênica, por modificarem sítios para fatores de transcrição. A presença de SNPs em regiões regulatórias na unidade não traduzida 3' (3'UTR), pode alterar a expressão protéica, por influenciarem a estabilidade do RNAm e eficiência de tradução. Além desses, SNPs em sítios de *splicing* podem alterar o processamento alternativo de RNA mensageiro (RNAm)³³.

Os genes polimórficos podem estar envolvidos no metabolismo de determinados alimentos ou toxinas, resposta inflamatória, interação medicamentosa, entre outros³⁴. 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 prognóstico³⁵.

1.4 GENE COX-2 E VARIANTES GENÉTICAS

O gene COX-2 está localizado no cromossomo 1 (locus q25.2-q25.3) e possui aproximadamente 12500 pares de bases (pb). Inclui a região promotora, 5'UTR, 10 éxons, 9 íntrons e 3'UTR. A estrutura deste gene foi caracterizada por Appleby e col.³⁶ Com relação às variantes polimórficas, 948 já foram identificadas, e destas, 886 são polimorfismos de nucleotídeo único³⁷.

Reportou-se um grande número de polimorfismos e estes podem ocorrer em qualquer área do gene COX-2. Os presentes em regiões regulatórias são mais frequentemente relatados na literatura. Muitos foram identificados e associados à doenças complexas como acidente vascular cerebral^{38; 39; 40; 41}, doença pulmonar obstrutiva crônica^{42; 43}, doença de Parkinson⁴⁴ e câncer em: pulmão⁴⁵, fígado⁴⁶, próstata⁴⁷, esôfago⁴⁸, colorretal^{49; 50; 51; 52; 53} entre outras. Porém, os localizados em éxons possuem frequência muito baixa, especialmente em

caucasianos. Uma variante no éxon 1, Val511Ala, apresenta modificação do aminoácido na presença do polimorfismo e, por conseguinte, altera a estrutura e função da proteína final. Esse SNP foi inversamente associado ao risco de CCR em afro-americanos. O polimorfismo tem frequência alélica de 5% em afro-americanos e é ausente em caucasianos⁴⁹.

A região promotora do *COX-2*, que se estende entre os nucleotídeos -1000 e +165, é rica em sítios de reconhecimento para proteínas nucleares como a proteína estimulatória 1 (Sp1), c-MYB, NF-kB, proteína ativadora 1 (AP1) entre outros, que são críticos na indução da transcrição do gene *COX-2*^{48; 54; 55}. Os polimorfismos nesta região podem ter impacto na atividade gênica transcricional por alterarem a capacidade de ligação com certas proteínas nucleares⁴⁸. O polimorfismo *COX-2*-1195G>A (rs689466) cria uma sequência de reconhecimento no núcleo para o fator de transcrição c-MYB, resultando no aumento da transcrição gênica⁴⁸. O c-MYB, presente na região promotora de muitos genes, é um fator de transcrição envolvido no sistema hematopoiético e no trato gastrointestinal, atuando na regulação do equilíbrio entre a divisão celular, diferenciação e sobrevivência⁵⁶. Esse SNP já foi associado ao aumento do risco de tumores gastrointestinais, incluindo o CCR^{57; 58}. Alguns estudos não encontraram associação^{53; 59} e outros o associaram a efeito protetor⁶⁰. Não há consenso na literatura e essa discrepância nos resultados pode estar relacionada às diferenças étnicas entre as populações.

A região 3'UTR do *COX-2* compreende mais de 2000 bases, e há evidências de que desempenhe papel na regulação da expressão protéica. O nível de expressão do *COX-2* é determinado em parte pela integração de múltiplos sinais que regulam eventos pós-transcricionais, os quais são dependentes de sequências 3'UTR contidas no RNAm não processado. Sabe-se que esta região contém elementos ricos em adenina-uracila, altamente conservados também conhecidos como sequências de Shaw-Kamen (AUUUA)^{36; 61}. São usualmente encontrados em 3'UTR de proto-oncogenes e genes de citocinas e apresentam importância na regulação da transcrição gênica, porque proteínas regulatórias como IL-1, lipopolissacarídeos (LPS) e certos taxanos se ligam nesta região. O polimorfismo *COX-2*+8473T>C (rs5275), localizado no éxon 10, pode modificar a afinidade na ligação de fatores regulatórios e influenciar a estabilidade do RNAm e/ou eficácia translacional e,

subsequentemente, influenciar na suscetibilidade ao câncer^{62; 63; 64}. A variante polimórfica foi associada a maior sobrevida, sugerindo efeito protetor do alelo C⁶⁵. Associação inversa foi identificada em outro estudo⁵¹. Da mesma forma, existem discrepâncias nos achados dos estudos de investigação de risco⁶⁶. Recentemente, foi descoberto que a região que contém o polimorfismo é alvo de micro RNAs, que atuam como reguladores pós-transcricionais⁶⁷. O miR-542-3p foi identificado como ligante na 3'UTR, próximo ao nucleotídeo 8473. A presença do alelo ancestral T promove o decaimento do RNAm e, em contraste, a variante C interfere na ligação miRNA-RNAm, ocasionando maior estabilidade do RNAm. O mesmo estudo mostrou que a não funcionalidade desses miRNA aumenta em 10 vezes a síntese da PGE₂ em células HeLa, contribuindo assim para o aumento da expressão da COX-2⁵⁰.

1.5 A ENZIMA COX-2 E OS TUMORES COLORRETAIS

A COX-2 não é constitutivamente expressa na mucosa colônica. No entanto, a expressão da enzima foi detectada em adenomas e adenocarcinomas^{68; 69}. Trabalhos recentes encontraram superexpressão de COX-2 em 40% a 72% dos tumores colorretais^{70; 71; 72}. A expressão aumentada da COX-2 foi encontrada em pólipos adenomatosos gastrointestinais de modelos animais de polipose adenomatosa^{73,74}, em pacientes com polipose adenomatosa familiar^{75; 76}, e em alguns adenomas esporádicos^{68; 77}. Um estudo brasileiro encontrou a ocorrência de expressão da enzima em 9% dos adenomas estudados e em 40% dos adenocarcinomas colorretais⁷⁸. A inibição da COX-2 por anti-inflamatório se tornou alternativa real de quimioprevenção e tem incentivado o desenvolvimento do uso dos inibidores seletivos como agentes preventivos do câncer colorretal⁷⁹.

O uso de inibidores seletivos desta enzima, tem resultado em significativa diminuição no número e tamanho de pólipos adenomatosos em modelos animais e pacientes com polipose adenomatosa familiar^{80; 81}. O uso crônico de aspirina levou à redução do risco de CCR em 50%⁸². Uma revisão sistemática, com 19 estudos caso-controle e mais de 20.000 casos, mostrou que o uso regular de aspirina ou AINEs associou-se a diminuição do risco de câncer coloretal de 20% a 41%⁸³. O uso de sulindac, inibidor não seletivo de COX, causou a redução do número e tamanho de adenomas colorretais em doentes com polipose

adenomatosa familiar⁸⁴. Os coxibes, inibidores seletivos de COX, foram desenvolvidos para reduzir os efeitos adversos pela inibição da COX-1, que causa toxicidade do trato gastrointestinal superior. Porém, apesar de comprovada eficácia, acarretam em toxicidade cardiovascular. Entre os AINEs, o único agente potencialmente quimiopreventivo é a aspirina em baixas doses, uma vez que não acarreta risco cardiovascular e apresenta baixo risco para toxicidade gastrointestinal⁸⁵.

A localização da COX-2 nos adenomas tubulares colorretais é nos miofibroblastos subepiteliais e na região periluminal. Na mucosa normal e nos pólipos hiperplásicos a expressão da enzima ocorre nos macrófagos e células endoteliais⁸⁶. Em adenomas colorretais, a expressão da COX-2 encontrava-se aumentada em 24%. Em carcinomas invasivos a expressão da enzima estava aumentada na porção adenomatosa do tumor e foi detectada em 62% dos casos. Somente em 23% dos casos de carcinomas invasivos foi detectada a expressão da COX-2 em células epiteliais malignas⁸⁶. Em um estudo onde se analisou sua expressão em mucosa normal, pólipos hiperplásicos, adenomas e câncer colorretal, verificou-se que a mesma foi elevada em câncer e adenomas. A imunoexpressão da COX-2 não apresentou diferença significativa entre mucosa normal e pólipos hiperplásicos. Não houve associação significativa entre a localização ou o estágio do tumor e a expressão da enzima. Maekawa *et al.* concluíram que a imunoexpressão aumentada da COX-2 pode ser evento precoce na carcinogênese do câncer colorretal⁸⁷. Em outro estudo onde se verificou a localização da COX-2 em adenomas esporádicos do cólon, encontrou-se a expressão da proteína em 77% dos adenomas. A localização foi nas células intersticiais superficiais, em 75% dos casos. Em 17% dos casos a proteína foi detectada em células intersticiais profundas, identificadas como macrófagos, dentro do corpo do adenoma. Na maioria dos adenomas a COX-2 não foi observada nas células epiteliais. Entretanto, nas células epiteliais displásicas a expressão da proteína foi detectada em 29%. Em mucosa normal não houve imunoexpressão da proteína⁶⁹. Com relação ao tamanho, um estudo demonstrou que nos adenomas pequenos (< que 5 mm) a proporção da expressão da COX-2 foi de 38% e em adenomas maiores foi de 82%⁸⁸.

Em carcinomas gástricos e colorretais, a COX-2 parece ter papel importante na regulação da angiogênese e progressão tumoral⁸⁸. Estudos epidemiológicos demonstraram que ocorre uma diminuição do risco relativo de carcinoma colorretal de 40-50% nos pacientes

que fazem uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). É sabida a importância da COX-2 em camundongos com mutação do APC, sugerindo que a elevação de PGE₂ estimula seus receptores na superfície da célula EP₂, tendo importante papel na angiogênese. Estudos ainda mostraram que a expressão de COX-2 pode ocorrer não só nas células epiteliais, mas também nos macrófagos da lâmina própria de adenomas e que um inibidor seletivo da COX-2 reduz o crescimento de adenomas grandes, principalmente pela inibição da angiogênese⁸⁹.

1.6 SIGNIFICÂNCIA

O câncer é uma doença cujas células tem a capacidade de proliferar, expandir localmente e se disseminar, formando focos de crescimento em sítios distantes. Reveste-se de grande importância o conhecimento dos fatores que influenciam esses processos e, dentre esses fatores, destacam-se os polimorfismos.

A análise de polimorfismos pode auxiliar na detecção de pessoas com maior risco de desenvolver câncer, caracterização de evolução diferenciada, resposta distinta ao tratamento quimioterápico ou radioterápico e prognóstico.

O estudo dos polimorfismos no gene COX-2 pode trazer novos conhecimentos da carcinogênese colorretal, principalmente relacionados à inflamação locorregional. Estudos em nossa população podem contribuir com o entendimento mais preciso do que ocorre na progressão do tumor colorretal em nosso meio, orientando inclusive estratégias de detecção, prevenção e tratamento diferenciados.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar a influência dos polimorfismos -1195A>G e 8473T>C do gene COX-2 como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer colorretal.
2. Investigar o impacto dos polimorfismos -1195A>G e 8473T>C na progressão e sobrevida de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico por câncer colorretal.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Duzentos e trinta pacientes com o diagnóstico de adenocarcinoma colorretal histologicamente confirmado, admitidos no Projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP, tratados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo formaram o grupo caso. Todos os pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica, no período de setembro de 2001 a novembro de 2006. Este grupo apresenta idade ao diagnóstico entre 22 e 87 anos. Cento e noventa e seis indivíduos operados por doença benigna no Hospital das Clínicas de São Paulo, pareados quanto ao sexo e idade, sem histórico individual ou familiar de câncer, constituíram o grupo controle. Pacientes internados com diagnóstico de doenças associadas a conhecidos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer colorretal, como doenças associadas ao tabaco e álcool, doença de Crohn, colite ulcerativa, isquemia mesentérica crônica e pólipos adenomatosos foram considerados inelegíveis para o grupo controle.

Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido do projeto Genoma Clínico 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, protocolo nº 0803/11.

3.2 MÉTODO

3.2.1 COLETA DE SANGUE E ARMAZENAMENTO

Amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas durante as consultas de acompanhamento ambulatorial. As coletas de sangue do grupo controle também foram

realizadas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Foi realizada a venóclise de veia periférica e coletado 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), armazenado em tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml a -20°C 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 55°C para promover a digestão protéica. Ao término da incubação, foram adicionados ao lisado 200 μL de etanol absoluto, 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 $10000 \times g$ por 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida, descartou-se o tubo coletor. 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*. A seguir, foi centrifugada a $10000 \times g$ por 1 minuto à temperatura ambiente. Novamente, o tubo coletor foi descartado e substituído. Foram adicionados à coluna 500 μL de *Wash Buffer 2*. 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 contendo o DNA genômico purificado foi armazenado a 4°C . O kit apresenta rendimento de 3–10 μg de DNA diluídos em até 200 μL de água ultrapura.

A concentração das amostras de DNA foi determinada em espectrofotômetro *NanoDrop™ ND-1000* (*NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, EUA*) pela absorbância em luz ultravioleta a 260 nm, utilizando-se como valor padrão 1 DO₂₆₀= 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 do material foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 3,0 µg/mL e visualizado em transiluminador de luz UV em comprimento de onda 203 nm.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Transplante e Cirurgia de Fígado - LIM 37 Setor de Biologia Molecular, Disciplina de Transplante de Órgãos do Aparelho Digestivo - Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2.3 SELEÇÃO DOS SNPs (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS)

Para este estudo foram selecionados SNPs funcionais, ou seja, que potencialmente influenciam a expressão gênica e protéica, por ocorrerem próximos a regiões gênicas regulatórias.

Utilizou-se os bancos de dados dbSNP do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>), *International HapMap Project* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) e artigos na literatura para auxiliar na seleção. Devido aos dados do HapMap Project e dbSNP serem derivados de populações de não-brasileiros, os dados genotípicos gerados por este estudo contribuíram para a caracterização do perfil genotípico da população brasileira.

Nas referências acima citadas, foram verificados dados de frequência de genótipos e alelos. Para possibilitar a detecção dos três perfis genotípicos na população de estudo, foram selecionados os SNPs com percentual de homozigotos para o alelo menos frequente superior a 10. Também foi analisada a distribuição dos genótipos e alelos nos diferentes grupos étnicos. Polimorfismos restritos a populações étnicas específicas, como a africana e asiática, e ausente ou em frequência em caucasianos inferior a 10%, foram desconsiderados.

3.2.4 GENOTIPAGEM POR TAQMAN® SNP GENOTYPING ASSAYS

Foi utilizada a técnica de identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos *TaqMan® SNP Genotyping Assays* (AppliedBiosystems, 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 sequência alvo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos (polimórfico e tipo selvagem). Esta sonda apresenta na extremidade 5' um fluoróforo (*dyereporter*) 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 *dyereporters* 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 *dyereporter* 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 será 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 *dyereporter* 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 específica, e evitando que ela se ligue inespecificamente à sequência correspondente ao outro alelo.

A genotipagem dos polimorfismos do *COX-2* foi realizada através dos kits *TaqMan® SNP Genotyping Assays* (AppliedBiosystems, Foster City, EUA). Foram adquiridos os kits prontos para uso e validados *TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assay* dos SNPs *COX-2* -1195A>G (rs689466) e 8473T>C (rs5275), cujos códigos de identificação para compra são, respectivamente, “C__1647381_10” e “C__16198794_10”.

A fluorescência emitida na reação foi detectada em PCR em Tempo Real pelo equipamento *StepOne Plus* (*AppliedBiosystem, Life Technologies, Foster City, EUA*), que faz a discriminação alélica através da emissão de luz em comprimento de onda característico (figura 1). Os genótipos foram determinados de acordo com o perfil de emissão das fluorescências ao final da reação de PCR. Para amplificação dos fragmentos desejados, foram utilizadas as seguintes condições de reação, sumarizados na tabela 1: 5,0 μL do mastermix , 0,5 μL de TaqmanGenotyping 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; e 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

Figura 1. Esquema gráfico da discriminação genotípica pelo StepOne Plus. O software capta a fluorescência das sondas VIC (verde - alelo 1) e FAM (azul - alelo 2) como mostram os gráficos à direita e, ao final da reação de PCR, agrupa as amostras de acordo com os padrões de emissão de fluorescência encontrados. A determinação dos três genótipos resulta na formação de três clusters. De acordo com o gráfico *Allelic Discrimination Plot*, o cluster de pontos azuis caracteriza indivíduos homozigotos para o alelo 2, pois houve detecção apenas da sonda FAM. Heterozigotos são representados pelos pontos verdes, com identificação de fluorescência das duas sondas. Para os homozigotos polimórficos, ocorre a detecção apenas da sonda VIC e são representados por pontos vermelhos no gráfico.

3.3 LEVANTAMENTO DE DADOS

Realizou-se extenso trabalho de revisão de dados e das informações de todos os pacientes inseridas no *Clinical Genomics*, banco de dados do Projeto Genoma Clínico do

Câncer, 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 MODELOS

Utilizou-se em todas as análises o modelo codominante, ou seja, uso dos três genótipos de cada um dos polimorfismos estudados. Para aumentar o poder estatístico das variantes de menor frequência, os heterozigotos foram combinados aos homozigotos polimórficos, e este agrupamento foi denominado modelo recessivo. Em alguns testes, também foi utilizado o modelo dominante, que consiste no agrupamento dos genótipos que continham ao menos um alelo selvagem.

3.4.2 CASOS X CONTROLES

Calcularam-se as frequências haplotípicas foram através do algoritmo EM discutido em Excoffier e Slatkin (1995)⁹⁰.

Verificou-se o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos do *COX-2* pelo valor do D', coeficiente de desequilíbrio de ligação, através do software Haploview.

Avaliou-se associação dos genótipos, alelos do *COX-2* entre os grupos caso e controle usando o teste χ^2 , ou teste exato de Fisher quando indicado.

Adicionalmente, realizou-se o ajuste dos modelos de Regressão Logística Univariável para genótipos com os grupos caso e controle. Calculou-se a razão de chances e intervalos de confiança de 95%. No cálculo das razões de chance para haplótipos, foi utilizado o algoritmo EM discutido por Lakes et al. (2002) em que a estimação dos haplótipos e das medidas de efeito do estudo caso-controle é feita em uma única etapa ⁹¹.

Na análise multivariável, o ajuste realizou-se pelas seguintes variáveis: idade, sexo, etnia, escolaridade, etilismo e tabagismo. Idade, sexo, etnia e escolaridade foram selecionadas para a adequação do pareamento dos grupos caso e controle.

3.4.3 CASOS CLÍNICOS

Aplicou-se o teste exato de Fisher para verificar a associação dos dados genotípicos com as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas dos pacientes operados por câncer colorretal.

3.4.4 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 intervalo de progressão livre de doença foi definido como o período entre a data do diagnóstico e a data da última avaliação médica sem indícios de recidiva de doença.

O tempo de sobrevida global e progressão livre de doença associado às variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas, genótipos e haplótipos foi estimado pelo método Kaplan-Meier e o teste de log-rank, aplicado na comparação dos grupos.

Realizou-se a análise do risco de óbito pela doença e de recidiva pelo modelo de regressão de Cox simples⁹². Obtiveram-se os respectivos valores de risco associados às variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas, genótipos pelo cálculo da razão de risco (RR) e intervalos de confiança (95%). Verificou-se hipótese de riscos proporcionais através dos resíduos de Choenfeld ⁹³.

Para o cálculo da razão de risco associado aos haplótipos, foram usados os algoritmos de imputação múltipla⁹⁴, considerando 100 simulações e EM em um procedimento de duas etapas para a estimação dos haplótipos e o ajuste do modelo de regressão de Cox foi utilizado.

Na análise multivariável, realizou-se o modelo ajustado com as variáveis cujo valor de p foi inferior a 0,10 na Regressão de Cox simples, e que também minimizaram o AIC (Critério de Informação de Akaike). O AIC é uma medida de distância entre o modelo ajustado e o modelo verdadeiro considerando o tamanho amostral disponível. Dentro desses critérios, foram selecionadas variáveis de confusão, relacionadas a risco, agressividade e tratamento: sexo, idade, estadio, tipo de ressecção e realização de tratamento adjuvante.

3.4.5 PROGRAMAS UTILIZADOS E NÍVEL DESCRITIVO

Realizaram-se as análises no programa computacional R, versão 3.1.2 e Haploview, versão 4.2 e o nível de significância estatística foi estabelecido em 0,05. Valores descritivos (p) inferiores a este foram considerados significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDO CASOS X CONTROLES

4.1.1 CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS DE ESTUDO

A casuística do projeto genoma do câncer colorretal originalmente possuía 265 pacientes operados entre 2001 e 2006. No início deste estudo, o biorrepositório de DNA de sangue periférico continha 195 amostras. Trinta e cinco pacientes foram abordados em ambulatório e o material coletado para complementação da casuística do banco de DNA. Houve impossibilidade de contato com 35 pacientes por: óbito (23 casos), perda de seguimento (1 paciente), alta hospitalar de pacientes clinicamente curados e com idade avançada (6 pacientes) e pacientes residentes fora do estado de São Paulo (5 casos).

Desta forma, o presente estudo é composto por 230 pacientes e 196 controles. Dentre os indivíduos do grupo caso, 53,91% são homens e 46,09%, mulheres. A média de idade dos participantes foi de 61,96 anos (variação de 22 a 87 anos). Com relação à composição étnica, auto-declarada, a maioria da população foi branca (85,65%); os demais se dividiam em afrodescendentes (10%) e asiáticos (4,35%). A avaliação da população pelo nível de escolaridade mostrou que mais da metade dos indivíduos possuía baixa instrução (55,65% - 0 a 5 anos de estudo), 8,26% chegaram ao ensino fundamental (6 a 9 anos de estudo), 23,51% chegaram ao ensino médio (10 a 12 anos) e 12,17% progrediram com os estudos após o término do ensino médio (mais de 12 anos de estudo).

A análise de alguns fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento deste tipo de câncer revelou que mais da metade dos pacientes nunca fizeram uso de bebidas alcoólicas ou cigarro (60,43% e 56,09%, respectivamente). A categorização destes dados ocorreu da seguinte forma: com relação ao etilismo, 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 bebida alcoólica (vinho, cerveja e destilados) ao menos uma vez por mês. Da mesma 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.

No grupo controle, a porcentagem de homens e mulheres foi de 54,08% e 45,92%, respectivamente. Este grupo apresentou média de idade de 62,03 anos (variação de 17 a 89 anos). A distribuição étnica, autodeclarada, foi desigual, sendo a maioria da população branca, com 80,61%, seguida dos afrodescendentes, 15,82% e asiáticos, com de 3,57%. No que concerne o nível de escolaridade dos participantes, 43,88% apresentaram tempo de estudo de 0 a 5 anos. Chegaram ao ensino fundamental 2,55% (6 a 9 anos), e fizeram de 10 a 12 anos e acima de 12 anos, 27,04% e 26,53%, respectivamente. Referente ao uso de tabaco e álcool, o grupo controle, mais da metade dos indivíduos relatou não serem etilistas ou tabagistas (78,57% e 60,20%, respectivamente).

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à idade ($p = 0,84$), sexo ($p=1,00$), etnia ($p=0,58$) e tabagismo ($p=1,00$). No entanto, as variáveis escolaridade e etilismo mostraram diferença estatística ($p < 0,001$). Na tabela 2 estão representadas as características demográficas de ambos os grupos.

Tabela 2. Distribuição da população de estudo (casos e controles) segundo idade, sexo, etnia, escolaridade, etilismo e tabagismo. São Paulo, Brasil, 2001-2006.

		Casos (n=230)	Controles (n = 196)				Total (n = 426)
Variável		n (%)	n (%)	p	OR(95% IC) ^e	p ^e	n (%)
Idade^a	Média (DP)	61,96 ± 14,01	62,03 ± 14,81	0,84 ^c	1(0,99-1,01)	0,96	61,99 ± 14,37
	Mediana	64	63				64
Sexo	Feminino	106(46,09)	90(45,92)	1,00 ^d	Referência	0,66	196(46,01)
	Masculino	124(53,91)	106(54,08)		1(0,68-1,47)	0,99	230(53,99)
Etnia^b	Branca	197(85,65)	158(80,61)	0,58 ^d	Referência	-	355(83,33)
	Afrodescendente	23(10,00)	31(15,82)		0,60(0,33-1,06)	0,08	54(12,68)
	Asiática	10(04,35)	7(03,57)		1,15(0,43-3,08)	0,78	17(03,99)
Escolaridade	0 a 5 anos	128(55,65)	86(43,88)	0,00 ^d	Referência	-	214(50,23)
	6 a 9 anos	19(08,26)	5(02,55)		2,55(0,92-7,10)	0,07	24(05,63)
	10 a 12 anos	55(23,91)	53(27,04)		0,70(0,44-1,11)	0,13	108(25,35)
	> 12 anos	28(12,17)	52(26,53)		0,36(0,21-0,62)	0	80(18,78)
Etilismo	Não-etilistas	139(60,43)	154(78,57)	0,00 ^d	Referência	-	293(68,78)
	Ex-etilistas	33(14,35)	16(08,16)		2,28(1,21-4,33)	0,01	49(11,50)
	Etilistas	58(25,22)	26(13,27)		2,47(1,48-4,14)	0,00	84(19,72)
Tabagismo	Não-tabagistas	129(56,09)	118(60,20)	1,00 ^d	Referência	-	247(57,98)
	Ex-tabagistas	71(30,87)	50(25,51)		1,30(0,84-2,02)	0,24	121(28,40)
	Tabagistas ativos	30(13,04)	28(14,29)		0,98(0,55-1,74)	0,95	58(13,62)

^a Idade de diagnóstico para os casos e idade do momento da entrevista para os controles, DP: Desvio padrão; ^b Etnia autodeclarada; ^c Teste de Mann-Whitney; ^d Teste exato de Fisher; ^e Regressão logística;

4.1.2 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE GENÓTIPOS E HAPLÓTIPOS

A posição dos polimorfismos do *COX-2* no cromossomo, frequências esperadas e observadas, informações sobre o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e MAF (*Minor Allele Frequency*) estão descritas na tabela 3. No presente estudo, as frequências genotípicas observadas e esperadas dos SNPs do *COX-2* foram consistentes com o Equilíbrio de Hardy Weinberg, com valor de *p* superior a 0,05 para todas as análises, exceto para o grupo controle do polimorfismo 8473T>C (*p*=0,02). As frequências dos alelos de menor frequência na população-1195G e 8473C foram, respectivamente, 19,1% e 34,2%.

Tabela 3. Polimorfismos estudados, posição no cromossomo, frequências esperadas e observadas, informações sobre o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, % de amostras genotipadas, MAF (*Minor Allele Frequency*) e alelos analisados para cada polimorfismo.

SNP	Posição no Cromossomo	ObsHET	PredHET	Hwpval	Hwpval Casos	Hwpval Controles	MAF	Alelos avaliados
COX-2 -1195A>G (rs689466)	186650751	0,29	0,31	0,52	0,43	0,80	0,19	A:G
COX-2 8473T>C (rs5275)	186643058	0,41	0,45	0,14	1,00	0,02	0,34	T:C

SNP: polimorfismos de nucleotídeo único, Obs HET: frequências observadas; PredHET: frequências esperadas; HwpVal: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; MAF: *Minor Allele 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 COX-2 - 1195A>G e 8473T>C, que distam entre si em 7 kilobases (Kb), com $D'=97$. 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: TA, 46,9%, CA 34% e TG 18,9%.

Figura 2. Representação da estrutura de desequilíbrio de ligação (DL) entre os polimorfismos do gene COX-2 (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).

4.1.3 ANÁLISE DE RISCO ENTRE CASOS E CONTROLES

A distribuição e frequência dos polimorfismos do *COX-2* -1195A>G e 8473T>C, em casos, controles e na somatória das duas populações está representada na tabela 4. Realizou-se teste de associação entre os grupos caso e controle com os genótipos no modelo codominante (três genótipos), modelo dominante (agrupamento de genótipos com alelo selvagem) e modelo recessivo (agrupamento de genótipos com alelo polimórfico). Determinou-se na casuística de pacientes operados por câncer colorretal, as frequências genotípicas dos SNPs *COX-2* -1195A>G (AA = 63,48%; AG = 31,30%; GG = 5,22%) e *COX-2* 8473T>C (TT = 45,22%; TC = 44,35%; CC = 10,43%), e também em indivíduos sadios (*COX-2* -1195A>G: AA = 68,88%; AG = 28,06%; GG = 3,06%; *COX-2* 8473T>C: TT = 44,90%; TC = 38,27%; CC = 16,84%). As frequências foram similares em ambos os grupos ($p>0,05$), tanto no modelo de regressão logística simples quanto no modelo de regressão logística múltipla, onde foi feito o ajuste pelas variáveis: sexo, idade, etnia, escolaridade, tabagismo e etilismo. No modelo não ajustado foi detectada uma tendência a menor risco

pelo genótipo 8473TT (OR:0,58; 95% IC, 0,33-1,01; $p=0,05$), porém, sem significância estatística.

Tabela 4. Distribuição, frequências genotípicas e teste de associação dos SNPs do COX-2 entre casos e controles.

Genótipo	Casos (n=230)	Controles (n = 196)	Não ajustado ^a		Ajustado ^b		Total (n=426)
	n (%)	n (%)	OR(95% IC)	<i>p</i>	OR(95% IC)	<i>p</i>	n (%)
COX-2 -1195A>G (rs689466)							
AA	146(63,48)	135(68,88)	1,00(Referência)	-	1,00(Referência)	-	281(65,96)
AG	72(31,30)	55(28,06)	1,21(0,79-1,84)	0,37	1,26(0,80-1,99)	0,31	127(29,81)
GG	12(5,22)	6(3,06)	1,85(0,68-5,07)	0,23	2,23(0,70-7,14)	0,18	18(4,23)
AA/AGxGG	218(94,78)	190(96,94)	1,74(0,64-4,74)	0,27	2,04(0,65-6,43)	0,22	408(95,77)
AAxAG/GG	84(36,52)	61(31,12)	1,27(0,85-1,91)	0,24	1,34(0,86-2,07)	0,17	145(34,04)
COX-2+8437T>C (rs5275)							
TT	104(45,22)	88(44,90)	1,00(Referência)	-	1,00(Referência)	-	192(45,07)
TC	102(44,35)	75(38,27)	1,15(0,76-1,74)	0,50	1,26(0,81-1,97)	0,31	177(41,55)
CC	24(10,43)	33(16,84)	0,62(0,34-1,12)	0,11	0,71(0,37-1,36)	0,29	57(13,38)
TT/TCxCC	206(89,57)	163(83,16)	0,58(0,33-1,01)	0,05	0,63(0,34-1,16)	0,14	369(86,62)
TTxTC/CC	126(54,78)	108(55,10)	0,99(0,67-1,45)	0,95	1,10(0,73-1,67)	0,65	234(54,93)

^aModelo de regressão logística não ajustada; ^bModelo de regressão logística múltipla, ajustado por sexo, idade, etnia, escolaridade, tabagismo e etilismo). COX-2: Ciclooxigenase-2; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança.

Avaliou-se a associação entre os alelos dos SNPs do COX-2, em casos e controles (tabela 5). Não foram detectadas diferenças na distribuição dos alelos de ambos os SNPs entre casos e controles ($p>0,05$). O mesmo ocorreu com a análise dos haplótipos (tabela 6). Não foram detectadas diferenças de frequências entre os haplótipos TA, CA e TG do gene COX-2 entre casos e controles ($p>0,05$).

Tabela 5. Teste de associação (χ^2) dos alelos de cada polimorfismo do *COX-2* entre casos e controles.

SNP	Alelos	Razão caso- controle	χ^2	<i>p</i>
<i>COX-2</i> -1195A>G (rs689466)	G	96:364, 67:325	1,95	0,16
<i>COX-2</i> 8473T>C (rs5275)	T	310:150, 251:141	1,06	0,30

Tabela 6. Teste de associação (χ^2) dos haplótipos formados pelo bloco selecionado com o câncer colorretal.

Associação de Haplótipos	Frequência	Razão caso- controle	χ^2	<i>p</i>
TA	0,469	215,4:244,6; 184,3: 207,7	0,003	0,96
CA	0,340	148,6:311,4; 140,7:251,3	1,22	0,27
TG	0,189	94,6:365,4; 66,7:325,3	1,74	0,19

Os mesmos resultados foram obtidos nos testes de associação pelo método de regressão logística, como mostra a tabela 7. Tanto no modelo simples quanto no modelo ajustado pelas variáveis de confusão, os valores de *p* foram superiores a 0,05.

Tabela 7. Distribuição, frequências haplotípicas e teste de associação dos SNPs do *COX-2* entre casos e controles.

Haplótipos COX-2		Casos (n=230)	Controles (n = 196)	Não ajustado ^a		Ajustado ^b		Total (n=426)
		Freq. (%)	Freq.(%)	OR(95% IC)	p	OR(95% IC)	p	Freq.
A	T	32,23	35,97	1,00(Referência)	-	1,00(Referência)	-	46,90
A	C	46,90	46,94	1,04(0,70-1,57)	0,83	1,19(0,77-1,84)	0,44	34,00
G	T	20,49	17,09	1,27(0,83-1,94)	0,28	1,38(0,87-2,19)	0,18	18,90
*	*	00,38	-	-	-	-	-	0,20

^aModelo de regressão logística não ajustada; ^bModelo de regressão logística múltipla, ajustado por sexo, idade, etnia, escolaridade, tabagismo e etilismo). COX-2: Ciclooxigenase-2; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança.

4.2 ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS COM AS VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS EM PACIENTES COM CCR

4.2.1 CARACTERÍSTICAS DO GRUPO DE ESTUDO

As características demográficas, epidemiológicas e clínicas estão sumarizadas na tabela 8. Como mencionado anteriormente, 53,91% dos pacientes são homens e 46,09%, mulheres. A idade categorizada em dois grupos, mostra um percentual maior de indivíduos com mais de 50 anos (80,87%) e 60 anos (56,52%). A avaliação da população pelo nível de escolaridade mostrou que mais da metade dos indivíduos possuía baixa instrução (55,65% - 0 a 5 anos de estudo), 8,26% chegaram ao ensino fundamental (6 a 9 anos de estudo), 23,51% chegaram ao ensino médio (10 a 12 anos) e 12,17% progrediram com os estudos após o término do ensino médio (mais de 12 anos de estudo). É maioria nestes o percentual de brancos (85,65%), comparados a afrodescendentes (10,00%) e asiáticos (4,35%).

A análise de alguns fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento deste tipo de câncer revelou que mais da metade dos pacientes não faz uso de bebidas alcoólicas ou cigarro, 60,43% e 56,09%, respectivamente. Com relação aos hábitos de dieta, 74,78% consomem quantidade recomendada de fibras e 51,11% não fazem dieta de alto consumo de gordura animal.

A investigação do histórico familiar de câncer nos pacientes do estudo mostrou um percentual de 46,52 de indivíduos com história de câncer na família, em parentes de primeiro e segundo graus. Dezesesseis por cento do total de indivíduos apresentavam história familiar

de câncer colorretal. Síndrome hereditária foi identificada em nove pacientes (3,91%), correspondente a Polipose Adenomatosa Familiar, diagnosticada histologicamente em oito indivíduos, e Câncer Colorretal Hereditário não Polipóide (HNPCC), identificada por diagnóstico molecular em um paciente.

Avaliou-se também o CEA pré-operatório e 55,81% dos pacientes possuíam CEA normal (abaixo de 5ng/mL para os não fumantes e abaixo de 10ng/mL para fumantes) enquanto 44,19% apresentavam CEA alterado.

Calculou-se o índice de massa corpórea (IMC) em dois momentos: no período anterior ao aparecimento dos sintomas e no período pré-operatório. Os valores foram categorizados da seguinte forma: indivíduos abaixo do peso, aqueles que apresentavam IMC inferior a 18,5; peso normal, aqueles com IMC igual ou maior que 18,5 e menor a 25; e acima do peso, indivíduos com IMC igual ou maior que 25. Levando-se em conta o período antecedente aos sintomas, os percentuais mais expressivos encontravam-se primeiramente em indivíduos acima do peso (65,30%) e em indivíduos com IMC dentro dos parâmetros normais (33,33%). No período pré-operatório, 49,77% dos pacientes apresentavam IMC normal e 45,25% estavam acima do peso.

Com relação à conduta de tratamento do câncer colorretal, 85,22% dos pacientes foram submetidos a procedimentos cirúrgicos com intenção curativa. O restante, 14,78% dos indivíduos, já apresentavam doença metastática detectada no período pré-operatório, por exames de imagem ou comprovação histológica (biópsias). Também foram considerados procedimentos não curativos, aqueles em que ocorreu a identificação de lesão metastática não passível de ressecção no ato cirúrgico (intra-operatório) e quando a avaliação histológica da peça cirúrgica apresentava margens de ressecção comprometidas.

Além do procedimento cirúrgico, para mais da metade dos pacientes foi indicado o tratamento adjuvante (54,78%). No câncer colorretal, era padrão a prescrição do fármaco 5-Fluoracil (5-FU) com o uso combinado do ácido folínico. Em alguns casos, a radioterapia também foi indicada. Nem todos fizeram uso exclusivo do 5-FU ou seguiram com o planejamento inicialmente proposto. Modificações foram realizadas de acordo com a presença de toxicidade expressiva e /ou progressão da doença.

Tabela 8. Características epidemiológicas e clínicas dos 230 pacientes operados por câncer colorretal. HCFMUSP, 2001-2006.

Variável		Casos (n=230) n (%)
Idade	≤ 60	100(43,48)
	> 60	130(56,52)
	≤ 50	44(19,13)
	> 50	186(80,87)
Sexo	Feminino	106(46,09)
	Masculino	124(53,91)
Etnia	Branca	197(85,65)
	Afrodescendente	23(10,00)
	Asiática	10(4,35)
Escolaridade	0 a 5 anos	128(55,65)
	6 a 9 anos	19(8,26)
	10 a 12 anos	55(23,91)
	> 12 anos	28(12,17)
Etilismo	Não-etilistas	139(60,43)
	Ex-etilistas	33(14,35)
	Etilistas	58(25,22)
Tabagismo	Não-tabagistas	129(56,09)
	Ex-tabagistas	71(30,87)
	Tabagistas ativos	30(13,04)
Dieta de fibra ^a	Não	57(25,22)
	Sim	169(74,78)
Dieta de alto consumo de gordura animal ^a	Não	115(51,11)
	Sim	110(48,89)
Histórico familiar de câncer ^b	Não	123(53,48)
	Sim	107(46,52)
Histórico familiar de CCR ^b	Não	193(83,91)
	Sim	37(16,09)
Síndrome Hereditária (HNPCC/PAF)	Não	221(96,09)
	Sim	9(3,91)
CEA pré-operatório ^a	Normal	120(55,81)
	Alterado	95(44,19)
IMC pré-sintomas ^a	Abaixo do peso	3(1,37)
	Peso normal	73(33,33)
	Acima do peso	143(65,30)
IMC pré-operatório ^a	Abaixo do peso	11(4,98)
	Peso normal	110(49,77)
	Acima do peso	100(45,25)
Tipo de ressecção	Curativa	196(85,22)
	Não curativa	34(14,78)
Tratamento Adjuvante	Não	104(45,22)
	Sim	126(54,78)

^a Dados ausentes das variáveis: dieta de fibra, 4 casos; dieta de alto consumo de gordura animal, 5 casos; CEA pré-operatório, 15 casos; IMC pré-sintomas, 11 casos; IMC pré-operatório, 9 casos. ^b História familiar de parentes de primeiro grau e segundo grau com câncer / câncer colorretal. Parâmetros IMC: abaixo do peso < 18,5; peso normal: 18,5 ≤ IMC < 25; acima do peso ≥ 25. CEA - valores de referência: Normal: < 5 ng/ml (Não fumantes), <10 ng/ml (fumantes); alterado: ≥ 5 ng/ml (não fumantes) e ≥ 10 ng/ml (fumantes).

As características anatomopatológicas estão sumarizadas na tabela 9. A avaliação anatomopatológica está de acordo com critérios pré-estabelecidos pelo *College of American Pathologists* (CAP), baseada na sexta edição da classificação TNM. Esta classificação era a vigente no período em que os pacientes foram operados e as condutas terapêuticas foram definidas a partir dos anatomopatológicos avaliados com esses critérios. Considerando a localização dos tumores, 25,33% apresentam câncer em cólon proximal, 45,41% em cólon distal e 29,26% em reto. Quanto ao tipo histológico, prevalece os tumores não-mucinosos (75,65%). Aqueles com até 40,00% de componente de mucina e mucinosos tem, respectivamente, 15,65% e 8,70%. Os tumores moderadamente diferenciados mostraram valores mais expressivos (83,26%) que os pouco diferenciados (7,05%) e bem diferenciados (9,69%). Com relação ao estadiamento TNM, os maiores percentuais foram encontrados nos grupos II (42,17%) e III (32,61%). Quando agrupados em duas categorias, aqueles com estágio I+II prevaleceram em maior número (53,91%), comparados ao grupo III+IV, com 46,09%. Na avaliação da invasão em profundidade do tumor, a maior parte dos indivíduos são T3 e T4, com percentual de 75 e 10,96, respectivamente (85,96% quando as duas categorias são agrupadas). Em 55,65% dos pacientes não foi detectada metástase linfonodal, enquanto que 23,91% e 20,43% dos indivíduos são categorizados como N1 e N2. Com relação à dissecação linfonodal, em 78,70% dos casos foram identificados mais de 12 linfonodos na peça cirúrgica. Metástase à distância foi diagnosticada em 13,04% dos casos. Invasão angiolinfática e perineural esteve presente em 37,44% e 24,78% dos casos e a identificação de depósitos tumorais foi positiva em 7,89% dos indivíduos.

Tabela 9. Características anatomopatológicas dos 230 pacientes operados por câncer colorretal. HCFMUSP, 2001-2006.

Variável		Casos (n=230) n (%)
Localização do tumor ^a	Cólon direito	58(25,33)
	Cólon esquerdo	104(45,41)
	Reto	67(29,26)
Tipo histológico	Não mucinoso	174(75,65)
	Com componente mucinoso ^b	36(15,65)
	Carcinoma mucinoso	20(8,70)
Grau histológico ^a	Pouco diferenciado	16(7,05)
	Moderadamente diferenciado	189(83,26)
	Bem diferenciado	22(9,69)
Estadio	I	27(11,74)
	II	97(42,17)
	III	75(32,61)
	IV	31(13,48)
Estadio agrupado	I+II	124(53,91)
	III+IV	106(46,09)
Estadio pT	1	6(2,63)
	2	26(11,40)
	3	171(75,00)
	4	25(10,96)
Estadio pT agrupado	1 ^c e 2	32(14,04)
	3 e 4	196(85,96)
Estadio pN	0	128(55,65)
	1	55(23,91)
	2	47(20,43)
Metástase linfonodal	Não	128(55,65)
	Sim	102(44,35)
Linfonodos identificados	< 12	49(21,30)
	≥ 12	181(78,70)
Estadio M	0	200(86,96)
	1	30(13,04)
Invasão Angiolinfática ^a	Não	142(62,56)
	Sim	85(37,44)
Invasão Perineural ^a	Não	170(75,22)
	Sim	56(24,78)
Depósitos Tumorais ^a	Não	210(92,11)
	Sim	18(7,89)

^a Dados ausentes das variáveis: localização do tumor, 1 caso (transverso médio); grau histológico, 3 casos; invasão angiolinfática, 3 casos; invasão perineural, 4 casos; depósitos tumorais, 2 casos. ^b Com até 40% de componente mucinoso. ^c Inclui 2 casos de tumores com invasão até lâmina própria (*in situ*).

4.2.2 TESTE DE ASSOCIAÇÃO DAS VARIÁVEIS COM OS GENÓTIPOS

Considerando o grupo de pacientes operados por câncer colorretal, a avaliação da distribuição genotípica entre as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas mostrou diferenças significativas na distribuição do polimorfismo *COX-2* -1195A>G por etnia. Os resultados estão especificados na tabela 10. A estratificação por grupos étnicos evidenciou a frequência elevada do alelo polimórfico *COX-2* -1195G na população oriental (figuras 3 e 4). Este grupo, constituído em sua maioria por japoneses, mostrou um perfil genotípico distinto das demais etnias estudadas. O alelo tem baixa frequência em afrodescendentes (figura 4A). Para este polimorfismo, o teste de Fisher com os modelos codominante, dominante e recessivo resultou em um valor de p inferior a 0,05.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as variáveis anatomopatológicas e o SNP *COX-2* -1195A>G, como mostra a tabela 11.

Tabela 10. Distribuição, frequências genótípicas do SNP *COX-2* -1195A>G e teste de associação com as variáveis epidemiológicas e clínicas em 230 pacientes operados por câncer colorretal.

COX-2 -1195A>G								
Variável	Genótipo (n; %)			p	Genótipo (n; %)	p	Genótipo (n; %)	p
	AA	AG	GG		AA/AG		AG/GG	
Idade								
≤ 60	63(63,00)	30(30,00)	7(7,00)	0,55	93 (93,00)	0,37	37(37,00)	1
> 60	83(63,85)	42(32,31)	5(3,85)		925 (96,15)		47(36,16)	
≤ 50	25(56,82)	14(31,82)	5(11,36)	0,13	39 (88,64)	0,06	19(43,18)	0,38
> 50	121(65,05)	58(31,18)	7(3,76)		179 (96,24)		65(34,94)	
Sexo								
Feminino	74(69,81)	26(24,53)	6(5,66)	0,13	100 (94,34)	0,78	32(30,19)	0,08
Masculino	72(58,06)	46(37,10)	6(4,84)		118 (95,16)		52(41,94)	
Etnia								
Branca	125(63,45)	63(31,98)	9(04,57)	0,02	188 (95,43)	0,01	72(36,55)	0,04
Afrodescendente	18(78,26)	5(21,74)	0(0,00)		7(70,00)		5(21,74)	
Asiática	3(30,00)	4(40,00)	3(30,00)		23(100,00)		7(70,00)	
Histórico familiar de câncer ^a								
Não	76(61,79)	38(30,89)	9(7,32)	0,33	114(92,68)	0,15	47(38,21)	0,59
Sim	70(65,42)	34(31,78)	3(2,80)		104(97,20)		37(34,58)	
Histórico familiar de CCR ^a								
Não	120(62,18)	64(33,16)	9(04,66)	0,29	184(95,34)	0,42	73(37,82)	0,46
Sim	26(70,27)	8(21,62)	3(08,11)		34(91,89)		11(29,73)	
Síndrome Hereditária (HNPCC/PAF)								
Não	141(63,80)	69(31,22)	11(4,98)	0,47	210(95,02)	0,39	80(36,20)	0,73
Sim	5(55,56)	3(33,33)	1(11,11)		8(88,89)		4(44,44)	
CEA pré-operatório ^b								
Normal	71(59,17)	45(37,50)	4(3,33)	0,16	116(96,67)	0,22	49(40,83)	0,4
Alterado	60(65,22)	25(27,17)	7(0,61)		85(92,39)		32(34,78)	

^a História familiar de parentes de primeiro grau e segundo grau com câncer / câncer colorretal. ^b Dado ausente da variável CEA pré-operatório, 15 casos. Valores de referência: Normal: < 5 ng/ml (Não fumantes), <10 ng/ml (fumantes); alterado: ≥ 5 ng/ml (não fumantes) e ≥ 10 ng/ml (fumantes).

Figura 3. Frequência genotípica do polimorfismo *COX-2* -1195A>G entre os diferentes grupos étnicos do grupo caso.

Figura 4. Frequência genotípica do polimorfismo *COX-2* -1195A>G entre os diferentes grupos étnicos do grupo caso. Modelos dominante (A) e recessivo (B).

Tabela 11. Distribuição, frequências genotípicas do SNP *COX-2* -1195A>G e teste de associação com as variáveis anatomopatológicas em 230 pacientes operados por câncer colorretal.

COX-2 -1195A>G								
Variáveis	Genótipo (n; %)			p	Genótipo (n; %)	p	Genótipo (n; %)	p
	AA	AG	GG				AG/GG	
Localização do Tumor ^a								
Cólon direito	33(56,90)	20(34,48)	5(8,62)	0,29	53(91,38)	0,17	25(43,10)	0,20
Cólon esquerdo	64(61,54)	34(32,69)	6(5,77)		98(94,23)		40(38,46)	
Reto	48(71,64)	18(26,87)	1(1,49)		66(98,51)		19(28,36)	
Tipo Histológico								
Não mucinoso	112(64,37)	54(31,03)	8(4,60)	0,20	166(95,40)	0,11	62(35,63)	0,17
Com componente mucinoso	25(69,44)	10(27,78)	1(2,78)		35(97,22)		11(30,56)	
Carcinoma mucinoso	9(45,00)	8(40,00)	3(15,00)		17(85,00)		11(55,00)	
Grau Histológico ^b								
Pouco diferenciado	9(56,25)	6(37,50)	1(6,25)	0,45	15(93,75)	0,38	7(43,75)	0,32
Moderadamente diferenciado	123(65,08)	57(30,16)	9(4,76)		180(95,24)		66(34,92)	
Bem diferenciado	11(50,00)	9(40,91)	2(9,09)		20(90,91)		11(50,00)	
Estadio								
I	19(70,37)	7(25,93)	1(3,70)	0,43	26(96,30)	0,66	8(29,63)	0,45
II	56(57,73)	37(38,14)	4(4,12)		93(95,88)		41(42,26)	
III	49(65,33)	22(29,33)	4(5,33)		71(94,67)		26(34,66)	
IV	22(70,97)	6(19,35)	30(9,68)		28(90,32)		9(29,03)	
Estadio agrupado								
I+II	75(60,48)	44(35,48)	5(4,03)	0,25	119(95,97)	0,55	49(39,51)	0,34
III+IV	71(66,98)	28(26,42)	7(6,60)		99(93,40)		35(33,02)	
Estadio pT								
1	5(83,33)	1(16,67)	0(0,00)	0,81	6(100,00)	0,65	1(16,67)	0,73
2	18(69,23)	6(23,08)	2(7,69)		24(92,31)		8(30,77)	
3	107(62,57)	56(32,75)	8(4,68)		163(95,32)		64(37,43)	
4	15(60,00)	8(32,00)	2(8,00)		23(92,00)		10(40,00)	
Estadio pT agrupado								
1 ^c e 2	23(71,88)	7(21,88)	2(6,25)	0,49	30(93,75)	0,68	9(28,13)	0,33
3 e 4	122(62,24)	64(32,65)	10(5,10)		186(94,90)		74(37,75)	
Estadio pN								
0	77(60,16)	46(35,94)	5(3,91)	0,08	123(96,09)	0,23	51(39,85)	0,33
1	35(63,64)	18(32,73)	2(3,64)		53(96,36)		20(36,37)	
2	34(72,34)	8(17,02)	5(10,64)		42(89,36)		13(27,66)	
Metástase Linfonodal								
Não	77(60,16)	46(35,94)	5(3,91)	0,18	123(96,09)	0,38	51(39,85)	0,27
Sim	69(67,65)	26(25,49)	7(6,86)		95(93,14)		33(32,35)	
Estadio M								
0	126(63,00)	65(32,50)	9(4,50)	0,25	191(95,50)	0,20	10(33,33)	0,84
1	20(66,67)	7(23,33)	3(10,00)		27(90,00)		74(37,00)	

^a Dados ausentes das variáveis: localização do tumor, 1 caso (transverso médio); grau histológico, 3 casos; invasão angiolinfática, 3 casos; invasão perineural, 4 casos; depósitos tumorais, 2 casos. ^b Com até 40% de componente mucinoso. ^c Inclui 2 casos de tumores com invasão até lâmina própria (*in situ*).

Tabela 11. (Continuação) Distribuição, frequências genótípicas do SNP *COX-2* -1195A>G e teste de associação com as variáveis anatomopatológicas em 230 pacientes operados por câncer colorretal.

<i>COX-2</i> -1195A>G								
Variáveis	Genótipo (n; %)			<i>p</i>	Genótipo (n; %)	<i>p</i>	Genótipo (n; %)	<i>p</i>
	AA	AG	GG		AA/AG		AG/GG	
Invasão Angiolinfática^d								
Não	89(62,68)	47(33,10)	6(4,23)	0,58	136(95,77)	0,37	53(37,33)	1,00
Sim	54(63,53)	25(29,41)	6(7,06)		79(92,94)		31(36,47)	
Invasão Perineural								
Não	107(62,94)	55(32,35)	8(4,71)	0,75	162(95,29)	0,50	63(37,06)	1,00
Sim	35(62,50)	17(30,36)	4(7,14)		52(92,86)		21(37,50)	
Depósitos Tumorais^f								
Não	133(63,33)	67(31,90)	10(4,76)	0,28	200(95,24)	0,24	77(36,66)	1,00
Sim	12(66,67)	4(22,22)	2(11,11)		16(88,89)		6(33,33)	

^a Dados ausentes das variáveis: localização do tumor, 1 caso (transverso médio); grau histológico, 3 casos; invasão angiolinfática, 3 casos; invasão perineural, 4 casos; depósitos tumorais, 2 casos. ^b Com até 40% de componente mucinoso. ^c Inclui 2 casos de tumores com invasão até lâmina própria (*in situ*).

A avaliação da distribuição dos genótipos do SNP *COX-2* 8473T>C entre as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas mostrou diferenças significativas na distribuição do polimorfismo por etnia. Os resultados estão especificados na tabela 12 e figuras 5 e 6. A estratificação por grupos étnicos evidenciou a frequência elevada de indivíduos heterozigotos e homozigotos para o alelo polimórfico em afrodescendentes no modelo codominante (figura 5) e recessivo (TC+CC, figura 6) comparados às outras etnias ($p<0,05$).

Tabela 12. Distribuição, frequências genotípicas do SNP *COX-2* 8437T>C e teste de associação com as variáveis epidemiológicas e clínicas em 230 pacientes operados por câncer colorretal.

COX-2 8473T>C								
Variável	Genótipo (n; %)			p	Genótipo (n; %)	p	Genótipo (n; %)	p
	TT	TC	CC		TT/TC		TC/CC	
Idade								
≤ 60	43(43,00)	48(48,00)	9(9,00)	0,61	91 (91,00)	0,67	57(57,00)	0,59
> 60	61(46,92)	54(41,54)	15(11,54)		115(88,46)		69(53,08)	
≤ 50	22(50,00)	18(40,91)	4(9,09)	0,83	40(90,91)	1,00	22(50,00)	0,50
> 50	82(44,09)	84(45,16)	20(10,75)		166(89,25)		104(55,91)	
Sexo								
Feminino	41(38,68)	51(48,11)	14(13,21)	0,14	92(86,79)	0,28	65(61,32)	0,08
Masculino	63(50,81)	51(41,13)	10(8,06)		114(91,94)		61(49,19)	
Etnia								
Branca	96(48,73)	83(42,13)	18(9,14)	0,00	179(90,86)	0,18	101(51,27)	0,00
Afrodescendente	2(08,70)	16(69,57)	5(21,74)		18(78,26)		21(91,31)	
Asiática	6(60,00)	3(30,00)	1(10,00)		9(90,00)		4(40,00)	
Histórico familiar de câncer ^a								
Não	57(46,34)	49(39,84)	17(13,82)	0,13	106(86,18)	0,09	66(53,66)	0,79
Sim	47(43,93)	53(49,53)	7(6,54)		100(93,46)		60(56,07)	
Histórico familiar de CCR ^a								
Não	17(45,95)	18(48,65)	2(05,41)	0,61	171(88,60)	0,39	106(54,92)	1,00
Sim	87(45,08)	84(43,52)	22(11,40)		35(94,59)		20(54,06)	
Síndrome Hereditária (HNPCC/PAF)								
Não	101(45,70)	96(43,44)	24(10,86)	0,47	197(89,14)	0,60	120(54,30)	0,52
Sim	3(33,33)	6(66,67)	0(0,00)		9(100,00)		6(66,67)	
CEA pré-operatório ^b								
Normal	59(49,17)	51(42,50)	10(8,33)	0,41	110(91,67)	0,36	61(50,83)	0,34
Alterado	39(42,39)	41(44,57)	12(13,04)		80(86,96)		53(57,61)	

^a História familiar de parentes de primeiro grau e segundo grau com câncer / câncer colorretal. ^b Dado ausente da variável CEA pré-operatório, 15 casos. Valores de referência: Normal: < 5 ng/ml (Não fumantes), <10 ng/ml (fumantes); alterado: ≥ 5 ng/ml (não fumantes) e ≥ 10 ng/ml (fumantes).

Figura 5. Frequência genotípica do polimorfismo *COX-2* 8473T>C entre os diferentes grupos étnicos do grupo caso.

Figura 6. Frequência genotípica do polimorfismo *COX-2* 8473T>C entre os diferentes grupos étnicos do grupo caso. Modelos dominante (A) e recessivo (B).

Em relação às variáveis anatomopatológicas, encontrou-se associação entre invasão angiolinfática e o SNP *COX-2* 8473T>C ($p < 0,05$). O genótipo CC é mais frequente em indivíduos com invasão angiolinfática presente. Não foi encontrada associação dos genótipos com as demais variáveis estudadas. Os resultados estão especificados na figura 7 e na tabela 13.

Figura 7. Frequência genotípica do polimorfismo *COX-2* 8473T>C entre indivíduos com e sem invasão angiolinfática. Modelos codominante (A) e recessivo (B).

Tabela 13. Distribuição, frequências genotípicas do SNP COX-2 8437T>C e teste de associação com as variáveis anatomopatológicas em 230 pacientes operados por câncer colorretal.

COX-2 8473T>C								
Variáveis	Genótipo (n; %)			p	Genótipo (n; %)	p	Genótipo (n; %)	p
	TT	TC	CC		TT/TC		TT	
Localização do Tumor ^a								
Cólon direito	26(44,83)	26(44,83)	6(10,34)	0,86	52(89,66)	1,00	32(55,17)	0,57
Cólon esquerdo	44(42,31)	49(47,12)	11(10,58)		93(89,42)		60(57,70)	
Reto	34(50,75)	26(38,81)	7(10,45)		60(89,55)		33(49,26)	
Tipo Histológico								
Não mucinoso	76(43,68)	81(46,55)	17(9,77)	0,74	157(90,23)	0,75	98(56,32)	0,62
Com componente mucinoso	17(47,22)	14(38,89)	5(13,89)		31(86,11)		19(52,78)	
Carcinoma mucinoso	11(55,00)	7(35,00)	2(10,00)		18(90,00)		9(45,00)	
Grau Histológico ^b								
Pouco diferenciado	6(37,50)	9(56,25)	1(6,25)	0,87	15(93,75)	1,00	10(62,50)	0,75
Moderadamente diferenciado	88(46,56)	80(42,33)	21(11,11)		168(88,89)		101(53,44)	
Bem diferenciado	9(40,91)	11(50,00)	2(9,09)		20(90,91)		13(59,09)	
Estadio								
I	9(33,33)	15(55,56)	3(11,11)	0,09	24(88,89)	0,42	18(66,67)	0,32
II	53(54,64)	37(38,14)	7(7,22)		90(92,78)		44(45,36)	
III	34(45,33)	32(42,67)	9(12,00)		66(88,00)		41(54,67)	
IV	8(25,81)	18(58,06)	5(16,13)		26(83,87)		23(74,19)	
Estadio agrupado								
I+II	62(50,00)	52(41,94)	10(8,06)	0,21	114(91,94)	0,28	62(50,00)	0,14
III+IV	42(39,62)	50(47,17)	14(13,21)		92(86,79)		64(60,38)	
Estadio pT								
1	3(50,00)	3(50,00)	0(0,00)	0,05	6(100,00)	0,07	3(50,00)	0,23
2	7(26,92)	15(57,69)	4(15,38)		22(84,62)		19(73,07)	
3	80(46,78)	77(45,03)	14(8,19)		157(91,81)		91(53,22)	
4	13(52,00)	6(24,00)	6(24,00)		19(76,00)		12(48,00)	
Estadio pT agrupado								
1 ^c e 2	10(31,25)	18(56,25)	4(12,50)	0,20	28(87,50)	0,76	22(68,75)	0,12
3 e 4	93(47,45)	83(42,35)	20(10,20)		176(89,80)		103(52,55)	
Estadio pN								
0	62(48,44)	55(42,97)	11(8,59)	0,45	117(91,41)	0,25	66(51,56)	0,35
1	25(45,45)	25(45,45)	5(9,09)		50(90,91)		30(54,54)	
2	17(36,17)	22(46,81)	8(17,02)		39(82,98)		30(63,83)	
Metástase Linfonodal								
Não	62(48,44)	55(42,97)	11(8,59)	0,43	117(91,41)	0,39	66(51,56)	0,29
Sim	42(41,18)	47(46,08)	13(12,75)		89(87,25)		60(58,83)	
Estadio M								
0	9(30,00)	16(53,33)	5(16,67)	0,13	181(90,50)	0,21	21(70,00)	0,08
1	95(47,50)	86(43,00)	19(9,50)		25(83,33)		105(52,50)	

Tabela 13. (Continuação) Distribuição, frequências genótípicas do SNP *COX-2* 8437T>C e teste de associação com as variáveis anatomopatológicas em 230 pacientes operados por câncer colorretal.

COX-2 8473T>C								
Variáveis	Genótipo (n; %)			p	Genótipo (n; %)	p	Genótipo (n; %)	p
	TT	TC	CC		TT/TC		TT	
Invasão Angiolinfática ^d								
Não	64(45,07)	69(48,59)	9(6,34)	0,04	133(93,66)	0,02	78(54,93)	1,00
Sim	39(45,88)	32(37,65)	14(16,47)		71(83,53)		46(54,12)	
Invasão Perineural								
Não	77(45,29)	79(46,47)	14(8,24)	0,20	156(91,76)	0,12	93(54,71)	1,00
Sim	26(46,43)	21(37,50)	9(16,07)		47(83,93)		30(53,57)	
Depósitos Tumorais ^f								
Não	22(10,48)	91(43,33)	97(46,19)	0,52	188(89,52)	1,00	113(53,81)	0,33
Sim	6(33,33)	10(55,56)	2(11,11)		16(88,89)		12(66,67)	

4.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.3.1 SEGUIMENTO DOS PACIENTES

O *status* da casuística ao final de 5 anos de seguimento está descrito na tabela 14. Após 60 meses de acompanhamento, 67,83% dos pacientes estavam vivos e 32,17% morreram. Em relação ao número de recidivas, 62 pacientes tiveram recidiva da doença, locorregional ou sistêmica. Dos 230 casos, apenas 10 tiveram perda de seguimento. Foram incluídos na análise como vivos, mas com dados censurados. Os tempos sobrevida global e de progressão livre de doença são apresentados na figura 8.

Tabela 14. *Status* vital dos pacientes operados por câncer colorretal.

Status vital (n=230)	n	%
Vivos	156	67,83
Vivos com CCR	15	6,52
Vivos sem CCR	141	61,30
Óbitos	74	32,17
Óbitos por CCR	56	24,35
Óbitos outras causas	18	7,83

Figura 8. Curvas obtidas pelo método de Kaplan-Meier para sobrevida global (A) e sobrevida livre de doença (B) dos pacientes operados por câncer colorretal.

4.3.2. ANÁLISE DA SOBREVIDA GLOBAL E PROGRESSÃO LIVRE DE DOENÇA

As tabelas 15 e 16 mostram os resultados da análise de risco de óbito e recidiva das variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas de pacientes operados por CCR. A maioria dos fatores relacionados à agressividade da doença apresentaram risco aumentado de recidiva e/ou óbito.

Observou-se risco de recidiva de 1,6 vezes (IC95%: 0,36-0,99) menor em indivíduos acima dos 60 anos, comparados com os indivíduos com idade inferior aos 60 anos ($p=0,03$). A etnia branca tem risco de 0,46 vezes (IC95%: 0,24-0,92), ou 2,73 vezes menor de desenvolver recidiva, comparado ao grupo de afrodescendentes.

O CEA elevado associou-se a maior risco de óbito e recidiva por CCR ($p<0,02$), com razão de risco de 2,80 (IC95%: 1,59-4,95) e 1,88 (IC95%: 1,12-3,14), respectivamente. A realização do tratamento adjuvante também se associou a maior risco de óbito por CCR, 2,61 vezes (IC95%: 1,42-4,78) maior e recidiva, 4,31 (IC95%: 2,30-8,11), comparado aos indivíduos que não fizeram o tratamento. O mesmo ocorre com o tipo de ressecção ($p<0,001$), cujo risco de óbito foi 18,57 vezes (IC95%: 10,35-33,31) maior para o grupo de pacientes

com ressecção não curativa. O risco de recidiva foi 2,96 vezes (IC95%: 1,69-5,17) maior, comparado ao grupo de pacientes com ressecção curativa.

Tabela 15. Resultado da análise de risco de óbito e recidiva das variáveis epidemiológicas com seus intervalos de confiança (95%), de 230 pacientes com câncer colorretal.

Variável		Sobrevida global		Progressão livre de doença	
		RR (95% IC)	p	RR (95% IC)	p
Idade	≤ 60	Referência	-	Referência	-
	> 60	0,84(0,50-1,42)	0,52	0,60(0,36-0,99)	0,04
	≤ 50	Referência	-	Referência	-
	> 50	1,16(0,58-2,30)	0,67	0,87(0,47-1,60)	0,64
Sexo	F	Referência	-	Referência	-
	M	1,47(0,86-2,52)	0,16	1,58(0,94-2,64)	0,08
Etnia	Afrodescendente	Referência	-	Referência	-
	Branco	0,63(0,30-1,33)	0,23	0,46(0,24-0,92)	0,03
	Oriental	0,84(0,22-3,18)	0,80	0,36(0,08-1,66)	0,19
Escolaridade	0 a 5 anos	Referência	-	Referência	-
	6 a 9 anos	0,64(0,20-2,11)	0,47	0,63(0,19-2,05)	0,44
	10 a 12 anos	1,56(0,88-2,77)	0,13	1,11(0,62-2,00)	0,72
	> 12 anos	1,54(0,75-3,16)	0,24	0,53(0,19-1,51)	0,24
Histórico familiar de câncer ^c	Não	Referência	-	Referência	-
	Sim	0,87(0,51-1,47)	0,60	0,91(0,55-1,51)	0,73
Histórico familiar de CCR ^c	Não	Referência	-	Referência	-
	Sim	1,10(0,56-2,19)	0,78	1,31(0,70-2,45)	0,41
Síndrome Hereditária (HNPCC/PAF)	Não	Referência	-	Referência	-
	Sim	0,82(0,20-3,36)	0,78	0,87(0,21-3,54)	0,84
Etilismo	Não-etilista	Referência	-	Referência	-
	Ex-etilista	1,15(0,53-2,51)	0,72	1,08(0,52-2,24)	0,84
	Etilista	1,39(0,77-2,51)	0,28	1,07(0,60-1,93)	0,82
Tabagismo	Não-tabagista	Referência	-	Referência	-
	Ex-tabagista	0,81(0,45-1,49)	0,50	0,80(0,45-1,42)	0,45
	Tabagista ativo	0,56(0,22-1,43)	0,23	0,79(0,35-1,76)	0,56
Dieta de fibra	Não	Referência	-	Referência	-
	Sim	0,99(0,54-1,82)	0,98	0,93(0,52-1,64)	0,79
Dieta de alto consumo de gordura animal ^b	Não	Referência	-	Referência	-
	Sim	1,00(0,59-1,70)	1,00	0,79(0,48-1,31)	0,37
IMC pré sintomas	18.5 - 25	Referência	-	Referência	-
	< 18.5	1,73(0,23-13,13)	0,59	-	1,00
	≥ 25	1,34(0,73-2,44)	0,34	1,09(0,63-1,89)	0,75
IMC pré-operatório	18.5 - 25	Referência	-	Referência	-
	< 18.5	1,27(0,38-4,20)	0,69	1,11(0,34-3,65)	0,86
	≥ 25	1,04(0,60-1,82)	0,88	1,01(0,60-1,71)	0,96
CEA pré-operatório	Normal	Referência	-	Referência	-
	Alterado	2,80(1,59-4,95)	0,00	1,88(1,12-3,14)	0,02
Tratamento adjuvante	Não	Referência	-	Referência	-
	Sim	2,61(1,42-4,78)	0,00	4,31(2,30-8,11)	0,00
Tipo de ressecção	Curativa	Referência	-	Referência	-
	Não curativa	18,57(10,35-33,31)	0,00	2,96(1,69-5,17)	0,00

RR: Razão de Risco; IC: intervalo de confiança.

De acordo com o estudo das razões de recidiva e óbito das variáveis anatomopatológicas, tabela 16, foi observado risco de óbito 4,17 vezes (RR:0,24 IC95%: 0,06-0,93) menor em pacientes com grau histológico bem diferenciado, comparado com os tumores pouco diferenciados ($p=0,04$). O estadio também mostrou risco mais elevado de óbito em estágios avançados da doença, III e IV e a análise agrupada dos estadios revelou risco de óbito de 8,45 vezes (IC95%: 4,14-17,27) maior para o grupo III/IV, comparado ao grupo I+II ($p<0,001$). Risco de recidiva foi 4,16 vezes (IC95%: 2,35-7,36) maior para o grupo com doença avançada.

A metástase linfonodal presente foi fator de risco para os pacientes com CCR ($p<0,01$), com risco de óbito aumentado em 3,15 vezes (IC95%: 1,46-6,80) em pacientes N1 e 10,9 vezes (IC95%: 5,56-21,38) em N2. Risco de óbito 2,63 vezes (IC95%: 1,32-5,26) maior em N1 e 7,47 vezes (IC95%: 4,06-13,76) maior em N2. Agrupando dois itens, o risco de óbito é 6,06 vezes (IC95%: 3,2-11,49) maior, comparados aos indivíduos com linfonodos negativos para células neoplásicas. O risco de recidiva na presença de metástase linfonodal, é 4,53 vezes (IC95%: 2,56-8,01) maior, comparados aos indivíduos com metástase linfonodal ausente.

A metástase à distância também foi avaliada e o risco de óbito na presença de sítios metastáticos foi 12,83 vezes (IC95%: 7,27-22,66) maior ($p<0,001$). Invasão angiolinfática, perineural e depósitos tumorais mostraram risco de óbito aumentado em 2,81(IC95%: 1,65-4,80), 3,67(IC95%: 2,16-6,21) e 2,85(IC95%: 1,40-5,83) vezes ($p<0,001$), comparados aos grupos com essas características ausentes. A invasão angiolinfática, perineural também apresentou risco aumentado de recidiva ($p<0,001$), com razões de riscos de 2,41 (IC95%: 1,46-3,97) e 2,49(IC95%: 0,44-2,75), respectivamente.

Tabela 16. Resultado da análise de risco de óbito e recidiva das variáveis anatomopatológicas com seus intervalos de confiança (95%), de pacientes com câncer colorretal.

Variável		Sobrevida global		Progressão livre de doença	
		RR (95% IC)	p	RR (95% IC)	p
Localização do tumor	Cólon Esquerdo	Referência	-	Referência	-
	Colón Direito	1,12(0,58-2,18)	0,73	0,47(0,22-1,04)	0,06
	Reto	1,43(0,78-2,63)	0,25	1,63(0,95-2,78)	0,07
Tipo histológico	Não mucinoso	Referência	-	Referência	-
	Com componente mucinoso	1,04(0,50-2,13)	0,92	1,27(0,67-2,38)	0,47
	Mucinoso	1,03(0,41-2,61)	0,95	0,32(0,08-1,30)	0,11
Grau histológico	Pouco diferenciado	Referência	-	Referência	-
	Moderadamente diferenciado	0,45(0,20-0,99)	0,05	0,82(0,33-2,05)	0,67
	Bem diferenciado	0,24(0,06-0,93)	0,04	0,34(0,08-1,43)	0,14
Estadio	I	Referência	-	Referência	-
	II	-	1,00	2,09(0,48-09,21)	0,33
	III	-	1,00	7,35(1,76-30,69)	0,01
	IV	-	1,00	8,50(1,93-37,43)	0,01
Estadio agrupado	I/II	Referência	-	Referência	-
	III/IV	8,45(4,14-17,27)	0,00	4,16(2,35-7,36)	0,00
Estadio pT	1	Referência	-	Referência	-
	2	-	1,00	-	1,00
	3	-	1,00	-	1,00
	4	-	1,00	-	1,00
Estadio pT agrupado	1 e 2	Referência	-	Referência	-
	3 e 4	3,11(0,97-9,95)	0,06	2,72(0,99-7,50)	0,05
Estadio pN	0	Referência	-	Referência	-
	1	3,15(1,46-06,80)	0,00	2,63(1,32-05,26)	0,01
	2	10,9(5,56-21,38)	0,00	7,47(4,06-13,76)	0,00
Metástase linfonodal	Não	Referência	-	Referência	-
	Sim	6,06(3,20-11,49)	0,00	4,53(2,56-8,01)	0,00
Nº de linfonodos identificados	<12	Referência	-	Referência	-
	≥12	0,72(0,39-1,31)	0,28	1,24(0,65-2,39)	0,51
Estadio M	Não	Referência	-	Referência	-
	Sim	12,83(7,27-22,66)	0,00	1,85(0,98-3,47)	0,06
Invasão angiolinfática	Não	Referência	-	Referência	-
	Sim	2,81(1,65-4,80)	0,00	2,41(1,46-3,97)	0,00
Invasão perineural	Não	Referência	-	Referência	-
	Sim	3,67(2,16-6,21)	0,00	2,49(1,50-4,13)	0,00
Depósitos tumorais	Não	Referência	-	Referência	-
	Sim	2,85(1,40-5,83)	0,00	1,10(0,44-2,75)	0,84

RR: Razão de Risco; IC: intervalo de confiança.

Avaliaram-se as razões de risco de óbito por CCR e recidiva na presença dos genótipos dos genes *COX-2* (tabelas 17 e 18). Para o modelo de regressão simples, o risco de óbito na presença do genótipo *COX-2* -1195GG é 2,63 vezes (IC95%: 1,10-6,27) maior do que no genótipo de referência AA. No modelo de regressão múltipla, o risco de óbito do genótipo GG é 2,78 vezes (IC95%: 1,13-6,84) maior do que o genótipo de referência AA, considerando as variáveis de confusão. Associação similar foi obtida no teste com o modelo dominante. O genótipo GG mostrou risco de óbito 2,7 vezes (IC95%: 1,15-6,30) maior, quando comparado à combinação dos genótipos AA+AG no modelo de regressão simples. A razão de risco encontrada no modelo ajustado para as variáveis de confusão foi de 2,59 (IC95%: 1,07-6,27). As curvas de sobrevida obtidas pelo método de Kaplan-Meier com os respectivos valores de *p* de log rank estão representados na figura 9. Não foi encontrada associação significativa polimorfismo 8473T>C com o risco de morte por CCR.

Tabela 17. Resultado da análise de risco de óbito e seus intervalos de confiança (95%) dos polimorfismos do *COX-2* em pacientes com câncer colorretal.

Sobrevida global					
Genótipo		Não ajustado ^a		Ajustado ^b	
		RR (95% IC)	<i>p</i>	HR (95% IC)	<i>p</i>
<i>COX-2</i> -1195A>G (rs689466)					
	AA	Referência	-	Referência	-
	AG	0,92(0,51-1,67)	0,80	1,34(0,72-2,52)	0,36
	GG	2,63(1,10-6,27)	0,03	2,78(1,13-6,84)	0,02
	AA/AGxGG	2,70(1,15-6,30)	0,02	2,59(1,07-6,27)	0,04
	AAxAG/GG	1,12(0,66-1,92)	0,67	1,62(0,93-2,85)	0,09
<i>COX-2</i>+8473T>C (rs5275)					
	TT	Referência	-	Referência	-
	TC	1,16(0,66-2,03)	0,61	0,61(0,33-1,12)	0,11
	CC	1,71(0,74-4,00)	0,21	0,72(0,30-1,75)	0,47
	TT/TCxCC	1,59(0,72-3,51)	0,25	0,92(0,41-2,07)	0,83
	TTxTC/CC	1,24(0,73-2,12)	0,42	0,63(0,35-1,12)	0,12

^aModelo de regressão de Cox não ajustado; ^b Modelo de regressão de Cox ajustado por sexo, idade, estadió, tipo de ressecção e tratamento adjuvante. RR: Razão de Risco; IC: intervalo de confiança.

Figura 9. Curvas obtidas pelo método de Kaplan-Meier para sobrevida global do polimorfismo *COX-2* - 1195A>G. Modelo geral (A) e modelo dominante (B).

Com relação à sobrevida livre de doença, realizou-se a avaliação do risco dos genótipos dos polimorfismos do *COX-2* nos modelos simples e ajustado de regressão. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa dos genótipos do *COX-2* com o risco de recidiva. Os dados estão representados na tabela 18.

Tabela 18. Resultado da análise de risco de recidiva e seus intervalos de confiança (95%) dos polimorfismos do COX-2 em pacientes com câncer colorretal.

Progressão livre de doença					
Genótipo		Não ajustado ^a		Ajustado ^b	
		RR (95% IC)	<i>p</i>	HR (95% IC)	<i>p</i>
COX-2 -1195A>G (rs689466)					
	AA	Referência	-	Referência	-
	AG	0,67(0,37-1,20)	0,18	0,68(0,37-1,24)	0,21
	GG	1,11(0,40-3,10)	0,84	0,79(0,28-2,25)	0,66
	AA/AGxGG	1,26(0,46-3,46)	0,66	0,88(0,31-2,48)	0,81
	AAxAG/GG	0,73(0,42-1,25)	0,25	0,70(0,41-1,22)	0,21
COX-2+8473T>C (rs5275)					
	TT	Referência	-	Referência	-
	TC	0,85(0,50-1,45)	0,56	0,79(0,46-1,36)	0,40
	CC	1,03(0,45-2,33)	0,95	0,96(0,41-2,25)	0,93
	TT/TCxCC	1,00(0,50-2,43)	0,80	1,09(0,49-2,44)	0,84
	TTxTC/CC	0,89(0,54-1,46)	0,64	0,82(0,49-1,37)	0,45

^aModelo de regressão de Cox não ajustado; ^b Modelo de regressão de Cox ajustado por sexo, idade, estágio, tipo de ressecção e tratamento adjuvante. Razão de Risco; IC: intervalo de confiança.

A análise de haplótipos foi conduzida para avaliar o efeito combinado dos dois polimorfismos na sobrevida dos pacientes com CCR

Como mostra a análise de risco de óbito dos haplótipos do gene COX-2, resumizada na tabela 19, os perfis de haplótipos estimados não estão associados com risco de morte por CCR, resultados encontrados nos modelos não ajustado e ajustado da regressão de Cox.

Tabela 19. Resultado da análise de risco de óbito e seus intervalos de confiança (95%) dos haplótipos do COX-2 em pacientes com câncer colorretal

Sobrevida global					
Haplótipos COX-2		Não ajustado ^a		Ajustado ^b	
		HR (95% IC)	<i>p</i>	HR (95% IC)	<i>p</i>
A	T	0,70(0,39-1,26)	0,24	0,69(0,38-1,27)	0,23
A	C	1,19(0,70-2,02)	0,51	1,00(0,57-1,75)	0,95
G	T	0,94(0,53-1,65)	0,82	1,28(0,71-2,30)	0,41

^aModelo de regressão de Cox não ajustado; ^b Modelo de regressão de Cox ajustado por sexo, idade, estágio, tipo de ressecção e tratamento adjuvante. Razão de Risco; IC: intervalo de confiança.

A tabela 20 evidencia os resultados da análise de risco de recidiva dos haplótipos do gene COX-2. Não foram encontrados perfis de haplótipos estatisticamente significativos associados ao risco de recidiva da doença, em ambos os modelos de regressão de Cox estudados.

Tabela 20. Resultado da análise de risco de recidiva e seus intervalos de confiança (95%) dos haplótipos do COX-2 em pacientes com câncer colorretal

Progressão livre de doença					
Haplótipos COX-2		Não ajustado ^a		Ajustado ^b	
		RR (95% IC)	<i>p</i>	RR (95% IC)	<i>p</i>
A	T	0,91(0,52-1,60)	0,75	0,86(0,49-1,53)	0,61
A	C	0,96(0,58-1,58)	0,84	1,00(0,60-1,66)	0,96
G	T	1,02(0,60-1,73)	0,92	0,87(0,51-1,48)	0,59

^aModelo de regressão de Cox não ajustado; ^b Modelo de regressão de Cox ajustado por sexo, idade, estágio, tipo de ressecção e tratamento adjuvante. RR: Razão de Risco; IC: intervalo de confiança.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O câncer colorretal é considerado um problema de saúde pública em escala mundial¹. No Brasil, tem grande importância, especialmente em termos de incidência e mortalidade². A literatura mostra três estudos brasileiros de associação dos SNPs do *COX-2* com o câncer. Piranda *et al.*⁹⁵, em um estudo caso-controle, de câncer de mama, onde foram verificados 9 SNPs do *COX-2*, entre eles, -1195A>G e 8473T>C; *COX-2* -765G>C (rs20417), em pacientes com CCR, por Pimenta *et al.*⁹⁶, e no câncer gástrico para análise de risco, por Campanholo *et al.*⁹⁷.

Portanto, este é primeiro trabalho de investigação do impacto dos polimorfismos -1195A>G e 8473T>C no risco, progressão e sobrevida de pacientes com CCR na população brasileira. Duzentos e trinta casos e 196 controles foram analisados quanto à distribuição genotípica e alélica dos SNPs acima referidos. As frequências encontradas nos casos foram: -1195 AA = 63,48%; AG = 31,30%; GG = 5,22% e *COX-2* 8473 TT = 45,22%; TC 44,35%; CC = 10,43%; e em indivíduos sadios: -1195 AA = 68,88%; AG = 28,06%; GG = 3,06% e 8473 TT = 44,90%; TC 38,27%; CC = 16,84%. Levando-se em consideração a população geral, as frequências do alelo polimórfico obtidas na genotipagem dos SNPs 1195A>G e 8473T>C foram, respectivamente, de 0,19 e 0,34, superiores às frequências alélicas do estudo brasileiro em câncer de mama. Na análise preliminar para seleção dos SNPs, o MAF para os polimorfismos acima citados foram 0,15 e 0,22⁹⁵.

No presente estudo, as frequências genotípicas observadas e esperadas dos SNPs do *COX-2* foram consistentes com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na população geral, exceto para o grupo controle do polimorfismo 8473T>C, cujo valor de p foi de 0,02, considerando o nível de significância de 5%. As frequências, diferentes das esperadas em equilíbrio, podem ocorrer devido a intercruzamento, estratificação populacional, seleção ou fatores desconhecidos de erros de determinação do genótipo⁹⁸. 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} ⁹⁹.

Selecionou-se a técnica de genotipagem *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays* (*Applied Biosystems, Foster City, EUA*), em PCR em tempo real. Esta metodologia foi a escolhida, apesar do método RFLP (Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição) ainda ser utilizado¹⁰⁰. O RFLP consiste na amplificação por PCR convencional da região contendo o SNP de interesse, seguido do tratamento com enzimas de restrição específicas, que reconhecem apenas um dos alelos. Posteriormente, os fragmentos são separados por eletroforese e os alelos reconhecidos pelas diferenças de tamanho dos fragmentos pós digestão enzimática.

A metodologia Taqman garante maior precisão e eficiência que a técnica descrita acima, com obtenção de resultados num período de tempo consideravelmente curto. É menos trabalhosa, por eliminar etapas de manipulação de amostras amplificadas. Amplifica segmentos do gene muito menores que os exigidos por RFLP, o que possibilitou a genotipagem de amostras antigas e parcialmente degradadas. Os protocolos requerem menor quantidade de DNA. E a metodologia permite a paralelização de reações, através dos ensaios multiplex, em equipamentos de PCR em tempo real com mais de dois filtros.

Avaliou-se a associação entre os alelos dos SNPs do *COX-2*, em casos e controles, assim como os genótipos e haplótipos, e não foi encontrada associação estatisticamente significativa dos SNPs com a predisposição ao CCR, apenas uma tendência a menor risco do genótipo 8473TT no modelo não ajustado de regressão logística (OR:0,58; 95% IC, 0,33-1,01; $p=0,055$).

O papel desempenhado pela *COX-2* no processo de carcinogênese de tumores do colorretais é bem estabelecido⁶⁸. Estudos funcionais demonstraram o efeito dos polimorfismos em locais gênicos importantes do *COX-2*, e estes podem estar relacionados aos níveis aumentados de expressão do RNAm nos tumores colorretais⁶⁰. O SNP -1195A>G reside em uma região rica em sítios de reconhecimento para proteínas nucleares que são críticas na ativação da transcrição^{48; 54; 55}. Alterações nesta área podem influenciar na capacidade de ligação com certas proteínas nucleares⁴⁸. Sabe-se que o polimorfismo cria uma sequência de reconhecimento no núcleo para o fator de transcrição c-MYB, resultando em maior atividade de transcrição e expressão de RNAm em comparação ao alelo selvagem⁴⁸. O c-MYB, presente na região promotora de muitos genes, é um fator de transcrição envolvido no sistema hematopoiético e no trato gastrointestinal, atuando na regulação do equilíbrio

entre a divisão celular, diferenciação e sobrevivência⁵⁶. Um estudo funcional recente demonstrou “in vitro” a influência do polimorfismo -1195A>G sobre a atividade transcricional do gene COX-2. O alelo -1195G aumentou a transcrição em duas linhagens celulares de cólon¹⁰¹.

Os achados do presente estudo estão de acordo com trabalhos já publicados. Na população holandesa, Hoff *et al.*¹⁰², não encontraram associação significativa do polimorfismo -1195A>G com o risco de CCR na análise de genótipos, mas houve uma tendência a risco reduzido na presença do haplótipo -1195A e -765C. Ausência de associação também foi encontrada em um estudo de risco de CCR na população chinesa¹⁰³. O mesmo foi visto no estudo de Siezen *et al.*⁵⁹ na população espanhola e Andersen *et al.*¹⁰⁴ na Dinamarca, o qual não encontraram associação significativa do SNP em suas respectivas populações. Por fim, duas revisões sistemáticas não identificaram variantes do polimorfismo que interfiram na suscetibilidade ao CCR^{105; 106}.

Existe uma grande variabilidade nos resultados dos estudos de associação. Várias referências na literatura atribuem a mesma variante associações opostas de suscetibilidade ao CCR, gerando dados conflitantes^{58; 66}. A avaliação da distribuição dos genótipos na população da Jordânia, conferiu efeito protetor na presença do alelo selvagem -1195A contra a formação de pólipos e CCR¹⁰⁷. Em um estudo na população japonesa, a presença do genótipo -1195AA foi associada à redução do risco de desenvolvimento de adenomas, porém, sem significância estatística. Haplótipos contendo o alelo A sugeriram efeito protetor¹⁰⁸. Pereira *et al.* realizaram um estudo caso-controle com 117 pacientes com CCR em Portugal e associaram o polimorfismo -1195A>G à predisposição aumentada ao CCR em 1,73 vezes¹⁰⁹. Esses resultados corroboram os achados do estudo funcional de Pereira *et al.*, que identificou superexpressão do gene COX-2 em linhagens celulares portadores do alelo G, comparadas àquelas com o alelo A¹⁰¹, reforçando a hipótese da participação do alelo G na suscetibilidade ao CCR.

Entretanto, Tan *et al.*⁵⁷ associaram os genótipos AA e GA a risco aumentado de predisposição de CCR, com OR de 1,77 e 1,24, comparados ao genótipo GG. Em relação às variáveis clínicas, o alelo A foi prevalente em Dukes elevados, sugerindo risco em cânceres

avanzados ao diagnóstico. Vogel *et al.*, mostraram que portadores do alelo variante G tinham risco reduzido de CCR⁶⁰. Dong *et al.*, em revisão sistemática de uma série de polimorfismos do COX-2 em tumores do aparelho digestivo, identificaram, em asiáticos, maior predisposição ao CCR na presença do alelo -1195A⁵⁸. Achados similares foram encontrados em outros tumores do aparelho digestivo, como o esofágico⁴⁸ e gástrico¹¹⁰. Este é outro problema nos estudos de SNPs. Não existe uma padronização da nomenclatura e mesmo a designação do alelo selvagem e polimórfico é contraditória. A maioria dos trabalhos considerou o alelo G o polimórfico, apesar dos estudos acima relatados atribuírem a variante ao alelo A. Ainda assim, manteve-se a associação ao risco aumentado de câncer relacionada ao alelo polimórfico. Esses achados foram consistentes com o estudo funcional de Zhang *et al.* Na presença da variante A, é criado um sítio c-MYB, que acarretaria no aumento do número de transcritos⁴⁸.

A região 3'UTR do COX-2 contém elementos ricos em adenina-uracila, altamente conservados, conhecidos como sequências de Shaw-Kamen (AUUUA) e proteínas regulatórias como IL-1, LPS e certos taxanos que ligam nesta região^{36; 61}. O polimorfismo 8473T>C pode modificar a afinidade na ligação de fatores regulatórios e influenciar a estabilidade do RNAm e/ou eficácia translacional^{62; 63; 64}. A região é alvo de micro RNAs, que atuam como reguladores pós-transcricionais⁶⁷ e a presença do alelo C interfere nessa interação, reduzindo o decaimento do RNAm da COX-2. A ausência da atividade regulatória do miRNA leva a maior estabilidade do RNAm, consequentemente, aumento da síntese protéica⁵⁰.

Não foram encontradas evidências de associação do polimorfismo 8473T>C à suscetibilidade ao CCR neste trabalho. Cox *et al.*¹¹¹, em avaliação de 8 SNPs, dentre eles, o 8473T>C, não detectaram associação significativa. Pereira *et al.*, também não encontraram associação do SNP ao CCR na população portuguesa¹⁰⁹. Vogel *et al.*, não identificaram em variantes do SNP 8473T>C potencial risco de CCR⁶⁰. O mesmo ocorreu com Siezen *et al.*⁵⁹ na população espanhola e Andersen *et al.*¹⁰⁴ na Dinamarca. No estudo de Gong *et al.* não houve relação do polimorfismo com o desenvolvimento de adenomas, mas foi encontrado menor risco na análise estratificada, em usuários de AINEs portadores do alelo C

(OR=0,35)¹¹². Um estudo caso-controle na população dinamarquesa associou o polimorfismo 8473T>C ao aumento do risco de CCR e interação do SNP -1195A>G com variáveis relacionadas à dieta e hábitos de vida⁵³. Revisão sistemática realizada por Zhu *et al.*¹¹³ não identificou associação do SNP 8473T>C ao risco de CCR, mas a encontrou em outros cânceres. A variante 8473C foi associada a menor predisposição ao câncer de mama e pulmão. Outras duas revisões sistemáticas recentes não evidenciaram associação do polimorfismo com o risco de ocorrência de CCR^{105; 106}.

As características demográficas, epidemiológicas, clínicas anatomopatológicas foram coletadas, parametrizadas e comparadas aos genótipos dos polimorfismos -1195A>G e 8473T>C do *COX-2*. Não foram encontrados trabalhos na literatura comparáveis aos apresentados neste estudo. O número de variáveis da casuística foi um fator diferencial. Apesar da maioria das análises não resultarem em associações estatisticamente significativas, encontrou-se diferenças na distribuição dos polimorfismos *COX-2* -1195A>G e 8473T>C entre os grupos étnicos. A estratificação evidenciou a frequência elevada do alelo polimórfico *COX-2* -1195G na população oriental. Este grupo, constituído em sua maioria por japoneses, mostrou um perfil genotípico distinto das demais etnias estudadas. O alelo tem baixa frequência em afrodescendentes. Já para o SNP *COX-2* 8473T>C, a estratificação por grupos étnicos evidenciou a frequência elevada de indivíduos heterozigotos e homozigotos para o alelo polimórfico em afrodescendentes. A etnia oriental tem destaque por ser composta quase em sua totalidade por nativos. Os estudos em populações asiáticas citados anteriormente mostraram distribuições genotípicas distintas das demais, resultados estes evidenciados nas revisões sistemáticas¹¹⁴. Os afrodescendentes, apesar da determinação dos genótipos ser autodeclarada, mostraram perfil genotípico diferencial. O polimorfismo do *COX-2* Val511Ala apresentou frequência do menor alelo de 5% em afro-americanos e foi ausente em caucasianos⁴⁹. Esses resultados destacam um dado já conhecido: as frequências genotípicas são distintas nas diferentes populações humanas.

Polimorfismos podem ser classificados como cosmopolitas ou específicos de determinadas populações. Os cosmopolitas podem ser encontrados em todos os grupos étnicos, com frequências alélicas variáveis, mas em grande proporção. Acredita-se que

tenham surgido antes das migrações dos seres humanos e, em geral, são mais antigos que os polimorfismos de populações específicas, os quais são compatíveis com o isolamento geográfico das populações humanas. Esses polimorfismos provavelmente se originaram em populações isoladas e, em seguida, atingiram determinada frequência por seleção positiva ou não conferiram qualquer vantagem ou desvantagem à população. Estudos das sequências polimórficas dos diversos grupos étnicos dos EUA demonstraram que os afro-americanos tem os números mais altos de polimorfismos populacionais específicos, em comparação com americanos de ascendências europeia, mexicana e asiática. Assim, os africanos são considerados a população mais antiga e, por esta razão, tem polimorfismos populacionais específicos recém-desenvolvidos e grande quantidade de polimorfismos cosmopolitas, que se formaram antes das migrações para fora da África¹¹⁵.

Em relação às variáveis anatomopatológicas, nos indivíduos com invasão angiolinfática houve associação ao polimorfismo 8473T>C ($p<0,05$), com prevalência do genótipo CC. A associação sugere que possa existir alguma influência do genótipo na presença de invasão angiolinfática e progressão tumoral.

É notória a relação da invasão angiolinfática com agressividade tumoral. Neste trabalho, o grupo com invasão angiolinfática tem risco aumentado de óbito e recidiva de 2,81 (IC95%:1,65-4,80; $p<0,001$) e 2,41 (IC95%:1,46-3,97; $p<0,001$) vezes, respectivamente, comparado ao grupo sem invasão angiolinfática. Estudos mostraram associação da variável à possibilidade de metástase linfonodal oculta, com aplicação na avaliação da agressividade tumoral e de prognóstico^{116; 117}. O alelo C está relacionado à estabilidade do RNAm do *COX-2*, como foi discutido no item anterior⁵⁰. A estabilidade resulta no aumento da expressão protéica, com consequente aumento da síntese de PGs, e estas contribuem para a progressão tumoral induzindo fenótipos múltiplos de células cancerosas²⁸.

Realizou-se a análise de sobrevida global e progressão livre de doença em 230 pacientes com 60 meses de acompanhamento pós cirurgia. Destes, apenas 10 não completaram o seguimento. O banco de dados com informações chave dos 5 anos de evolução clínica é um fator diferencial neste trabalho. Avaliou-se as razões de risco de óbito por CCR e recidiva na presença dos polimorfismos do *COX-2*.

A *COX-2* tem um papel bem estabelecido em estágios iniciais da carcinogênese, participando de diversos processos celulares como a inflamação, proliferação celular e

angiogênese^{21; 22}. Por isso, além do seu papel na suscetibilidade ao câncer, ela vem sendo estudada como potencial marcador prognóstico no CCR e em outras neoplasias^{118; 119}. Polimorfismos que modulam a produção de COX-2 também apresentam potencial como marcadores prognósticos de CCR⁶⁵.

Três estudos investigaram o impacto dos polimorfismos -1195A>G e 8473T>C na sobrevida de pacientes com a neoplasia. Kim *et al.* associaram a presença do genótipo 8473TT com maior sobrevida global e sobrevida livre de doença em pacientes com CCR avançado, tratados com XELOX, comparados ao genótipo TC/CC (RR=0,47/p=0,046 e HR=0,16/p=0,013, respectivamente)⁵¹. Lurje *et al.* constataram que pacientes com o genótipo 8473CC tiveram menor risco de recidiva (RR: 0,67; IC95%: 0,40-1,13; $p = 0,003$), ou seja, maior sobrevida livre de doença, em comparação a outros genótipos. Na análise multivariada, COX-2 8473 T>C ($p = 0,013$) permaneceu associado a menor progressão, independente das variáveis de confusão⁶⁵. O efeito protetor do alelo C contradiz os achados de Moore *et al.*, que o associaram a um aumento de expressão protéica por inibição do miRNA, discutido na análise de suscetibilidade⁵⁰. E elevados níveis de COX-2 foram correlacionados a menor sobrevida global¹²⁰. No presente estudo, não foi encontrada associação significativa deste polimorfismo com o prognóstico de pacientes com CCR.

Com relação ao polimorfismo -1195A>G, o alelo G parece influenciar na sobrevida global de pacientes com CCR. No modelo de regressão simples, o risco de óbito na presença do genótipo -1195GG foi 2,63 vezes (IC95%: 1,10-6,27) maior do que no genótipo AA. No modelo de regressão múltipla, o risco de óbito do genótipo GG foi 2,78 vezes (IC95%: 1,13-6,84) maior do que o genótipo de referência AA, ajustando para as variáveis de confusão. Associação similar foi obtida no teste com o modelo dominante. O genótipo GG mostrou risco de óbito 2,7 vezes (IC95%: 1,15-6,30) maior, quando comparado à combinação dos genótipos AA+AG no modelo de regressão simples e manteve a significância estatística na análise de regressão múltipla (RR: 2,59; IC95%: 1,07-6,27). Esses resultados corroboram os achados de Pereira *et al.*, de aumento da expressão gênica na presença do alelo G¹⁰¹.

Li *et al.* avaliaram esse SNP e seu impacto na sobrevida de pacientes com CCR e não encontraram associação significativa¹⁰³. Não há outros estudos que avaliem o efeito do polimorfismo no prognóstico dos pacientes com CCR. Assim, este é o primeiro trabalho a

avaliar o impacto desses polimorfismos na sobrevida de pacientes com câncer colorretal na população brasileira.

O valor prognóstico do polimorfismo em outros tipos tumorais foi avaliado. Em pacientes com carcinoma pulmonar de células não pequenas localmente avançado, tratados com quimioterapia à base de platina, o genótipo AA foi significativamente associado a maior sobrevida global e progressão livre de doença, em comparação com AG ou genótipo GG; e a regressão multivariada mostrou que o polimorfismo teve valor prognóstico independente para sobrevida global¹²¹. Não foi encontrada associação do polimorfismo na sobrevida de pacientes com colangiocarcinoma¹²².

Os resultados divergentes encontrados nas diferentes populações e em tipos diferenciados de tumor sugerem que os SNPs desempenhem um papel na carcinogênese colorretal, mas sofrem influência de fatores moleculares, como a presença de outros polimorfismos funcionais não identificados, que acentuam ou neutralizam o efeito da variante; pode ocorrer a modulação tecido-específico, o que justificaria os achados diferentes em termos de mecanismo de ação e em função na expressão gênico/protéica e interferência de fatores ambientais e da composição étnica da população, demonstrado nos resultados dos estudos em diferentes populações.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

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

- As variantes *COX-2* -1195A>G e 8473T>C não participam da suscetibilidade genética ao câncer colorretal na população brasileira.
- O polimorfismo *COX-2* -1195A>G associa-se a menor sobrevida e pode atuar como marcador prognóstico nestes pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ FERLAY, J. et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11** [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. 2014.
- ² INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: < www.inca.gov.br/estimativa/2014/ >.
- ³ KARAHALIOS, A.; ENGLISH, D. R.; SIMPSON, J. A. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Am J Epidemiol**, v. 181, n. 11, p. 832-45, Jun 2015. ISSN 1476-6256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25888582> >.
- ⁴ NORAT, T. et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. **J Natl Cancer Inst**, v. 97, n. 12, p. 906-16, Jun 2005. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956652> >.
- ⁵ WILLETT, W. C. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, n. 1, p. 3-8, Jan 2001. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205486> >.
- ⁶ Fearon ER, Gruber SB. Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. In Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA. The Molecular Basis of Cancer. WB Saunders Company. 2001;p.289-312.
- ⁷ WINAWER, S. J. Natural history of colorectal cancer. **Am J Med**, v. 106, n. 1A, p. 3S-6S; discussion 50S-51S, Jan 1999. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089106> >.

- ⁸ KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**, v. 87, n. 2, p. 159-70, Oct 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8861899> >.
- ⁹ MENDELSON, J. et al. **The Molecular Basis of Cancer**. WB Saunders Company, 2001.
- ¹⁰ TAKAYAMA, 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, n. 3, p. 599-611, Sep 2001. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522744> >.
- ¹¹ LYNCH, H. T.; DE LA CHAPELLE, A. Hereditary colorectal cancer. **N Engl J Med**, v. 348, n. 10, p. 919-32, Mar 2003. ISSN 1533-4406. 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**, v. 87, n. 15, p. 1114-25, Aug 1995. ISSN 0027-8874. 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, n. 1, p. 113-30, Jan 2007. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17204026> >.
- 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**, v. 28, n. 4, p. 423-34, Apr 2004. ISSN 0147-5185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087661> >.

- 15 _____ . 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**, v. 30, n. 12, p. 1491-501, Dec 2006. ISSN 0147-5185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17122504> >.
- 16 MÄKINEN, M. J. Colorectal serrated adenocarcinoma. **Histopathology**, v. 50, n. 1, p. 131-50, Jan 2007. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17204027> >.
- 17 KRUHØFFER, M. et al. Gene expression signatures for colorectal cancer microsatellite status and HNPCC. **Br J Cancer**, v. 92, n. 12, p. 2240-8, Jun 2005. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956967> >.
- 18 VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 38, p. 97-120, 1998. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597150> >.
- 19 NEEDLEMAN, P. et al. Arachidonic acid metabolism. **Annu Rev Biochem**, v. 55, p. 69-102, 1986. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3017195> >.
- 20 SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A. J. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 2, p. 96-102, Feb 2003. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559775> >.
- 21 WILLIAMS, C. S.; MANN, M.; DUBOIS, R. N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. **Oncogene**, v. 18, n. 55, p. 7908-16, Dec

1999. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10630643> >.
- 22 FOSSLIN, E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. **Ann Clin Lab Sci**, v. 30, n. 1, p. 3-21, Jan 2000. ISSN 0091-7370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10678579> >.
- 23 DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J**, v. 12, n. 12, p. 1063-73, Sep 1998. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9737710> >.
- 24 WANG, D.; MANN, J. R.; DUBOIS, R. N. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v. 128, n. 5, p. 1445-61, May 2005. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15887126> >.
- 25 CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 21, p. 13926-31, Oct 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242329> >.
- 26 DINCHUK, J. E.; LIU, R. Q.; TRZASKOS, J. M. COX-3: in the wrong frame in mind. **Immunol Lett**, v. 86, n. 1, p. 121, Mar 2003. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600754> >.
- 27 MUTOH, M. et al. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 62, n. 1, p. 28-32, Jan 2002. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782353> >.
- 28 WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

- 29 ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre. ArtMed: 2010. 1601p
- 30 NCBI Variation Viewer Homo sapiens:GRCh37.p13 (GCF_000001405.25)Chr 1 (NC_000001.10):186.6M - 186.7M
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?q=PTGS2&filters=source:dbsnp&asm=GCF_000001405.25
- 31 STRACHAN, T.; READ, A. P. **Human molecular genetics**. New York: Garland Science/Taylor & Francis Group, 2011. 716p.
- 32 CAETANO, A. R. **Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro**. Minas Gerais: R. Bras. Zootec. V. 38: 64-71 p. 2009.
- 33 GUIMARÃES, P.; COSTA, M. **SNPs: sutis diferenças de um código: Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. 26: 24-27 p. 2002.
- 34 HOULSTON, R. S.; TOMLINSON, I. P. Polymorphisms and colorectal tumor risk. **Gastroenterology**, v. 121, n. 2, p. 282-301, Aug 2001. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487538> >.
- 35 SHIELDS, P. G.; HARRIS, C. C. Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer. **JAMA**, v. 266, n. 5, p. 681-7, Aug 1991. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2072479> >.
- 36 APPLEBY, S. B. et al. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. **Biochem J**, v. 302 (Pt 3), p. 723-7, Sep 1994. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7945196> >.

- 37 NCBI Variation Viewer Homo sapiens:GRCh37.p13 (GCF_000001405.25)Chr 1
(NC_000001.10):186.6M - 186.7M
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?q=PTGS2&filters=source:dbsnp&asm=GCF_000001405.25
- 38 CHEN, G. Z. et al. Cyclooxygenase-2 genetic polymorphism and stroke subtypes in Chinese. **J Mol Neurosci**, v. 51, n. 2, p. 467-73, Oct 2013. ISSN 1559-1166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23907768> >.
- 39 OLIVEIRA-FILHO, J. et al. COX-2 rs20417 Polymorphism Is Associated with Stroke and White Matter Disease. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 24, n. 8, p. 1817-22, Aug 2015. ISSN 1532-8511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25957909> >.
- 40 LEMAITRE, R. N. et al. Variation in eicosanoid genes, non-fatal myocardial infarction and ischemic stroke. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 2, p. e58-63, Jun 2009. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19046748> >.
- 41 CIPOLLONE, F. et al. A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. **JAMA**, v. 291, n. 18, p. 2221-8, May 2004. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15138244> >.
- 42 CHEN, L. J. et al. Cyclooxygenase 2 1195G > A polymorphism is associated with chronic obstructive pulmonary disease in Japanese and Chinese patients. **Chin Med J (Engl)**, v. 126, n. 12, p. 2215-21, Jun 2013. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23786928> >.
- 43 WANG, R. et al. Effect of a single nucleotide polymorphism in miR-146a on COX-2 protein expression and lung function in smokers with chronic obstructive

- pulmonary disease. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 10, p. 463-73, 2015. ISSN 1178-2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25767384> >.
- 44 HÅKANSSON, A. et al. Cyclooxygenase-2 polymorphisms in Parkinson's disease. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 144B, n. 3, p. 367-9, Apr 2007. ISSN 1552-4841. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17171651> >.
- 45 ZHOU, F. et al. The association between COX-2 polymorphisms and hematologic toxicity in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with platinum-based chemotherapy. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61585, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23620771> >.
- 46 GHARIB, A. F. et al. COX-2 polymorphisms -765G→C and -1195A→G and hepatocellular carcinoma risk. **Gene**, v. 543, n. 2, p. 234-6, Jun 2014. ISSN 1879-0038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24720952> >.
- 47 ZHANG, J. et al. Polymorphisms in inflammatory genes, plasma antioxidants, and prostate cancer risk. **Cancer Causes Control**, v. 21, n. 9, p. 1437-44, Sep 2010. ISSN 1573-7225. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431935> >.
- 48 ZHANG, X. et al. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 565-76, Aug 2005. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16083713> >.
- 49 SANSBURY, L. B. et al. COX-2 polymorphism, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and risk of colon cancer in African Americans (United States). **Cancer Causes Control**, v. 17, n. 3, p. 257-66, Apr 2006. ISSN 0957-5243. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489533> >.

- 50 MOORE, A. E.; YOUNG, L. E.; DIXON, D. A. A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. **Oncogene**, v. 31, n. 12, p. 1592-8, Mar 2012. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822307> >.
- 51 KIM, J. G. et al. Prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) 8473T>C polymorphism associated with prognosis for patients with colorectal cancer treated with capecitabine and oxaliplatin. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 64, n. 5, p. 953-60, Oct 2009. ISSN 1432-0843. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19219602> >.
- 52 SIEMES, C. et al. Protective effect of NSAIDs on cancer and influence of COX-2 C(-765G) genotype. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 8, p. 753-64, Dec 2008. ISSN 1873-5576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075598> >.
- 53 ANDERSEN, V. et al. Interactions between diet, lifestyle and IL10, IL1B, and PTGS2/COX-2 gene polymorphisms in relation to risk of colorectal cancer in a prospective Danish case-cohort study. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78366, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24194923> >.
- 54 KOSAKA, T. et al. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. **Eur J Biochem**, v. 221, n. 3, p. 889-97, May 1994. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8181472> >.
- 55 LUKIW, W. J. et al. Budesonide epimer R or dexamethasone selectively inhibit platelet-activating factor-induced or interleukin 1beta-induced DNA binding activity of cis-acting transcription factors and cyclooxygenase-2 gene expression in human epidermal keratinocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 7, p. 3914-9, Mar 1998.

ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520467> >.

- 56 RAMSAY, R. G.; BARTON, A. L.; GONDA, T. J. Targeting c-Myb expression in human disease. **Expert Opin Ther Targets**, v. 7, n. 2, p. 235-48, Apr 2003. ISSN 1744-7631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12667100> >.
- 57 TAN, W. et al. Associations of functional polymorphisms in cyclooxygenase-2 and platelet 12-lipoxygenase with risk of occurrence and advanced disease status of colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 6, p. 1197-201, Jun 2007. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17151091> >.
- 58 DONG, J. et al. Potentially functional COX-2-1195G>A polymorphism increases the risk of digestive system cancers: a meta-analysis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 25, n. 6, p. 1042-50, Jun 2010. ISSN 1440-1746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594217> >.
- 59 SIEZEN, C. L. et al. Polymorphisms in the genes involved in the arachidonic acid-pathway, fish consumption and the risk of colorectal cancer. **Int J Cancer**, v. 119, n. 2, p. 297-303, Jul 2006. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16482563> >.
- 60 VOGEL, L. K. et al. Intestinal PTGS2 mRNA levels, PTGS2 gene polymorphisms, and colorectal carcinogenesis. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105254, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25166592> >.
- 61 SHAW, G.; KAMEN, R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. **Cell**, v. 46, n. 5, p. 659-67, Aug 1986. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3488815> >.

- ⁶² DIXON, D. A. et al. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. **J Biol Chem**, v. 275, n. 16, p. 11750-7, Apr 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766797> >.
- ⁶³ LANGSENLEHNER, U. et al. The cyclooxygenase-2 (PTGS2) 8473T>C polymorphism is associated with breast cancer risk. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 4, p. 1392-4, Feb 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489098> >.
- ⁶⁴ COK, S. J.; MORRISON, A. R. The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. **J Biol Chem**, v. 276, n. 25, p. 23179-85, Jun 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294846> >.
- ⁶⁵ LURJE, G. et al. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 23, p. 7884-95, Dec 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19047118> >.
- ⁶⁶ PEREIRA, C.; MEDEIROS, R. M.; DINIS-RIBEIRO, M. J. Cyclooxygenase polymorphisms in gastric and colorectal carcinogenesis: are conclusive results available? **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 21, n. 1, p. 76-91, Jan 2009. ISSN 1473-5687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060633> >.
- ⁶⁷ YOUNG, L. E.; DIXON, D. A. Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase 2 Expression in Colorectal Cancer. **Curr Colorectal Cancer Rep**, v. 6, n. 2, p. 60-67, Apr 2010. ISSN 1556-3790. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20577575> >.

- 68 EBERHART, C. E. et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology**, v. 107, n. 4, p. 1183-8, Oct 1994. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926468> >.
- 69 CHAPPLE, K. S. et al. Localization of cyclooxygenase-2 in human sporadic colorectal adenomas. **Am J Pathol**, v. 156, n. 2, p. 545-53, Feb 2000. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666384> >.
- 70 KIM, N. K. et al. The combination of nuclear factor kappa B, cyclo-oxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression predicts poor prognosis in stage II and III colorectal cancer. **Anticancer Res**, v. 34, n. 11, p. 6451-7, Nov 2014. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368245> >.
- 71 SOUMAORO, L. T. et al. Coexpression of VEGF-C and Cox-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis. **Dis Colon Rectum**, v. 49, n. 3, p. 392-8, Mar 2006. ISSN 0012-3706. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474989> >.
- 72 LIM, S. C. et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 expression and nuclear p53 accumulation in patients with colorectal cancer. **J Surg Oncol**, v. 97, n. 1, p. 51-6, Jan 2008. ISSN 0022-4790. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17929263> >.
- 73 WILLIAMS, C. S. et al. Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. **Gastroenterology**, v. 111, n. 4, p. 1134-40, Oct 1996. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8831610> >.
- 74 CHULADA, P. C. et al. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. **Cancer Res**, v. 60, n. 17, p. 4705-8, Sep 2000.

ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987272> >.

- ⁷⁵ KELLER, J. J. et al. Molecular analysis of sulindac-resistant adenomas in familial adenomatous polyposis. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 12, p. 4000-7, Dec 2001. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751493> >.
- ⁷⁶ KHAN, K. N. et al. Enhanced cyclooxygenase-2 expression in sporadic and familial adenomatous polyposis of the human colon. **Scand J Gastroenterol**, v. 36, n. 8, p. 865-9, Aug 2001. ISSN 0036-5521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11495083> >.
- ⁷⁷ HAO, X. et al. Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. **J Pathol**, v. 187, n. 3, p. 295-301, Feb 1999. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398082> >.
- ⁷⁸ BALBINOTTI, R. A. et al. hMLH1, hMSH2 and cyclooxygenase-2 (cox-2) in sporadic colorectal polyps. **Anticancer Res**, v. 27, n. 6C, p. 4465-71, 2007 Nov-Dec 2007. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18214062> >.
- ⁷⁹ MARNETT, L. J.; DUBOIS, R. N. COX-2: a target for colon cancer prevention. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 42, p. 55-80, 2002. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807164> >.
- ⁸⁰ JACOBY, R. F. et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. **Cancer Res**, v. 60, n. 18, p. 5040-4, Sep 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11016626> >.

- 81 STEINBACH, G. et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. **N Engl J Med**, v. 342, n. 26, p. 1946-52, Jun 2000. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874062> >.
- 82 DUBOIS, R. N.; SMALLEY, W. E. Cyclooxygenase, NSAIDs, and colorectal cancer. **J Gastroenterol**, v. 31, n. 6, p. 898-906, Dec 1996. ISSN 0944-1174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027660> >.
- 83 FLOSSMANN, E.; ROTHWELL, P. M.; TRIAL, B. D. A. T. A. T. U.-T. A. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. **Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1603-13, May 2007. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499602> >.
- 84 GIARDIELLO, F. M. et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. **N Engl J Med**, v. 328, n. 18, p. 1313-6, May 1993. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8385741> >.
- 85 PIAZUELO, E.; LANAS, A. NSAIDS and gastrointestinal cancer. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 120, p. 91-6, Jul 2015. ISSN 1098-8823. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26093284> >.
- 86 ADEGBOYEGA, P. A. et al. Subepithelial myofibroblasts express cyclooxygenase-2 in colorectal tubular adenomas. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 17, p. 5870-9, Sep 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355919> >.
- 87 MAEKAWA, M. et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. **Jpn J Clin Oncol**,

- v. 28, n. 7, p. 421-6, Jul 1998. ISSN 0368-2811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9739782> >.
- ⁸⁸ ELDER, D. J. et al. Human colorectal adenomas demonstrate a size-dependent increase in epithelial cyclooxygenase-2 expression. **J Pathol**, v. 198, n. 4, p. 428-34, Dec 2002. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12434411> >.
- ⁸⁹ GUBA, M. et al. Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer. **Int J Colorectal Dis**, v. 19, n. 6, p. 510-7, Nov 2004. ISSN 0179-1958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999511> >.
- ⁹⁰ EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. **Mol Biol Evol**, v. 12, n. 5, p. 921-7, Sep 1995. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7476138> >.
- ⁹¹ LAKE, S. L. et al. Estimation and tests of haplotype-environment interaction when linkage phase is ambiguous. **Hum Hered**, v. 55, n. 1, p. 56-65, 2003. ISSN 0001-5652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12890927> >.
- ⁹² COX, D. R. Regression models and life-tables. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, p. 187-220. , 1972.
- ⁹³ CHOENFELD, D. **Partial residuals for the proportional hazards regression model**: Biometrika. 69: 239-241 p. 1982.
- ⁹⁴ RUBIN, D. B. **Multiple imputation after 18+ years (with discussion)**. Journal of the American Statistical Society. 91: 473-489 p. 1996.

- 95 PIRANDA, D. N. et al. Polymorphisms in regulatory regions of cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in Brazilians: a case-control study. **BMC Cancer**, v. 10, p. 613, 2010. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21059239> >.
- 96 PIMENTA, C. A. et al. Study of the polymorphisms of cyclooxygenase-2 (-765G>C) and 5-lipoxygenase (1708G>A) in patients with colorectal cancer. **Oncol Lett**, v. 7, n. 2, p. 513-518, Feb 2014. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24396479> >.
- 97 CAMPANHOLO, V. M. D. L. P. et al. **O polimorfismo -765 G>C do gene COX-2 e o risco de câncer gástrico na população Brasileira**. São Paulo: Arq. Gastroenterol. V. 51 2014.
- 98 XU, J. et al. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? **Hum Genet**, v. 111, n. 6, p. 573-4, Dec 2002. ISSN 0340-6717. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516594> >.
- 99 BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 10, p. 781-91, Oct 2006. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983374> >.
- 100 NEMATİ, K. et al. Interleukin-17FT7488 allele is associated with a decreased risk of colorectal cancer and tumor progression. **Gene**, v. 561, n. 1, p. 88-94, Apr 2015. ISSN 1879-0038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25680555> >.
- 101 PEREIRA, C. et al. The -1195G allele increases the transcriptional activity of cyclooxygenase-2 gene (COX-2) in colon cancer cell lines. **Mol Carcinog**, v. 53

- Suppl 1, p. E92-5, Feb 2014. ISSN 1098-2744. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23776069> >.
- ¹⁰² HOFF, J. H. et al. COX-2 polymorphisms -765G-->C and -1195A-->G and colorectal cancer risk. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 36, p. 4561-5, Sep 2009. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19777615> >.
- ¹⁰³ LI, S. et al. Polymorphisms in arachidonic acid metabolism-related genes and the risk and prognosis of colorectal cancer. **Fam Cancer**, v. 12, n. 4, p. 755-65, Dec 2013. ISSN 1573-7292. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23715757> >.
- ¹⁰⁴ ANDERSEN, V. et al. Polymorphisms in the xenobiotic transporter Multidrug Resistance 1 (MDR1) and interaction with meat intake in relation to risk of colorectal cancer in a Danish prospective case-cohort study. **BMC Cancer**, v. 9, p. 407, 2009. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19930591> >.
- ¹⁰⁵ WANG, J. et al. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer: a meta-analysis. **Yonsei Med J**, v. 54, n. 6, p. 1353-61, Nov 2013. ISSN 1976-2437. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24142638> >.
- ¹⁰⁶ PENG, Q. et al. Meta-analysis of the association between COX-2 polymorphisms and risk of colorectal cancer based on case-control studies. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94790, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24733273> >.
- ¹⁰⁷ SHOMAF, M. et al. Cyclooxygenase-2 (COX2) gene polymorphisms and the risk of sporadic colorectal cancer and polyps among Jordanian population. **Turk J Gastroenterol**, v. 26, n. 2, p. 154-8, Mar 2015. ISSN 2148-5607. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25835114> >.

- 108 UEDA, N. et al. Genetic polymorphisms of cyclooxygenase-2 and colorectal adenoma risk: the Self Defense Forces Health Study. **Cancer Sci**, v. 99, n. 3, p. 576-81, Mar 2008. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18167131> >.
- 109 PEREIRA, C. et al. Genetic variability in key genes in prostaglandin E2 pathway (COX-2, HPGD, ABCC4 and SLCO2A1) and their involvement in colorectal cancer development. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e92000, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24694755> >.
- 110 LIU, F. et al. Genetic variants in cyclooxygenase-2: Expression and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population. **Gastroenterology**, v. 130, n. 7, p. 1975-84, Jun 2006. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16762620> >.
- 111 COX, D. G. et al. Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. **Br J Cancer**, v. 91, n. 2, p. 339-43, Jul 2004. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173859> >.
- 112 GONG, Z. et al. Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 genes and risk of colorectal adenoma. **Int J Colorectal Dis**, v. 24, n. 6, p. 647-54, Jun 2009. ISSN 1432-1262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19205707> >.
- 113 ZHU, W. et al. -765G>C and 8473T>C polymorphisms of COX-2 and cancer risk: a meta-analysis based on 33 case-control studies. **Mol Biol Rep**, v. 37, n. 1, p. 277-88, Jan 2010. ISSN 1573-4978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19669667> >.

- 114 DONG, G. et al. Potentially functional genetic variants in KDR gene as prognostic markers in patients with resected colorectal cancer. **Cancer Sci**, v. 103, n. 3, p. 561-8, Mar 2012. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22182247> >.
- 115 HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12a. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- 116 AKAGI, Y. et al. Prognostic impact of lymphatic invasion of colorectal cancer: a single-center analysis of 1,616 patients over 24 years. **Anticancer Res**, v. 33, n. 7, p. 2965-70, Jul 2013. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23780987> >.
- 117 E., S. G. F. et al. **Correlação de fatores anatomopatológicos com a sobrevida de pacientes operados por adenocarcinoma colorretal**. Rio de Janeiro: REV. COL. BRAS. CIR. V.35: 240-245 p. 2008.
- 118 HOLMES, M. D. et al. COX-2 expression predicts worse breast cancer prognosis and does not modify the association with aspirin. **Breast Cancer Res Treat**, v. 130, n. 2, p. 657-62, Nov 2011. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21728052> >.
- 119 ELZAGHEID, A. et al. High cyclooxygenase-2 expression is associated with advanced stages in colorectal cancer. **Anticancer Res**, v. 33, n. 8, p. 3137-43, Aug 2013. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23898071> >.
- 120 LURJE, G. et al. COX-2 mRNA expression is significantly increased in acid-exposed compared to nonexposed squamous epithelium in gastroesophageal reflux disease. **J Gastrointest Surg**, v. 11, n. 9, p. 1105-11, Sep 2007. ISSN 1091-255X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17619937> >.

- ¹²¹ LIU, L. et al. Prognostic value of cyclooxygenase-2 gene polymorphisms in advanced non-small cell lung cancer patients treated with first-line platinum-based chemotherapy. **Asia Pac J Clin Oncol**, Aug 2014. ISSN 1743-7563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25131817> >.
- ¹²² CHAITEERAKIJ, R. et al. Association between variants in inflammation and cancer-associated genes and risk and survival of cholangiocarcinoma. **Cancer Med**, v. 4, n. 10, p. 1599-602, Oct 2015. ISSN 2045-7634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26276523> >.

ANEXOS

8. ANEXOS

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

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0803/11

Título: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES CICLOOXIGENASE-2 (COX-2) E FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF) NO CÂNCER COLORRETAL

Pesquisador Responsável: Ulysses Ribeiro Junior

Pesquisador Executante: Michele Tatiana Pereira Tomitão

Co-autores: Michele Tatiana Pereira Tomitão, Márcia Saldanha Kubrusly, Guilherme Cutait Cotti, Sérgio Carlos Nahas, Venâncio A.F. Alves, Luís Carneiro D'Albuquerque, Ivan Ceconello

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: GASTROENTEROLOGIA

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 18/11/2011, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 18 de Novembro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

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 ☒ F ☒
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 ☒ F ☒
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	☒	<u>RISCO MÍNIMO</u>	☒	RISCO MÉDIO	☒
RISCO BAIXO	☒	RISCO MAIOR	☒		

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência 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 reavalado, para que se possa assegurar sua privacidade e de seus familiares. Não será realizado nenhum tipo de procedimento experimental no paciente.
- 3. Desconfortos e riscos esperados** – O desconforto 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 procedimento 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 procedimentos, 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

Dr. Ulysses Ribeiro Jr.

Prof. Dr. Desidério Kiss

Dr. Osmar Kenji Yagi

Prof. Dr. Venâncio A.F. Alves

Dr. Marcelo Eidi Nita

Prof. Dr. José Eduardo Krieger

Dr. Rodrigo Perez

Prof. Dr. José Hypólito da Silva

Gladis Wilner

Uana Maria Miguel Jorge

Helena Scavone Paschoale

Katia Adriana Tessima Franco

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)

ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO GRUPO CONTROLE.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

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

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☒ F ☒
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 ☒ F ☒
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	☒	<u>RISCO MÍNIMO</u>	☒	RISCO MÉDIO	☒
RISCO BAIXO	☒	RISCO MAIOR	☒		

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência 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 obter um maior conhecimento clínico e científico sobre o câncer, em especial do câncer colorretal. Através desta pesquisa, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores), pretende-se entender com maior precisão os mecanismos desta doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Além disto, este trabalho envolve a descoberta de novos genes e de alterações genéticas ainda não identificadas. Para realizar este estudo é indispensável a comparação entre pacientes com câncer e indivíduos ou pacientes sem esta doença.
2. **Procedimento que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que serão experimentais** – Você está sendo convidado (a) a colaborar com este estudo, autorizando a coleta de uma pequena amostra de sangue para pesquisa científica. Todo este material será identificado através de números, e o nome dos pacientes não serão revelados, assegurando assim sua privacidade e de seus familiares. Não será realizado nenhum tipo de procedimento experimental no paciente. O uso desse material não implicará riscos adicionais nem exigirá que se submeta a qualquer procedimento adicional para o participante.
3. **Desconfortos e riscos esperados** – O desconforto e o risco deste procedimento estão diretamente associados à coleta da amostra de 5 ml de sangue periférico. Em geral o desconforto e os riscos são mínimos. Poderá ocorrer dor, hematoma ou inflamação no local de punção para coleta de sangue. Tais complicações exigem apenas cuidados locais com excelentes resultados em curto prazo de tempo.
4. **Benefícios que poderão ser obtidos** – Acredita-se que, entendendo melhor o câncer e as alterações genéticas envolvidas, os médicos poderão ter condições de fazer a prevenção, 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 procedimento 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 procedimentos, 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 as 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	Dr. Ulysses Ribeiro Jr.
Prof. Dr. Desidério Kiss	Dr. Osmar Kenji Yagi
Prof. Dr. Venâncio A.F. Alves	Dr. Marcelo Eidi Nita
Prof. Dr. José Eduardo Krieger	Dr. Rodrigo Perez
Prof. Dr. José Hypólito da Silva	Gladis Mosseri
Uana Miguel Jorge	Dárcio Matenhauer Lehrbach
Katia Adriana Tessima Franco	Maria Fernanda Pimentel de Carvalho

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 3082 8832

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

Dr. Rodrigo Perez – Residente Responsável: BIP 6847-5000 cód. 1007465

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 20__.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)