Evelise Pelegrinelli Zaidan

Análise de polimorfismos das enzimas ciclooxigenase-2 e metilenotetrahidrofolato redutase em pacientes com câncer do esôfago

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

Evelise Pelegrinelli Zaidan

Análise de polimorfismos das enzimas ciclooxigenase-2 e metilenotetrahidrofolato redutase em pacientes com câncer do esôfago

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

Zaidan, Evelise Pelegrinelli

Análise de polimorfismos das enzimas ciclooxigenase-2 e metilenotetrahidrofolato redutase em pacientes com câncer do esôfago / Evelise Pelegrinelli Zaidan. -- 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 esofágicas 2.Adenocarcinoma 3.Carcinoma de células escamosas 4.Polimorfismo genético 5.Polimorfismo de nucleotídeo único 6.Ciclo-oxigenase 2 7.Metilenotetra-hidrofolato redutase (NADPH2)

USP/FM/DBD-470/15

Aos meus
queridos pais José Neves Pelegrinelli e Vilma Queiroz Pelegrinelli pelo amor e incentivo ao estudo.

Às minhas
amadas avós Feleda Nietzsche e Yolanda Pelegrinelli Neves (*in memorian*) e ao meu amado avô Sebastião Chagas Neves (*in memorian*) por me ensinarem o amor incondicional**.**

Ao meu
amado marido Ricardo Deslandes Zaidan pelo incentivo e por todo o apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior, verdadeiro mestre na área acadêmica, na área profissional e pessoal, modelo de caráter, ética e disciplina. Meus eternos agradecimentos pelo incentivo, apoio e pela presença constante em todos os momentos de desafios.

Ao Professor Titular Dr. Ivan Cecconello, pelo apoio, incentivo e competência.

Ao Prof. Dr. Eleazar Chaib, pelo incentivo.

Aos pacientes, pela colaboração fundamental nesta pesquisa.

Às minhas amigas Srta. Michele Tatiana Tomitão e Srta. Priscila Caproni, pelos ensinamentos e ajuda em todas as etapas deste trabalho.

Ao Sr. Márcio Augusto Diniz, mente brilhante, o qual sem o conhecimento e a sua dedicação este trabalho não seria possível.

A Sra. Márcia Saldanha Kubrusly, sempre dedicada e prestativa.

Aos Professores Dr. Rubens Antônio Aissar Sallum e Dr. Marco Aurélio Santo que sempre acreditaram em mim e me receberam com muito carinho desde os primeiros dias de HC.

A Sra. Myrtes Freire de Lima pela amizade e incentivo.

A Srta. Vilma Libério, sempre prestativa.

A Srta. Marina Alessandra Pereira, pelo incentivo, ajuda e dedicação.

Aos colegas de Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, pela amizade, auxílio e incentivo.

Ao Marcos Antonio Retzer (*in memorian*) sempre alegre e prestativo.

À FAPESP, pelo auxílio concedido.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

(1867 – 1934)

SUMÁRIO

Lista de Siglas e Abreviaturas
Lista de Tabelas
Lista de Figuras
Resumo
Abstract
1. INTRODUÇÃO……..……..……1
1.1. O Câncer de Esôfago……..……..……2
1.2. Classificação clinicopatológica do câncer de esôfago.....3
1.3. Estadiamento do Câncer do esôfago da AJCC/UICC.....3
1.4. Fatores de Risco para o câncer de esôfago.....4
1.5. A inflamação crônica e o câncer de esôfago.....5
1.6. A deficiência de folato e o câncer de esôfago.....6
1.7 Polimorfismos Genéticos.....6
1.8. Equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação (DL).....8
1.9. Polimorfismos do Gene da enzima Ciclooxigenase-2.....9
1.10. Polimorfismos do Gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase.15
1.11. Justificativa.....19
2. OBJETIVOS.....21
2.1 Objetivo principal.....22
2.2 Objetivos secundários.....22
3. MÉTODOS.....23
3.1 Critérios de Inclusão.....26
3.2 Critérios de Exclusão.....26
3.3 Coleta de sangue e armazenamento.....28
3.4 Extração e Purificação de DNA Genômico.....28
3.5 Seleção dos SNPs (*single nucleotide polimorphisms*).....29
3.6 Genotipagem por TaqMan ® SNP *Genotyping Assays*.....31
3.7 Análise Estatística.....,.....34
3.8. Considerações Éticas.....35
4. RESULTADOS.....36
4.1. Dados Demográficos analisados nos grupos Caso e Controle.....37
4.2. Dados Clínico-patológicos analisados no grupo de pacientes com câncer de esôfago.....40
4.3. Avaliação da Frequência dos Genótipos entre Caso e Controle.....41
4.4. Distribuição da frequência dos polimorfismos entre casos e controles.....42
4.5. Análise dos Haplótipos entre Caso e Controle.....49
4.5.1. Haplótipos dos polimorfismos do *MTHFR*.....48
4.5.2. Haplótipos dos polimorfismos do *COX-2*.....49

4.6. A frequência dos blocos de haplótipos e a suscetibilidade ao câncer de esôfago.....49
4.7. Associação entre os polimorfismos e variáveis demográficas e anatomopatológicas 52
4.7.1 Polimorfismo *MTHFR* 677C>T.....52
4.7.2. Polimorfismo *MTHFR* 1298A>C.....52
4.7.3. Polimorfismo COX-2+8437T>C.....53
4.7.4. Polimorfismo COX-2-1195A>G.....53
4.8. Análise da Sobrevida Global.....54
5. DISCUSSÃO.....59
5.1. Dados Demográficos analisados nos grupos Caso e Controle.....59
5.2. Seleção do Método de Genotipagem.....62
5.3. Distribuição da frequência dos polimorfismos entre casos e controles.....62
5.4. Os Polimorfismos do Gene da Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR).....64
5.5. Os Polimorfismos do Gene da Enzima Ciclooxigenase-2 (COX-2).....69
5.6. Limitações deste Estudo.....73
6. CONCLUSÃO.....75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....77
ANEXOS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenina
ADENO	Adenocarcinoma
C	Citosina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEC	Carcinoma Epidermóide de Células Escamosas
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRGE	Doença do Refluxo Gastresofágico
dTMP	Desoxitimidilato
dUMP	Desoxiuridilato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
G	Guanina
g	Grama
HPV	Vírus do papiloma humano
mL	Mililitros
mRNA	RNA mensageiro
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato Redutase
MTR	Metionina Sintase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
	(Centro Nacional de Informação em Biotecnologia)
NF-kB	Fator Nuclear – kB
PAX6	Proteína box pareado 6

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PG	Prostaglandinas
PGES	Prostaglandina sintase.
PL	Fosfolipases
PTGIS	Prostaciclina sintase
RFLP	Polimorfismos no Comprimento de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucleico
SAH	S-adenosil homocisteína
SAM	S-adenosil metionina
SHMT	Hidroximetiltransferase
Sp1	Proteína Estimulatória 1
T	Timina
TFIID	Fator de transcrição IID
THF	5,10-metileno-tetra-hidrofolato
TS	Timidilato Sintase
TX	Tromboxanos
UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
UV	ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitros

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doença ou Condição que Exclui o Paciente do Grupo Controle. Projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP 2001.....27

Tabela 2. Características dos polimorfismos selecionados.....30

Tabela 3: Ensaios *TaqMan* ® utilizados para a detecção dos polimorfismos dos genes COX-2 e MTHFR.....32

Tabela 4. Distribuição da população de estudo (casos e controles) segundo idade, sexo, etnia, etilismo e tabagismo. HC-FMUSP, 2001-2008.....39

Tabela 5. Distribuição dos casos em relação ao Tipo Histológico do Tumor e ao Estádio pTNM. HC-FMUSP, 2001-2008.....40

Tabela 7. Valores de *p* dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg.....41

Tabela 8. Distribuição das frequências genotípicas entre casos e controles....42

Tabela 9. Distribuição das frequências genotípicas comparando os Genótipos Selvagens e Polimórficos. Modelo Dominante.....43

Tabela 10: Razões de chances para o Câncer do esôfago de acordo com os genótipos.....44

Tabela 11. Razões de chances para o Câncer do esôfago de acordo com os genótipos. Regressão Logística Múltipla.....45

Tabela 12. Razões de chances para o Câncer do esôfago entre Casos e Controles comparando os Genótipos Selvagens e Polimórficos. Modelo Dominante.....47

Tabela 13. Razões de chances para o Câncer do esôfago entre Casos e Controles comparando os Genótipos Selvagens e Polimórficos. Regressão Logística Múltipla. Modelo Dominante.....48

Tabela 14. Distribuição da frequência dos haplótipos dos polimorfismos *MTHFR* 677C>T e *MTHFR* 1298A>C entre casos e controles.....50

Tabela 15. Distribuição da frequência dos haplótipos dos polimorfismos *COX-2+8437T>C* e *COX-2-1195A>G* entre casos e controles.....50

Tabela 16. Razões de chances para o Câncer do esôfago entre Casos e Controles comparando os Blocos de Haplótipos. Regressão Logística Simples.....51

Tabela 17. Razões de chances para o Câncer do esôfago entre Casos e Controles comparando os Blocos de Haplótipos. Regressão Logística Múltipla.....51
Tabela 18. Distribuição das frequências genotípicas em relação às variáveis demográficas e clinico-patológicas.....53
Tabela 19. Distribuição das frequências genotípicas em relação às variáveis demográficas e clinico-patológicas. Modelo Dominante.....53
Tabela 20. Razão de Risco de Óbito em relação aos Genótipos.....55
Tabela 21. Razão de Risco de Óbito em relação aos Genótipos. Regressão logística múltipla ajustada pelas variáveis sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo.....56
Tabela 22. Razão de Risco de Óbito em relação aos blocos de haplótipos.....57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado da cadeia do ácido aracdônico. Expressão da enzima COX-2 no citoplasma em resposta ao estímulo inflamatório.....10

Figura 2. Regulação da expressão da COX-2 no câncer.....12

Figura 3. Esquema simplificado do metabolismo do folato envolvendo a enzima MTHFR.....15

Figura 4. Dois possíveis mecanismos pelos quais a alteração da metilação pode levar ao câncer.....17

Figura 5. Esquema gráfico do ensaio de genotipagem por sondas TaqMan®.32

Figura 6. Resultados obtidos da Genotipagem por TaqMan.....33

Figura 7. Distribuição da população de estudo (casos e controles) segundo variáveis (A) etilismo e (B) tabagismo.....39

Figura 8. Frequência genotípica do polimorfismo *COX-2*+8437T>C entre os casos e controles. (A) Modelo genótipo (B) Modelo dominante.....44

Figura 9. Representação dos blocos de haplótipos dos polimorfismos do *MTHFR* na amostra total de casos e controles.....49

Figura 10. Representação dos blocos de haplótipos dos polimorfismos do *COX-2* na amostra total de casos e controles.....,.....49

Figura 11. Curva de Sobrevida de Kaplan-Meier dos indivíduos com câncer de esôfago, grupo de casos (n=109).....54

Figura 12. Curva de Sobrevida de Kaplan-Meier comparando o estádio pTNM (n=103).....55

Figura 13. Curva de Sobrevida de Kaplan-Meier comparando os genótipos do polimorfismo *MTHFR* 677C>T. (n=109).....58

Resumo

Zaidan EP. Análise de polimorfismos das enzimas ciclooxigenase-2 e metilenotetrahidrofolato redutase em pacientes com câncer do esôfago **[Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.**

Introdução: O estudo de polimorfismos genéticos pode permitir maior conhecimento sobre os fatores de risco, progressão e susceptibilidade ao câncer do esôfago. A enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) é induzida em resposta ao fator de crescimento e citocinas, sendo expressa nas doenças inflamatórias, lesões pré-malignas e tumores de esôfago. O produto do metabolismo do folato, pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), atua na síntese do DNA. A alteração ou a inibição da atividade desta enzima aumenta a suscetibilidade a mutações, danos e metilação aberrante do DNA, o que altera a expressão gênica de supressores de tumor e proto-oncogenes, potenciais fatores de risco para o câncer de esôfago.
Objetivo: Investigar a frequência dos polimorfismos COX-2 (-1195A>G e 8473T>C) e MTHFR (677C>T e 1298C>A) em pacientes com câncer de esôfago, verificar as associações entre a frequência desses polimorfismos com a susceptibilidade à esta doença e aos fatores clínicos, epidemiológicos e patológicos.
Metodologia: Inclui-se cento e nove pacientes com o diagnóstico de câncer de esôfago, submetidos à esofagectomia. Cento e dois indivíduos, pareados quanto ao sexo e idade, sem histórico individual ou familial de câncer, constituem o grupo controle. O DNA genômico foi isolado do creme leucocitário de sangue periférico e a genotipagem foi realizada através dos kits *TaqMan ® SNP Genotyping Assays*, seguida da amplificação pela reação em cadeia da polimerase e análise em tempo real (RT-PCR). Os resultados dos polimorfismos encontrados foram associados aos dados epidemiológicos e clinicopatológicos destes pacientes. Utilizou-se a regressão logística para avaliar as associações entre os polimorfismos e o risco de desenvolver o câncer de esôfago, com intervalos de confiança de 95%.
Resultados: A presença do alelo COX-2+8437C (p=0,016) e dos haplótipos *COX-2*1195A/*COX2*843C (p=0,002) e *COX-2*1195G/*COX2*8437T (p=0,01) indicaram associação com a doença. Os indivíduos com câncer do esôfago portadores do polimorfismo MTHFR 677TT apresentaram maior risco de óbito pela doença (p = 0,045).
Conclusão: A presença do alelo COX-2+8437C e dos haplótipos *COX-2*1195A/*COX2*843C e *COX-2*1195G/*COX2*8437T associaram-se ao câncer de esôfago. O genótipo homozigoto polimórfico *MTHFR*677TT está relacionado ao pior prognóstico em pacientes com câncer de esôfago.

Descritores: neoplasias esofágicas; adenocarcinoma; carcinoma de células escamosas; polimorfismo genético; polimorfismo de nucleotídeo único; ciclo-oxigenase 2; metilenotetra-hidrofolato redutase(NADPH2).

Abstract

Zaidan EP. Analysis of the cyclooxygenase-2 and methylenetetrahydrofolate reductase genes polymorphisms in esophageal cancer **[Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.**

Introduction: The study of genetic polymorphisms may allow better understanding of the risk factors, progression and susceptibility to cancer of the esophagus. The cyclooxygenase-2 enzyme (COX-2) is induced in response to growth factors and cytokines and is expressed in inflammatory diseases, pre-malignant and esophageal tumors. The product of folate metabolism, the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), engaged in DNA synthesis. Changing or inhibiting the activity of this enzyme increases the susceptibility to mutations, damage and aberrant DNA methylation, which alters gene expression of tumor suppressors and proto-oncogenes, potential risk factors for esophageal cancer.
Objective: To investigate the frequency of COX-2 (-1195A> G and 8473T> C) and MTHFR (677C> T and 1298C> A) polymorphisms in patients with esophageal cancer, verify the associations between the frequency of these polymorphisms with susceptibility to this disease and clinical, epidemiological and pathological factors.
Methodology: This study includes up one hundred nine patients diagnosed with esophageal cancer who underwent esophagectomy. One hundred and two individuals, matched for sex and age, no individual or familial history of cancer, constitute the control group. Genomic DNA was isolated from the peripheral blood buffy coat and genotyping was performed using the TaqMan ® SNP Genotyping Assays kits, followed by amplification by polymerase chain reaction and real-time analysis (RT-PCR). The results of found polymorphisms were associated with epidemiological and clinicopathological these patients. Logistic regression was used to assess associations between polymorphisms and the risk of developing esophageal cancer, with 95% confidence intervals.
Results: The presence of COX-2 + 8437C allele (p = 0.016) and haplotypes COX-21195A / COX2843C (p = 0.002) and COX-21195G / COX28437T (p = 0.01) indicated association with the disease. Individuals with esophageal cancer carrying the MTHFR 677TT polymorphism had higher risk of death from the disease (p = 0.045).
Conclusion: The presence of COX-2+8437C allele and haplotype COX-21195A/ COX2843C and COX-21195G/COX28437T was associated with esophageal cancer. The polymorphic homozygous genotype MTHFR677TT is related to worse prognosis in patients with esophageal cancer.

Descriptors: esophageal neoplasms; adenocarcinoma; carcinoma, squamous cell; polymorphism, genetic; polymorphism, single nucleotide; cyclooxigenase 2; methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH2).

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de mortalidade em todo o mundo. No ano de 2012 foram registrados 14 milhões de casos e 8,2 milhões de mortes. (BRAY et al. 2012; FERLAY et al. 2014).

No Brasil estima-se 576 mil casos novos de câncer para o ano de 2015, o mais incidente será o câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos), seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Os tipos mais incidentes em homens serão: próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide. (INCA, 2014).

Para o ano de 2030 estima-se cerca de 21 milhões de casos novos e 13 milhões de mortes por câncer, isto se deve ao crescimento e ao envelhecimento da população, a redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento. (INCA, 2014).

1.1 O Câncer do Esôfago

O câncer do esôfago corresponde à oitava causa de câncer no mundo (FERLAY et al, 2014) e afeta mais de 450 mil pessoas a cada ano. Para 2014, estimava-se 323 mil casos novos em homens e 132 mil em mulheres, desta maneira, a taxa de incidência no mundo em homens é mais do que o dobro da incidência em mulheres (homens:mulheres razão 2,4:1). (BRAY et al, 2013; FERLAY et al, 2014; INCA, 2014).

É a sexta causa de câncer mais incidente no Brasil em homens, no ano de 2014 foram 8.010 casos novos e 2.770 em mulheres, um risco estimado de

8,18 casos novos a cada 100 mil homens e 2,70 a cada 100 mil mulheres. (FERLAY, 2014; INCA, 2014).

A sobrevida em cinco anos é baixa, geralmente inferior a 10%, (BRAY et al, 2013; FERLAY et al, 2014) enquanto que a taxa de mortalidade no mundo é muito próxima da incidência, em razão de sua alta letalidade (0,88). (BRAY et al, 2013; FERLAY et al, 2014; INCA, 2014). A metástase linfonodal, seguida pela sua rápida progressão explica o prognóstico ruim desta doença. (CHENG et al, 2014)

1.2. Classificação clinicopatológica do câncer do esôfago

O câncer do esôfago divide-se em dois principais tipos histológicos: carcinomas de células escamosas (CEC) e adenocarcinomas. (INCA, 2014). Menos de 2% de todos os casos de câncer do esôfago contemplam os outros tipos. (NAPIER; SCHEERER; MISRA, 2014).

O CEC é o mais comum e ocorre mais frequentemente em homens, a partir dos 50 anos, principalmente asiáticos, acometendo mais o terço médio e inferior do esôfago. (INCA, 2014; LEWIS; SMITH, 2005; BADREDDINE; WANG, 2010).

O adenocarcinoma, originado de células glandulares, é mais incidente em algumas regiões mais desenvolvidas, como Austrália, Finlândia, França, Estados Unidos e Reino Unido, onde teve importante aumento da sua incidência na última década (LEWIS; SMITH, 2005). Acomete principalmente a região distal do esôfago (BADREDDINE; WANG, 2010).

1.3. Estádio do Câncer do esôfago da AJCC/UICC

A classificação TNM do estádio do câncer do esôfago é proposta pela *American Joint Committee on Cancer and International Union Against Cancer* (AJCC/UICC). A sétima edição deste manual, publicada em 2010, tem o

objetivo de, além do arranjo simples de ordenar o tamanho do tumor (T), acometimento linfonodal (N) e metástase à distância (M), agrupar características da doença que refletem na diminuição da sobrevida entre os diferentes estádios, diferença na sobrevida entre os grupos e sobrevida similar entre os grupos (RICE; BLACKSTONE; RUSCH, 2010; CORAL et al, 2015). (ANEXO A)

1.4. Fatores de Risco para o câncer de esôfago

Ao lado de mecanismos puramente hereditários, os hábitos de vida e o meio ambiente podem induzir ou talvez prevenir a carcinogenêse do esôfago. A neoplasia resulta de efeitos interativos adicionais aos gênicos e aos fatores ambientais, que podem variar entre as diversas regiões do mundo (WILLETT, 2001; BUTLER, 2003).

A transformação no fenótipo maligno através de ordem sequencial de mutações tem múltiplas causas que são pobremente definidas e a expressão gênica pode variar em diferentes etapas desde a mucosa normal até tumores metastáticos (WILLETT, 2001).

Alguns comportamentos podem aumentar o risco do câncer de esôfago, como a dieta pobre em folato, (LANGEVIN et al, 2009) a ingestão de alimentos em altas temperaturas, a irritação crônica da mucosa, e principalmente, o consumo de álcool e tabaco. (LEWIS; SMITH, 2005; INCA, 2014) É atribuído ao consumo de álcool e tabaco, 45% dos casos novos de câncer do esôfago em homens e 11% em mulheres (HVID-JENSEN et al; 2011).

O fumo, isoladamente, aumenta o risco de câncer do esôfago em 2 a 4 vezes, e, associado ao consumo de bebida alcoólica, possui efeito sinérgico. (LIMA, 2003; RIDDEL, 2000). A dificuldade em se observar a relação dose/resposta é devido à grande variedade do consumo e do efeito sinérgico

álcool/tabaco relacionados ao risco de câncer do esôfago. (LUBIN et al, 2012; KAERCHER et al, 2014).

Os fatores de risco relacionados ao carcinoma de células escamosas são a idade, o histórico familiar, o consumo de álcool e fumo, as infecções orais por fungos, os agentes infecciosos como o vírus do papiloma humano (HPV), a deficiência de riboflavina, o excesso do uso de vitamina A, a contaminação de produtos alimentícios por micotoxinas fumonisinas e a ingestão excessiva de erva-mate em temperaturas elevadas, comum no Sul do Brasil. (INCA, 2014).

A presença de refluxo gastroesofágico, que predispõe ao esôfago de Barrett, é considerada importante precursor do adenocarcinoma (INCA, 2014), entretanto, aproximadamente 95% dos pacientes diagnosticados com esta neoplasia não possui diagnóstico prévio de esôfago de Barrett. (BADREDDINE; WANG, 2010) Outros fatores de risco para o adenocarcinoma esofágico são a obesidade e o tabagismo. (FAHEY et al, 2015)

1.5. A inflamação crônica e o câncer de esôfago

A resposta inflamatória crônica, presente no epitélio escamoso e na mucosa do esôfago, é caracterizada pela presença constante de citocinas inflamatórias, como por exemplo, a interleucina-8 (IL-8). Condições inflamatórias crônicas participam da regulação do processo de desenvolvimento do microambiente tumoral, desde o desenvolvimento, crescimento e progressão. (KAVANAGH et al, 2014; FAHEY et al, 2015)

A esofagite está associada com risco aumentado de desenvolvimento de câncer de esôfago, há evidências de que o tecido epitelial esofágico não é danificado apenas pelo ácido proveniente do refluxo gástrico, mas também pela produção de quimiocinas e citocinas, incluindo IL-8 e IL-1B graças à exposição de células escamosas de sais de ácidos biliares, que aumentam de forma

significativa a taxa de migração dos linfócitos. Isto sugere que a secreção de citocina, por células epiteliais em resposta à exposição ao ácido, pode iniciar a resposta inflamatória, causando lesão epitelial mediada por esta resposta. (KAVANAGH et al, 2014)

1.6. A deficiência de folato e o câncer do esôfago

Folato é um termo geral utilizado para descrever compostos com atividade e estrutura semelhante ao ácido fólico, vitamina hidrossolúvel do complexo B, que também é conhecido como pteroilglutamatos, ácido pteroilglutâmico, ácido fólico, vitamina Bc, vitamina B9 ou vitamina M. Estas substâncias são precursores de derivados que atuam nas rações de transferência de carbono em seres humanos (LIMA; CATHARINO**;** GODOY; 2003).

O folato age como doador de grupos metil e formil em reações de metilação intracelular, portanto, a sua deficiência prejudica a atividade de reparo do DNA e é responsável pela metilação aberrante do DNA, através da ativação de oncogenes e inativação genes supressores de tumor, e consequentemente, contribui para a carcinogênese do esôfago. (LANGEVIN et al, 2008)

1.7 Polimorfismos Genéticos

Diferenças na sequência do DNA podem contribuir para a variação do fenótipo, influenciar nas diferenças individuais das características antropométricas, suscetibilidade a doenças e respostas ao meio ambiente. (SACHIDANANDAM, 2001). Estas variações no DNA, que são consideradas normais para a espécie humana, uma vez que nem todas as sequências de DNA codificam proteínas, são geralmente decorrentes de mutações ocorridas

em ancestrais e podem ser detectadas em qualquer célula do organismo (BROOKES, 1999).

Aproximadamente 0,1% da sequência do genoma difere entre os seres humanos e a maioria dessas diferenças, cerca de 90%, corresponde a polimorfismo, que é caracterizado pela presença de dois ou mais alelos diferentes em um determinado local cromossômico, que estão presentes na população numa frequência superior a 1% (BROOKES, 1999).

O polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) é caracterizado pela substituição de apenas um nucleotídeo, é a fonte mais comum de variação genética humana e pode contribuir para a suscetibilidade ao câncer (ZHANG et al, 2011).

A maioria dos polimorfismos não tem repercussão funcional, porém alguns são capazes de influenciar a expressão gênica: (TABOR, 2002)

SNPs em regiões promotoras ou regulatórias: Quando os SNPs ocorrem em regiões promotoras/regulatórias (5'UTR e 3'UTR) podem afetar a regulação gênica ou estabilidade do mRNA e eficiência de tradução. SNPs que ocorrem em sítios de *splicing* podem mudar o padrão de *splicing* e gerar proteínas diferentes, pois resultam na inserção, exclusão ou modificação de tamanho de exons, podendo alterar a estabilidade do mRNA ou da proteína, mas podem estar envolvidos no metabolismo de determinados alimentos ou toxinas, resposta inflamatória, interação medicamentosa, entre outros. Basicamente são classificados da seguinte forma. (TABOR; RISCH; MYERS, 2002)

SNPs em regiões codificadoras: Os SNPs em regiões codificadoras do gene (exons) podem modificar a sequência codificada, o que resulta em novo códon que codifica aminoácido diferente, e gera, portanto, proteínas com a sequência de aminoácidos alterada, neste caso, são chamados de SNPs sinônimos.

Cerca de 20% a 30% dos SNPs acarretam danos na função proteica. (TABOR; RISCH; MYERS, 2002).

Os SNPs não sinônimos não modificam a sequência codificadora, pois resulta em um novo códon que codifica o mesmo aminoácido, não havendo alteração na proteína resultante. (TABOR; RISCH; MYERS, 2002).

SNPs em sítios de *splicing:* SNPs que ocorrem em sítios de *splicing* podem mudar o padrão de *splicing* e gerar proteínas diferentes, pois resultam na inserção, exclusão ou modificação de tamanho de exons, podendo alterar a estabilidade do mRNA ou da proteína. (TABOR; RISCH; MYERS, 2002).

Os genes polimórficos podem estar envolvidos no metabolismo de determinados alimentos ou toxinas, resposta inflamatória, interação medicamentosa, entre outros. (BROOKERS, 1999)

Discrepâncias encontradas entre os resultados nos diversos estudos sugerem que a presença de outros fatores pode modular o comportamento do polimorfismo, como exposição ao álcool, tabaco, uso de drogas anti-inflamatórias, ocasionando a grande variação genética entre diferentes etnias. (CANOVA; HASHIBE; SIMONATO, 2009; LIANG et al, 2011)

1.8. Equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação (DL)

O equilíbrio de Hardy-Weinberg significa que numa população mendeliana as frequências alélicas são constantes através de gerações e, portanto, as frequências genotípicas permanecem estáveis. Ou seja, se mantidas as mesmas condições, alelos raros não se tornam cada vez mais raros, a frequência é a mesma ao passar das gerações. (TERWILLIGER; WEISS, 1998) Quando a amostra analisada se encontra neste equilíbrio, significa que é representativa desta mesma população em escala maior. (TERWILLIGER; WEISS, 1998)

Os alelos adjacentes de um mesmo *locus* no cromossomo, que são segregados em bloco com frequência maior que esperado pelo acaso, e herdados conjuntamente, são chamados de haplótipos. (TERWILLIGER; WEISS, 1998)

O desequilíbrio de Ligação (DL) pode ser definido como associação não aleatória entre alelos de diferentes loci em uma população, isto é, a diferença entre as proporções haplotípicas observadas e aquelas esperadas se os alelos segregam independentemente. Os alelos dos SNPs, que não estão em desequilíbrio de ligação, localizados em regiões próximas no cromossomo, migram juntos na divisão celular. (TERWILLIGER; WEISS, 1998)

As estimativas da frequência de arranjos haplotípicos são de interesse crescente em relação aos estudos de associação de população e doenças, já que a identificação de um alelo do SNP sempre revelará o outro que pertence ao mesmo bloco haplotípico. (SINGLE et al, 2002)

1.9. Polimorfismos do Gene da enzima Ciclooxigenase-2

As enzimas ciclooxigenases apresentam-se de três formas: a COX-1, a COX-2 e a COX-3. A primeira é expressa em muitos tecidos e participa na homeostase de várias funções fisiológicas, tais como a proteção da mucosa gástrica e regulação da agregação plaquetária. (ZHANG et al, 2005; KRINSTINSSON et al, 2009; LIANG et al, 2011)

A COX-2 é induzida em resposta a fator de crescimento e citocinas, sendo expressa em doenças inflamatórias e neoplásicas (ZHANG et al, 2005; KRINSTINSSON et al, 2009).

A COX-3 é um produto de *splicing* diferencial da COX-1 e participa do controle da dor e febre. (ZHANG et al, 2005; KRINSTINSSON et al, 2009; LIANG et al, 2011)

A COX-2 está envolvida na conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanos (KONG et al, 2012; PRINS et al, 2012) portanto, regula processos biológicos como proliferação celular, angiogênese, respostas imunológicas e inflamatórias fundamentais no processos de desenvolvimento, progressão, metástase, invasão e gênese tumoral. (ZHANG et al, 2005; KRINSTINSSON et al, 2009; DONG et al, 2010; LIANG et al, 2011)

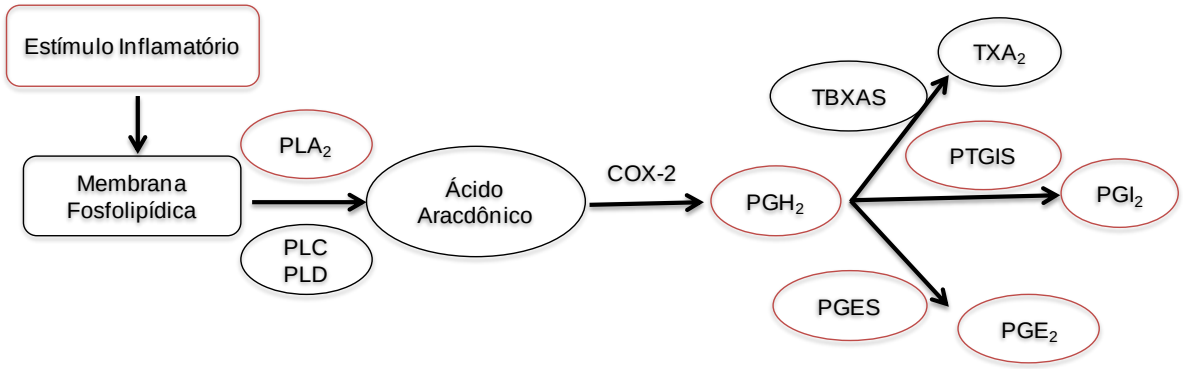

Figura 1. Esquema simplificado da cadeia do ácido aracdônico. Expressão da enzima COX-2 no citoplasma em resposta ao estímulo inflamatório.
PL: Fosfolipases; COX-2: ciclooxigenase-2; PG: Prostaglandinas;TX: Tromboxanos; PTGIS: Prostaciclina sintase; PGES: Prostaglandina sintase.
Fonte: Modificada de Stasinopoulos, I. et al (2013)

A expressão da enzima COX-2 é comumente aumentada tanto nos tecidos pré-malignos como nos malignos, provavelmente consequência do aumento da transcrição e estabilidade do mRNA. Estes elementos induzem a transcrição da COX-2 através da proteína quinase C (PKC) e sinalização mediada por RAS. Os taxanos induzem COX-2, através da ativação de PKC e de proteínoquinase ativada por mitogênio (MAPK). (UPADHYAY et al, 2009)

Muito menos se sabe sobre moduladores negativos da transcrição de COX-2, alguns estudos *in vitro* sugerem que o p53 inibi a transcrição da COX-2 por concorrência com a TATA *binding protein.* A importância da influência do

p53 na expressão da COX-2 se dá pelos níveis aumentados desta enzima em câncer do esôfago, do estômago, do pulmão e de mama que expressam o p53 polimórfico. O equilíbrio entre ativação de oncogenes e de genes supressores de tumor afeta a expressão de COX-2. (SUBBARAMAIAH et al, 2003)

Outros mecanismos, como a hipermetilação da região promotora, podem alterar transcrição e, consequentemente, os níveis de COX-2 nos tumores. Há evidências crescentes de que podem determinar os níveis de COX-2 em tecidos tumorais. (SUBBARAMAIAH et al, 2003)

A expressão da COX-2 esofágica também é resultado da concentração local de componentes do refluxo e citocinas inflamatórias, o que ocorre na progressão da esofagite de refluxo para Esôfago de Barrett e adenocarcinoma. Por outro lado, é muito pequeno o número de pacientes que evoluem do refluxo gastroesofágico para o adenocarcinoma, o que sugere que fatores genéticos, como polimorfismos, podem modular a resposta inflamatória conforme fenótipos específicos. (MOONS et al, 2007)

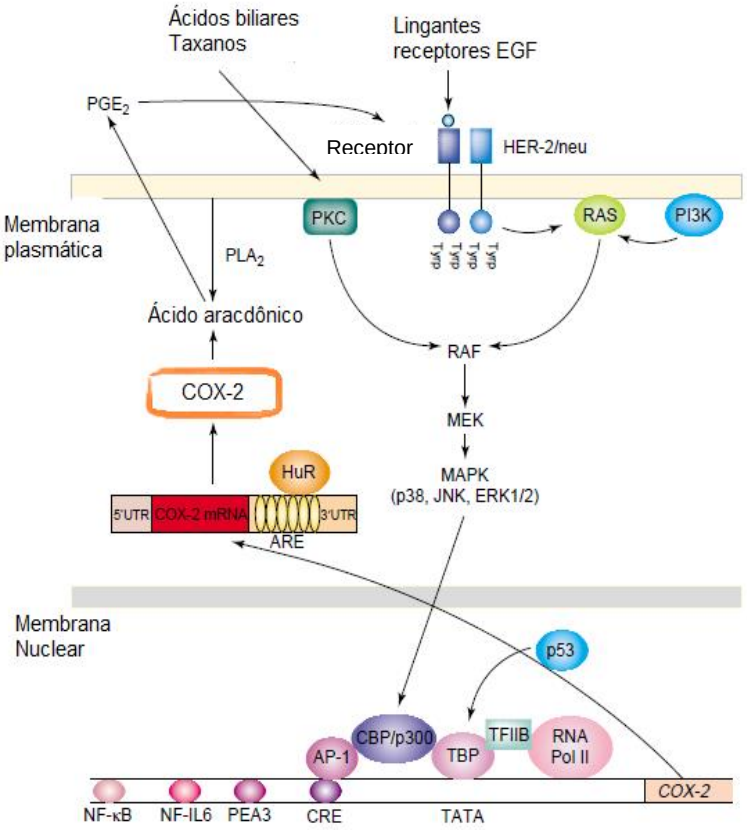

Figura 2. Regulação da expressão da COX-2 no câncer

Regulação da ciclooxigenase-2 (COX-2) no câncer. A COX-2 é induzida por uma variedade de estímulos, incluindo oncogenes *Human Epidermal growth factor* (HER-2 / neu), Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), promotores de tumores (ésteres de forbol e ácidos biliares) e quimioterapia (taxanos). O estímulo da Proteína Quinase C (PKC), ou sinalização da RAS aumenta a atividade das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) que, por sua vez, ativam a transcrição de COX-2. Vários fatores de transcrição, incluindo um ativador proteico 1 (AP-1) e o fator nuclear kB (NF-kB), mediam a indução da COX-2. Em contrapartida, o p53 selvagem inibe a transcrição de COX-2. COX-2 também é regulada por mecanismos de pós-transcrição. A região 3' não traduzida (3'UTR) de RNAm de COX-2 contém uma série de sequências AUUUA, conhecidos como elementos UA-enriquecido (AREs) que conferem instabilidade mensagem. A ligação Hur, uma proteína de ligação de RNA, para estes elementos é responsável, pelo menos em parte, para aumentar a estabilidade do RNAm de COX-2 em tumores. Além disso, a prostaglandina E2 (PGE2) induz COX-2, ativando atividade de tirosina quinase do receptor de EGF, mas não se sabe se este mecanismo de retroalimentação positiva é relevante em tumores humanos. Abreviaturas: PFC, proteína de ligação CREB; CRE, elemento de resposta AMPc; ERK, sinal extracelular quinase regulada; JNK quinase Jun N-terminal; MEK, a MAPK quinase; NF-IL6, factor nuclear interleucina 6; PEA3, ativador do potenciador do polyomavirus 3; De PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PLA2, fosfolipase A2; ARN Pol II, RNA polimerase II; TBP, proteína de ligação a TATA.

Fonte: Modificada de Subbaramaiah, K. et al (2003)

O gene da enzima COX-2 está localizado no cromossomo 1q25.2 e contém 10 exons. Os polimorfismos genéticos desta enzima influenciam na sua expressão através de mecanismo de transcrição e pós-transcrição. (UPADHYAY et al, 2009)

Os polimorfismos nesta região podem ter impacto na atividade gênica transcricional por alterar a capacidade de ligação com certas proteínas nucleares. (GOU et al, 1998) O c-MYB, por exemplo, presente na região promotora de muitos genes, é um fator de transcrição envolvido no sistema hematopoiético e trato gastrointestinal que atua na regulação do equilíbrio entre a divisão celular, diferenciação e sobrevivência. (GOU et al, 1998; TANG et al, 2011)

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), sítio ativador de interferon γ(GAS), TATA *binding protein* TFIID (fator de transcrição IID), fator nuclear para IL-6 (NF-IL6), PEA3, elementos de resposta ao AMP-cíclico e elementos de resposta ao TGF-β , que são críticos na indução da transcrição do gene COX-2. Os polimorfismos nesta região podem ter impacto na atividade gênica transcricional por alterar a capacidade de ligação com certas proteínas nucleares. (ZHANG et al, 2005) O c-MYB, presente na região promotora de muitos genes, é um fator de transcrição envolvido no sistema hematopoiético e trato gastrointestinal que atua na regulação do equilíbrio entre a divisão celular, diferenciação e sobrevivência. (ZHANG et al, 2005; MOONS et al, 2007; TANG et al, 2011)

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 atividade de transcrição. O alelo COX-2-1195 A associa-se a maior expressão da COX-2. (ZHANG, 2005 et al; MOONS et al, 2007)

O polimorfismo *COX-2*+8473T>C (rs5275), localizado dentro desta região funcional, pode modificar a afinidade na ligação de fatores regulatórios e influenciar a estabilidade do mRNA e/ou eficácia translacional e, subsequentemente, influenciar na suscetibilidade ao câncer. Este polimorfismo apresenta alta associação com o adenocarcinoma do esôfago em caucasianos, mas parece não haver relação com o CEC em asiáticos. (ZHANG et al, 2005; FERGUSON et al 2008; UPADHYAY et al, 2009).

A região 3'UTR do gene da COX-*2* contém 22 elementos ricos em adenina-uracila, altamente conservados também conhecidos como sequências de Shaw-Kamen (AUUUA) (ZHAO et al, 2009; TANG et al, 2011). 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, LPS e certos taxanos se ligam nesta região. Portanto, podem ter relação com a regulação da produção da COX-*2* por atuarem como determinantes de instabilidade do mRNA e elemento inibitório de transição. (SRIVASTAVA et al, 1994; GOU et al, 1998; DIXON, 2000)

Pacientes que apresentam tumores com maiores níveis de expressão da COX-2 tem pior prognóstico, comparados a tumores com baixa expressão desta enzima. Altos níveis de prostaglandinas são associados à agressividade tumoral. (LIANG et al, 2011; MOONS et al, 2007). Por isso, as drogas inibidoras da COX-2 podem ser indicação promissora para neoplasias

gastrointestinais e esofágicas que possuem aumento da expressão desta enzima (UPADHYAY et al, 2009).

1.10 Polimorfismos do Gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase

A enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) tem papel importante no metabolismo do folato, o substrato para a enzima MTHFR, 5,10-metileno-tetra-hidrofolato (THF) é doador do grupo metil para a conversão do desoxiuridilato (dUMP) a desoxitimidilato (dTMP), necessário para síntese do DNA. (YANG et al, 2005; DURESNE-PECOLLO et al, 2009; LIU et al, 2011; GALBIATTI et al, 2012)

A enzima MTHFR converte irreversivelmente 5,10-metilenotetrahidrolato intracelular a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHFR), forma do folato mais presente no plasma e doador de carbono para a reemetilação da homocisteína em metionina, precursor imediato da S-adenosil metionina (SAM), o doador do grupo metil para as reações de metilação do DNA. (LARSSON; GIOVANNUCCI; WOLK, 2006; JING et al, 2012)

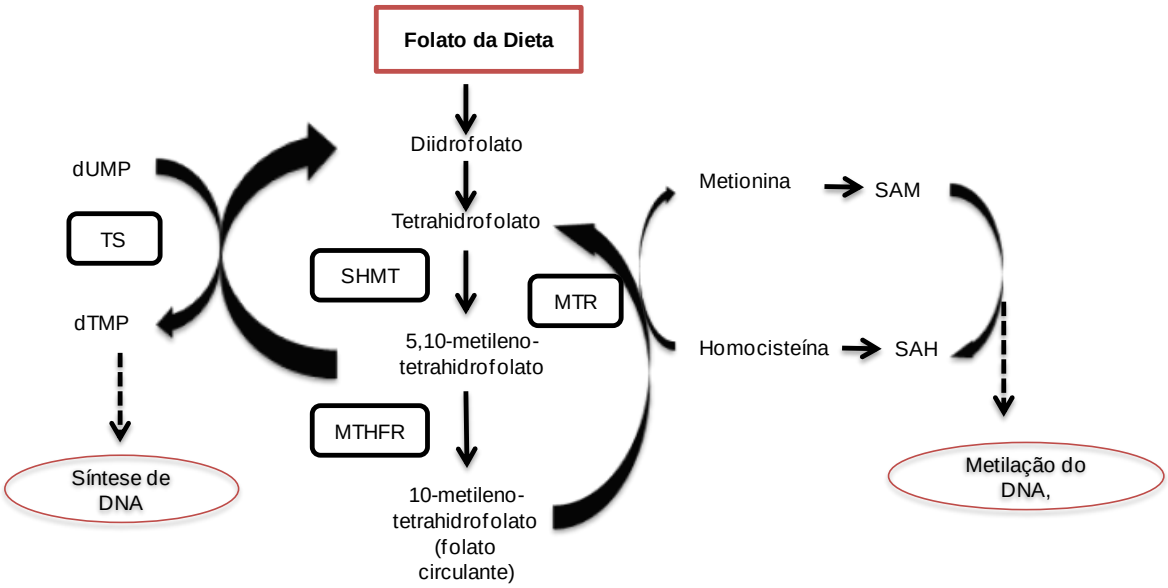

Figura 3. Esquema simplificado do metabolismo do folato envolvendo a enzima MTHFR.
TS: Timidilato Sintase; SHMT: Hidroximetiltransferase; MTR: Metionina Sintase; MTHFR: Metilenotetrahidrofolato Redutase.
Fonte: Modificado de Larsson, SC.*et al* (2006)

A deficiência de folato e a alteração da atividade da MTHFR são descritos como fatores de risco para o câncer do esôfago através de dois mecanismos: um é pela incorporação errônea do uracil no DNA, o que gera ruptura da sua integridade e reparação, aumentando a suscetibilidades a mutações e danos do DNA. (STOLZINBERG-SOLOMON et al, 2003; YANG et al, 2005; LU et al, 2011; JING et al, 2012).

O outro mecanismo é a metilação aberrante do DNA, que ocorre quase que exclusivamente no dinucleótido CpG (ilhas de CpG), na posição 5’ do anel de citosina, formando a 5-metilcitosina, geralmente protegidos de metilação em tecidos normais. (EADS; NICKEL; LAIRD, 2002; CHENG et al, 2014).

A Metilação do DNA tem efeitos importantes sobre o desenvolvimento celular e função, esta alteração epigenética, incluindo a hipometilação genômica ou a hipermetilação regional, (EADS; NICKEL; LAIRD, 2002) muda a estabilidade genômica e a expressão gênica de supressores de tumor e proto-oncogenes, evento comum na carcinogênese. (MIAO et al, 2002; LEHRBACH; NITA; CECCONELLO, 2003; YANG et al, 2005; DURESNE-PECOLLO et al, 2009; LU et al, 2011)

A frequência de metilação de um gene específico varia muito de um tipo de tumor para o outro, (EADS; NICKEL; LAIRD, 2002) em relação ao câncer de esôfago, os genes supressores de tumor que mais sofrem hipermetilação são p73 e p15. (WEIBERG, 2005).

CHENG et al (2014) descreveu algumas regiões genômicas que sofrem alterações de metilação, como possíveis biomarcadores de metástase linfonodal ou prognóstico de pacientes com câncer do esôfago. A hipermetilação em ilhas CpG nas proximidades de PAX6 (proteína box pareado 6) e de regiões promotoras dos genes UCHL1 (ubiquitin carboxyl-

terminal hydrolase), FHIT (tríade de histidina frágil), GRIN2B (receptor de glutamato, ionotrópicos, N-metil-d-aspartato 2B) e GADD45G (parada do crescimento induzível por dano ao DNA gama) associaram-se a pior sobrevida dos pacientes com câncer de esôfago. (CHENG et al, 2014)

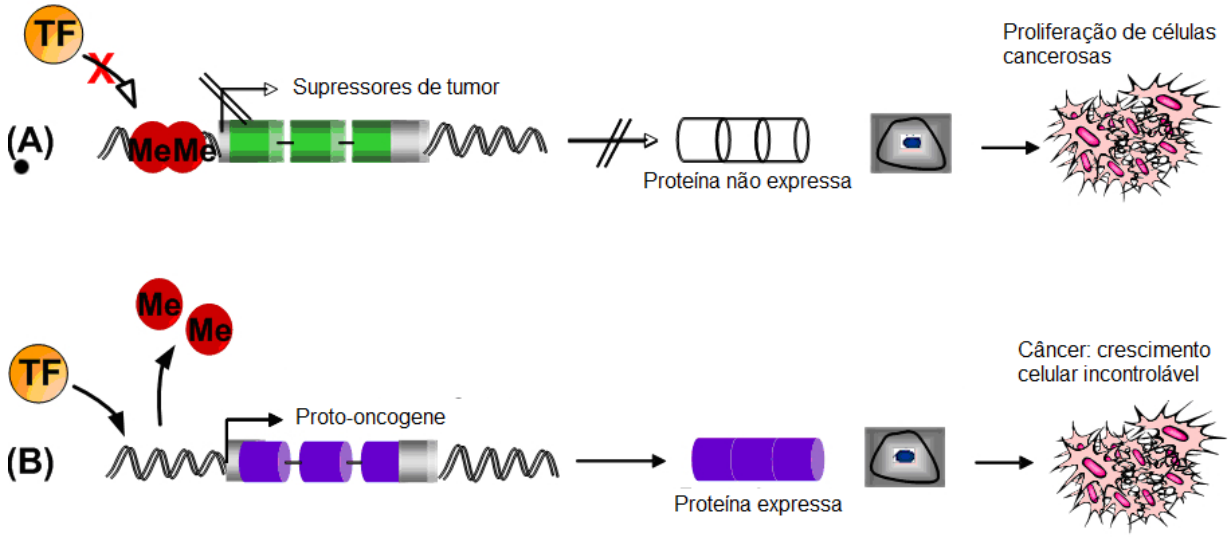

Figura 4. Dois possíveis mecanismos pelos quais a alteração da metilação pode levar ao câncer

(A) Um gene supressor de tumor anteriormente não metilado tais como p53 torna-se metilado, o fator de transcrição (TF) já não pode ligar-se a região promotora, o gene não é expresso, e a proliferação de células cancerosa aumenta.

(B) Um proto-oncogene é desmetilado, permitindo que fatores de transcrição (TF) iniciam a transcrição e a proteína é expressa, neste caso o crescimento celular é descontrolado.

Fonte: Modificado de Nelson, S. (2008)

O gene da enzima MTHFR contém uma região codificadora com 11 éxons e esta localizado no cromossomo 1p36.3. Aproximadamente 60 polimorfismos foram descritos neste gene. (MIAO et al, 2002)

Os genótipos variantes dos polimorfismos C677T e A1298C do gene da MTHFR associam-se à diminuição importante da atividade enzimática e, consequentemente, interrupção do metabolismo do folato. (MIAO et al, 2002)

A variante C677T (rs1801133) é a transição C para T no éxon 4 no nucleotídeo 677, resultando na conversão da alanina para valina na posição 222 da sequência de aminoácidos. (YANG et al, 2005; LANGEVIN et al, 2008; DURESNE-PECOLLO et al, 2009) Este polimorfismo está associado à redução da atividade enzimática, limitando a conversão de 5,10 metilenotetrahidrofolato para 5-MTHFR. (GALBIATTI et al, 2012)

Comparados ao subtipo homozigoto selvagem (CC), o heterozigoto polimórfico (CT) expressa a enzima com 65% de atividade, já o homozigoto polimórfico (TT) expressa a enzima com 30% da atividade. Ambos estão associados com menores níveis séricos de folato, maiores níveis de homocisteína plasmática, com consequente hipometilação do DNA, fator presente da carcinogênese. (YANG et ak, 2005; LANGEVIN et al, 2008; GALBIATTI et al, 2012)

Indivíduos que carregam o alelo T tem menor concentração de folato no plasma. Esta deficiência pode ser pior para etilistas, pela deficiência do co-fator de transferência de metil com o folato, a vitamina B6 e a vitamina B12. Portanto, a capacidade de metilação prejudicada foi observada em quem abusa do álcool. (LANGEVIN et al, 2008; DURESNE-PECOLLO et al, 2009; LIU et al, 2011)

A administração de folato pode ser efetiva na prevenção do câncer do esôfago para estes indivíduos. (LIU et al, 2011)

Outro polimorfismo que altera a atividade da MTHFR é a substituição do *A* pelo *C* no nucleotídeo 1298 (rs1801131). Isso resulta numa alteração do aminoácido glutamato por alanina no éxon 7, o que reduz a atividade enzimática. Esta variante é menos grave que a 677. (DURESNE-PECOLLO et al, 2009) Indivíduos com genótipo *CC* no resíduo 1298 tem 60% da capacidade

enzimática comparada ao genótipo AA. (STOLZINBERG-SOLOMON et al, 2003; DURESNE-PECOLLO et al, 2009)

Indivíduos que são homozigotos para o alelo A1298C não apresentam maiores níveis plasmáticos de homocisteína comparados ao genótipo AA. Entretanto, indivíduos heterozigotos para os alelos A1298C e C677T, apresentaram níveis plasmáticos aumentados de homocisteína e diminuídos de folato. (STOLZINBERG-SOLOMON et al, 2003; DURESNE-PECOLLO et al, 2009)

Os genes que tem associação a determinadas doenças tendem a ocorrer com mais frequência entre os familiares dos indivíduos afetados do que na população em geral, quando há substancial hereditariedade. (TERWILLIGER; WEISS, 1998)

A principal dificuldade em determinar o efeito de qualquer alelo sobre o risco para a doença crónica é normalmente fraco, principalmente pela influência de fatores ambientais.

Mas a esperança é que métodos de análise de associação possam levar ao diagnóstico precoce e ao tratamento da doença crônica comum com maior precisão, através da identificação de fatores de risco genéticos. (TERWILLIGER; WEISS, 1998)

1.11. Justificativa

O câncer é considerado uma doença genética, que em geral resulta de alterações do controle da proliferação e diferenciação celular. Os proto-oncogenes, que atuam no crescimento e diferenciação celular, normalmente não seriam prejudiciais, mas por translocações cromossômicas, amplificações gênicas e mutações de um único nucleotídeo (SNPs), podem se tornar potencial carcinogênico.

Os SNPs determinam as diferenças fenotípicas entre os indivíduos, que associados a fatores ambientais, podem definir a suscetibilidade genética ao desenvolvimento tumoral. Portanto, é possível, através do conhecimento do perfil polimórfico individual, determinar a suscetibilidade para o câncer do esôfago e, futuramente, gerar políticas de prevenção.

O estudo dos genes polimórficos COX-2 e MTHFR pode trazer novos conhecimentos da carcinogênese do esôfago, principalmente relacionados à inflamação locorregional e à síntese de DNA. Estudos na nossa população podem contribuir com o entendimento mais preciso do que ocorre na progressão do tumor esofágico em nosso meio, orientando inclusive estratégias de detecção, prevenção e tratamento diferenciados.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

- Investigar a frequência dos polimorfismos do *COX-2* (-1195A>G e 8473T>C), e do *MTHFR* (677C>T e 1298C>A) em pacientes com câncer de esôfago.

2.2 Objetivos secundários

- Verificar a associação entre os polimorfismos estudados e a suscetibilidade ao câncer de esôfago, através da avaliação da distribuição dos genótipos e haplótipos entre casos e controles.
- Investigar a associação dos polimorfismos com fatores clínicos, epidemiológicos e patológicos.

3 MÉTODOS

3. MÉTODOS

Trata-se de um estudo caso-controle, o qual cento e nove pacientes foram incluídos com o diagnóstico de adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas do esôfago, histologicamente confirmado, submetidos à esofagectomia potencialmente curativa, no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período de junho de 2001 a janeiro de 2008.

O grupo controle é constituído por cento e dois indivíduos operados por doença benigna e recrutados nos ambulatórios do Hospital das Clínicas da FMUSP, sem histórico individual ou familial de câncer, que não apresentavam doenças associadas a conhecidos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de esôfago, como doenças associadas ao tabaco e álcool, esôfago de Barrett, esofagite de refluxo crônica (doença do refluxo gastroesofágico) e megaesôfago. (Tabela 1)

Os grupos caso e controle foram pareados quanto ao sexo, idade e etnia.

Todos os indivíduos foram recrutados durante o Projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP, no subprojeto intitulado: “Perfil genético do carcinoma epidermóide do esôfago: Aplicações Clínicas”, aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq) sob o número 903/01 (ANEXO B), tratados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, o centro de pesquisa deste projeto, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (ANEXO C)

Os dados clinico-patológicos (idade, sexo, etnia) dos casos e controles foram coletados através de questionários aplicados aos participantes de

pesquisa durante o Projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP e revisados conforme informações dos prontuários do Hospital das Clínicas da FMUSP.

As informações de estádio da doença, tipo histológico do tumor e óbito foram coletadas através de informações de prontuários físicos do Hospital das Clínicas-HC, Prontuário Médico Eletrônico (HCMED), Sistema Integrado de Gestão Hospitalar (SIGH), prontuário eletrônico do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo-ICESP (Sistema Tasy) e laudos de exames do Hospital das Clínicas da FMUSP.

O estádio da doença foi classificado conforme os critérios da *American Joint Committee on Cancer and International Union Against Cancer* (AJCC/UICC). (RICE; BLACKSTONE; RUSCH, 2010; CORAL et al, 2015). (ANEXO A).

Determinou-se a sobrevida global dos pacientes com câncer de esôfago como o período, em meses, entre a data da cirurgia e a data do óbito ou a data do último seguimento (último contato com o paciente por telefone ou em consulta ambulatorial).

Considerou-se etilismo o consumo de bebidas alcoólicas pelo menos uma vez por mês e o tabagismo como o hábito de fumar em média um cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente, pelo menos por um ano.

Para os pacientes com câncer de esôfago, determinou-se a idade no dia da cirurgia, para os controles, a idade no momento da entrevista do Projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP.

Este estudo recebeu auxílio regular da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, processo número 2012/17920-2.

3.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com o diagnóstico de adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas do esôfago, submetidos à ressecção cirúrgica
- Idade acima de 18 anos
- Pacientes que aceitaram participar do estudo Genoma Clínico do Câncer da FAPESP e assinaram o termo de consentimento.

3.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes que realizaram qualquer forma de terapia neoadjuvante, incluindo quimioterapia e radioterapia.
- Pacientes que realizaram cirurgia do esôfago prévia à ressecção cirúrgica do esôfago pelo adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas.

Tabela 1. Doença ou Condição que Exclui o Paciente do Grupo Controle. Projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP 2001

Qualquer tipo de câncer
Doenças do tabaco e do álcool:
Doença pulmonar crônica
Doença cardíaca coronariana
Trombose venosa
Hepatite
Cirrose
Doenças ocupacionais:
Asma
Pneumoconiose
Anemia aplástica adquirida
Doenças crônicas não-neoplásicas da cavidade oral, faringe e laringe:
Gengivite e periodontite crônica
Glossite, estomatitite e abscesso da boca
Leucoplasia
Sinusite crônica amigdalite e laringite
Pólipo da corda vocal e da laringe
Abscesso da faringe
Doenças crônicas não-neoplásicas do trato digestivo:
Esofagite de refluxo crônica (doença do refluxo gastroesofágico)
Esôfago de Barret
Gastrite atrófica
Doença de Crohn
Colite ulcerativa
Isquemia mesentérica crônica
Pólipos ademotosos
Condições crônicas incapacitantes:
Diabetes
Imunodeficiências:
Doenças auto-imunes
Transtornos mentais:
Condições psicóticas senis ou pré-senis
Outras psicoses, retardo mental
Doenças do sistema nervoso central:
Infecções
Doenças hereditárias e degenerativas
Doença cerebrovascular
Tumores cerebrais
Gravemente doentes ou incapazes de responder

3.3 Coleta de sangue e armazenamento

Coletaram-se amostras de sangue periférico dos casos e controles durante as consultas de acompanhamento ambulatorial do Projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP. Realizou-se a venóclise de veia periférica e coletou-se 10 a 15 mL de sangue, em tubo contendo anticoagulante EDTA. O material coletado foi processado por centrifugação refrigerada e o volume contendo as células nucleadas (creme leucocitário), foi armazenado em tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL a – 20ºC para posterior extração de DNA.

3.4 Extração e Purificação de DNA Genômico

Isolou-se o DNA genômico 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. Após o descongelamento das amostras, foram transferidos 200 µL do creme leucocitário para 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 obter uma solução homogênea, foi efetuada agitação vigorosa em vórtex. Incubou-se a mistura por 10 minutos a 55ºC para promover a digestão protéica. Ao término da incubação, adicionaram-se ao lisado 200 µL de etanol 96-100%, seguido de agitação em vórtex. Transferiu-se o lisado para coluna de sílica, acoplada ao tubo coletor de 2,0 mL; centrifugado a 10000 × g por 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida, o tubo coletor foi descartado. Transferiu-se a coluna contendo o DNA genômico fixado para novo tubo coletor de 2,0 mL. Adicionaram-se à coluna, 500 µl de *Wash Buffer* 1, preparado previamente com etanol. A seguir, foi centrifugada a 10000 × g

por 1 minuto à temperatura ambiente. Novamente, o tubo coletor foi descartado e substituído. Adicionaram-se à coluna, 500 µl de *Wash Buffer* 2, preparado previamente com etanol. A mistura foi centrifugada à velocidade máxima por 3 minutos à temperatura ambiente. Ao término do processamento, o tubo coletor foi descartado e substituído por um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL. Para a eluição do DNA, incubou-se a solução 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 conteve o DNA genômico purificado.

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

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

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental - LIM 37 do Setor de Biologia Molecular, Disciplina de Transplante de Fígado (Titular Prof. Dr. Luiz Carneiro D'Albuquerque) do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.5 Seleção dos SNPs (*single nucleotide polimorphisms*)

Realizou-se uma busca extensa na literatura para selecionar os SNPs já validados e documentados, que pudessem ter relação com o risco de câncer

de esôfago, por serem potencialmente funcionais por ocorrerem próximos a regiões regulatórias e em região codificadora dos genes, que tem o potencial de influenciarem a expressão gênica, alterando a quantidade final da proteína codificada pelos genes ou associados à diminuição importante da atividade enzimática. Considerou-se também a frequência do alelo polimórfico, sendo selecionados com frequência maior que 10% na população, devido tamanho da amostral deste projeto.

Utilizaram-se os bancos de dados dbSNP do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp) e International HapMap Project (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/) para auxiliar na seleção dos SNPs.

Identificou-se a distribuição dos haplótipos com o objetivo de selecionar os SNPs mais informativos. Devido aos dados do HapMap Project e dbSNP serem derivados de populações de não-brasileiros, os genótipos gerados no nosso estudo servirão para uma primeira análise da distribuição dos haplótipos na nossa população, o que, certamente, poderá beneficiar futuros estudos.

As características dos genes e dos respectivos polimorfismos analisados estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Características dos polimorfismos selecionados

Gene	Polimorfismo	Outro Nome	Alelo Polimórfico	Coordenada Genômica	Tipo
COX-2	rs689466	-1195A>G	G	chr1: 186650751	*upstream*
	rs5275	+8473T>C	C	chr1: 186643058	3'UTR
MTHFR	rs1801133	C677T	T	chr1:11856378	*missense* (Ala-Val)
	rs1801131	A1298C	C	chr1:11854476	*missense* (Glu-Ala)

Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?

3.6 Genotipagem por TaqMan ® SNP *Genotyping Assays*

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

Os kits *TaqMan* ® contém primers (oligonucleotídeos) que flanqueiam a região polimórfica para amplificação dos produtos por PCR, além de duas sondas (fragmento de DNA de oligonucleotídeos de 18-22 pb) complementares à sequência alvo, sendo cada uma especifica para um dos alelos descritos (polimórfico e tipo selvagem). Esta sonda apresenta na extremidade 5' um fluoróforo (*dye reporter*) e extremidade 3' um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor).

Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os *dye reporters* e os *quenchers* impede que a fluorescência seja emitida. Durante a atividade exonuclease 5’ --> 3’ da Taq DNA polimerase, a sonda ligada ao fragmento é clivada, causando a liberação do *dye reporter* e a emissão de fluorescência. Como apenas a sonda específica para 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 *dye reporter* e da molécula quencher, uma molécula denominada MGB (*Minor Groove Binder*) também está afixada a sonda, tendo a função de elevar a sua temperatura de anelamento, permitindo ligação mais especifica, e evitando que ela se ligue de forma inespecífica a sequência correspondente ao outro alelo. (Figura 7)

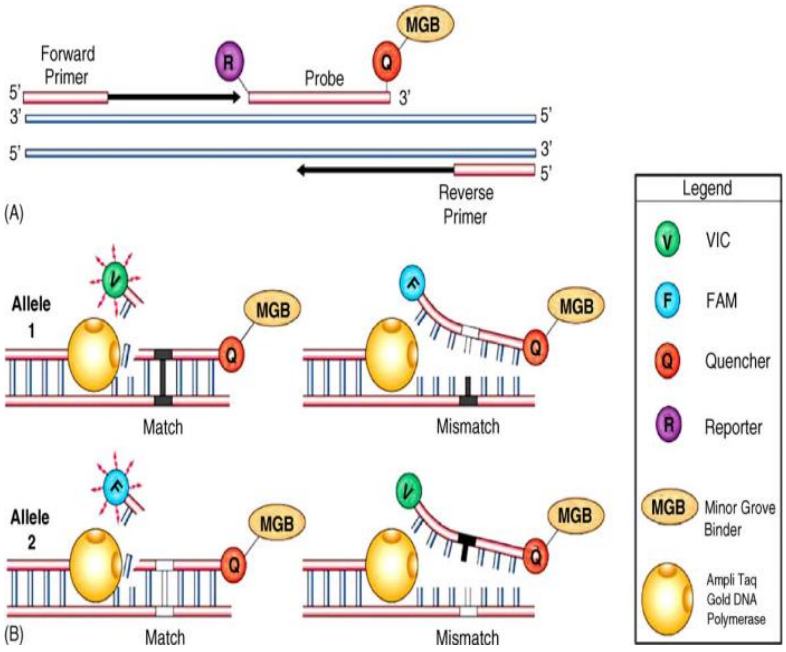

Figura 5. Esquema gráfico do ensaio de genotipagem por sondas TaqMan®

(A) Anelamento de sondas e primers e extensão. (B) A discriminação alélica é obtida pelo reconhecimento seletivo da sonda correspondente à sequência molde, o que gera um sinal alelo-específico (fluoróforo-específico) (1)

Fonte: Modificado de De La Vega et al (2005).

Determinou-se a genotipagem dos polimorfismos do *COX-2* e MTHFR através dos kits *TaqMan ® SNP Genotyping Assays* (*Applied Biosystems, Foster City*, EUA). Foram adquiridos os kits prontos para uso e validados *TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assay* dos SNPs, conforme descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Ensaios *TaqMan ®* utilizados para a detecção dos polimorfismos dos genes COX-2 e MTHFR

Ensaio	Sondas Fluorescentes [VIC/FAM]	Gene	Polimorfismo
C_2517145_20	TTAGATGGAAGGGAGATTTTGACAG[C/T]TGGAATTTCATCTTTG CTTTTGTTT	*COX-2*	rs689466
C_7550203_10	TGTTTTTGTTTGATGACAGAAAAAT[A/G]ACCAAAAGTACTTTAAA ATTTCAAA	*COX-2*	rs5275
C_1202883_20	GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG[G/A]CTCCCGCAGACACCT TCTCCTTCAA	*MTHFR*	rs1801133
C_850486_20	AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTT[G/T]CTTCACTGGTCAGCT CCTCCCCCCA	*MTHFR*	rs1801131

A fluorescência emitida na reação foi detectada em *Real Time PCR Step One Plus* (*Applied Biosystem, Life Technologies***,** *Foster City,* EUA), que faz a discriminação alélica através da emissão de luz em comprimento de onda característico. Os genótipos foram determinados de acordo com o perfil de emissão das fluorescências ao final da reação de PCR.

Para amplificação dos fragmentos desejados utilizaram-se as seguintes condições de reação: 5,0 µL do master mix , 0,5 µL de Taqman Genotyping 20X, 3,5 µL de água RNase DNase Free e 1,0 µL contendo 10 ng de DNA, somando um total de 10 µL para cada reação. Utilizaram-se 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. Repetiu-se a genotipagem em 20% das amostras de pacientes e controles e os resultados mostraram 100% de similaridade.

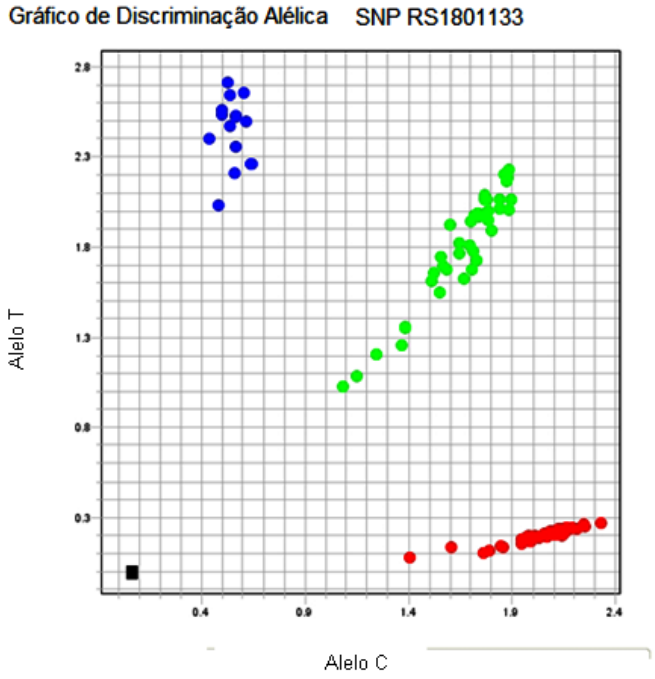

Figura 6. Resultados obtidos da Genotipagem por TaqMan ®

Alelo C / Alelo C lelo C / Alelo T elo T / Alelo T

Amostras de indivíduos homozigotos para o alelo C em vermelho (genótipo CC), indivíduos heterozigotos em verde (genótipo CT) e homozigotos para o alelo T em azul (genótipo TT).

3.7 Análise Estatística

As associações entre os polimorfismos nos grupos caso e controle foram estudadas usando-se o teste Exato de Fisher. Utilizou-se a regressão Logística para quantificar tais associações em termos de razões de chances com seus respectivos intervalos de confiança de 95%. No grupo caso também foi estudada a presença ou ausência do polimorfismo e verificou-se a associação aos dados clinicopatológicos, incluindo-se: idade, sexo, estádio da doença, tipo histológico e tabagismo.

Utilizou-se o modelo de regressão logística múltipla, ajustado pelas variáveis sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo, para confirmar a associação independente dos polimorfismos à suscetibilidade ao câncer de esôfago

Construíram-se curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier e o teste de log-rank aplicado a cada um dos polimorfismos no grupo com câncer do esôfago. Por último, aplicou-se a regressão de Cox simples a fim de calcular as razões de risco de óbito em funções dos genótipos.

Os cálculos foram feitos através do program R, versão 3.1.1 (R Core Team, 2014). A frequência dos haplotipos foi calculada a partir do algoritmo EM (Expecting-Maximization) e comparadas pelo teste Qui-Quadrado assim como a avaliação do desequilbrio de Hardy-Weinberg. (BARRETT et al, 2005)

Na análise multivariável, realizou-se o modelo ajustado com as variáveis de confusão: sexo, idade, etnia, estádio, tabagismo e etilismo.

Em toda a análise, foi adotado o nível de significância de 0,05 (5%) e valores descritivos (*p*) inferiores a este foram considerados significantes. (FOULKES, 2009; R CORE TEAM, 2014).

3.8. Considerações Éticas

Este estudo foi conduzido conforme a resolução 466/12 CNS/MS e suas complementares, a declaração de Helsinque, o documento das Américas, as Boas Práticas Clínicas (GCP/ICH) e o presente protocolo, aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP, em 24 de Outubro de 2012, conforme Parecer Consubstanciado em anexo (ANEXO D).

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Dados Demográficos analisados nos grupos Caso e Controle

O presente estudo incluiu 109 pacientes operados por câncer do esôfago, pareados a 102 controles, em relação ao sexo, idade e etnia.

Dentre os indivíduos do grupo caso, 84,40% são homens e 15,60% são mulheres. Entre os controles, 80,39% são homens e 19,61% são mulheres (p=0,473), não houve diferença entre os grupos.

A média de idade do grupo caso foi de 60,66 anos (variação de 38 a 90 anos), no grupo controle a média foi de 57,89 (variação de 32 a 81 anos). Não houve diferença entre os grupos, Os resultados foram descritos em média e desvio padrão (DP), foi utilizado o teste t de Student.

Coletaram-se as informações de etnia de prontuários médicos, baseados na declaração dos indivíduos. No grupo caso a maioria da população é branca (70,64%), os demais se dividem em mulatos (16,51%), negros (11,00%), asiáticos (0,92%) e índio (0,92%). No grupo controle, a distribuição étnica também é desigual, sendo que a maioria da população é branca, com 78,43%, seguida dos mulatos com 9,80%, negros com 9,80% e asiáticos, com de 1,96%, não houve diferença entre os grupos (p=0,226).

Devido ao pequeno número de indivíduos das etnias asiático, índio, mulato e negro, as variáveis de etnia foram agrupadas em categorias branco e não-branco. Os brancos são maioria dos casos com 70,64% e dos controles com 78,43%, não houve diferença entre os grupos (p= 0,21).

As informações sobre o hábito de consumo de bebida alcoólica (etilismo) foram coletadas através de questionários preenchidos pelos participantes durante o estudo Genoma Clínico do Câncer da FAPESP, que responderam a questão de múltipla escolha sobre ingestão de bebidas alcoólicas pelo menos

uma vez por mês, dentre as opções “sim-ainda bebe”, “nunca”, “Só no passado”.

Devido a grande variedade dos dados e o pequeno número amostral, a quantidade e a frequência do consumo de bebida alcoólica não foram consideradas. Não foi possível coletar esta informação de sete participantes do grupo caso, portanto, para este grupo, foi considerado um total de 102 sujeitos.

Houve diferença entre os grupos (p=0,001), sendo os grupos ex-etilista (48,04%) e etilista (34,31%) os mais prevalentes entre os pacientes com câncer do esôfago (grupo caso).

As informações sobre tabagismo também foram coletadas de questionários preenchidos pelos participantes durante o projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP, a pergunta foi: “fuma ou já fumou em média 1 cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente, pelo menos por 1 ano?” e as opções de resposta eram “Sim, ainda fuma”, “nunca fumou” e “Somente no passado”.

Não foi possível coletar esta informação de oito participantes do grupo caso, portanto, para este grupo, foi considerado um total de 101 sujeitos (n=101). Houve diferença entre os grupos, os Ex-tabagistas (40,59%) e os Tabagistas Ativos (45,54%) são mais prevalentes entre os pacientes com câncer do esôfago (grupo caso). Dados descritos na tabela 4

Tabela 4. Distribuição da população de estudo (casos e controles) segundo idade, sexo, etnia, etilismo e tabagismo. HC-FMUSP, 2001-2008

		Caso (n=109)	Controle (n=102)		Total (n=211)
Variável		**n (%)**	**n (%)**	***p***	**n (%)**
Idade[a]	Média (DP)	60,66 ± 10,54	57,89 ± 13,60	0,102[c]	59,33 ± 12,17
	Mediana	59	58		59
Sexo	Feminino	17 (15,6)	20 (19,61)	0,473[d]	37 (17,53)
	Masculino	92 (84,4)	82 (80,39)		174 (82,46)
Etnia[b]	Branco	77 (70,64)	80 (78,43)	0,21[d]	157 (74,40)
	Não-branco	32 (29,36)	22 (21,57)		54 (25,59)
Etilismo[e]	Não-etilista	18 (17,65)	66 (65,71)	0,001[d]*	84 (80,77)
	Ex-etilista	49 (48,04)	14 (13,73)		63 (60,58)
	Etilista	35 (34,31)	22 (21,57)		57 (54,81)
Tabagismo[e]	Nunca Fumou	14 (13,86)	45 (44,12)	0,001[d] *	59 (56,73)
	Ex-tabagista	41 (40,59)	36 (35,29)		77 (74,04)
	Tabagista Ativo	46 (45,54)	21 (20,59)		67 (64,42)

[a]Idade do dia da cirurgia para os casos e idade do momento da entrevista para os controles; (DP): desvio padrão; [b] Etnia auto-declarada; [c]teste t de Student; [d] teste exato de Fisher; *Valor de *p*<0,05

[e]Dados ausentes das variáveis: etilismo 7 casos; tabagismo: 8 casos.

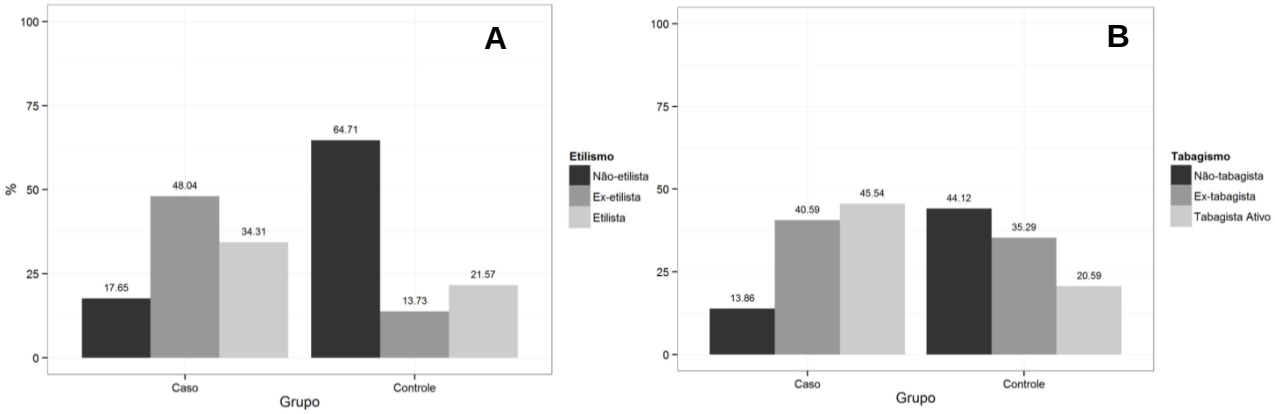

Figura 7. Distribuição da população de estudo (casos e controles) segundo variáveis (A) etilismo e (B) tabagismo

4.2. Dados Clínico-patológicos analisados no grupo de pacientes com câncer de esôfago.

Coletaram-se os dados clínico-patológicos de formulários preenchidos durante o projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP e conferidos com os dados de laudos de exames e prontuários do HC da FMUSP.

A maioria dos tumores analisados é do tipo histológico Carcinoma Epidermóide de Células Escamosas (CEC) em 60,55%, enquanto que 39,45% dos tumores é do tipo histológico Adenocarcinoma (ADENO). O estádio tumoral foi classificado de acordo com a 7ª Edição da AJCC – *American Joint Comitee on Cancer* de 2010. (RICE; BLACKSTONE; RUSCH, 2010)

Não foi possível coletar os dados de estádio anatomopatológico do tumor de seis (6) pacientes, pois houve perda do material biológico, representados como a variável “Sem informação” (5,50%). Em relação ao Estádio anatomopatológico (pTNM) 10,68% dos pacientes faziam parte do estádio I, 35,92% do estádio II, 45,63% do estádio III e 7,77 do estádio IV. Dados na tabela 5

Tabela 5. Distribuição dos casos em relação ao Tipo Histológico do Tumor e ao Estádio pTNM. HC-FMUSP, 2001-2008

Variável		**Casos (n=109)**	
		n	**%**
Tipo Histológico	Adenocarcinoma (ADENO)	43	39,45
	Carcinoma epidermóide (CEC)	66	60,55
Estádio pTNM[a]	Estádio I	11	10,1
	Estádio II	37	33,94
	Estádio III	47	43,12
	Estádio IV	8	7,34
	Sem Informação	6	5,5

[a] Dados ausentes das variáveis: Estádio pTNM: 6 casos.

4.3. Avaliação da Frequência dos Genótipos entre Caso e Controle

A distribuição dos genótipos na população total estudada obedece ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Dados Tabela 6.

Tabela 6. Dados sobre o Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Polimorfismo	Posição	ObsHET	PredHET	Hardy-Weinberg	%	MAF	Alelos
MTHFR 677C>T (RS1801133)	11796321	0,444	0,461	0,6665	100	0,361	C:T
MTHFR 1298A>C (rs1801131)	11794419	0,361	0,401	0,1835	100	0,278	A:C
COX-2+8437T>C (rs5275)	186673926	0,44	0,484	0,2195	100	0,41	T:C
COX-2-1195A>G (rs689466)	186681619	0,241	0,259	0,4118	100	0,153	A:G

Posição: Posição no cromossomo; ObsHET: Frequências esperadas; PredHET: Frequências observadas; %: Porcentagem das amostras genotipadas; MAF: Alelo de menor frequência; Alelos: Alelos analisados para cada polimorfismo.
Informações da análise pelo Haploview.

A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg também foi realizada entre os casos e controles separadamente. O polimorfismo *COX-2+8437T>C* (rs5275) do grupo controle não se apresentou em equilíbrio (p<0,05), mas o total da população analisada (casos e controles) apresentou-se em equilíbrio para este polimorfismo (p= 0,219). Os demais polimorfismos analisados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos de casos e controles. (tabela 7).

Tabela 7. Valores de *p* dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg

Polimorfismo	Hardy-Weinberg (p)		
	Caso	Controle	Total
MTHFR 677C>T (RS1801133)	0,679	1,000	0,666
MTHFR 1298A>C (rs1801131)	0,016	0,806	0,183
COX-2+8437T>C (rs5275)	0,702	0,022*	0,219
COX-2-1195A>G (rs689466)	0,187	0,683	0,411

*Valor de p<0,05

4.4. Distribuição da frequência dos polimorfismos entre casos e controles.

A frequência dos polimorfismos foi avaliada em 109 casos e 102 controles, pareados por sexo, idade e etnia.

A distribuição e frequência de dois polimorfismos do *COX-2* (-1195A>G, 8473T>C) e de dois polimorfismos do *MTHFR* (677C>T e 1298C>A) em casos está descrita na Tabela 8.

Tabela 8. Distribuição das frequências genotípicas entre casos e controles

		Caso (n = 109)		**Controle (n = 102)**			**Total (n = 211)**	
Genótipo		**n**	**%**	**n**	**%**	***p***	**Total**	**%**
MTHFR 677C>T								
(RS1801133)	CC	46	42,20	41	40,20	0,963	87	41,23
	CT	48	44,04	47	46,08		95	45,02
	TT	15	13,76	14	13,73		29	13,74
MTHFR 1298A>C								
(rs1801131)	AA	63	57,8	52	50,98	0,14	115	54,50
	AC	33	30,28	43	42,16		76	36,02
	CC	13	11,93	7	6,86		20	9,48
COX-2+8437T>C								
(rs5275)	TT	33	30,28	45	44,12	0,06	78	36,96
	TC	56	51,38	37	36,27		93	44,07
	CC	20	18,35	20	19,61		40	18,95
COX-2-1195A>G								
(rs689466)	AA	77	70,64	77	75,49	0,52	154	72,98
	AG	27	24,77	23	22,55		50	23,69
	GG	5	4,59	2	1,96		7	3,317

Foi utilizado o teste exato de Fisher.

Não houve diferença estatisticamente significante na frequência entre genótipos avaliados dos polimorfismos *MTHFR* 677C>T (*p*=0,88), *MTHFR* 1298A>C (*p*=0,14) e *COX-2-1195A>G* (*p*=0,52). Uma tendência à associação significativa entre os genótipos do polimorfismo *COX-2*+8473T>C e o câncer do esôfago foi detectada (*p*=0,06). O genótipo heterozigoto TC é mais frequente

no grupo de casos, o que pode associar a presença do alelo polimórfico C e o câncer de esôfago.

Realizou-se a análise do modelo dominante para avaliar a frequência dos polimorfismos entre os casos e os controles, ou seja, comparando a frequência dos homozigotos selvagens com os genótipos que contém o alelo polimórfico (soma do heterozigoto com homozigoto polimórfico). Os dados foram descritos na Tabela 9.

Tabela 19. Distribuição das frequências genotípicas comparando os Genótipos Selvagens e Polimórficos. Modelo Dominante

		Caso (n = 109)		**Controle (n = 102)**			**Total (n = 211)**	
Genótipo		**n**	**%**	**n**	**%**	***p***	**Total**	**%**
MTHFR 677C>T						0,78		
(RS1801133)	CC	46	42,2	41	40,2		87	41,23
	CT+TT	63	57,8	61	59,8		124	58,76
MTHFR 1298A>C						0,33		
(rs1801131)	AA	63	57,8	52	50,98		115	54,50
	AC+CC	46	42,2	50	49,02		96	45,50
COX-2+8437T>C								
(rs5275)	TT	33	30,28	45	44,12	0,04*	78	36,97
	TC+CC	76	69,72	57	55,88		133	63,03
COX-2-1195A>G								
(rs689466)	AA	77	70,64	77	75,49	0,44	154	72,98
	AG+GG	32	29,36	25	24,51		57	27,01

Foi utilizado o teste exato de Fisher
*Valor de $p<0,05$

Foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao polimorfismo *COX-2+8437T>C* e o câncer do esôfago. A maior frequência do alelo polimórfico C no grupo de casos pode indicar associação ao câncer do esôfago ($p=0,04$).

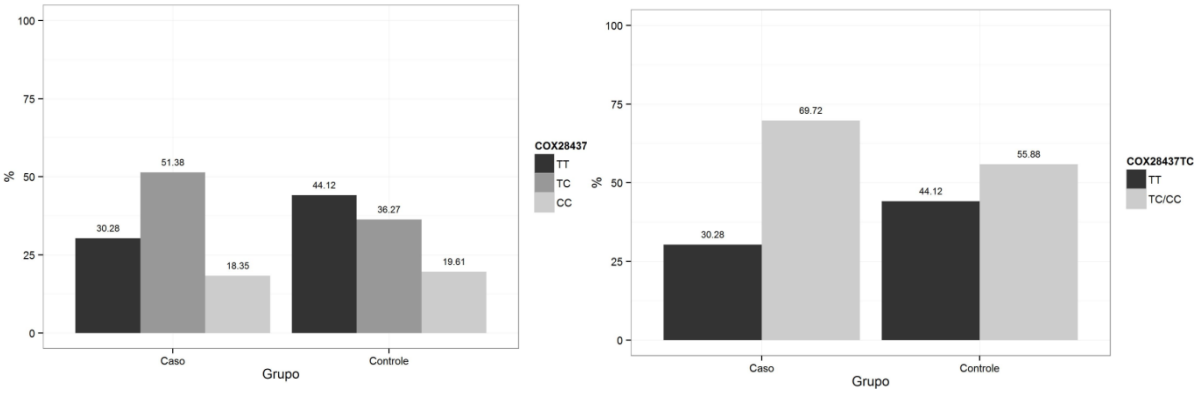

Figura 8. Frequência genotípica do polimorfismo *COX-2*+8437T>C entre os casos e controles. (A) Modelo genótipo (B) Modelo dominante

A regressão logística simples, entre casos e controles foi realizada para confirmar a associação do polimorfismo *COX-2+8437T>C* e o câncer do esôfago. Os valores de *Odds Ratio* (razão de chances) foram calculados utilizando o modelo de regressão logística binária. Dados descritos na Tabela 10.

Tabela 10: Razões de chances para o Câncer do esôfago de acordo com os genótipos

Genótipos		**RC**	**95% IC**		***p***
***MTHFR* 677C>T**					
(RS1801133)	CC	Referência			
	CT	0,91	0,51	1,63	0,75
	TT	0,96	0,41	2,21	0,91
***MTHFR* 1298A>C**					
(rs1801131)	AA	Referência			
	AC	0,63	0,35	1,14	0,12
	CC	1,53	0,57	4,12	0,39
Cox-2+8437T>C					
(rs5275)	TT	Referência			
	TC	2,06	1,12	3,81	0,02*
	CC	1,36	0,63	2,93	0,42
Cox-2-1195A>G					
(rs689466)	AA	Referência			
	AG	1,17	0,62	2,22	0,62
	GG	2,5	0,47	13,28	0,28

Foi utilizada a Regressão Logística. RC: Razão de Chances; IC: Intervalo de Confiança de 95%

*Valor de $p<0,05$

Indivíduos portadores do genótipo heterozigoto polimórfico *COX-2+8437TC***,** apresentam 2,06 vezes maior chance para o desenvolvimento do câncer do esôfago em relação aos indivíduos do genótipo homozigoto selvagem *COX-2+8437TT,* com respectivo intervalo de confiança de 95% (*p*=0,02; IC: 1,12 – 3,81). Não houve associação significativa para os demais polimorfismos avaliados *MTHFR* 677C>T, *MTHFR* 1298A>C e *COX-2-1195A>G.*

Utilizou-se o modelo de regressão logística múltipla, ajustado pelas variáveis sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo, para confirmar a associação independente dos polimorfismos à suscetibilidade ao câncer de esôfago. Dados na Tabela 11.

Tabela 11. Razões de chances para o Câncer do esôfago de acordo com os genótipos. Regressão Logística Múltipla

Genótipos		**RC**	**95% IC**		***p***
***MTHFR* 677C>T**					
(RS1801133)	CC	Referência			
	CT	0,95	0,46	1,96	0,885
	TT	1,12	0,4	3,15	0,837
***MTHFR* 1298A>C**					
(rs1801131)	AA	Referência			
	AC	0,63	0,3	1,32	0,216
	CC	2,59	0,7	9,61	0,156
COX-2+8437T>C					
(RS5275)	TT	Referência			
	TC	3,06	1,4	6,71	0,006*
	CC	1,45	0,53	3,93	0,472
COX-2-1195A>G					
(rs689466)	AA	Referência			
	AG	1,7	0,73	3,95	0,22
	GG	6,49	0,95	44,29	0,055**

Foi utilizada a Regressão Logística Múltipla. RC: Razão de Chances; IC: Intervalo de Confiança de 95%.

*Valor de *p*<0,05

**Valor de *p*<0,10

Este modelo confirmou a associação significativa do polimorfismo *COX-2+8437T>C* e o câncer do esôfago. Indivíduos portadores do genótipo heterozigoto polimórfico *COX-2+8437TC***,** apresentam 3,06 vezes maior chance para o desenvolvimento do câncer do esôfago que em relação aos indivíduos do genótipo homozigoto selvagem *COX-2+8437TT,* com respectivo intervalo de confiança de 95% (*p*=0,006; IC: 1,4– 6,71).

Uma tendência a diferença significativa foi detectada em relação as frequências do polimorfismo *COX-2-1195A>G* entre os casos e controles. Quando ajustada pelas variáveis sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo, houve tendência a associação independente do genótipo homozigoto polimórfico *COX-2-1195GG* e o aumento de 6,49 vezes a chance do câncer de esôfago, com respectivo intervalo de confiança de 95% (*p*=0,055; IC: 0,95-44,29). Não houve associação significativa para os demais polimorfismos avaliados *MTHFR 677C>T*, *MTHFR 1298A>C.*

Para o modelo dominante, a regressão logística simples foi realizada comparando-se o genótipo homozigoto selvagem com a soma dos genótipos polimórficos heterozigoto e homozigoto. Dados na Tabela 12.

Tabela 12. Razões de chances para o Câncer do esôfago entre Casos e Controles comparando os Genótipos Selvagens e Polimórficos. Modelo Dominante

Genótipo		RC	95% CI		*p*
***MTHFR* 677C>T**					
(RS1801133)	CC	Referência			
	CT + TT	0,92	0,53	1,59	0,767
***MTHFR* 1298A>C**					
(rs1801131)	AA	Referência			
	TC + CC	0,76	0,44	1,31	0,321
COX-2+8437T>C					
(rs5275)	TT	Referência			
	TC + CC	1,82	1,03	3,2	0,038*
COX-2-1195A>G					
(rs689466)	AA	Referência			
	AG + GG	1,28	0,69	2,36	0,429

Foi utilizada a Regressão Logística. RC: Razão de Chances; IC: Intervalo de Confiança de 95%
*Valor de $p<0,05$

Para o polimorfismo *COX-2+8437T>C*, a presença do alelo C (TC + CC) associou-se a uma chance de 1,82 vezes de desenvolver o câncer do esôfago, com respectivo intervalo de confiança de 95% (p=0,038; IC 1,03 – 3,2).

A regressão logística múltipla, ajustado pelas variáveis sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo, também foi realizada para confirmar a associação independente da presença do alelo polimórfico à suscetibilidade ao câncer do esôfago, para o modelo dominante. Dados na Tabela 13.

Tabela 13. Razões de chances para o Câncer do esôfago entre Casos e Controles comparando os Genótipos Selvagens e Polimórficos. Regressão Logística Múltipla. Modelo Dominante

Genótipo		RC	95% CI		*p*
***MTHFR* 677C>T**					
(RS1801133)	CC	Referência			
	CT + TT	0,99	0,5	1,97	0,971
***MTHFR* 1298A>C**					
(rs1801131)	AA	Referência			
	TC + CC	0,83	0,42	1,64	0,592
COX-2+8437T>C					
(rs5275)	TT	Referência			
	TC + CC	2,44	1,18	5,03	0,016*
COX-2-1195A>G					
(rs689466)	AA	Referência			
	AG + GG	2,03	0,91	4,54	0,087

Foi utilizada a Regressão Logística Múltipla. RC: Razão de Chances; IC: Intervalo de Confiança de 95%.

*Valor de $p<0,05$

Este modelo confirma a associação do polimorfismo *COX-2+8437T>C,* independente das variáveis sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo, e o câncer do esôfago. A presença do alelo C (TC + CC) associou-se a uma chance de 2,44 vezes de desenvolver o câncer de esôfago, com respectivo intervalo de confiança de 95% (p=0,016; IC:1,18-5,03). A relação independente da presença do alelo G do polimorfismo *COX-2-1195A>G* e o câncer do esôfago não foi confirmada no modelo de regressão logística múltipla (p=0,087).

4.5. Análise dos Haplótipos entre Caso e Controle

Para a seleção dos blocos haplotípicos, os valores de D' foram calculados na amostra total de casos e controles, para verificar quais polimorfismos estavam em desequilíbrio de ligação.

4.5.1. Haplótipos dos polimorfismos do *MTHFR*

O valor de D' (0,92) mostra que os polimorfismos rs1801131 (bloco 1) e rs1801133 (bloco 2) encontram-se em desequilíbrio de ligação.

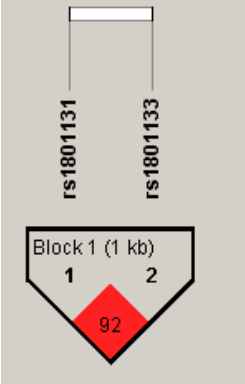

Figura 9. Representação dos blocos de haplótipos dos polimorfismos do *MTHFR* na amostra total de casos e controles. O valor entre parênteses representa o tamanho em kilobases (kb); Dentro do losango o valor de D' em porcentagem.
Fonte: software Haploview 4.2.

4.5.2. Haplótipos dos polimorfismos do *COX-2*

O valor de D' (1,00) mostra que os polimorfismos rs5275 (bloco 1) e rs689466 (bloco 2) encontram-se em desequilíbrio de ligação

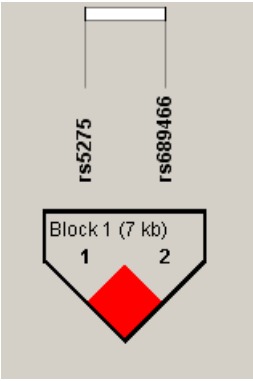

Figura 10. Representação dos blocos de haplótipos dos polimorfismos do *COX-2* na amostra total de casos e controles. O valor entre parênteses representa o tamanho em kilobases (kb)
Fonte: software Haploview 4.2.

4.6. A frequência dos blocos de haplótipos e a suscetibilidade ao câncer de esôfago

Para verificar se há associação dos haplótipos e o câncer do esôfago, foi realizada uma comparação entre as frequências dos blocos haplotípicos

formado pelos polimorfismos do *MTHFR* e do *COX-2* entre os casos e os controles. Dados nas tabelas 14 e 15

Tabela 14. Distribuição da frequência dos haplótipos dos polimorfismos *MTHFR* 677C>T e *MTHFR* 1298A>C entre casos e controles

Blocos de Haplótipos	Frequência (%)	Caso (%)	Controle (%)	X²	*p*
AC	36,8	37	36	0,094	0,76
AT	35,4	36	36	0,059	0,81
CC	27	27	27	0,002	0,96

Teste de associação (teste χ^2) dos haplótipos formados pelo bloco selecionado com o câncer esôfago.

Tabela 15. Distribuição da frequência dos haplótipos dos polimorfismos *COX-2+8437T>C* e *COX-2-1195A>G* entre casos e controles

Blocos de Haplótipos	Frequência (%)	Caso (%)	Controle (%)	X²	*p*
TA	43,7	39	49	4,361	0,03*
CA	41	43,9	37,7	1,664	0,2
TG	15,3	17,1	13,2	1,246	0,26

Teste de associação (teste χ^2) dos haplótipos formados pelo bloco selecionado com o câncer esôfago.
*Valor de $p<0,05$

Não foi encontrada diferença estatística na avaliação dos blocos de haplótipos AC (p=0,76), AT (p=0,81) e CC (p=0,96) formados pelos polimorfismos *MTHFR* 677C>T e *MTHFR* 1298A>C. Dados descritos na Tabela 20.

Na análise dos blocos de haplótipos, formados pelos polimorfismos *COX-2+8437T>C* e *COX-2-1195A>G*, detectou-se diferença de frequência do haplótipo TA entre casos e controles (p=0,037). A presença dos alelos selvagens COX-2+8437T e COX-2-1195A foi mais frequente no grupo controle, como mostra os dados descritos na Tabela 21, relacionado a presença deste haplótipo a um efeito protetor em relação ao câncer do esôfago. Não houve diferença estatística na frequência dos blocos de haplótipos CA (p=0,20) e TG (p=0,26).

Realizou-se a regressão logística simples para confirmar a associação da presença do bloco de haplótipos *COX-2*1195A/*COX2*843C e a suscetibilidade ao câncer de esôfago. Dados apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Razões de chances para o Câncer do esôfago entre Casos e Controles comparando os Blocos de Haplótipos. Regressão Logística Simples

Bloco Háplótipo	**RC**	**95% CI**		***p***
MTHFR 677C/*MTHFR*1298A	Referência			
MTHFR 677C/*MTHFR*1298C	0,76	0,43	1,34	0,345
MTHFR 677T/*MTHFR*1298A	0,88	0,5	1,56	0,668
*COX-2*1195A/*COX2*8437T	Referência			
*COX-2*1195A/*COX2*843C	2,16	1,17	3,99	0,015*
*COX-2*1195G/*COX2*8437T	1,71	0,88	3,34	0,116

Foi utilizada a Regressão Logística Simples. RC: Razão de Chances; IC: Intervalo de Confiança de 95%.
*Valor de $p<0,05$

O haplótipo *COX-2*1195A/*COX2*843C apresentou chance de 2,16 vezes maior de desenvolver o câncer do esôfago, com respectivo intervalo de confiança de 95% ($p=0,015$; IC 1,17– 3,99). Não houve diferença estatisticamente significativa nesta análise dos demais haplótipos.

Foi utilizado também o modelo de regressão logística múltipla, ajustado pelas variáveis sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo, para confirmar a associação independente do bloco haplotípico à suscetibilidade ao câncer do esôfago. Dados na Tabela 17.

Tabela 17. Razões de chances para o Câncer do esôfago entre Casos e Controles comparando os Blocos de Haplótipos. Regressão Logística Múltipla

Bloco Háplótipo	**RC**	**95% CI**		***p***
MTHFR 677C/*MTHFR*1298A	Referência			
MTHFR 677C/*MTHFR*1298C	0,86	0,41	1,79	0,688
MTHFR 677T/*MTHFR*1298A	0,98	0,47	2,04	0,961
*COX-2*1195A/*COX2*8437T	Referência			
*COX-2*1195A/*COX2*843C	3,48	1,58	7,66	0,002*
*COX-2*1195G/*COX2*8437T	3,3	1,35	8,08	0,01*

Foi utilizada a Regressão Logística Múltipla. RC: Razão de Chances; IC: Intervalo de Confiança de 95%.
*Valor de $p<0,05$

A presença do haplótipo *COX-2*1195A*/COX2*843C está relacionada a uma chance de 3,48 vezes maior de desenvolver o câncer do esôfago, com respectivo intervalo de confiança de 95% (*p*=0,002; IC 1,58– 7,66). O haplótipo *COX-2*1195G*/COX2*8437T apresentou 3,30 vezes maior chance de desenvolver o câncer do esôfago, com respectivo intervalo de confiança de 95% (*p*=0,01; IC 1,35– 8,08) conforme modelo de regressão logística múltipla.

4.7. Associação entre os polimorfismos e variáveis demográficas e anatomopatológicas

Verificou-se a distribuição da frequência dos genótipos em relação às variáveis demográficas e clinico-patológicas idade, sexo, etnia, tabagismo, etilismo, tipo histológico e estadiamento tumoral.

Serão mostrados apenas os dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa.

4.7.1. Polimorfismo *MTHFR* 677C>T

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre o polimorfismo *MTHFR* 677C>T e as variáveis de sexo, idade, etnia, etilismo, tabagismo, tipo histológico e estádio tumoral.

4.7.2. Polimorfismo *MTHFR* 1298A>C

Encontrou-se tendência a diferença estatística em análise da frequência do polimorfismo *MTHFR* 1298A>C em relação ao tabagismo, na análise do modelo dominante. Dados na Tabela 18.

Tabela 18. Distribuição das frequências genotípicas em relação às variáveis demográficas e clinico-patológicas

MTHFR 1298A>C		Genótipo				Modelo Dominante		
Variável	Categoria	AA	AC	CC	*p*	AA	AC + CC	*p*
Tabagismo	Nunca Fumou	12 (85,71)	2 (14,29)	0 (0)	0,208	12 (85,71)	2 (14,29)	0,051*
	Ex-tabagista	20 (48,78)	14 (34,15)	7 (17,07)		20 (48,78)	21 (51,22)	
	Tabagista Ativo	27 (58,70)	13 (28,26)	6 (13,04)		27 (58,70)	19 (41,30)	

Foi utilizado o teste exato de Fisher
*Valor de *p*<0,10

Indivíduos do genótipo *MTHFR* 1298AA são mais frequentes entre os que nunca fumaram e os tabagistas ativos (*p*=0,051).

4.7.3. Polimorfismo *COX-2+8437T>C*

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre o polimorfismo *COX-2+8437T>C* e as variáveis de sexo, idade, etnia, etilismo, tabagismo, tipo histológico e estádio tumoral.

4.7.4. Polimorfismo *COX-2-1195A>G*

Encontrou-se tendência a diferença estatística em análise da frequência do polimorfismo *COX-2-1195A>G* em relação à etnia, na análise do modelo dominante. Dados na Tabela 19.

Tabela 19. Distribuição das frequências genotípicas em relação às variáveis demográficas e clinico-patológicas. Modelo Dominante

COX-2-1195A>G		Genótipo				Modelo Dominante		
Variável	Categoria	AA	AG	GG	*p*	AA	AG + GG	*p*
Etnia	Branco	50 (64,94)	22 (28,57)	5 (6,49)	0,092	50 (64,94)	27 (35,06)	0,063*
	Não-Branco	27 (84,38)	5 (15,62)	0 (0)		27 (84,38)	5 (15,62)	

Foi utilizado o teste exato de Fisher
*Valor de *p*<0,10

Indivíduos do genótipo *COX-2-1195AA* são mais frequentes entre os de etnia não-branco (*p*=0,063).

4.8. Análise da Sobrevida Global

Realizou-se a análise por meio da regressão de Cox e pelo método de Kaplan-Meier, aplicada a cada um dos polimorfismos para o grupo com câncer do esôfago, para verificar quais estão associadas à sobrevida global.

O resultado da análise de regressão logística univariável permitiu determinar a razão de risco de óbito pela doença, com intervalo de confiança de 95%. A regressão de Cox múltipla foi realizada, ajustada pelas variáveis sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo, para identificar a associação independente dos polimorfismos e o risco de óbito por câncer do esôfago, com intervalo de confiança de 95%. Serão mostrados apenas os dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa.

A mediana da sobrevida global dos pacientes operados por câncer do esôfago foi de 23 meses, sendo que 62 (56,88%) pacientes foram a óbito devido ao câncer de esôfago.

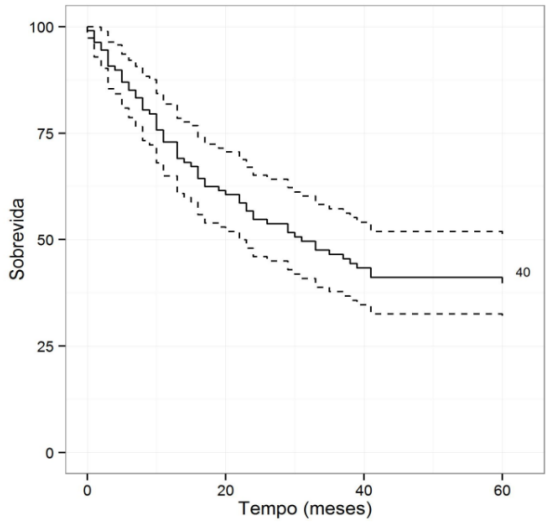

Figura 11. Curva de Sobrevida pelo método de Kaplan-Meier dos indivíduos com câncer do esôfago, grupo de casos (n=109)

Em relação ao estádio pTNM, (agrupados em os estádios I/II e estádios III/IV), houve diferença estatisticamente significativa, os indivíduos com a doença mais avançada apresentaram pior sobrevida global (*p*=0,01).

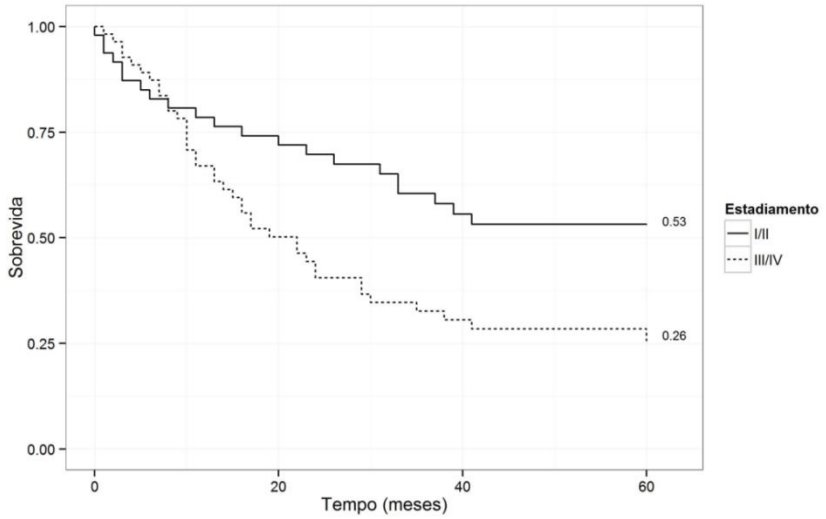

Figura 12. Curva de Sobrevida de Kaplan-Meier comparando o estádio pTNM (n=103) (*p*=0,01).

Utilizou-se a regressão simples de Cox para avaliar a razão de risco de óbito pela doença dentre os genótipos estudados, para o modelo de análise por genótipos e para o modelo dominante, não foi encontrada diferença estatística, como mostra a Tabela 20.

Tabela 20. Razão de Risco de Óbito em relação aos Genótipos

Genótipos		**RR**	**95% IC**		***p***		**RR**	**95% IC**		***p***
***MTHFR* 677C>T**										
(RS1801133)	CC	Referência				CC	Referência			
	CT	0,94	0,55	1,63	0,833	CT + TT	1,32	0,76	2,31	0,33
	TT	1,62	0,78	3,36	0,198					
***MTHFR* 1298A>C**										
(rs1801131)	AA	Referência				AA	Referência			
	AC	1,02	0,59	1,78	0,934	AC + CC	0,94	0,57	1,55	0,8
	CC	0,76	0,34	1,71	0,508					
COX-2+8437T>C										
(RS5275)	TT	Referência				TT	Referência			
	TC	1,18	0,65	2,14	0,591	TC + CC	1,32	0,76	2,31	0,33
	CC	1,74	0,87	3,49	0,117					
COX-2-1195A>G										
(rs689466)	AA	Referência				AA	Referência			
	AG	0,79	0,43	1,47	0,46	AG + GG	0,73	0,41	1,31	0,3
	GG	0,5	0,12	2,05	0,333					

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

Realizou-se a regressão logística múltipla, para os modelos genótipo e dominante, ajustada pelas variáveis sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo. Dados na Tabela 21.

Tabela 21. Razão de Risco de Óbito em relação aos Genótipos. Regressão logística múltipla ajustada pelas variáveis sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo

Genótipos		**RR**	**95% IC**		***p***		**RR**	**95% IC**		***p***
***MTHFR* 677C>T**										
(RS1801133)	CC	Referência				CC	Referência			
	CT	1,15	0,64	2,06	0,643	CT + TT	1,35	0,79	2,31	0,272
	TT	2,22	1,02	4,83	0,045*					
***MTHFR* 1298A>C**										
(rs1801131)	AA	Referência				AA	Referência			
	AC	1	0,52	1,95	0,992	AC + CC	0,79	0,43	1,45	0,451
	CC	0,5	0,2	1,27	0,145					
COX-2+8437T>C										
(RS5275)	TT	Referência				TT	Referência			
	TC	1,16	0,61	2,21	0,647	TC + CC	1,13	0,61	2,1	0,707
	CC	1,03	0,46	2,31	0,938					
COX-2-1195A>G										
(rs689466)	AA	Referência				AA	Referência			
	AG	1,06	0,55	2,06	0,852	AG + GG	1,06	0,56	2,02	0,853
	GG	1,04	0,23	4,8	0,96					

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

*Valor de $p<0,05$

Houve diferença estatisticamente significativa do polimorfismo *MTHFR* 677C>T. Para indivíduos do genótipo homozigoto polimórfico *TT* há o risco de óbito pela doença de 2,22 maior do que para os indivíduos com genótipo selvagem *MTHFR* 677CC (referência) (p=0,045; RR=2,22; IC: 1,02 - 4,83).

A curva de sobrevida, calculada pelo método de Kaplan-Meier, comparando os três genótipos do polimorfismo *MTHFR* 677C>T não mostrou diferença estatística na sobrevida global para os pacientes com câncer do esôfago (p= 0,32).

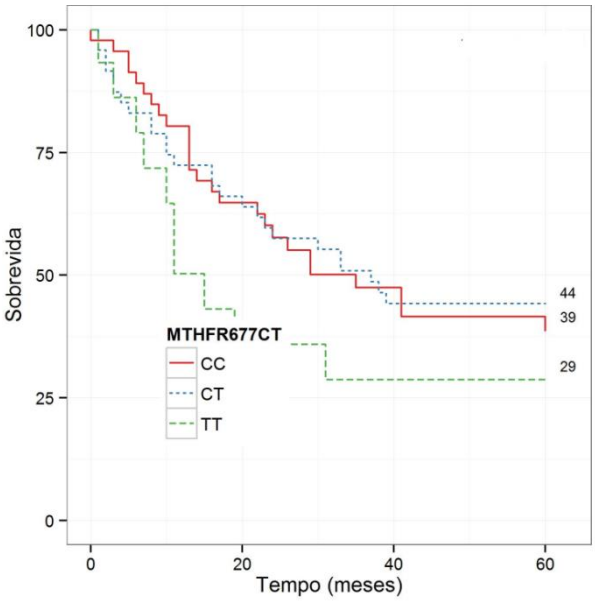

Figura 13. Curva de Sobrevida pelo método de Kaplan-Meier dos indivíduos com câncer do esôfago, grupo de casos (n=109) (*p*= 0,32)

Os modelos de regressão de Cox foram utilizados para estimar a associação dos blocos haplotípicos e o risco de morte por câncer de esôfago, como mostram os dados na Tabela 22.

Tabela 22. Razão de Risco de Óbito em relação aos blocos de haplótipos

Sobrevida global							
	Regressão Simples				**Regressão Logística Múltipla**		
Bloco Háplótipo		**95% IC**		***p***	**95% IC**		***p***
MTHFR 677C/*MTHFR*1298A	Referência						
MTHFR 677C/*MTHFR*1298C	0,372	0,68	1,86	0,64	0,67	1,99	0,61
MTHFR 677T/*MTHFR*1298A	0,358	0,72	2,04	0,47	0,76	2,43	0,3
*COX-2*1195A/*COX2*8437T	Referência						
*COX-2*1195A/*COX2*843C	0,44	0,56	1,64	0,89	0,58	1,86	0,9
*COX-2*1195G/*COX2*8437T	0,39	0,58	1,68	0,96	0,54	1,7	0,88

Os resultados são expressos em razão de risco (RR) intervalo de confiança de 95%(IC). Foram utilizadas a regressão simples de Cox e a regressão múltipla de Cox.

Não houve relação estatisticamente significativa entre os blocos haplotípicos e o risco de óbito por câncer de esôfago.

5 DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os objetivos deste estudo foram investigar a frequência dos polimorfismos em pacientes com câncer de esôfago, a distribuição dos genótipos e haplótipos entre casos e controles e associá-los aos fatores clínicos, epidemiológicos e patológicos.

Realizou-se um estudo caso-controle, no qual os casos foram constituídos por pacientes operados por câncer do esôfago e os controles por pacientes sem histórico individual ou familial de câncer, que não apresentavam doenças associadas ao câncer de esôfago.

A distribuição das frequências dos genótipos, alelos e haplótipos foi avaliada entre casos e controles, para verificar se havia alguma associação ao câncer do esôfago. Analisou-se ainda a associação entre os SNPs estudados e os fatores clínicos, epidemiológicos, patológicos e a sobrevida global a fim de identificar, dentre os polimorfismos selecionados, quais poderiam ser úteis como marcadores de prognóstico do câncer de esôfago, e a magnitude da associação pelo cálculo da razão de chances e significância, com intervalos de confiança.

5.1. Dados Demográficos analisados nos grupos Caso e Controle

A maioria dos indivíduos com câncer do esôfago, grupo de casos, foi do sexo masculino (84,40%), com média de idade, no momento operatório, de 60,66 anos. Segundo dados do INCA, a incidência desta doença é bem maior em homens, mais que o dobro da incidência em mulheres e possui maior frequência após os 50 anos de idade. Outro estudo nacional mostrou resultado similar, com 75,8% de homens e maior incidência entre os 60 e 70 anos de idade. (INCA, 2014; CORAL et al, 2015)

A maioria dos indivíduos do grupo de casos é de etnia branca (70,64%), dado que foi coletado de prontuários médicos, baseados na declaração dos próprios pacientes. Conforme a literatura, o câncer do esôfago é mais prevalente em asiáticos, em países como China e Japão, e no Sudeste da África (LEHRBACH; NITA; CECCONELLO, 2003; LANGEVIN et al, 2009).

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

Observou-se diferença em relação ao etilismo entre os grupos de casos e controles, fator relacionado ao risco de câncer do esôfago. O hábito de consumo de bebida alcoólica foi mais prevalente entre os indivíduos com câncer do esôfago, onde 34,31% declararam consumir bebidas alcoólicas e 48,04% disseram que consumiram apenas no passado.

A prevalência do hábito de fumar também foi diferente entre o grupo de casos e controles, dentre os indivíduos com câncer do esôfago, 40,59% disseram ser ex-tabagistas e 45,54% tabagistas ativos.

O alto índice de consumo e álcool e tabaco é comum dentre os indivíduos com câncer do esôfago (LANGEVIN et al, 2009; CORAL et al 2015). Jing et al (2012) mostrou que 17% dos indivíduos com câncer do esôfago consumem álcool em excesso, 41% consomem moderadamente e 29% nunca beberam. Em relação ao tabagismo, 15% são fumantes de consumo intenso, 32,9% fumam moderadamente e 42,4% nunca fumaram. (JING et al, 2012).

Um estudo realizado com pacientes da região sul do Brasil mostrou que, dentre os pacientes com câncer de esôfago, 89% eram tabagistas e 71,8% eram etilistas. (Kaercher et al, 2014).

O consumo de álcool e tabaco apresenta efeito sinérgico para o risco de câncer do esôfago, o qual é atribuído a principal causa desta neoplasia, sobretudo na Europa e nos Estados Unidos. (TABOR et al, 2012; LIANG et al, 2011).

Algumas bebidas são relacionadas à maior incidência de câncer do esôfago que outras, não apenas pelo teor alcoólico, mas também pelas quantidades significativas de carcinógenos, como os hidrocarbonetos policíclicos, nitrosaminas e outros compostos mutagênicos. (TABOR et al, 2012; LIANG et al, 2011).

Neste estudo, não foi possível avaliar a relação dose/resposta, devido à grande variedade dos dados em relação ao pequeno tamanho amostral.

Em relação ao tipo histológico, a maioria foi do tipo Carcinoma Epidermóide de Células Escamosas (CEC) 60,55%, e 39,45% foi do tipo Adenocarcinoma (ADENO), os dados da literatura também mostram maior incidência do tipo histológico carcinomas de células escamosas (CEC) e adenocarcinomas. (INCA, 2014; BADREDDINE; WANG; BARRETT, 2010; LEWIS; SMITH, 2005), embora o adenocarcinoma é mais incidente em algumas regiões mais desenvolvidas e teve um importante aumento na última década (LEWIS; SMITH, 2005; BADREDDINE; WANG; BARRETT, 2010; LIANG et al, 2011; TABOR; RISCH; MYERS, 2002).

Apenas 10,10% dos pacientes apresentavam tumores precoces do momento da operação (estádio I), a maioria, 45,63%, apresentava tumor avançado (estádio III), dados que acordam com a literatura, o qual a maioria

dos pacientes apresentaram tumores T3. Segundo Coral et al (2015) o câncer do esôfago geralmente é diagnosticado já na fase avançada da doença, seja por sintomas tardios ou por atraso no tratamento oferecido pelo sistema público de saúde. (ZHANG et al, 2005; LIU et al 2011; CORAL et al 2015).

A mediana da sobrevida global foi de 23 meses, os dados da literatura corroboram a baixa sobrevida desta neoplasia, geralmente inferior a 10% em cinco anos (BRAY et al, 2012; FERLAY et al, 2014). Em países desenvolvidos, a sobrevida global em 5 anos é de 17% em países desenvolvidos (LANGEVIN et al, 2009).

Nesta casuística 56,68% do pacientes foram a óbito pelo câncer de esôfago, os dados da literatura mostram alta mortalidade desta doença, chegando a 94,3% (CORAL et al, 2015)

5.2. Seleção do Método de Genotipagem

Vários métodos estão disponíveis para genotipagem de SNPs, a escolha do método de Genotipagem por *TaqMan* ® para este estudo foi realizada levando-se em consideração o rendimento e a sensibilidade do ensaio, pois por se tratar de um estudo retrospectivo, havia pequena quantidade de DNA extraído disponível. Este método utiliza apenas 1,0 µL contendo 10 ng de DNA é necessário para a análise.

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

5.3. Distribuição da frequência dos polimorfismos entre casos e controles.

Para garantir a qualidade das análises, foram selecionados na literatura SNPs validados e bem documentados, os quais a frequência de alelos

menores (MAF) fosse maior que 10% na população estudada (maioria de etnia branca) e que possam ter relação com o risco de câncer de esôfago. Os casos e controles foram pareados conforme sexo, etnia e idade e a genotipagem foi repetida em 20% das amostras de pacientes e controles, com resultado de 100% de similaridade.

Um pré-requisito para estudos de associação de SNPs é verificar se as amostras estudadas obedecem ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ocorrer devido à endogamia, mutação, erro na estratificação da população, ou seleção natural e podem resultar em associações não condizentes com a realidade. (SINGLE et al, 2002)

Em estudo de caso-controle o equilíbrio de Hardy-Weinberg deve ser avaliado nos grupos caso e controle separadamente e em ambos os grupos, pois os polimorfismos relacionados ao fenótipo do caso podem não estar em equilíbrio. (SINGLE et al, 2002)

O polimorfismo rs5275 apresentou desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle, talvez pela heterogeneidade genética da população deste estudo. Porém, considerando a amostra total (casos e controles), este polimorfismo obedece ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Portanto, foi mantida a análise de comparação entre casos e controles deste polimorfismo.

Segundo Single (2002) desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg conduzem a uma perda na precisão da estimativa, portanto, os resultados deste polimorfismo devem ser vistos com cautela. (SINGLE et al, 2002)

O presente estudo investigou quatro polimorfismos de dois genes candidatos a marcadores genéticos para o risco do câncer de esôfago, em 109 pacientes operados por câncer de esôfago, comparados a 102 controles.

5.4. Os Polimorfismos do Gene da Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR)

A deficiência de folato e a alteração da atividade da enzima MTHFR estão associadas ao aumento do risco de câncer do esôfago pelo aumento da suscetibilidade a mutações, danos e metilação aberrante do DNA. (STOLZINBERG-SOLOMON et al, 2003; YANG et al, 2005; LU et al, 2011; JING et al, 2012).

Os genes polimórficos podem estar envolvidos no metabolismo de determinados alimentos ou toxinas, resposta inflamatória, interação medicamentosa, entre outros. (BROOKERS, 1999)

Os polimorfismos selecionados para análise deste estudo, *MTHFR* 677C>T e *MTHFR* 1298A>C, estão localizados na região codificadora do gene, são associados à diminuição importante da atividade enzimática. (MIAO et al, 2002)

Em pacientes com câncer do esôfago a frequência dos genótipos do polimorfismo *MTHFR* 677C>T foi de CC de 42,20%, CT de 44,04% e TT 13,76%. Na literatura, a frequência dos alelos C677T mostrou variação entre as diferentes etnias. Em chineses a frequência entre indivíduos com câncer do esôfago foi de CC 18,3%, CT de 42,9% e TT 38,8%, (STOLZENBERG-SOLOMON et al, 2002**)** Entre os japoneses, a distribuição das frequências dos genótipos foram mais similares a este estudo, com CC 38,2%, CT de 49,7% e TT 12,1% (YANG et al, 2005), dentre os norte americanos com câncer do esôfago a frequência do genótipo TT foi de 6,5%. (LARSSON, 2006).

Em relação ao polimorfismo *MTHFR* 1298A>C, a distribuição das frequências dos genótipos neste estudo foi de AA 57,8%, AC 30,28% e CC 11,93%, achados bem diferentes se comparados com indivíduos japoneses

com câncer do esôfago AA 74,3% AC 24,2 % CC 1,4% (STOLZENBERG-SOLOMON et al, 2002**).** Entre os norte americanos, a frequência do genótipo CC foi de 12,9% (LARSSON, 2006)

Não foi observada diferença na distribuição das frequências dos genótipos, alelos ou haplótipos entre casos e controles para os polimorfismos *MTHFR* 677C>T e *MTHFR* 1298A>C, Cheng Lu et al (2011) também não observou-se relação entre o polimorfismo *MTHFR* 677C>T e o câncer do esôfago em chineses, mas nesta mesma população, Stolzenberg-Solomon et al (2003), Miao et al (2002) e Larsson et al (2006) observaram que há uma associação significativa entre o genótipo *MTHFR 677TT* e o câncer do esôfago, o que sugere que o efeito deste polimorfismo pode variar conforme a etnia. Larsson et al (2006) não encontraram relação do polimorfismo *MTHFR* 1298A>C como risco de câncer de esôfago, Stolzenberg-Solomon et al (2003) também não encontraram associação deste polimorfismo com o câncer do esôfago em chineses. (MIAO et al, 2002; STOLZENBERG-SOLOMON et al, 2003; LARSSON et al, 2006; CHENG LU et al, 2011)

Discrepâncias encontradas entre os resultados nos diversos estudos sugerem que a presença de outros fatores pode modular o comportamento do polimorfismo, como exposição ao álcool, tabaco e a grande variação genética entre diferentes etnias. (LIANG et al, 2011; CANOVA et al, 2009).

A distribuição das frequências dos polimorfismos também foi relacionada aos dados clínicos, epidemiológicos e patológicos dos pacientes com câncer de esôfago.

Não foi encontrada associação entre os polimorfismos *MTHFR* 677C>T e *MTHFR* 1298A>C e o câncer do esôfago dentre os indivíduos etilistas.

Em relação ao tabagismo, não foi encontrada associação entre os polimorfismos *MTHFR* 677C>T. Mas em relação ao polimorfismo *MTHFR* 1298A>C, os resultados deste estudo mostraram que os indivíduos do genótipo selvagem AA são mais frequentes dentre os pacientes com câncer do esôfago que nunca fumaram e tabagistas ativos, o que não mostra uma associação deste polimorfismo com o hábito de fumar. Os dados da literatura também não mostraram relação entre o polimorfismo *MTHFR* A1298C, o hábito de fumar e o câncer de esôfago, entretanto, são poucos os estudos na literatura com este polimorfismo e o número de pacientes no genótipo CC é muito pequeno, o que limita as discussões com estes resultados. (STOLZENBERG-SOLOMON et al, 2003)

Alguns estudos sugerem que a relação entre o polimorfismo MTHFR C677T e o câncer do esôfago pode ser modificado pelo consumo de álcool e tabaco, pois interferem no seu metabolismo. (LARSSON et al, 2006)

Um estudo com 165 participantes de origem japonesa mostrou que há associação entre o genótipo MTHFRTT e o consumo excessivo de álcool. (YANG et al. 2005). Esta relação deve-se pelo fato do álcool inibir a síntese de metionina mediada por folato, e que pode interromper processos de metilação, induzindo a hipometilação de DNA na mucosa esofágica. (YANG et al. 2005; TAVAN et al, 2012). Além disso, o álcool tem efeito antagônico ao folato, através da redução de sua absorção. (LARSSON et al, 2006).

O consumo de tabaco tem mostrado como responsável pela transformação de folato e coenzimas B12 em um produto biologicamente inativado, o álcool atua como antagonista do folato, resultando na diminuição da sua absorção e aumento da excreção. (LARSSON et al, 2006).

Langevin et al (2009) descreve associação do genótipo *MTHFR* 677TT dentre os etilistas e fumantes e o câncer do esôfago e Stolzenberg-Solomon et al (2003) relatou associação entre o polimorfismo MTHFR 677TT, em indivíduos que consumiam álcool por pelo menos 12 meses, com o adenocarcinoma de esôfago. LARSSON et al (2006) relatou que a presença do alelo C em etilistas e fumantes teve relação com o câncer de esôfago. Yang et al (2005) encontrou relação deste polimorfismos com o câncer do esôfago em indivíduos tabagistas. (STOLZENBERG-SOLOMON et al, 2003; LARSSON et al, 2006; LANGEVIN et al, 2009)

Os resultados conflitantes ente o presente estudo e a literatura sobre a correlação do polimorfismo da *MTHFR*, o consumo de álcool e tabaco e o câncer do esôfago pode ser devido à relação da dose e da frequência da exposição a estas substâncias. (LANGEVIN et al, 2003)

Os fatores dietéticos e seus efeitos também devem ser considerados, a dieta pobre em folato associada aos polimorfismos da MTHFR aumenta o risco para o câncer do esôfago, por outro lado, indivíduos que apresentam níveis de folato séricos adequados adquirem uma insensibilidade aos efeitos promovidos pelo genótipo MTHFR 677TT. (LANGEVIN et al, 2003)

Indivíduos com o genótipo polimórfico homozigoto *MTHFR* 677TT apresentaram maior risco de óbito pela doença, pela análise de regressão logística múltipla ajustada pelas variáveis sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo. Cheng Lu et al (2011) não observaram nenhum efeito do polimorfismo MTHFR C677T e a sobrevida global em indivíduos com carcinoma epidermóide na população chinesa. (CHENG LU et al; 2011)

Jing et al (2012) relataram maior risco de morte por câncer do esôfago em indivíduos do genótipo MTHFR 677TT, relatou que este resultado se deve, provavelmente, devido a dois mecanismos, o primeiro pela alteração do processo normal de metilação e o segundo pela desequilíbrio dos níveis de precursores do DNA, o que leva a síntese aberrante, instabilidade do DNA. (JING et al, 2012)

Maior concentração de 5,10-metileno-THF, resultante do genótipo MTHFR 677TT, pode ter efeito sobre a sobrevida de pacientes com câncer do esôfago, devido a resposta das células tumorais para os pacientes que receberam tratamento neoadjuvante com 5-fluorouracil (5-FU), (JING et al, 2012), mas na casuística do presente estudo, os pacientes que realizaram tratamento neoadjuvante foram excluídos, por isso esta relação não foi considerada.

A relação entre o polimorfismo MTHFR C677T e o câncer do esôfago deve-se, provavelmente, à metilação aberrante do DNA. Dados da literatura mostram que a metilação do DNA genômico é menor em indivíduos do genótipo MTHFR 677TT, se comparado com indivíduos do genótipo MTHFR 677CC e esta diferença também teve relação entre os níveis de folato na circulação sanguínea. (EADS et al, 2001; LARSSON et al, 2006)

A hipometilação sistêmica e local do DNA foi identificada em vários tipos de cânceres, o que induz a ativação de protooncogenes e instabilidade do cromossomo, a hipermetilação está associada ao silenciamento da expressão de genes supressores de tumor. Como enzima chave no processo de

metabilismo do folato, a MTHFR pode ter papel importante no prognóstico do câncer do esôfago. (JING et al, 2012; CHENG et al 2014)

Os resultados conflitantes entre os achados deste estudo e a literatura podem ter ocorrido pelo fato de que há outros fatores devem influenciar na atividade da enzima MTHFR e no metabolismo do folato. (JING et al, 2012)

5.5. Os Polimorfismos do Gene da Enzima Ciclooxigenase-2 (COX-2)

A inflamação crônica tem papel fundamental em diversos estágios no desenvolvimento, progressão e resposta ao tratamento do câncer em humanos, particularmente do aparelho digestivo. (ZHANG et al, 2005; UPADHYAY et al, 2009)

A enzima COX-2 é fundamental na conversão de ácido araquidônico a livre em prostaglandina H2, importante regulador de diversos processos biológicos, tais como a inflamação. A sua expressão é regulada por complexa via de sinais de transdução que envolve a interação de várias proteínas nucleares. (SUBBARAMAIAH et al, 2003)

A região promotora do gene da enzima COX-2 desempenha papel decisivo na sua atividade de transcrição, através da alteração da capacidade de ligação proteínas moduladora, por isso, para este estudo, selecionou-se o polimorfismo *COX-2*–1195A>G (rs689466) localizado nesta região e associado a maior atividade de transcrição deste gene. (ZHANG et al, 2005)

Mecanismos pós-transcricional podem influenciar na estabilidade do RNAm de COX-2, assim, é possível que polimorfismos na região reguladora 3'UTR possam contribuir para a expressão diferencial de COX-2. O polimorfismo COX-2+8473 T>C (rs5275) localizado nesta região funcional foi escolhido para as investigações deste estudo. (ZHANG et al, 2005)

Em pacientes com câncer do esôfago as frequências dos genótipos do polimorfismo encontradas neste estudo foram: COX-2+8473 T> C foi de TT de 30,28%, TC de 51,38% e CC 18,35%. Resultados similares foram encontrados em um estudo na Índia, em que a frequência dos genótipos foi de TT 38.8%, TC de 49.6% e CC 11,6%. (UPADHYAY et al, 2009**)** Entre caucasianos europeus, a distribuição da frequência dos genótipos foi próxima a encontrada neste estudo, TT 34,9%, TC de 50,71% e CC 14,35%. (LIANG et al, 2011).

Em relação ao polimorfismo *COX-2*–1195A>G, a distribuição das frequências dos genótipos neste estudo foi de AA 70,64%, AG 24,77% e GG 4,59%, Os dados das frequências destes polimorfismos na literatura são conflitantes entre as diferentes etnias, entre os indianos, a frequência foi de 12.6%, 45.0%, e 42.4%, para os genótipos GG, GA e AA respectivamente, dentre os chineses, as frequências foram de GG 16,6%, GA 52,9% e AA 30,5%. (ZHANG et al, 2005), Entre os caucasianos europeus, a frequência dos genótipos foi mais próxima dos achados deste estudo, com GG 59,28%, GA 38,57% e AA 2,14%. (LIANG et al, 2011).

Este estudo não detectou associação entre o polimorfismo *COX-2*–1195A>G e o câncer de esôfago, porém, observou-se tendência à associação significativa do polimorfismo *COX-2*+8473T>C e o câncer de esôfago, indivíduos portadores do genótipo heterozigoto polimórfico *COX-2+8437TC* apresentam 2,06 vezes maior chance para o desenvolvimento da doença, em relação aos indivíduos do genótipo homozigoto selvagem *COX-2+8437TT.* Houve também diferença estatística na análise do modelo dominante, o que indica associação da presença alelo C ao câncer de esôfago. Ferguson et al (2008) relataram que há relação entre o alelo *COX-2* 8473C e a suscetibilidade

ao adenocarcinoma de esôfago. Já Upadhyay et al (2009) não encontraram associação deste alelo ao câncer do esôfago, mesmo comparando aos diferentes tipos histológicos. (Ferguson et al, 2008; Upadhyay et al, 2009)

Na análise dos blocos de haplótipos, a presença dos alelos selvagens COX-2+8437T e COX-2-1195A mostrou-se protetora para o câncer de esôfago, por outro lado, indivíduos do genótipo *COX-2*1195A/*COX2*843C e *COX-2*1195A/*COX2*843C apresentam maior chance de desenvolver o câncer de esôfago. O modelo de regressão logística múltipla confirmou a associação independente destes haplótipos à suscetibilidade ao câncer de esôfago.

Um estudo que incluiu 174 pacientes concluiu que houve relação entre indivíduos do genótipo COX-2-1195AG com carcinoma epidermóide de esôfago (UPADHYAY et al, 2009), Zhang et al. (2005) relataram que ao presença do alelo COX-2-1195G foi significativamente associada com o aumento do risco de carcinoma esofágico na população chinesa, Kristinsson et al (2009) indicaram os genótipos COX-2-1195 AG e COX-2-1195 GG podem resultar em maior chance de desenvolver o adenocarcinoma esofágico. (ZHANG et al, 2005; UPADHYAY et al, 2009)

Em relação à associação da frequência dos polimorfismos e os dados clínicos, epidemiológicos e patológicos, no presente estudo, houve maior prevalência de indivíduos do genótipo homozigoto polimórfico *COX-2*-1195AA entre os de etnia não-branco. Uma revisão sistemática, com metanálise, incluiu 9.482 casos 12.206 controles, de 25 estudos caso-controle, verificou que a presença do alelo *COX-2*-1195G aumenta o risco de câncer do esôfago apenas na população asiática. (TANG et al, 2011). A variação do efeito do polimorfismo em relação à doença entre diferentes populações deve ser considerada.

Realizou-se a avaliação da frequência dos polimorfismos da enzima COX-2 nos diferentes tipos histológicos, já que o adenocarcinoma e o CEC possuem etiologias diferentes, mas não houve diferença estatisticamente significativa. Em contrapartida, um estudo caso-controle (com 1.026 pacientes e 1.270 controles) mostrou que a presença do alelo *COX-2*-1195A aumenta a chance para o carcinoma epidermóide de esôfago. (BURKHARD et al, 2005), ao contrário do resultado encontrado no estudo caso-controle realizado por Zhang et al (2005) em chineses, que concluiu que a presença do alelo *COX-2*-1195G foi significativamente associada ao risco de carcinoma epidermóide. Entretanto, o estudo de Kristinsson et al (2009) indicou que a presença do alelo *COX-2*-1195G resulta em maior chance para o adenocarcinoma. (BURKHARD et al, 2005; ZHANG et al, 2005; KRISTINSSON et al, 2009)

Não foram encontrados dados na literatura que mostrassem associação dos haplótipos formados pelos polimorfismos *COX-2*–1195A>G e COX-2+8473 T>C e o câncer do esôfago, porém, estudo realizado na Índia mostrou a relação entre o haplótipo COX2−1195A/COX2−765C e o CEC do esôfago. (UPADHYAY et al, 2009). Outro estudo associou a presença do haplótico COX-2-765C/COX2-1195A ao adenocarcinoma esofágico, proveniente do esôfago de Barrett. (MOONS et al, 2007).

Os achados deste estudo comparados aos dados da literatura sugerem que a inflamação crônica, induzida pelo aumento da expressão da COX-2, tem papel importante na carcinogênese esofágica. (MOONS et al, 2007). Entretanto, as associações dos polimorfismos da enzima COX-2 encontradas na literatura foram inconsistentes nas diferentes populações, o que sugere efeitos específicos em diferentes etnias. (UPADHYAY et al, 2009)

5.6. Limitações deste Estudo

O número do tamanho da amostra é pequeno, portanto, pode interferir no poder estatístico dos resultados observados. Além disso, trata-se de um estudo caso-controle, o qual os dados foram coletados retrospectivamente de prontuários, laudos de exames e questionários. Algumas variáveis foram declaradas pelos pacientes, como etnia, tabagismo e alcoolismo.

Outro ponto a considerar é a grande miscigenação da população deste estudo, o qual seria talvez indicado realizar uma investigação de marcadores de ancestralidade genética.

O polimorfismo *COX-2+8437T>C* do grupo controle não se apresentou em equilíbrio de Hardy-Weinberg (p<0,05), mas o grupo dos pacientes com câncer do esôfago e a soma dos dois grupos apresentaram-se em equilíbrio, portanto, optou-se por considerar os resultados das análises deste polimorfismo, mas devem ser observados com cautela, já que o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg pode apresentar uma perda da precisão da estimativa.

Além disso, este estudo não avaliou o consumo adequado de folato, a metilação sistêmica e local do DNA, e o uso de drogas inibidoras de COX-2, fatores que poderiam influenciar nos resultados aqui apresentados.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

A frequência dos polimorfismos em pacientes com câncer do esôfago foram respectivamente *MTHFR* 677CC 42,2%, *MTHFR* 677CT 44,04%, *MTHFR* 677TT 13,76%, *MTHFR* 1298AA 57,8%, *MTHFR* 1298AC 30,28%, *MTHFR* 1298CC 11,93%, *COX-2+8437TT* 30,28%, *COX-2+8437TC* 51,38%, *COX-2+8437CC* 18,35%, *COX-2-1195AA* 70,64%, *COX-2-1195AG* 24,77% e *COX-2-1195GG* 4,59%.

A presença do alelo COX-2+8437C apresentou associação ao câncer do esôfago.

A presença dos haplótipos *COX-2*-1195A/COX-2+8437C e *COX-2*1195G/*COX2*8437T associou-se a maior chance de desenvolvimento do câncer do esôfago.

Indivíduos do genótipo homozigoto polimórfico *MTHFR*677TT apresentaram maior risco de óbito pela doença.

6. REFERÊNCIAS BIBILOGRÁFICAS

Badreddine RJ, Wang KK. Barrett esophagus: an update. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010 Jul;7(7):369-78. Epub 2010 Jun 1.

Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. (2005). "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps". Bioinformatics 21 (2): 263–5.doi:10.1093/bioinformatics/bth457. PMID 15297300

Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. Int J Cancer. 2013 Mar 1;132(5):1133-45. doi: 10.1002/ijc.27711. Epub 2012 Jul 26.

BROOKES, AJ. The essence of SNPs. Gene. 1999 Jul 8;234(2):177-86.

Butler LM, Sinha R, Milikan RC, Martin CF, Newman B, Gammon MD, Ammerman AS, Sandler RS. Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study. Am J Epidemiol 2003, 157:434-45.

Canova C, Hashibe M, Simonato L, et al. Genetic associations of 115 polymorphisms with cancers of the upper aerodigestive tract across 10 European countries: the ARCAGE project. Cancer Res. 2009 Apr 1;69(7):2956-65.

Cheng CP, Kuo IY, Alakus H, Frazer KA, Harismendy O, Wang YC, Tseng VS. Network-based analysis identifies epigenetic biomarkers of esophageal squamous cell carcinoma progression. Bioinformatics. 2014 Nov 1;30(21):3054-61. doi: 10.1093/bioinformatics/btu433. Epub 2014 Jul 10.

Coral RV, Bigolin AV, Coral RP., Hartmann A, Dranka C, Roehe AV. Índice de metástase linfonodal da 6a ou 7a edição do AJCC: qual é a melhor classificação linfonodal para o câncer de esôfago? Uma análise de fatores prognósticos em 487 pacientes. ABCD, arq. bras. cir. dig. [Internet]. 2015 June [cited 2015 Nov 02] ; 28(2): 94-97.

De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. Mutat Res. 2005 Jun 3;573(1-2):111-35.

Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 30-untranslated region. J Biol Chem, 275(16):11750–11757, 2000.

Dong J, Dai J, Zhang M, Hu Z, Shen H. Potentially functional COX-2-1195G>A polymorphism increases the risk of digestive system cancers: a meta-analysis. J Gastroenterol Hepatol. 2010 Jun;25(6):1042-50.

Druesne-Pecollo N, Tehard B, Mallet Y, Gerber M, Norat T, Hercberg S, Latino-Martel P. Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. Lancet Oncol. 2009 Feb;10(2):173-80.

Eads CA, Nickel AE, Laird PW. Complete genetic suppression of polyp formation and reduction of CpG-island hypermethylation in Apc(Min/+) Dnmt1-hypomorphic Mice. Cancer Res. 2002 Mar 1;62(5):1296-9.
esophagitis, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 17 (2008) 727–731.

Fahey PP, Mallitt KA, Astell-Burt T, Stone G, Whiteman DC. Impact of prediagnosis behavior on risk of death from esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. Cancer Causes Control. 2015 Oct;26(10):1365-73.doi: 10.1007/s10552-015-0635-z. Epub 2015 Jul 26.

Ferguson H.R., Wild C.P.,Anderson L.A, Murphy S.J., Johnston B.T., Murray L.J., Watson R.G., McGuigan J., Reynolds J.V., Hardie L.J., Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of reflux esophagitis, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 17 (2008) 727–731.

Foulkes, Andrea S. Applied statistical genetics with R. New York: Springer, 2009.

Galbiatti AL, Ruiz MT, Maniglia JV, Raposo LS, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer: genetic polymorphisms and folate metabolism. Braz J Otorhinolaryngol. 2012 Feb;78(1):132-9.

Gou Q, Liu CH, Ben-Av P, Hla T. Dissociation of basal turnover and cytokine-induced transcript stabilization of the human cyclooxygenase-2 mRNA by mutagenesis of the 3′-untranslated region. Biochem Biophys Res Commun, 242: 508–12, 1998.

Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, Sørensen HT, Funch-Jensen P. Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. N Engl J Med. 2011 Oct 13;365(15):1375-83. doi: 10.1056/NEJMoa1103042.
Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em http://www.inca.gov.br/estimativa/2014.

Jing C, Huang Z, Duan Y, Xiao X, Zhang R, Jiang J. Folate intake, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in association with the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(2):647-51.

Kaercher A, Brollo J, Rodrigues MR, Paese MI, Lopes PS, Reboredo TG, Giacomazzi J. Registro hospitalar de câncer em um centro de referência no Sul do Brasil: análise dos diagnósticos ao longo de 7 anos. Revista Brasileira de Oncologia Clínica. Vol. 10 (37). 2014

Kavanagh ME, O'Sullivan KE, O'Hanlon C, O'Sullivan JN, Lysaght J, Reynolds JV. The esophagitis to adenocarcinoma sequence; the role of inflammation. Cancer Lett. 2014 Apr 10;345(2):182-9. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.017. Epub 2013 Aug 27

Kong J, Crissey MA, Stairs DB, Sepulveda AR, Lynch JP. Cox2 and β-catenin/T-cell factor signaling intestinalize human esophageal keratinocytes when cultured under organotypic conditions. Neoplasia. 2011 Sep;13(9):792-805.

Kristinsson JO, van Westerveld P, te Morsche RH, Roelofs HM, Wobbes T, Witteman BJ, Tan AC, van Oijen MG, Jansen JB, Peters WH. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and the risk of esophageal adeno- or squamous cell carcinoma. World J Gastroenterol. 2009 Jul 28;15(28):3493-7.

Langevin SM, Lin D, Matsuo K, Gao CM, Takezaki T, Stolzenberg-Solomon RZ, Vasavi M, Hasan Q, Taioli E. Review and pooled analysis of studies on MTHFR C677T polymorphism and esophageal câncer. Toxicol Lett. 2009, Jan 30;184(2):73-80. Epub 2008 Sep 16.

Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate intake, MTHFR polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis. Gastroenterology. 2006 Oct;131(4):1271-83. Epub 2006 Aug 5.

Lehrbach DM, Nita ME, Cecconello, I. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. *Arquivos de Gastroenterologia*, 2003. *40*(4), 256-261.

Lewis SJ, Smith GD. Alcohol, ALDH2, and esophageal cancer: a meta-analysis which illustrates the potentials and limitations of a Mendelian randomization approach. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Aug;14(8):1967-71.

Liang Y, Liu JL, Wu Y, Zhang ZY, Wu R. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer: a meta-analysis. Tohoku J Exp Med. 2011;223(2):137-44.

Lima J A, catharino RR, godoy, HT. Folatos em vegetais, importância, efeito do processamento e biodisponibilidade. Alim Nutr 2003; 14:123-9.

Liu YX, Wang B, Wan MH, Tang WF, Huang FK, Li C. Meta-analysis of the relationship between the Metholenetetrahydrofolate reductase C677T genetic polymorphism, folate intake and esophageal cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2011;12(1):247-52.

Lu C, Xie H, Wang F, Shen H, Wang J. Diet folate, DNA methylation and genetic polymorphisms of MTHFR C677T in association with the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2011 Mar 5;11:91

Lubin, J. H., Cook, M. B., Pandeya, N., Vaughan, T. L., Abnet, C. C., Giffen, C Whiteman, D. C. (2012). The importance of delivery rate on odds ratios by cigarette smoking and alcohol consumption for esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in the Barrett's and Esophageal Adenocarcinoma Consortium. *Cancer Epidemiology*, *36*(3), 306–316. http://doi.org/10.1016/j.canep.2012.03.001

Miao X, Xing D, Tan W, Qi J, Lu W, Lin D. Miao X, Xing D, Tan W, Qi J, Lu W, Lin D. Susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma and genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase in an at-risk Chinese population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002 Nov;11(11):1454-8.

Moons LM, Kuipers EJ, Rygiel AM, Groothuismink AZ, Geldof H, Bode WA, Krishnadath KK, Bergman JJ, van Vliet AH, Siersema PD, Kusters JG. COX-2 CA-haplotype is a risk factor for the development of esophageal adenocarcinoma. Am J Gastroenterol. 2007 Nov;102(11):2373-9. Epub 2007 Jun 20.

Napier KJ, Scheerer M, Misra S. Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. World J Gastrointest Oncol 2014 May 15; 6(5): 112-120

Prins MJ, Verhage RJ, ten Kate FJ, van Hillegersberg R. Cyclooxygenase isoenzyme-2 and vascular endothelial growth factor are associated with poor prognosis in esophageal adenocarcinoma. J Gastrointest Surg. 2012 May;16(5):956-66. Epub 2012 Jan 19.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URLhttp://www.R-project.org/.

Rice TW, Blackstone EH, Rusch VW. 7th edition of the AJCC Cancer Staging Manual: esophagus and esophagogastric junction. Ann Surg Oncol. 2010 Jul;17(7):1721-4. doi: 10.1245/s10434-010-1024-1.

Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature. 2001 Feb 15;409(6822):928-33.

Single RM, Meyer D, Hollenbach JA, Nelson MP, Noble JA, Erlich HA, Thomson G. Haplotype frequency estimation in patient populations: the effect of departures from Hardy-Weinberg proportions and collapsing over a locus in the HLA region. Genet Epidemiol. 2002 Feb;22(2):186-95**.**

Srivastava SK, Tetsuka T, Daphna-Iken D, Morrison AR () IL-1 beta stabilizes COX II mRNA in renal mesangial cells: role of 30-untranslated region. Am J Physiol, 267: 504–508, 1994

Stolzenberg-Solomon RZ, Qiao YL, Abnet CC, Ratnasinghe DL, Dawsey SM, Dong ZW, Taylor PR, Mark SD. Esophageal and gastric cardia cancer risk and folate- and vitamin B(12)-related polymorphisms in Linxian, China. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003 Nov;12(11 Pt 1):1222-6.

Subbaramaiah K, Marmo TP, Dixon DA, Dannenberg AJ. Regulation of cyclooxgenase-2 mRNA stability by taxanes: evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2, and HuR. J Biol Chem. 2003 Sep 26;278(39):37637-47. Epub 2003 Jun 25

Tabor HK, Risch NJ, Myers RM (2002). Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. Nat. Rev. Genet. 3(5):391-397

Tang Z, Nie ZL, Pan Y, Zhang L, Gao L, Zhang Q, Qu L, He B, Song G, Zhang Y, Shukui Wang. The Cox-2 -1195 G > A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 25 case-control studies. Mutagenesis. 2011 Nov;26(6):729-34. Epub 2011 Jul 6.

Terwilliger JD, Weiss KM. Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality? Curr Opin Biotechnol. 1998 Dec;9(6):578-94.

Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene and risk for esophageal squmaous cell carcinoma. Mutat Res. 2009 Apr 26;663(1-2):52-9. Epub 2009 Feb 4.
Weinberg RA. Biologia do Câncer. São Paulo: Artmed; 2008.

Willett WC. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev, 10(1):3-8, 2001.

Yang CX, Matsuo K, Ito H, Shinoda M, Hatooka S, Hirose K, Wakai K, Saito T, Suzuki T, Maeda T, Tajima K. Gene-environment interactions between alcohol drinking and the MTHFR C677T polymorphism impact on esophageal cancer risk: results of a case-control study in Japan. Carcinogenesis. 2005 Jul;26(7):1285-90. Epub 2005 Mar 24.

Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, Song W, Guo Y, Zhang X, Shen Y, Qiang B, Kadlubar FF, Lin D. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. Gastroenterology. 2005 Aug;129(2):565-76.

Zhao D, Zhang X, Guo Y, Tan W, Lin DCyclooxygenase-2 Gly587Arg Variant Is Associated With Differential Enzymatic Activity and Risk of Esophageal Squamous-Cell Carcinoma. Mol Carcinog. 2009 Oct;48(10):934-41.

ANEXO A. Estádio do Câncer do esôfago da AJCC/UICC

Quadro 1. Classificação TNM para o Câncer de Esôfago

Tumor Primário (T)	
TX	Tumor primário não pode ser identificado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Displasia de alto grau
T1	Tumor invade a lâmina própria, *muscularis da mucosa* ou submucosa.
T1a	Tumor invade a lâmina própria ou muscularis da mucosa
T1b	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria.
T3	Tumor invade a adventícia.
T4	Tumor invade estruturas adjacentes.
T4a	Tumor ressecável invadindo a pleura, o pericárdio ou o diafragma
T4b	Tumor iressecável invadindo outras estruturas adjacentes, incluindo aorta, corpo vertebral, traqueia etc
Linfonodos Regionais (N)	
Nx	Não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases linfonodais
N1	Metástases em 1 a 2 linfonodos regionais
N2	Metástases em 3 a 6 linfonodos regionais
N3	Metástases em 7 ou mais linfonodos regionais
Metástases à Distância (M)	
Mx	Não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância

Fonte: Elaborado da classificação TNM 7ª Edição da AJCC/UICC

Quadro 2. Classificação do Grau Histológico do Câncer de Esôfago

Grau Histológico	
GX	Grau não pode ser identificado
G1	Bem diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pouco diferenciado
G4	Indiferenciado

Fonte: Elaborado da classificação TNM 7ª Edição da AJCC/UICC

Quadro 3. Agrupamento por estadiamento do Carcinoma Epidermóide

Carcinoma Epidermóide		
Agrupamento por Estádios		***Grau de Diferenciação***
Estádio 0	TisN0M0	
Estádio IA	T1N0M0	Grau 1
Estádio IB	T1N0M0	Grau 2 ou 3
Estádio IIA	T2N0M0 T3N0M0	Grau 1 - 3
Estádio IIB	T1-2N1M0 T2-3N0M0	Grau 2 ou 3
Estádio IIIA	T1-2N2M0 T3N1M0 T4aN0 T4qualquerNM0	Qualquer
Estádio IIIB	T3N2M0	
Estádio IIIC	T4aN1-2M0 T4bqualquerNM0 qualquerTN3M0	
Estádio IV	qualquerTqualquerNM1	

Fonte: Elaborado da classificação TNM 7ª Edição da AJCC/UICC

Quadro 4. Agrupamento por estadiamento do Adenocarcinoma

Adenocarcinoma		
Agrupamento por Estádios		***Grau de Diferenciação***
Estádio 0	TisN0M0	
Estádio IA	T1N0M0	Grau 1 e 2
Estádio IB	T1N0M0 T2N0M0	Grau 3 Grau 2 ou 3
Estádio IIA	T2N0M0	Grau 3
Estádio IIB	T3N0M0 T1-2N1M0	Qualquer
Estádio IIIA	T1-2N2M0 T3N1M0 T4aN0M0	Qualquer
Estádio IIIB	T3N2M0 T4bqualquerNM0 qualquerTN3M0	Qualquer
Estádio IIIC	T4aN1-2M0	Qualquer
Estádio IV	qualquerTqualquerNM1	

Fonte: Elaborado da classificação TNM 7ª Edição da AJCC/UICC

ANEXO B. Carta de aprovação do subprojeto "Perfil genético do carcinoma epidermóide do esôfago: Aplicações Clínicas" (CAPPesq)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 3671
SÃO PAULO – BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.12.01, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa ***nº 903/01***, intitulado: **"Perfil genético do carcinoma epidermóide do esôfago: Aplicações clínicas"**, apresentado pelos(a) pesquisadores(a) PROF. DR. IVAN CECCONELLO e DR. MARCELO AUGUSTO DE OLIVEIRA, do Departamento de GASTROENTEROLOGIA, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

CAPPesq, 12 de Dezembro de 2001.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: *Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").*

ANEXO C. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto "Perfil genético do carcinoma epidermóide do esôfago: Aplicações Clínicas"

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

CONTROLES

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 Carcinoma Epidermóide do Esôfago: Aplicações Clínicas".**

PESQUISADOR: Prof. Dr. Ivan Cecconello , Dr. Marcelo Augusto de Oliveira

CARGO/FUNÇÃO: Médico INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 18.153

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo – Instituto Central - HC

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ **RISCO MÍNIMO X** RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

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

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : Dois anos

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

Nós estamos conduzindo um estudo no Estado de São Paulo e outros Estados do Brasil para investigar se certas características e hábitos dos homens e das mulheres estão relacionados com algumas doenças. Para isso, estamos solicitando aos pacientes neste e em outros hospitais para participarem da pesquisa.

A sua participação na pesquisa inclui: a) responder a perguntas de um questionário; b) a coleta de uma amostra de sangue de 15 ml por punção venosa. Esclarecemos que estes procedimentos podem lhe trazer algum desconforto.

Dependendo da sua doença e, somente se isto fizer parte dos procedimentos habituais e necessários de diagnóstico ou de tratamento de sua doença, serão coletadas pelo seu médico assistente, amostras de tecido da parte doente e, isto fará parte dos dados da pesquisa.

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

Todas a informações prestadas durante a entrevista serão de caráter confidencial e as informações colhidas serão utilizadas somente para fins científicos descritos no protocolo desta pesquisa, sem qualquer identificação pessoal.

Qualquer provável benefício do estudo para o bem-estar da população depende da exatidão de suas respostas. Portanto, se o(a) Sr(a) não entender alguma das questões, por favor solicite todos os esclarecimentos que julgar necessário sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa ou qualquer outra dúvida.

O(A) Sr.(a) tem a liberdade de não participar do estudo e retirar seu consentimento a qualquer momento deixando de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de sua assistência.

Para quaisquer danos à saúde decorrentes dos procedimentos necessários para a pesquisa (coleta de sangue) o (a) Sr.(a) será ressarcido pela pesquisa em compensação pelas despesas exclusivas decorrentes destes danos.

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

Prof. Dr. Ivan Cecconello – Professor Associado da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo - HCFMUSP

Dr. Marcelo Augusto de Oliveira – Médico Assistente da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo - HCFMUSP

Dr. Marcos de O. Taconi – Residente da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo - HCFMUSP

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 - 9° Andar – CEP 04619-035 São Paulo, SP. Telefone: 0xx 11 3082 8832

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)

ANEXO D. Parecer Consubstanciado de aprovação da CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DAS ENZIMAS CICLOOXIGENASE-2 E METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE EM PACIENTES COM CÂNCER DO ESÔFAGO
Pesquisador Responsável: Ulysses Ribeiro Junior **Versão: 2**
Pesquisador Executante: Evelise Pelegrinelli Zaidan **CAAE:** 05176812.2.0000.0068
Co-autores: Michele Tatiana Pereira Tomitão, Márcia Saldanha Kubrusly, Iberê Soares, Venâncio F. A. Alves, Rubens Antônio Aissar Sallum, Ivan Cecconello
Finalidade Acadêmica Mestrado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: GASTROENTEROLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9504

Número do Parecer: 128.369

Data da Relatoria: 17/10/2012

Apresentação do Projeto: O projeto apresentado é de relevância clínica e está fundamentado em dados científicos já publicados. Trata-se de estudo retrospectivo, onde serão estudados pacientes com o diagnóstico de adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas do esôfago histologicamente confirmado, admitidos no Projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP, tratados no HCFMUSP, e que foram submetidos à ressecção cirúrgica entre os anos de 2001 e 2008. Os dados serão obtidos a partir da análise de prontuário médico e as análises moleculares serão realizadas a partir de material de biópsias e DNA previamente armazenados.
Objetivo da Pesquisa: O objetivo principal da pesquisa é investigar a frequência de polimorfismos nos genes COX-2 e MHTFR em 150 pacientes com câncer de esôfago.
Como objetivos secundários estão listados: Verificar as associações entre os polimorfismos estudados e a suscetibilidade ao câncer de esôfago, através da avaliação da distribuição dos haplótipos entre pacientes e controles (n=150). Investigar a associação dos polimorfismos e da imunoexpressão proteica da COX-2 com fatores clínicos, epidemiológicos e patológicos. Verificar a associação entre a imunoexpressão proteica do COX-2 nos tumores e tecidos adjacentes aos mesmos.
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos diretos aos pacientes, pois serão utilizadas apenas amostras previamente estocadas. Pode haver um beneficio indireto aos sujeitos de pesquisa, caso haja alguma intervenção futura proposta para pacientes com o perfil genético e imunohistoquimico determinados neste projeto.
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto está apresentado de maneira clara e os objetivos são justificáveis para melhor entendimento da etiologia da doença. Os dados clínicos serão retirados dos prontuários dos pacientes e não haverá coleta de material biológico.
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Não há necessidade de utilização de TCLE, uma vez que as amostras (pacientes e controles) ja serem utilizadas
são blocos de parafina e DNA previamente estocados oriundos do Projeto Genoma Clínico do Câncer da FAPESP ("Perfil genético do carcinoma epidermóide do esôfago: aplicações clínicas" -CAPPesq n. 903/01). O pesquisador apresentou carta de concordância dos responsáveis pelos

LIM14 e LIM37, onde estão armazenadas as amostras de parafina e DNA, respectivamente, em participar do projeto.

Recomendações: No parecer anterior foi solicitado que o pesquisador citasse a fonte financiadora do projeto. O pesquisador encaminhou carta declarando que o projeto será encaminhado à FAPESP. Assim, solicita-se que o mesmo informe à essa Comissão quando o auxílio for aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há mais nenhuma pendência a ser considerada. Mas, solicita-se que o pesquisador comunique à CAPPesq no momento da aprovação do auxílio.

Situação do Parecer: Aprovado

São Paulo, 24 de Outubro de 2012

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq

ANEXO E. Dados Demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes operados por câncer de esôfago

N	Sexo	Etnia	Idade	Tipo histológico	Tabagismo	Estádio	Sobrevida Global (meses)	Óbito	Etilismo
1	M	Branco	73	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO I	135	Não	sim, ainda bebe
2	M	Branco	61	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	118	Não	sim, ainda bebe
3	M	Branco	75	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	119	Não	só no passado
4	M	Branco	54	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	29	Sim	só no passado
5	M	Branco	58	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	65	Não	sim, ainda bebe
6	M	Branco	54	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	107	Não	nunca bebe
7	M	Branco	57	ADENO	Tabagista Ativo	ESTADIO I	33	Sim	nunca bebe
8	M	Branco	58	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO IV	13	Sim	só no passado
9	M	Branco	67	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO I	1	Não	sim, ainda bebe
10	M	Mulato	60	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	16	Sim	sim, ainda bebe
11	M	Branco	52	ADENO	Tabagista Ativo	ESTADIO II	41	Sim	só no passado
12	M	Branco	72	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	8	Sim	sim, ainda bebe
13	F	Branco	69	ADENO	Nunca Fumou	ESTADIO III	14	Sim	nunca bebe
14	M	Branco	66	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO II	89	Não	nunca bebe
15	M	Branco	70	ADENO	Tabagista Ativo	ESTADIO II	62	Não	nunca bebe
16	M	Branco	60	ADENO	Nunca Fumou	ESTADIO II	37	Sim	nunca bebe
17	M	Branco	80	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO II	116	Não	só no passado
18	F	Amarelo	79	ADENO	Nunca Fumou	ESTADIO III	39	Não	nunca bebe
19	M	Branco	72	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO IV	17	Sim	só no passado
20	M	Branco	53	ADENO	Nunca Fumou	ESTADIO II	33	Sim	sim, ainda bebe
21	M	Branco	67	ADENO	Tabagista Ativo	ESTADIO III	10	Sim	só no passado
22	M	Branco	67	ADENO	Nunca Fumou	ESTADIO IV	30	Sim	só no passado
23	M	Mulato	74	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	19	Sim	sim, ainda bebe
24	M	Branco	70	ADENO	Tabagista Ativo	ESTADIO III	10	Sim	só no passado
25	M	Branco	51	ADENO	Tabagista Ativo	ESTADIO III	18	Não	só no passado
26	M	Branco	81	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO I	90	Não	só no passado
27	M	Branco	65	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	7	Sim	nunca bebe
28	M	Mulato	71	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO IV	22	Sim	só no passado
29	M	Branco	72	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO II	96	Não	sim, ainda bebe
30	M	Branco	75	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	58	Não	nunca bebe
31	F	Mulato	66	ADENO	Tabagista Ativo	ESTADIO II	5	Sim	sim, ainda bebe
32	M	Branco	53	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	55	Não	sim, ainda bebe

N	Sexo	Etnia	Idade	Tipo histológico	Tabagismo	Estádio	Sobrevida Global (meses)	Óbito	Etilismo
33	M	Branco	64	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	17	Sim	sim, ainda bebe
34	M	Mulato	54	ADENO	Tabagista Ativo	ESTADIO III	1	Sim	sim, ainda bebe
35	F	Branco	51	ADENO	Tabagista Ativo	ESTADIO II	23	Não	nunca bebe
36	M	Branco	61	ADENO	Tabagista Ativo	ESTADIO III	11	Sim	nunca bebe
37	M	Branco	69	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO III	3	Sim	só no passado
38	M	Branco	70	ADENO	Sem informação	ESTADIO III	38	Sim	Sem informação
39	F	Negro	59	ADENO	Nunca Fumou	ESTADIO III	86	Não	nunca bebe
40	M	Branco	90	ADENO	Sem informação	ESTADIO II	45	Não	Sem informação
41	F	Branco	59	ADENO	Sem informação	ESTADIO III	10	Sim	Sem informação
42	M	Branco	59	ADENO	Tabagista Ativo	ESTADIO I	82	Não	sim, ainda bebe
43	M	Mulato	71	ADENO	Ex-tabagista	ESTADIO II	36	Não	nunca bebe
44	M	Branco	58	CEC	Tabagista Ativo	sem informação	69	Não	só no passado
45	M	Mulato	50	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO III	72	Não	só no passado
46	F	Branco	65	CEC	Nunca Fumou	ESTADIO II	116	Não	nunca bebe
47	M	Negro	60	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO I	39	Sim	só no passado
48	F	Mulato	59	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	122	Não	nunca bebe
49	M	Branco	59	CEC	Tabagista Ativo	sem informação	13	Sim	só no passado
50	M	Branco	71	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO III	3	Sim	sim, ainda bebe
51	F	Branco	50	CEC	Nunca Fumou	ESTADIO III	24	Sim	sim, ainda bebe
52	M	Branco	46	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	122	Não	só no passado
53	M	Branco	72	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	44	Não	só no passado
54	M	Branco	49	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	1	Sim	sim, ainda bebe
55	M	Branco	47	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	5	Sim	sim, ainda bebe
56	M	Índio	80	CEC	Nunca Fumou	ESTADIO IV	24	Sim	sim, ainda bebe
57	M	Branco	59	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	11	Sim	só no passado
58	M	Mulato	38	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	16	Sim	sim, ainda bebe
59	F	Negro	61	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO I	51	Não	só no passado
60	M	Negro	72	CEC	Sem informação	sem informação	107	Não	Sem informação

N	Sexo	Etnia	Idade	Tipo histológico	Tabagismo	Estádio	Sobrevida Global (meses)	Óbito	Etilismo
61	M	Branco	49	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	15	Sim	só no passado
62	M	Mulato	48	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	62	Não	só no passado
63	F	Branco	54	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	35	Sim	nunca bebe
64	M	Branco	62	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO II	31	Sim	só no passado
65	M	Branco	76	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO I	114	Não	só no passado
66	M	Branco	61	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	3	Sim	sim, ainda bebe
67	M	Negro	49	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO I	115	Não	só no passado
68	F	Branco	48	CEC	Nunca Fumou	ESTADIO I	114	Não	só no passado
69	M	Mulato	63	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	64	Sim	sim, ainda bebe
70	M	Negro	66	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO III	23	Sim	só no passado
71	M	Negro	50	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	29	Sim	sim, ainda bebe
72	M	Branco	49	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	26	Sim	só no passado
73	M	Branco	74	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	4	Sim	só no passado
74	F	Branco	39	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	1	Sim	sim, ainda bebe
75	M	Branco	45	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO IV	10	Sim	sim, ainda bebe
76	M	Mulato	51	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO III	11	Sim	só no passado
77	M	Branco	57	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	83	Não	só no passado
78	M	Mulato	50	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO II	72	Não	só no passado
79	M	Branco	48	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO III	22	Sim	só no passado
80	M	Branco	50	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	103	Não	só no passado
81	M	Branco	49	CEC	Sem informação	ESTADIO I	1	Não	Sem informação
82	M	Mulato	72	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO III	8	Sim	nunca bebe
83	M	Negro	43	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO IV	9	Sim	só no passado
84	M	Branco	51	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	6	Sim	só no passado
85	M	Branco	67	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	16	Sim	sim, ainda bebe
86	M	Branco	58	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	101	Não	sim, ainda bebe

N	Sexo	Etnia	Idade	Tipo histológico	Tabagismo	Estádio	Sobrevida Global (meses)	Óbito	Etilismo
87	M	Branco	54	CEC	Nunca Fumou	ESTADIO II	101	Não	só no passado
88	M	Branco	86	CEC	Ex-tabagista	sem informaçã o	5	Sim	só no passado
89	F	Negro	53	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO II	3	Sim	sim, ainda bebe
90	M	Branco	79	CEC	Nunca Fumou	ESTADIO III	99	Não	sim, ainda bebe
91	M	Branco	69	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	41	Sim	sim, ainda bebe
92	M	Branco	54	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO II	97	Não	só no passado
93	M	Negro	55	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	7	Sim	sim, ainda bebe
94	M	Mulato	61	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO II	20	Sim	só no passado
95	M	Branco	53	CEC	Nunca Fumou	ESTADIO II	23	Sim	sim, ainda bebe
96	M	Branco	47	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO III	13	Sim	sim, ainda bebe
97	M	Branco	58	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	2	Sim	só no passado
98	M	Mulato	58	CEC	Sem informação	ESTADIO III	57	Não	só no passado
99	M	Branco	55	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	9	Não	só no passado
100	M	Branco	64	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO II	8	Sim	só no passado
101	M	Branco	64	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO II	74	Não	sim, ainda bebe
102	F	Negro	64	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO II	0	Sim	só no passado
103	M	Negro	65	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO II	6	Sim	só no passado
104	F	Branco	66	CEC	Nunca Fumou	ESTADIO II	13	Sim	nunca bebe
105	M	Mulato	57	CEC	Tabagista Ativo	sem informaçã o	38	Não	só no passado
106	F	Mulato	42	CEC	Ex-tabagista	ESTADIO II	23	Não	só no passado
107	M	Branco	48	CEC	Tabagista Ativo	ESTADIO III	29	Não	sim, ainda bebe
108	M	Branco	57	CEC	Sem informação	sem informaçã o	24	Não	Sem informação
109	M	Branco	69	CEC	Sem informação	ESTADIO IV	2	Sim	Sem informação

ANEXO F. Dados de genotipagem dos pacientes operados por câncer de esôfago

n	COX-2 -1195A>G	COX2+8437T>C	MTHFR 677C>T	MTHFR 1298A>C
1	A A	T C	C T	A C
2	A A	T C	C C	C C
3	A G	T T	C C	C C
4	A A	T C	C C	A A
5	A A	C C	T T	A A
6	A A	T C	C C	C C
7	G G	T T	C T	A A
8	A A	T C	C C	A C
9	A A	T T	C T	A C
10	A A	T C	C T	A A
11	A G	T T	C C	C C
12	A G	T T	C C	A C
13	A A	T C	C C	A A
14	G G	T T	T T	A A
15	A G	T C	C C	A C
16	A A	T C	C T	A A
17	A A	T C	C T	A A
18	A A	T C	C C	A A
19	A A	C C	C T	A A
20	A A	C C	C T	A C
21	G G	T T	C C	A A
22	A A	T T	C T	A A
23	A A	C C	T T	A A
24	A A	C C	C T	A C
25	A G	T C	C C	A A
26	A G	T T	C T	A A
27	A A	T C	C C	C C
28	A A	T C	C T	A A
29	A G	T C	C C	A A
30	G G	T T	T T	A A
31	A A	C C	C C	A A
32	A G	T T	C T	A A
33	A A	C C	C C	A A
34	A A	T T	C T	A C
35	A G	T C	C C	C C
36	A G	T C	C T	A C
37	A G	T C	C T	A C
38	A A	T C	C T	A C
39	A G	T C	C C	A A
40	A A	T C	C T	A C
41	A A	T T	C T	A C
42	A A	T C	C C	A C
43	A A	T T	C C	A C
44	A A	T C	C T	A C

n	COX-2 -1195A>G	COX2+8437T>C	MTHFR 677C>T	MTHFR 1298A>C
45	A A	C C	C C	C C
46	A G	T T	C T	A A
47	A A	T C	C T	A A
48	A A	T T	C T	A A
49	A A	T T	C C	A A
50	A G	T C	C T	A A
51	A A	T C	C T	A A
52	A A	T C	C C	A C
53	A A	T T	C T	A A
54	A A	C C	T T	A A
55	A A	T C	C T	A A
56	A A	C C	C C	A C
57	A G	T C	T T	A A
58	A A	T T	C C	A A
59	A A	C C	C T	A A
60	A A	T C	C T	A C
61	A A	T C	T T	A A
62	A A	C C	C T	A A
63	A A	T T	C C	A A
64	A A	T T	T T	A A
65	A G	T T	C C	C C
66	A A	T C	T T	A A
67	A A	C C	C T	A A
68	A A	T T	C C	A A
69	A A	T C	C C	C C
70	A A	T T	C T	A A
71	A A	C C	C C	A C
72	A A	C C	C C	C C
73	A A	T C	C T	A C
74	A A	T C	C T	A A
75	A A	C C	T T	A A
76	A A	T T	T T	A A
77	A G	T T	C T	A A
78	A A	T C	C C	A C
79	A G	T C	C C	A C
80	A A	T C	C T	A A
81	A G	T C	T T	A A
82	A G	T C	C T	A C
83	A A	T C	C C	C C
84	A G	T C	T T	A A
85	A G	T T	C T	A C
86	A G	T T	C T	A C
87	A A	T C	C C	A A
88	A A	C C	C C	C C
89	A G	T C	C C	A A
90	A A	T C	C T	A A
91	A A	C C	C C	C C

n	COX-2 -1195A>G	COX2+8437T>C	MTHFR 677C>T	MTHFR 1298A>C
92	A A	T C	C T	A C
93	A A	T C	T T	A A
94	A G	T T	C T	A C
95	A A	T C	C C	A A
96	A A	T C	C C	A C
97	A A	T T	C T	A C
98	A A	T C	C T	A A
99	A A	T C	C C	A A
100	A A	C C	C T	A A
101	G G	T T	C T	A C
102	A A	T C	C C	A A
103	A A	T C	C C	A C
104	A G	T T	C C	A A
105	A G	T C	T T	A A
106	A A	T C	C C	A A
107	A A	T C	C C	A C
108	A A	T T	C T	A A
109	A A	C C	C T	A A

.

ANEXO G. Dados demográficos, clínicos, patológicos e de genotipagem dos controles.

n	SEXO	ETNIA	IDADE	COX-2 -1195A>G	COX2 +8437T>C	MTHFR 677C>T	MTHFR 1298A>C
1	Masculino	BRANCO	32	A A	C C	C C	C C
2	Feminino	NEGRO	68	A A	C C	C C	A A
3	Masculino	BRANCO	63	A A	T C	C T	A A
4	Masculino	MULATO	54	A A	T C	C T	A C
5	Masculino	MULATO	58	A A	T C	T T	A A
6	Masculino	NEGRO	79	A A	T C	C C	A A
7	Masculino	BRANCO	63	A G	T T	C C	A C
8	Feminino	BRANCO	39	A A	C C	C T	A C
9	Masculino	BRANCO	35	A G	T T	C C	A A
10	Feminino	NEGRO	50	A A	T C	C C	A A
11	Masculino	BRANCO	62	A A	T T	C C	A C
12	Masculino	BRANCO	46	A A	T C	T T	A A
13	Feminino	BRANCO	44	A A	T C	T T	A A
14	Masculino	BRANCO	53	A A	T C	T T	A A
15	Masculino	BRANCO	70	A A	T T	C T	A A
16	Feminino	BRANCO	67	A A	T C	T T	A A
17	Masculino	BRANCO	50	A A	T C	C T	A A
18	Masculino	BRANCO	36	A A	T C	C T	A C
19	Feminino	BRANCO	65	A G	T C	C C	A A
20	Masculino	BRANCO	51	A G	T T	T T	A A
21	Masculino	BRANCO	62	A A	T T	C T	A A
22	Feminino	MULATO	53	A A	C C	C C	A C
23	Masculino	BRANCO	72	A A	C C	C C	A C
24	Feminino	BRANCO	63	A A	T T	C T	A A
25	Masculino	BRANCO	51	A G	T T	C T	A A
26	Masculino	BRANCO	44	A G	T C	C T	A A
27	Feminino	BRANCO	52	A A	T T	C C	C C
28	Masculino	BRANCO	57	A G	T T	C T	A A
29	Masculino	BRANCO	72	A G	T T	C T	A C
30	Feminino	MULATO	60	A A	T C	C T	A C
31	Masculino	BRANCO	73	A A	T C	C T	A C
32	Feminino	BRANCO	54	A G	T T	C T	A C
33	Feminino	BRANCO	50	A G	T C	C C	C C
34	Masculino	BRANCO	57	A G	T T	C C	A C
35	Feminino	BRANCO	48	A A	T C	C C	C C
36	Masculino	BRANCO	61	A G	T C	C T	A A
37	Masculino	BRANCO	38	A G	T T	C T	A A
38	Masculino	BRANCO	69	A A	T T	C T	A C
39	Masculino	BRANCO	58	A A	T C	C T	A C
40	Feminino	BRANCO	30	A A	T C	C T	A C
41	Masculino	BRANCO	74	A A	C C	C C	A C
42	Masculino	BRANCO	81	A A	T T	T T	A A
43	Masculino	BRANCO	61	A A	T C	C T	A A

n	SEXO	ETNIA	IDADE	COX-2 -1195A>G	COX2 +8437T>C	MTHFR 677C>T	MTHFR 1298A>C
44	Masculino	BRANCO	54	A A	T T	C C	A C
45	Masculino	BRANCO	58	A A	T T	C C	A C
46	Masculino	BRANCO	70	A A	T C	C T	A C
47	Masculino	NEGRO	48	A G	T T	C T	A A
48	Feminino	MULATO	53	A A	C C	C C	A C
49	Masculino	BRANCO	64	A G	T T	T T	A A
50	Masculino	MULATO	52	A A	T C	C C	A A
51	Masculino	BRANCO	69	A A	T T	T T	A A
52	Masculino	BRANCO	53	A A	T C	C T	A A
53	Feminino	BRANCO	59	A G	T T	C C	C C
54	Masculino	BRANCO	74	A G	T T	C C	A C
55	Masculino	BRANCO	58	A A	T T	C T	A A
56	Masculino	BRANCO	65	A A	T T	C T	A C
57	Masculino	BRANCO	29	A G	T T	C C	A C
58	Masculino	MULATO	59	A A	T T	C C	A A
59	Masculino	BRANCO	47	A A	T C	C C	A C
60	Masculino	BRANCO	38	A A	T C	C C	A C
61	Masculino	NEGRO	48	A A	T T	C T	A C
62	Masculino	BRANCO	60	A A	T C	C T	A A
63	Masculino	BRANCO	74	A G	T T	C C	C C
64	Masculino	NEGRO	48	A A	C C	C T	A C
65	Masculino	BRANCO	64	A A	T C	C C	A A
66	Masculino	NEGRO	39	A A	C C	C T	A A
67	Masculino	BRANCO	67	A A	T T	C C	A C
68	Masculino	BRANCO	47	A A	C C	C T	A C
69	Feminino	NEGRO	50	A A	T C	C C	A A
70	Masculino	BRANCO	72	A G	T C	C C	C C
71	Masculino	BRANCO	69	A A	T C	C T	A C
72	Masculino	BRANCO	80	A G	T C	C C	A C
73	Masculino	BRANCO	50	A G	T T	C C	A A
74	Masculino	NEGRO	63	A A	T T	C C	A A
75	Masculino	MULATO	53	A A	T T	C C	A C
76	Masculino	BRANCO	57	A A	C C	C C	A C
77	Masculino	BRANCO	67	A A	T T	C C	A A
78	Masculino	BRANCO	69	A A	T C	C T	A C
79	Masculino	BRANCO	79	A A	C C	T T	A A
80	Masculino	BRANCO	76	A G	T T	C T	A C
81	Masculino	AMARELO	66	G G	T T	C T	A A
82	Feminino	AMARELO	81	G G	T T	C T	A A
83	Feminino	MULATO	69	A A	C C	C T	A C
84	Feminino	BRANCO	66	A A	T C	T T	A A
85	Masculino	BRANCO	71	A A	C C	C T	A C
86	Masculino	BRANCO	73	A A	T C	T T	A A
87	Masculino	BRANCO	71	A A	C C	C T	A A
88	Masculino	MULATO	72	A A	C C	C T	A A
89	Masculino	BRANCO	45	A A	T T	C T	A A

n	SEXO	ETNIA	IDADE	COX-2 -1195A>G	COX2 +8437T>C	MTHFR 677C>T	MTHFR 1298A>C
90	Masculino	BRANCO	46	A A	T C	C C	A A
91	Masculino	NEGRO	46	A A	C C	C C	A C
92	Masculino	BRANCO	48	A A	C C	C T	A A
93	Masculino	BRANCO	57	A A	T T	T T	A C
94	Masculino	BRANCO	0	A A	C C	C T	A C
95	Masculino	BRANCO	46	A A	T T	C T	A C
96	Masculino	BRANCO	70	A A	T T	C T	A A
97	Masculino	BRANCO	70	A A	T T	C C	A A
98	Masculino	BRANCO	80	A A	T C	T T	A A
99	Masculino	BRANCO	71	A A	T T	C T	A C
100	Masculino	BRANCO	51	A A	T T	C C	A C
101	Masculino	BRANCO	53	A A	T T	C C	A A
102	Masculino	BRANCO	46	A A	C C	C T	A A