



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JOSÉ LUIZ MIRANDA GUIMARÃES

**“INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DO
METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO NA
SUSCEPTIBILIDADE AO ADENOCARCINOMA
COLORRETAL ESPORÁDICO”**

*“INFLUENCE OF GENETIC POLYMORPHISMS IN METABOLISM OF
FOLIC ACID IN SUSCEPTIBILITY TO SPORADIC
COLORECTAL ADENOCARCINOMA”*

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JOSÉ LUIZ MIRANDA GUIMARÃES

**“INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DO
METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO NA SUSCEPTIBILIDADE
AO ADENOCARCINOMA COLORRETAL ESPORÁDICO”**

Orientadora: Prof^a. Dra. Carmen Silvia Passos Lima

Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono

***“INFLUENCE OF GENETIC POLYMORPHISMS IN METABOLISM OF
FOLIC ACID IN SUSCEPTIBILITY TO SPORADIC
COLORECTAL ADENOCARCINOMA”***

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Doctorate Thesis presented to the Surgery Sciences Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of the Campinas University to obtain the Ph.D grade in Sciences

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno José Luiz Miranda Guimarães, orientada pela Profa. Dra Carmen Silvia Passos Lima

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

G947i Guimarães, José Luiz Miranda, 1959 -
Influência de polimorfismos gênicos do metabolismo
do ácido fólico na susceptibilidade ao adenocarcinoma
colorretal esporádico / José Luiz Miranda Guimarães. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Carmen Silvia Passos Lima.
Coorientador : Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Variação Genética. 2. Neoplasias do cólon. 3.
Neoplasias colorretais. 4. Deficiência ácido fólico. I.
Lima, Carmen Silvia Passos. II. Ayrizono, Maria de
Lourdes Setsuko. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Influence of genetic polymorphisms in metabolism of folic acid in
susceptibility to sporadic colorectal adenocarcinoma.

Palavras-chave em inglês:

Genetic variation

Colonic neoplasms

Colorectal neoplasms

Folic acid deficiency

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Carmen Silvia Passos Lima [Orientador]

Carmen Silvia Bertuzzo

Gustavo Jacob Lourenço

Ademar Lopes

José Claudio Casali da Rocha

Data da defesa: 27-07-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Banca Examinadora da Defesa de Doutorado

José Luiz Miranda Guimarães

Orientador: Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Passos Lima -



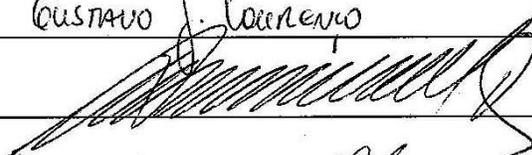
2. Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Bertuzzo -



3. Dr(a). Gustavo Jacob Lourenço -

GUSTAVO J. LOURENÇO

4. Prof(a). Dr(a). Ademar Lopes -



5. Prof(a). Dr(a). José Cláudio Casali da Rocha -



Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/07/2012

À minha esposa Rosângela,
companheira de todas as horas,
pela importância que tem na minha vida.

Aos meus filhos Bruno e Carolina,
pelo apoio incondicional ao meu trabalho.

Aos meus pais José Luiz e Irene,
por ensinarem a não ter medo das dificuldades.

Em memória ao meu avô Dr. Pacífico Carlos Pina Guimarães.

Talvez a melhor parte de uma tese seja a sua própria história.

O início desse trabalho se deu a 11.000 metros acima do nível do mar numa viagem ao Velho Continente. Por contingências da vida, tive o privilégio de viajar ao lado de uma professora de excelentes predicados acadêmicos. Na ocasião estava finalizando o prefácio de um livro que iria enviar para a editora nos próximos dias. Após as apresentações de praxe, identificamo-nos com a ciência e a pesquisa na área do câncer. Obviamente que houve uma convergência de afinidades acadêmicas e, a partir de então, trocamos inúmeras ideias no que concerne ao mundo dos polimorfismos genéticos. Uma área que eu tinha muito a aprender e que haveria necessidade de fazer escolhas. Fui contaminado pela possibilidade de reorientar minha carreira para a pesquisa, um sonho acalentado há vários anos. A sensibilidade aguçada dessa professora percebeu imediatamente que eu poderia contribuir em sua linha de pesquisa, e que poderia agregar a “*expertise*” adquirida na assistência aos pacientes portadores de câncer colorretal.

O desafio era enorme, porém as motivações eram grandiosas. A partir de então o processo de aprendizado, pesquisa, discussões, análise dos resultados, possíveis conclusões e a formatação do trabalho, se assemelhou a uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas intercorrências pessoais de toda a ordem, que me atropelaram. Esses percalços, longe de obscurecerem o resultado final, aumentaram o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força. Portanto, a maneira de como essa tese foi concebida e, sobretudo a quem creditar tal feito é, na minha opinião, o aspecto mais importante a ser considerado, e não uma simples formalidade a ser cumprida. Toda tese possui um “genoma” próprio que é fruto da curiosidade, maturidade científica e do raciocínio acadêmico lógico de um orientador.

Os orientadores possuem “polimorfismos” e “genótipos” diversos, entretanto todos, e sem exceção, detêm o “fenótipo” do educar e ensinar na sua essência de vida. São pessoas abnegadas na sua missão e não medem esforços para transmitir ensinamentos necessários para a formação de nós alunos. Como consequência, as teses herdam muitas características de nossos orientadores, herdam um projeto bem estruturado, uma sequência de investigação, uma base teórica irretocável e, por fim, a elegância acadêmica. Por conseguinte uma tese é, de certa forma, o reflexo do seu orientador, coroando a trajetória de uma linha de pesquisa própria, ou seja, carreando uma assinatura “genômica” própria.

Eis que chegou o momento de expressar toda a minha gratidão a minha orientadora **Professora Doutora Carmen Silvia Passos Lima**, pela sua sapiência, sensibilidade, compreensão, generosidade, paciência, confiança, afeto, pelo incentivo e, sobretudo pela amizade. Essa tese possui a assinatura “genômica” da Professora Carmen e agradeço pelo privilégio de ter participado de sua linha de pesquisa, e principalmente pela oportunidade e confiança depositada.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono pelo seu brilhantismo, pela ajuda na obtenção das amostras dos pacientes e por ter acreditado e apoiado o projeto.

Ao Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy por ter apoiado o projeto e, sobretudo pela gentileza em disponibilizar os dados relativos dos pacientes tratados no Serviço de Proctologia.

Ao biologista Gustavo Jacob Lourenço pela ajuda no processo de busca e aprendizado no laboratório de genética.

À Dra. Daniela Benzano por sua disponibilidade e sapiência na condução das análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. José Pio Rodrigues Furtado pela oportunidade de desfrutar de sua lealdade e amizade fraternal há mais de 30 anos.

À Dra. Débora Cravo Batassini pelo convívio profissional, amizade e, sobretudo pela sua paciência em disponibilizar horas de seu precioso tempo em ouvir e opinar.

Ao Prof. Dr. Neiro Waechter da Motta meu grande mestre e incentivador nato.

Ao Dr. Huberto Lambert minha gratidão e respeito.

A toda a equipe do Laboratório de Genética (LAGECA) pelo auxílio despendido.

À Paula Léa Flauzino da Costa Ferreira pela ajuda enquanto secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A todos os integrantes do Serviço de Oncologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp.

Às minhas secretárias pessoais Schirlei Niada de Souza e Adriana Lima dos Anjos que me deram o suporte e ajuda necessários.

Aos meus residentes e alunos que são a razão de ser na busca do aprendizado e atualização acadêmica constante.

A realização deste estudo contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Processo nº 04/06319-0.

*"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas,
que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os caminhos, que nos levam
sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos"*

Fernando Pessoa



RESUMO

O desenvolvimento de câncer colorretal (CCR) é resultado de uma complexa interação de variáveis, incluindo elementos externos, como a exposição a agentes ambientais e dietéticos, e fatores internos, de natureza somática ou hereditária. Não está estabelecido se genótipos de polimorfismos de baixa penetrância em genes relacionados com o metabolismo do ácido fólico, como o metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR* C677T e *MTHFR* A1298C), o metionina sintase (*MTR* A2756G), o metionina sintase redutase (*MTRR* A66G) e o timidilato sintase (*TS* 2R3R), estão associados com o risco de ocorrência da doença ou com suas manifestações clínicas. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar se esses polimorfismos gênicos influenciam o risco de ocorrência do adenocarcinoma colorretal esporádico (ACRE) e suas manifestações clínicas e biológicas em pacientes da região sudeste do Brasil. Foram avaliados 113 pacientes com ACRE e 188 controles, considerando os aspectos clínicos como a idade, o sexo, a raça, a localização, o grau de diferenciação do tumor, o estágio e os genótipos de cada gene. Os genótipos dos polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS* foram avaliados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida ou não por digestão enzimática. O significado estatístico das diferenças entre grupos foi calculado por meio do teste da probabilidade exata de Fisher ou qui-quadrado. As determinações dos riscos de ocorrência do ACRE, a que pacientes e controles foram submetidos, foram obtidas por meio das razões das chances (ORs) e calculadas considerando um intervalo de confiança de 95%. Portadores dos genótipos *MTRR* 66AG+GG, do *MTHFR* 1298AC+CC+677CT+TT, do *MTHFR* 677CT+TT+*MTR* 2756AG+GG, do *MTHFR* 1298AC+CC + 677CT+TT + *MTR* 2756AG+GG e *MTHFR* 1298AC+CC + 677CT+TT + *MTRR* 66AG+GG apresentaram riscos 1,99, 3,26, 2,22, 10,92 e 14,88 vezes maiores, respectivamente, de desenvolver ACRE do que os outros. Além disso, os indivíduos com o genótipo *MTHFR* 677CT+TT e os genótipos *MTR* 2756AG+GG tiveram um risco de 2,12 e 1,42 vezes maior de desenvolver ACRE com idade menor do que 50 anos. Afro-Brasileiros com o genótipo GG do polimorfismo *MTRR* A66G tiveram risco 1,98 vezes maior de desenvolver ACRE, e indivíduos com o genótipo *MTR* 2756AG+GG e os genótipos *MTHFR* 677CT+TT

estiveram sob risco 2,11 e risco 1,62 vezes maiores de ocorrência de tumores indiferenciados e avançados, respectivamente, do que os demais. Portadores dos genótipos *MTHFR* 1298AC+CC e *MTHFR* 1298AC+CC + *MTRR* 66AG+GG estiveram sob riscos 1,42 e 3,07 vezes maiores de tumor no reto, respectivamente, enquanto que portadores dos genótipos *MTHFR* 677CT+TT e *MTHFR* 677CT+TT + *TS* 2R3R+3R3R estiveram sob riscos 1,55 e 5,39 vezes maiores de tumor de cólon, respectivamente, do que portadores dos genótipos selvagens. Estes dados sugerem que polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS*, que codificam enzimas que participam do metabolismo do ácido fólico, especialmente em combinação, têm papéis consistentes para o risco de desenvolver ACRE em indivíduos da região sudeste do Brasil.



ABSTRACT

The development of colorectal cancer (CRC) is the result of a complex interaction of variables, including external factors such as exposure to environmental agents and dietary factors and internal factors, whether somatic or hereditary. It has not been established genotypes with low penetrance polymorphisms in genes related to metabolism of folic acid such as methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR* C677T and A1298C), methionine synthase (*MTR* A2756G), methionine synthase reductase (*MTRR* A66G) and thymidylate synthase (*TS* 2R3R), are associated with the risk of the disease or its clinical manifestations. Therefore, the aim of this study was to determine whether these genetic polymorphisms influence the risk of sporadic colorectal adenocarcinoma (SCA) and their clinical and biological manifestations in patients from southeast Brazil. For this, we analyzed 113 patients with SCA and 188 controls, considering the clinical aspects such as age, sex, race, location, stage, degree of tumor differentiation and the genotypes of each gene described above. The genotypes of the polymorphisms of the *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* and *TS* were assessed by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme digestion. The statistical significance of differences between groups was calculated using the probability test of Fisher's exact or chi-square.

Determination of the risks of SCA, the patients and controls were submitted, was obtained through the odds ratios (ORs) and calculated assuming a range of 95%. Carriers of the *MTRR* 66AG + GG, the *MTHFR* 1298AC+CC + 677CT+TT, the *MTHFR* 677CT+TT + *MTR* 2756AG+GG, the *MTHFR* 1298AC+CC + 677CT+TT + *MTR* 2756AG+GG, and the *MTHFR* 1298AC+CC + 677CT+TT + *MTRR* 66AG+GG genotypes had a 1.99, a 3.26, a 2.22, a 10.92 and a 14.88-fold increased risks for SCA than others, respectively. In addition, individuals with the *MTHFR* 677CT+TT and the *MTR* 2756AG+GG genotypes had a 2.12 and a 1.42-fold increased risks for SCA diagnosed under 50 years. African-Brazilians with the *MTRR* 66GG genotype had a 1.98-fold increased risk for SCA, and individuals with the *MTR* 2756AG+GG and the *MTHFR* 677CT+TT genotypes were under a 2.11 and a 1.62-fold increased risks for undifferentiated and advanced tumors, respectively, than others. Carriers of the *MTHFR* 1298AC+CC

and the *MTHFR* 1298AC+CC + *MTRR* 66AG+GG genotypes had a 1.42 and a 3.07-fold increased risks for rectal tumor, respectively, while carriers of the *MTHFR* 677CT+TT and the *MTHFR* 677CT+TT + *TS* 2R3R+3R3R genotypes had a 1.55 and a 5.39-fold increased risks for colon tumor, respectively, than carriers of the wild genotypes. This data suggest that polymorphisms of genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* and *TS*, which encode folate-dependent enzymes, particularly in combination, have consistent roles for SCA risk in southeastern Brazil.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminas aromáticas
ACE	Antígeno carcinoembrionário
ACRE	Adenocarcinoma colorretal esporádico
AH	Aminas heterocíclicas
APC	Gene “ <i>Adenomatous polyposis coli</i> ”
Arg	Arginina
A2756G	Polimorfismo do gene <i>MTR</i>
A1298C	Polimorfismo do gene <i>MTHFR</i>
A66G	Polimorfismo do gene <i>MTRR</i>
B12	Vitamina B12
<i>BMPR1</i>	Gene do receptor de proteína morfogenética óssea tipo 1
CBS	Cistationa β -sintase
CCR	Câncer colorretal
CCRHSP	Câncer colorretal hereditário sem polipose
cm	Centímetro
C677T	Polimorfismo do gene <i>MTHFR</i>
DHF	Ácido dihidrotetrafolico

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
DPD	Dihidropirimidina desidrogenase
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
dTMP	Monofosfato de deoxitimidina
dUMP	Monofosfato de deoxiuridina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
EUA	Estados Unidos da América
et al	e autores / outros (as)
FAD	Dinucleotideo de flavina adenine
FMN	Mononucleotídeo de flavina
GITSG	<i>“Gastrointestinal Study Group”</i>
Gly	Glicina
GSTP	Glutathiona S-transferase
HAP	Hidrocarboneto aromático policíclico
HaeIII	Enzima de restrição convencional
Hcy	Homocisteína

Hinfl	Enzima de restrição convencional
HR	“ <i>Hazard ratio</i> ” ou taxa de risco
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Kb	Quilobases
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodaltons
Lys	Lisina
LKB1	Proteína quinase codificada pelo Gene supressor <i>STK11</i>
LOH	Perda de heterozigose
MbolI	Enzima de restrição convencional
Met	Metionina
Mg Cl₂	Cloreto de Magnésio
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
MTR	Metionina sintase
MTRR	Metionina sintase redutase
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng/ml	Nanograma/mililitro

NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina fosfato dinucleotídeo
NdeI	Enzima de restrição convencional
NSABP	<i>“National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project”</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>“Odds ratio”</i> ou razão de chance
PAF	Polipose adenomatosa familiar
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia por polimerase
PFH	Polipose hamartomatosa familiar
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SHMT	Serina hidroximetil transferase
SDS 20%	Dodecil sulfato de sódio a 20%
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SVLD	Sobrevida livre de doença
SVLR	Sobrevida livre de recidiva

SVG	Sobrevida global
TA	Temperatura ambiente
THF	Ácido tetrahidrofólico
TRIS HCl	Tris-hidrocloro (tampão)
TRITON X 100	Éter p-t-octilfenil polioxietileno
TS	Timidilato sintase
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
VNTR	Polimorfismo de minissatélite (polimorfismo de número variável de repetições em “ <i>tandem</i> ”)
WNT	via de sinalização “ <i>wingless-type</i> ”
2R3R	Polimorfismo do gene <i>TS</i>
μl	Microlitro

	Pág.
Tabela 1- Distribuição dos 113 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico de acordo com a idade, o sexo e a raça.....	103
Tabela 2- Distribuição dos 113 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico de acordo com a localização, a diferenciação e o estágio do tumor.....	104
Tabela 3- Distribuição dos 113 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por características clínicas e biológicas de acordo com a localização do tumor...	105
Tabela 4- Distribuição dos 188 controles de acordo com a idade, o sexo e a raça.....	106
Tabela 5- Resultados das análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os <i>lóci</i> dos polimorfismos <i>MTHFR</i> C677T e A1298C, <i>MTR</i> A2756G, <i>MTRR</i> A66G e <i>TS</i> 2R3R em amostras dos 113 pacientes porta-dores de adenocarcinoma colorretal esporádico e dos 188 controles.....	107
Tabela 6- Frequências dos genótipos isolados dos polimorfismos <i>MTHFR</i> A1298C, <i>MTHFR</i> C677T, <i>MTR</i> A2756G, <i>MTRR</i> A66G e <i>TS</i> 2R3R em 113 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico e controles.....	109

Tabela 7-	Frequências dos genótipos combinados dos polimorfismos <i>MTHFR</i> A1298C, <i>MTHFR</i> C677T, <i>MTR</i> A66G, <i>MTRR</i> A2756G e <i>TS</i> 2R3R e suas associações nos 113 pacientes portadores de câncer colorretal esporádico e nos 188 controles.....	110
Tabela 8-	Frequência dos genótipos dos 113 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por idade e raça.....	112
Tabela 9-	Frequências dos genótipos nos 113 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por localização, diferenciação e estágio.....	114

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Representação esquemática das possibilidades de cometimento do câncer colorretal em parede do cólon.....	63
Figura 2- Metabolismo do ácido fólico, metionina e homocisteína.....	79
Figura 3- Identificação dos genótipos do polimorfismo <i>MTHFR</i> A1298C.....	95
Figura 4- Identificação dos genótipos do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T.....	96
Figura 5- Identificação dos genótipos do polimorfismo <i>MTR</i> A2756G.....	97
Figura 6- Identificação dos genótipos do polimorfismo <i>MTRR</i> A66G.....	98
Figura 7- Identificação dos genótipos do polimorfismo <i>TS 2R3R</i>	99

	Pág.
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxv
1- INTRODUÇÃO	53
1.1- Epidemiologia	55
1.1.1- Incidência e mortalidade.....	55
1.1.2- Variação geográfica.....	57
1.1.3- Padrão de imigração.....	57
1.1.4- Raça.....	58
1.1.5- Fatores socioeconômicos.....	58
1.2- Etiologia	58
1.2.1- Predisposição hereditária.....	59
1.2.2- Fatores ambientais.....	59
1.2.3- Dieta.....	59
1.2.4- Modo de vida.....	60
1.3- Diagnóstico	61
1.4- Rastreamento	61

1.5- Fatores prognósticos.....	62
1.5.1- Estadiamento.....	62
1.5.2- Histologia e grau histológico.....	64
1.5.3- Linfonodos regionais.....	64
1.5.4- Invasão vascular, linfática e perineural.....	65
1.5.5- Instabilidade genômica.....	65
1.5.6- Perda de heterozigose.....	69
1.5.7- Antígeno carcinoembrionário.....	69
1.5.8- Obstrução e perfuração.....	69
1.6- Câncer colorretal hereditário.....	70
1.6.1- Polipose adenomatosa familiar.....	70
1.6.2- Câncer colorretal hereditário sem polipose.....	70
1.7- Câncer colorretal esporádico.....	71
1.8- Câncer colorretal familiar.....	71
1.9- Metabolismo do ácido fólico.....	72
1.9.1- Gene <i>MTHFR</i>	74
1.9.2- Gene <i>MTR</i>	76
1.9.3- Gene <i>MTRR</i>	77
1.9.4- Gene <i>TS 2R3R</i>	78

2- OBJETIVOS.....	83
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	87
3.1- Avaliação clínica.....	89
3.2- Avaliação do tumor.....	89
3.3- Análise molecular dos genes <i>MTHFR</i>, <i>MTR</i>, <i>MTRR</i> e <i>TS 2R3R</i>.....	90
3.3.1- Extração do DNA.....	90
3.3.2- Identificação dos genótipos do polimorfismo do gene <i>MTHFR</i>	92
3.3.3- Identificação dos genótipos do polimorfismo do gene <i>MTR</i>	92
3.3.4- Identificação dos genótipos do polimorfismo do gene <i>MTRR</i>	93
3.3.5- Identificação dos genótipos do polimorfismo do gene <i>TS 2R3R</i>	94
3.4- Aspectos éticos.....	99
3.5- Análise estatística.....	100
4- RESULTADOS.....	101
4.1- Dados clínicos e biológicos do tumor em pacientes.....	103
4.2- Dados clínicos dos controles.....	106
4.3- Análise molecular dos genes <i>MTHFR</i>, <i>MTR</i>, <i>MTRR</i> e <i>TS</i>.....	107

4.3.1- Polimorfismos gênicos em pacientes e controles.....	107
4.3.2- Polimorfismos gênicos em pacientes estratificados por aspectos clínicos.....	111
4.3.3- Polimorfismos gênicos em pacientes estratificados por aspectos biológicos do tumor.....	113
5- DISCUSSÃO.....	117
6- CONCLUSÕES.....	129
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
8- ANEXOS.....	163
9- APÊNDICES.....	171



1- INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, avanços significativos foram obtidos no estudo do câncer colorretal (CCR), principalmente no entendimento das bases moleculares da doença e no surgimento de novas moléculas, com índices de resposta terapêutica bastante promissores. A consequência desses avanços ensejou uma modificação significativa na sobrevida, alterando de maneira substancial a abordagem desses pacientes. Além disso, novas estratégias de detecção precoce, rastreamento e da identificação de recorrência da doença, também impactaram positivamente, posicionando o CCR como uma doença de um efetivo potencial de curabilidade não negligenciável, mesmo em situações onde se identifica doença à distância. Outro aspecto a ser considerado é a incessante procura de marcadores genéticos que possam, de alguma forma, auxiliar no manuseio dessa doença ou eventualmente identificar grupos populacionais que possuam características, ou um conjunto delas, onde se possa ter um olhar mais atento no que se refere ao risco de desenvolvimento do CCR, ou de alguma maneira direcionar para um tratamento menos tóxico e mais efetivo.

1.1- Epidemiologia

1.1.1- Incidência e mortalidade

O desenvolvimento do CCR é resultado de uma complexa interação de variáveis, incluindo elementos externos, como a exposição a agentes ambientais e dietéticos, e fatores internos de natureza somática ou hereditária (Pinho e Rossi, 1999). Apesar dos tumores de cólon e de reto apresentarem diferenças epidemiológicas e clínicas, eles são habitualmente considerados em conjunto.

O CCR é um dos principais problemas de saúde do mundo ocidental e o terceiro câncer mais frequentemente diagnosticado em homens e o segundo entre as mulheres, com aproximadamente 1.200.000 casos diagnosticados em 2008, e com 608.700 óbitos ocorridos no mesmo ano, no mundo todo (*World Health Organization*, 2012). Altas taxas de incidência são observadas em

países desenvolvidos como a Austrália, Nova Zelândia e Estados Unidos, contrariamente a regiões subdesenvolvidas, especialmente África e Ásia. Constitui a terceira causa de óbito atribuída a neoplasia, após os cânceres de pulmão e de mama (Winawer e Sherlock, 1983; Cotton et al., 2000; Houlston e Tomlinson, 2001; Jemal et al., 2011).

No Brasil, a estimativa do número de casos novos de CCR para o ano de 2012 é de 14.180 e 15.960 para homens e mulheres respectivamente, correspondendo a um risco estimado de incidência de 14,75 por 100.000 homens e de 15,94 por 100.000 mulheres, segundo dados de base populacional (Instituto Nacional do Câncer, 2012). Ainda baseado nos registros de 17 municípios brasileiros, os maiores valores das taxas médias anuais de incidência ajustadas por idade por 100 mil homens foram encontrados em São Paulo (2001-2005: 33,4), em Porto Alegre (2000-2004: 24,7), em Goiânia (2001-2005: 24,25) e em Curitiba (2001-2005: 19,2). Na população feminina, as maiores taxas foram observadas em Porto Alegre (2000-2004: 33,96), em São Paulo (2001-2005: 30,76), em Goiânia (2001-2005: 27,47) e em Curitiba (2001-2005: 26,57). As menores taxas encontram-se na cidade de João Pessoa (2001-2005) em homens (9,38) e em Recife (2000-2003) na população feminina (8,77).

As estimativas de incidência elaboradas pelo INCA baseiam-se nas fontes oriundas dos Registros de Câncer de Base Populacional, sendo que problemas operacionais e de estrutura, de alguns deles, nos levam a afirmar que não existem dados consistentes que nos permitam conclusões sobre a tendência de incidência do CCR no estado de São Paulo. Por outro lado, quando a mortalidade por CCR é analisada, é possível afirmar que as taxas específicas de mortalidade apresentam tendência de crescimento, conforme estudo desenvolvido pela Fundação Oncocentro de São Paulo. Os dados apresentados foram ajustados por idade e padronizados para a população mundial, indicando um aumento importante e crescente das taxas de mortalidade, tanto para o sexo feminino como para o masculino. As taxas brutas passaram de 6,8 para 10,10 por

100.000 homens e de 6,2 para 8,12 por 100.000 mulheres, no período compreendido entre o biênio 1987/1988 e 2007 (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2005; Boletim Epidemiológico Paulista, 2009).

O CCR contabiliza aproximadamente 9,7% dos 12,7 milhões de novos casos de câncer, que ocorrem a cada ano no mundo (Ferlay et al., 2010), justificando plenamente um maior conhecimento sobre esta doença.

1.1.2- Variação geográfica

Existem enormes diferenças entre as diversas regiões no que concerne a incidência de CCR, havendo regiões com taxas de incidência de dois casos a cada 100.000 habitantes, como em Gâmbia e Argélia (Parkin et al., 2005; Jemal et al., 2011), até de 70 para cada 100.000 habitantes em regiões do Alaska (Brown et al., 1998). Em última análise, variações na incidência de CCR estão relacionadas, provavelmente, a fatores ambientais e genéticos existentes. De um modo geral, se observa uma maior taxa de incidência de CCR, bem como a taxa de mortalidade, em países desenvolvidos.

1.1.3- Padrão de imigração

Imigrantes de regiões de baixa incidência de CCR para regiões de alta incidência assumem os mesmos riscos desse último na mesma geração (McMichael e Giles, 1988). Um exemplo bastante emblemático são chineses que imigraram para os Estados Unidos da América, onde assumiram um risco maior de desenvolvimento de CCR, provavelmente em razão de um maior consumo de carnes vermelhas e uma diminuição da atividade física (Whittemore et al., 1990). Essas evidências nos levam a atentar para a modificação dos hábitos alimentares e no modo de vida, objetivando a prevenção do CCR.

1.1.4- Raça

Embora fatores dietéticos e modo de vida estejam intimamente relacionados com regiões de baixa incidência de CCR especialmente na Ásia e África, há evidências de que aspectos raciais e étnicos também tenham influência na incidência de CCR. Para exemplificar, mutações de genes de reparo de lesões no ácido desoxirribonucleico (DNA) são mais frequentes em Afro-americanos (Weber et al., 1993) e mutações hereditárias do gene *APC* são mais comumente observadas em Judeus Ashkenazi (Rozen et al., 1999).

1.1.5- Fatores socioeconômicos

Observa-se uma incidência e mortalidade aumentadas do CCR em países desenvolvidos (Wilmink, 1997). Muito provavelmente esse achado esteja ligado ao elevado consumo de gordura e carne vermelha, a falta de atividade física e obesidade.

1.2- Etiologia

A etiologia do CCR se reveste de complexidade e heterogeneidade ímpares, com a interação de fatores ambientais e genéticos, que levam a modificações da mucosa colônica normal com a consequente instalação de lesões precursoras do CCR, como o pólipó adenomatoso. Entretanto, somente 15% de adenomas maiores que um centímetro têm chance de desenvolver câncer (Kune et al., 1986). Outras lesões estão relacionadas com o desenvolvimento de CCR como a colite ulcerativa, onde o risco de desenvolver o tumor é dez vezes maior quando comparado à população geral (Lieberman et al., 2000). Alguns fatores ambientais parecem agir diretamente como carcinógenos ou aumentar as frequências de mutações somáticas, predispondo ou determinando o aparecimento da neoplasia (Harnden, 1995; Hill, 1995; Schottenfield, 1995; Shike, 1995).

1.2.1- Predisposição hereditária

História familiar de CCR confere um risco maior de desenvolver a doença, entretanto existe variabilidade na quantificação do risco, em função basicamente do grau de parentesco e da idade do diagnóstico do câncer. A história familiar de CCR em parente de primeiro grau, confere um risco dobrado para o desenvolvimento da doença (Fuchs et al., 1994) bem como a presença de adenomas em familiares de primeiro grau (Winawer et al., 1996). Alguns estudos sugerem que alguns grupos populacionais apresentam uma susceptibilidade maior (herança dominante) no desenvolvimento de adenomas e conseqüentemente de adenocarcinoma colorretal esporádico (ACRE), embora esse risco apresente enormes variabilidades (Burt et al., 1985; Ponz de Leon et al., 1992). Talvez os fatores que influenciem essa variabilidade nos estudos seja conseqüência de polimorfismos gênicos (Harris et al., 1998), variando de maneira significativa de acordo com diferenças raciais e grupos étnicos.

1.2.2- Fatores ambientais

Infelizmente os fatores ambientais (exposição ocupacional, hábitos alimentares, atividade física, etc), como partícipes no processo etiológico do CCR, não são estudados de maneira adequada em razão das dificuldades em conduzir estudos que não contenham algum tipo de viés. Portanto, as conclusões e evidências de que dispomos são bastante controversas.

1.2.3- Dieta

Existe uma associação óbvia entre o padrão da dieta e o CCR, ainda que não tenha sido identificado um carcinógeno específico que justifique completamente esta relação (Trock et al., 1990; Willett, 1990; Shike, 1995). Dietas caracterizadas pelo aumento do consumo de carne vermelha,

gordura saturada e diminuição do consumo de frutas, vegetais e grãos, que contêm fibras insolúveis, micronutrientes anti-oxidantes e cálcio estão, em geral, associadas ao aumento do risco de ocorrência da doença (Schottenfeld, 1995; Hill, 1995). É possível que alguns alimentos constituam uma fonte de substratos que possa ser metabolizada por bactérias do cólon, ou ainda, que possa ser ativada a substâncias carcinogênicas ou mutagênicas (Aries et al., 1969; Hill, 1995) por enzimas presentes na mucosa colônica (De Waziers et al., 1991). Dentre estes substratos, estão as aminas heterocíclicas (AH) produzidas pela exposição de carnes a temperaturas de pirólise durante o cozimento e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) contidos nos óleos vegetais (Gerhardsson de Verdier et al., 1991; Smith et al., 1995; Sachse et al., 2002). Ainda há evidências de que a obesidade e a ingestão calórica total são fatores de risco independente, resultando numa duplicação do risco de desenvolver a doença (Slattery et al., 1997; Singh e Fraser, 1998).

1.2.4- Modo de vida

O sedentarismo está associado com risco aumentado de CCR, apesar de se desconhecer o mecanismo (Whittemore et al., 1990; Wilmink, 1997; Potter, 1999). Tabagismo e consumo de álcool apresentam associação com risco de CCR, esse último provavelmente por interferência no metabolismo do ácido fólico (Seitz et al., 1990; Wilmink, 1997; Potter, 1999). Outro importante responsável pela exposição ambiental a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e aminas aromáticas (AA) é o cigarro (Cotton et al., 2000), que parece estar associado ao aumento do risco do CCR, após um período de indução relativamente longo ou de um número considerável de cigarros consumidos por dia (Knekt et al., 1998).

O uso de aspirina e anti-inflamatórios não esteroidais parecem constituir fatores protetores para o desenvolvimento de adenomas e CCR (Thun et al., 1991; Giovanucci et al., 1994; Giovanucci et al., 1995; Rosenberg et al., 1998;

Smalley et al., 1999), particularmente do cólon direito. O mecanismo seria pela alteração do metabolismo do ácido aracdônico, inibindo a COX-2, responsável pela proliferação celular.

1.3- Diagnóstico

O ACRE usualmente se apresenta como um conjunto de sinais e sintomas que incluem anemia, dor abdominal, perda de peso, sangramento retal e modificações do hábito intestinal, como a diarreia e a constipação (Wayer, 1980). Acomete predominantemente indivíduos após os 40 anos de idade, sendo que 90% dos casos ocorrem naqueles com idade maior ou igual a 50 anos (Schottenfeld, 1995; American Cancer Society, 2011; Jemal et al., 2011; Instituto Nacional do Câncer, 2012). O risco para o ACRE aumenta bruscamente a partir dos 50 anos, duplicando a cada década e atingindo o seu máximo entre os 75 e os 80 anos (Winawer et al., 1985; Jemal et al., 2011).

O câncer de cólon acomete de forma similar homens e mulheres. Já no câncer de reto, os indivíduos do sexo masculino são mais frequentemente acometidos do que os do sexo feminino, guardando entre si uma relação de 1,5:1 (Winawer e Sherlock, 1983; *World Cancer Research Fund / American Institut For Cancer Research*, 2007).

1.4- Rastreamento

O rastreamento para a prevenção do ACRE é recomendado para indivíduos com idade maior ou igual a 50 anos, independentemente de sinais, sintomas ou de história familiar, devido a sua alta incidência na população geral, para detecção e remoção dos pólipos adenomatosos, sendo comprovada a redução não apenas da mortalidade pela doença, mas também da sua incidência. O ACRE corresponde de 70% a 80% dos casos de CCR ocorrendo em pacientes

de risco médio, ou seja, indivíduos com idade maior ou igual a 50 anos, independente de sinais ou sintomas da doença e história familiar de câncer (Winawer et al., 1993; Citarda et al., 2001). Sua evolução se baseia na sequência adenoma-carcinoma (Morson, 1968) e na evolução natural de pólipos não tratados (Stryker et al., 1987), demonstrando que mais de 80% dos casos de ACRE derivam de pólipos adenomatosos, particularmente naqueles maiores do que um centímetro de diâmetro. Estudos prévios indicaram redução substancial da incidência de ACRE em indivíduos submetidos à colonoscopia com remoção de pólipos, particularmente naqueles com idade maior ou igual a 50 anos (Winawer et al., 1993; Jorgensen et al., 1993; Thiis-Evensen et al., 1999; Citarda et al., 2001).

Assim, rastreamento para prevenção secundária do ACRE parece custo-efetivo em pessoas com idade maior ou igual a 50 anos (Fisher et al., 2006).

1.5- Fatores prognósticos

O uso de um esquema de classificação clínica (estadiamento) deve englobar características do tumor que correspondam, o mais fiel possível, ao seu comportamento biológico. Além disso, tem como propósito comparar os resultados de intervenções terapêuticas de diversas séries de estudos.

1.5.1- Estadiamento

O principal sistema de estadiamento do tumor utilizado para a determinação do prognóstico e da terapêutica adequada a ser administrada a cada paciente é o TNM (Sobin et al., 2009) (Anexo 1).

O sistema TNM considera a extensão do acometimento do tumor na parede do cólon e em tecidos e órgãos adjacentes (T), a identificação da presença ou ausência de metástases para linfonodos (N) e a identificação da presença ou ausência de metástases em órgãos à distância (M) (Figura 1).

Cinco grupos de pacientes podem ser identificados por esse sistema (estágio 0, I, II, III e IV), sendo que as maiores probabilidades de sobrevida a longo prazo são observadas naqueles com os estágios 0 e I e a menor probabilidade de sobrevivência naqueles com o estágio IV da doença (Zinkin, 1983; Fielding, 1995; Compton et al., 2000; Merkel et al., 2001; Greene et al., 2002) (Anexo 2).

A despeito dos avanços terapêuticos, apenas cerca de metade dos pacientes com ACRE sobrevive por um período de cinco anos (Begg, 1995; Cohen, 1995; Herrero-Jimenez et al., 2000; Habr-Gama, 2005; Rachet et al., 2009).

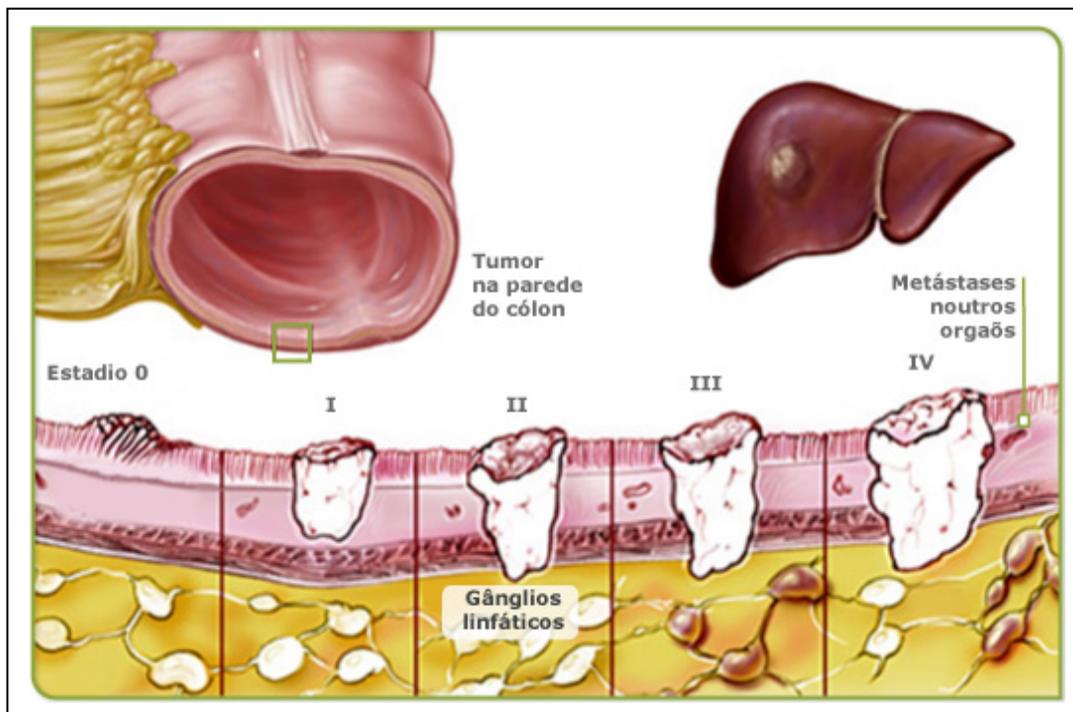


Figura 1- Representação esquemática das possibilidades de acometimento do câncer colorretal em parede colorretal.

1.5.2- Histologia e grau histológico

O adenocarcinoma é a forma histológica mais comum do CCR, correspondendo a cerca de 90% ou mais dos casos sendo classificado pelo grau de diferenciação. Albert Broders, em 1925, foi o pioneiro em classificar os adenocarcinomas pelo seu grau de diferenciação, baseado no percentual de células diferenciadas (Broders, 1925). Foram estabelecidas quatro situações: bem diferenciados, moderadamente diferenciados, pouco diferenciados e indiferenciados ou anaplásicos. Mais tarde, Cuthbert Dukes em 1932, considerou apenas três subdivisões em seu sistema de diferenciação: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e o grau III (indiferenciado), permitindo que essa classificação se tornasse amplamente aceita (Dukes, 1932). O grau histológico é universalmente aceito como fator prognóstico em CCR (Compton et al., 2000). A classificação histológica do CCR foi baseada na normatização da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Anexo 3).

1.5.3- Linfonodos regionais

O mais importante fator prognóstico do CCR é o comprometimento linfonodal regional, razão pela qual é imprescindível uma cuidadosa avaliação histológica de no mínimo 12 a 15 linfonodos (Wong et al., 1999; Tepper et al., 2002; Joseph et al., 2003). A utilização de técnicas mais sensíveis na detecção de envolvimento linfonodal microscópico, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a imunohistoquímica, parece ter importância no prognóstico de pacientes com CCR (Liefers et al., 1998). Muitos pesquisadores e clínicos recomendam que sejam realizadas em associação à análise histológica convencional, acreditando que a identificação da doença por esses métodos constitua fator de prognóstico adverso, orientando para um possível tratamento adjuvante (Hermanek et al., 1999; Compton et al., 2000). Mais recentemente, a biópsia do linfonodo sentinela foi proposta objetivando fornecer informação prognóstica e demonstrou-se que é

tecnicamente factível (Waters et al., 2000; Esser et al., 2001; Paramo et al., 2002). O grande óbice é a taxa de falso negativo que atinge cifras de 60% e, por outro lado, alguns estudos falharam em demonstrar qualquer modificação no estadiamento do tumor (Feig et al., 2001; Warner e Evans, 2002). Portanto, a biópsia do linfonodo sentinela exige estudos prospectivos para estabelecer se realmente possui importância no estadiamento do CCR.

1.5.4- Invasão vascular, linfática e perineural

Apesar de existir uma certa controvérsia entre os estudos, a invasão vascular e a invasão linfática parecem constituir fatores de prognóstico desfavorável (Compton et al., 2000; Burdy et al., 2001; Liebig et al., 2009).

1.5.5- Instabilidade genômica

O desenvolvimento do CCR é dependente da instabilidade genômica em razão de um cenário favorável ao surgimento de mutações, conferindo uma óbvia vantagem para as células tumorais. A instabilidade pode ser observada em pelo menos quatro situações bem definidas: instabilidade de microssatélites, instabilidade cromossômica, deficiência de reparo do DNA associado ao gene *MYH* e pelo fenótipo metilador das ilhotas CpG.

Microssatélites são sequências repetitivas de um a cinco nucleotídeos em todo o genoma, e altamente susceptíveis a erros (De La Chapelle, 2003). O DNA é uma molécula instável e sofre frequentes alterações, como perdas de segmentos, mutações ocorridas durante o processo de divisão celular, etc. Para corrigir tais alterações dispomos de proteínas com função de realizar os reparos necessários para manter a integridade do DNA. Essas proteínas são produzidas a partir de alguns genes conhecidos como genes de reparo ("*mismatch repair genes*" MMR) e suas funções são exercidas de forma contínua,

preservando os tecidos diversos. A observação de grande número de alterações nas sequências de microssatélites em determinado tecido tumoral demonstra a ausência ou deficiência de reparo de DNA. Representa, conseqüentemente, uma evidência indireta de que existe uma deficiência na ação das proteínas de reparo causada pela presença de mutações. De 10% a 15% dos pacientes portadores de ACRE apresentam instabilidade de microssatélites, confirmando a existência de erros de replicação do DNA.

A instabilidade pode ser maior ou menor e é baseada no percentual de instabilidade de um locus. Tumores que não apresentam instabilidade são considerados microssatélites estáveis, ou seja, o número de repetições no tecido tumoral é o mesmo do que no tecido normal. Importante frisar que pacientes com instabilidade de microssatélites apresentam padrões clínicos bastante peculiares, como tumor de localização proximal, tumor do tipo mucinoso com infiltração por linfócitos T citotóxicos e acúmulo de linfócitos B e T peritumoral, e tumor indiferenciado. Em estudo restrito a tumores de reto, os erros de replicação foram identificados em apenas 2% dos casos, confirmando a relação entre a instabilidade de microssatélites e tumores localizados no cólon direito ou transversal (Nilbert et al., 1999).

A instabilidade de microssatélites foi associada ao aumento da sobrevida global (SVG), independentemente do estágio, quando comparado a tumores com microssatélites estáveis em alguns estudos (Gryfe et al., 2000; Samowitz et al., 2001; Popat et al., 2005). O fato de haver evidências no aumento de SVG em pacientes portadores de instabilidade de microssatélite são amparadas por pelo menos duas teorias: a que sugere que o acúmulo de anormalidades genéticas leva à expressão de proteínas aberrantes, reconhecidas pelo sistema imune levando a destruição das células tumorais e a que relaciona o defeito no sistema de reparo com a melhor sobrevida, pois, uma vez que várias mutações não são reparadas durante a replicação, o acúmulo destas torna-se incompatível com a vida celular. Entretanto, outros estudos não confirmam benefícios na SVG (Carethers et al., 1999; Elsaleh et al., 2000; Meyers et al.,

2001; Bertagnolli et al., 2009;). De um modo geral, a instabilidade de microssatélites funciona como um biomarcador podendo ser utilizada para identificar pacientes de excelente prognóstico e com baixo risco de recidiva, onde um tratamento adjuvante não traria benefícios (Sinicrope e Sargent, 2009).

A instabilidade cromossômica ocorre em torno de 80% a 85% dos pacientes portadores de ACRE e caracteriza-se por um padrão de ganhos ou perdas de cromossomos inteiros (aneuploidia) ou partes desses cromossomos, indicando a presença de defeitos em sistemas responsáveis pela reparação apropriada dos cromossomos durante a divisão celular. São caracterizados pela inativação de genes protetores (“*gatekeepers*”), frequentemente identificada por um fenômeno chamado perda de heterozigose (LOH). Essa LOH caracteriza a perda de função de ambos os alelos de um gene (perda alélica do cromossomo 18q), geralmente o primeiro por mutação e o segundo por deleção, em especial nos casos avançados (Lengauer et al., 1998).

Outro gene protetor é o gene *APC*, que aparece mutado em 70% a 80% dos CCR e até 50% deles mostram mutações independentes na β -catenina. A mutação neste gene interfere na ligação com a β -catenina, a qual constitui um passo importante na via de sinalização “*wingless-type*” (WNT) (Cadigan e Liu, 2006). Esta via está implicada na regulação do crescimento, apoptose e diferenciação celular. Todas as mutações que ocorrem no gene *APC* alteram a ligação entre *APC* e β -catenina, resultam numa diminuição da degradação normal da β -catenina e originam uma constante ativação da via de sinalização WNT (Gregorieff e Clevers, 2005). A inativação dessa proteína é um achado frequente em etapas iniciais da transformação neoplásica (Sparks et al., 1998). A mutação germinativa do *APC* causa a polipose adenomatosa familiar (PAF). Além disso, a mutação do *KRAS*, a deleção do 17p, que contém o gene supressor tumoral *p53*, são alterações também características da instabilidade cromossômica.

O sistema de reparo do DNA tem como objetivo corrigir o erro de pareamento de bases, inserções e deleções que surgem como consequência do erro da DNA polimerase durante a síntese de DNA. Os genes de reparo cumprem diversas funções na estabilização genética, seja corrigindo erros na síntese de DNA ou participando nos passos iniciais de resposta a diferentes classes de danos ao DNA por apoptose (Jiricny e Nyström-Lahti, 2000; Peltomaki, 2001). Na Síndrome de Lynch há um defeito herdado em genes de reparo de lesões de DNA. Mutações germinativas em pelo menos um dos genes de reparo podem ser encontradas em mais de 80% dos indivíduos com Síndrome de Lynch (Peltomaki, 2003). Dentre os genes de reparo, os mais importantes são o gene *MLH1*, que localiza-se no cromossomo 3p21 (Peltomaki e Vasen, 2004) e o gene *MSH2*, que encontra-se no cromossomo 2p16 (Peltomaki, 2003). Mutações nos genes *MSH2* e *MLH1* representam mais de 80% dos casos com mutações germinativas na Síndrome de Lynch (Wijnen et al., 1997; Rossi et al., 2002).

A síndrome de polipose associada ao *MYH* é uma síndrome recessiva caracterizada pelo desenvolvimento de pelo menos 15 pólipos colônicos (preferencialmente no cólon direito) e pela predisposição ao CCR. Esses pacientes tendem a ser mais idosos e possuem duas mutações herdadas no gene de reparo de excisão de base *MYH* (*mutY homologue*) (Jones et al., 2002; Gismondi et al., 2004).

Ainda um percentual de pacientes portadores de ACRE, que não apresentam instabilidade cromossômica e/ou microssatélite, possuem como característica um silenciamento de vários genes por mecanismos epigenéticos, dentre eles, a metilação de citosinas das ilhotas CpG de regiões promotoras de genes funcionantes. As citosinas metiladas (5-metil-citosina) dos dinucleotídeos 5'-CpG-3' se tornam alvos preferenciais para a ocorrência de transições C>T e de transversões G>T, ocasionando mutações somáticas e alterações funcionais de genes condutores da carcinogênese (Rashid e Issa, 2004).

1.5.6- Perda de heterozigose

A perda do alelo envolvendo o cromossomo 18q ocorre em mais de 50% dos pacientes portadores de CCR e está íntimamente relacionado com o gene *DCC*. O produto codificado pelo gene *DCC* é a proteína DCC (*"deleted in colorectal cancer"*), embora pertencendo a família das imunoglobulinas, desempenha uma importante função relacionada a adesão celular. Existe uma tendência em acreditar que a perda desta proteína possa comprometer a capacidade de adesão celular no CCR, favorecendo o surgimento de metástases. A consequência é a associação direta com o prognóstico (Fearon et al., 1990; Shibatta et al., 1996); a perda da heterozigose do 18q foi identificada como marcador de prognóstico desfavorável em termos de SVG (Jen et al., 1994; Lanza et al., 1998; Popat et al., 2005).

1.5.7- Antígeno carcinoembrionário

O antígeno carcinoembrionário (ACE) é uma glicoproteína encontrada em vários tumores, incluindo o CCR. Observamos níveis elevados de ACE em 65% dos pacientes com CCR ao diagnóstico. O aumento pode preceder evidências de metástases em exames de imagem (Pietra et al., 1998). Alguns estudos demonstraram que o ACE é um fator prognóstico independente (Harrisson et al., 1997). Portanto, é razoável recomendar a dosagem pré-operatória da glicoproteína a todos os pacientes que se submetam a tratamento cirúrgico de CCR e sobretudo no seguimento pós-operatório.

1.5.8- Obstrução e perfuração

A presença de obstrução intestinal constitui prognóstico desfavorável para portadores de CCR, principalmente as obstruções ocorridas no cólon direito. Esse detalhe é consequência de que tumores localizados no cólon direito

necessitam atingir um volume considerável para que ocorra o fenômeno obstrutivo, quando comparado a tumores localizados no cólon esquerdo (Wolmark et al., 1983; Garcia-Valdecasas et al., 1991; Chen e Sheen-Chen, 2000). Da mesma forma, a ocorrência de perfuração intestinal também está associada a um prognóstico desfavorável (Willet et al., 1985; Steinberg et al., 1986).

1.6- Câncer colorretal hereditário

1.6.1- Polipose adenomatosa familiar

É uma desordem autossômica determinada por mutação do gene *APC*. Constitui 1% de todos os CCRs. Apresenta-se sob a forma de câncer de cólon ou de reto em adultos jovens, secundário à extensa polipose adenomatosa colônica. Centenas a milhares de pólipos desenvolvem-se entre os sete anos e os 36 anos (média de idade de 16 anos). Aos 35 anos, 95% dos indivíduos com a doença já terão desenvolvido pólipos, sendo que, se não for feita a cirurgia profilática, o tumor é inevitável (Solomon e Burt, 2010). Portanto, embora esses pólipos sejam inicialmente lesões benignas, o grande número deles garante que ao menos algum irá progredir para uma lesão invasiva (Kinzler e Vogelsteins, 1996). A idade média para a malignização das lesões é de 39 anos (entre 34 anos e 43 anos).

1.6.2- Câncer colorretal hereditário sem polipose

Também conhecido como síndrome de Lynch, o CCR sem polipose (CCRHSP) é uma doença autossômica, na qual a maioria dos pacientes apresenta um adenoma solitário que evolui para neoplasia colorretal. Ocorre em pacientes jovens (média de idade entre 42 anos e 45 anos). Os pacientes podem ter CCRs sincrônicos ou metacrônicos, assim como lesões malignas extracolônicas, entre elas o adenocarcinoma endometrial, o câncer de estômago, o de intestino

delgado, o de fígado, o de trato biliar, o de cérebro e o de ovários, assim como o carcinoma de células transicionais dos ureteres e pelve renal. Perfaz de 3% a 5% de todos os CCRs e é causado por uma mutação em um entre dos diversos genes reparadores do DNA, principalmente o *MLH1*, o *MSH2*, o *MSH6*, o *PMS1* e o *PMS2*. Quando a síndrome é diagnosticada, estes indivíduos têm de 70% a 80% de chance de desenvolver CCR e 39% de chance de evolução para câncer de endométrio até aos 80 anos de idade (Hampel e Peltomaki, 2000).

1.7- Câncer colorretal esporádico

O CCRE acomete indivíduo isolado, em geral com idade avançada em uma família. O desenvolvimento do CCRE está intimamente relacionado com pelo menos duas classes de genes. Os oncogenes, envolvidos na regulação da proliferação celular (transdução de sinais, fatores de transcrição, etc...) e os genes supressores, reguladores negativos da proliferação celular. Mutações de ganho de função nos oncogenes são dominantes (Alberts et al., 2006), enquanto que mutações de perda de função nos genes supressores são recessivas (Grady e Markowitz, 2002), ambas levando ao descontrole da proliferação celular. No CCRE os eventos mutacionais aleatórios durante a carcinogênese seguem uma sequência bem estabelecida. A inativação do gene *APC* localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q) é o passo inicial para a displasia em um adenoma. Na sequência, mutações adicionais vão se acumulando em oncogenes (família *RAS*) e em genes supressores de tumor nos cromossomos 18q (*DCC*, *SMAD2*, *SMAD4*) e 17q (*TP53*), levando a uma displasia acentuada e posteriormente ao carcinoma (Fujiwara et al., 1998).

1.8- Câncer colorretal familiar

É de muito conhecido que indivíduos de determinadas famílias apresentam risco aumentado da doença, sem seguir um padrão mendeliano (Johns e Houlston, 2001; Noe et al., 2008). Esses indivíduos apresentam um

genoma alterado que somado a fatores ambientais levam ao fenótipo maligno. Polimorfismos de baixa penetrância (genes de susceptibilidade), como os de genes relacionados com a angiogênese, com o metabolismo de carcinógenos ou de genes relacionados com o metabolismo do ácido fólico, podem explicar estes agrupamentos de indivíduos portadores de tumor em uma mesma família (Ma et al., 1997; Molloy et al., 1997; Ma et al., 1999; Friso et al., 2002; Shannon et al., 2002; Pufulete et al., 2003).

1.9- Metabolismo do ácido fólico

O ácido fólico (ácido pteroiloglutâmico-vitamina B9) é a forma mais estável de folato e é um dos substratos essenciais para o metabolismo celular (síntese de DNA e metilação). Entretanto não é encontrado naturalmente em tecidos vivos, necessitando ser reduzido “*in vivo*”, o que resulta em diidrofolato e tetraidrofolato, pela adição de átomos de hidrogênio. A sua deficiência foi associada a um grande número de malignidades. Derivados metilados de ácido fólico [formiltetraidrofolato N10 e N5, N10-metileno (5,10-MTHF)] são doadores de carbono para a síntese de nucleotídeos. Outro derivado de ácido fólico [metiltetraidrofolato N5 (5-MTHF)] produzido a partir de 5,10-MTHF por metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), é um doador metil da metionina (Met) na síntese de homocisteína (Hcy). Essa reação é catalisada pela metionina sintase, cujo cofator é a cobalamina (vitamina B12) (Stryer, 1992). A atividade da metionina sintase depende da função da metionina sintase redutase, que participa na mudança de metionina sintase para sua forma ativa (Leclerc et al., 1998). A metionina é metabolizada pela metionina adenosiltransferase para S-adenosilmetionina (SAM), que é um doador metil em inúmeras reações de transmetilação. Um dos produtos dessas reações é S-adenosilhomocisteína (SAH), convertido por adenosilhomocisteinase para homocisteína, que pode ser usado novamente para a síntese de Met. Se o nível celular de SAM é alto, a atividade da metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) é inibida e a cistationina sintase é ativada. Na reação catalisada pela cistationina β -sintase (CBS), a Hcy é

metabolizada em cistationina, e depois em cisteína (Finkelstein, 1998). Carência de ácido fólico, assim como irregularidades funcionais no metabolismo da enzima Hcy, produzem níveis elevados de Hcy nas células. Excesso dessa enzima leva à produção de betaína, que pode ser usado como doador metil para a síntese de Met. A reação é catalisada pela betaina metiltransferase homocisteína, uma enzima que só pode ser encontrada nos rins e fígado, e sua função está relacionada com a atividade inadequada da Met. Inibidores desta enzima são SAM e SAH, substâncias nas quais provavelmente regulam todo o metabolismo de Hcy e Met (Filkenstein, 1998).

Aumento dos níveis de Hcy pode também ser o resultado de uma metionina sintase mal funcionante. O substrato desta enzima é o 5-metiltetrahydrofolato, que é produzido em reações catalisadas por MTHFR. O cofator da metionina sintase é a cobalamina, que participa na transferência de grupos metil do 5-metiltetrahydrofolato de homocisteína. Os produtos desta reação são Met e tetrahydrofolato, que é levado novamente para o ciclo do folato. Cobalamina vinculado a enzima pode assumir três formas. O primeiro (COB I) é um redutor forte, que pode ser oxidada (COB II), levando a inativação da enzima. A ativação enzimática é dependente de uma metilação redutora, que produz a forma ativa da cobalamina (COB III). O SAM é o responsável pelo fornecimento de grupos metil. Os elétrons são retirados da nicotinamida adenina fosfato dinucleotídeo (NADPH) e todo o processo é catalisado pela metionina sintase redutase (MTRR) (Leclerc et al., 1998; Matthews et al., 1998). A metionina sintase (MTR) tem três domínios. O domínio N-terminal liga-se a substratos para a reação, o domínio central liga-se a cobalamina, enquanto o domínio C-terminal é um domínio de regulação, interagindo com o SAM (Chen et al., 1997; Matthews et al., 1998).

A timidilato sintase (TS) é a enzima chave para a biossíntese de timidilato, sendo um importante regulador dos níveis de desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) em íntima relação com o metabolismo do folato. A peculiaridade da TS deriva principalmente de seu papel regulatório no interior

da célula além de sua função enzimática. Pequenas mudanças na expressão de enzimas dNTP sintéticas influenciam na biodisponibilidade de dNTP afetando a sua replicação, permitindo um viés de leitura e interpretação (Angus et al. 2002; Martomo e Mathews, 2002). Por outro lado, o metabolismo do folato afeta a integridade do DNA através da síntese de nucleotídeos e por mecanismos de metilação (Choi e Mason, 2000).

Portanto, as principais enzimas no metabolismo do folato são a MTHFR, a MTR, a MTRR e a TS (Figura 2).

1.9.1- Metilenotetrahidrofolato redutase

Em 1994, o gene codificador da enzima MTHFR humana foi identificado. Está localizado no cromossomo 1 (1p36.3), possui 11 éxons e produz 656 resíduos de aminoácidos (Goyette et al., 1998). Dois polimorfismos A1298C e C677T, localizados nos éxons 7 e 4 respectivamente, que alteram a atividade enzimática, foram identificados no gene *MTHFR*. A atividade enzimática reduzida leva a uma diminuição nos níveis de SAM, inibição da metiltransferase e subsequente hipometilação.

O polimorfismo A1298C (rs1801131), localizado na região codificante do domínio regular, causa a substituição de glutamato por alanina. Os genótipos homocigoto variante 1298CC e heterocigoto 1298 AC foram identificados em cerca de 10% e 15% dos indivíduos em geral, enquanto que a frequência do alelo 1298C é de cerca de 0,36 nesses indivíduos (Botto e Yang, 2000). Heterocigotos para o polimorfismo A1298C apresentam uma redução na atividade da enzima MTHFR, resultando em elevados níveis plasmáticos de Hcy (Van Der Put et al., 1998). Duas meta-análises sugerem que o genótipo homocigoto variante 1298CC protege indivíduos do CCR (Kono e Chen, 2005; Huang et al., 2007), apesar do efeito funcional do alelo C ser ainda desconhecido.

No caso do polimorfismo C677T (rs1801133), a enzima se torna termolábil, com diminuição acentuada da sua atividade (70%) com o aumento da temperatura (Frosst et al., 1995). Esse efeito pode ser suprimido pela adição de ácido fólico. Cerca de 10% e 50% dos Caucasianos apresentaram o genótipo variante 677TT e heterozigoto 677CT, respectivamente (Brattstrom et al., 1998). Os indivíduos com o genótipo heterozigoto, também apresentaram redução da atividade enzimática da ordem de 30%, com níveis elevados de Hcy (Gunadson et al., 1998; Van Der Put et al., 1998). As frequências de cada alelo diferiram entre populações diversas; a frequência do alelo 677T em negros (0,05 - 0,18) foi menor do que em brancos (0,25 - 0,44) em estudo prévio (Botto e Yang, 2000).

Baixa prevalência de CCR foi identificada em indivíduos com o genótipo 677TT, sobretudo em populações com altos níveis séricos de folato (Chen et al., 1996; Ma et al., 1997; Slattery et al., 1999; Choi e Mason, 2002; Le Marchand et al., 2002; Shannon et al., 2002; Toffoli et al., 2003; Ulvik et al., 2004; Yin et al., 2004). Efeito protetor para CCR (OR: 0,776, IC 95%: 0,603-0,997; p=0,047) foi também associado ao alelo T em população macedônica (Matevska et al., 2008). Já Cao et al., em 2008, observaram risco 2,42 vezes maior para CCR em portadores do genótipo homozigoto variante do gene (Cao et al., 2008) e no estudo de Iacopetta et al. (2009), indivíduos com o alelo T e carência de folato apresentaram maior risco para câncer em cólon proximal (Iacopetta et al., 2009). Outros pesquisadores encontraram uma associação de maior risco de CCR em pacientes carreadores do alelo C (Wang et al., 2006; Lima et al., 2007; Chang et al., 2007). Ainda, o polimorfismo gênico não foi associado ao risco de CCR em outros estudos (Keku et al., 2002; Plaschke et al., 2003). Resultados contraditórios nos diferentes estudos podem ter resultado de diferenças nos hábitos alimentares, modo de vida e variações raciais, além de eventualmente outros polimorfismos estarem envolvidos no processo de carcinogênese.

1.9.2- Metionina sintase

O gene humano que codifica a enzima MTR foi localizado na região telomérica do cromossomo 1 (1q43). O gene é constituído por 12 éxons e codifica uma proteína de 1265 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 140kDa (Chen et al., 1997; Leclerc et al., 1998; Mathews et al., 1998). A MTR é essencial para a manutenção adequada de metionina e folato intracelular, bem como para assegurar que as concentrações de Hcy não atinjam níveis tóxicos (Van Der Put et al., 1997).

O polimorfismo mais comum no gene *MTR* é o A2756G (rs1805087), resultante de uma mutação de ponto que acarreta a substituição de ácido aspártico por glicina, localizado no éxon 8 (Van Der Put et al., 1997; Van Der Put et al., 1998). O ácido aspártico é fortemente polar e localiza-se na α hélix entre a cobalamina e o domínio regulatório. A mudança para aminoácido não-polar (glicina) conduz a perturbações na estrutura tridimensional da proteína e de sua função (Van Der Put et al., 1997; Van Der Put et al., 1998). O polimorfismo A2756G provavelmente leva a uma oxidação inadequada do cofator (cobalamina-vitamina B12), com redução da atividade da MTR e conseqüente aumento do nível de Hcy celular (Chen et al., 1997). Entretanto, outros estudos não confirmaram a tese de que há redução da atividade enzimática e conseqüente hiperhomocisteinemia (Ma et al., 1999; Klerk et al., 2003; Nagaraja e Diwakar, 2008)

O genótipo homozigoto variante 2756GG foi identificado em 2% a 3% de asiáticos (Van Der Put et al., 1997; Ma et al., 1997; Zhang e Daí, 2001; Le Marchand et al., 2002), em 3% de europeus e em 6% de afro-americanos (Sharp e Little, 2004; *Human Genome Epidemiology Network in* <http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/default.htm>). Seu papel no risco de CCR é incerto. Dois estudos, um em CCR e outro em adenomas demonstraram uma leve redução do risco de CCR para o genótipo GG (Ma et al., 1999; Chen et al., 1998). Um outro estudo não encontrou nenhum efeito global, entretanto foi observado uma associação inversa entre o genótipo GG e CCR em Hawaianos (Le Marchand et al., 2002).

1.9.3- Metionina sintase redutase

A enzima MTRR é codificada pelo gene *MTRR* que localiza-se no cromossomo 5 (5p15.31) (Leclerc et al., 1999). É responsável pela regulação da MTR por metilação redutora, possuindo um peso molecular de 77kDa. A enzima é um membro da família de elétrons transferase e possui 3 locais característicos na qual se ligam monocucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo flavina adenina (FAD) e NADPH. O gene *MTRR* é composto por 15 éxons, sendo da família dos genes de manutenção (“*housekeeping*”) (Leclerc et al. 1999; Wilson et al., 1999).

A remetilação de Hcy em Met necessita da enzima MTR, cujo cofator é a cobalamina. O polimorfismo mais comum no gene *MTRR* é o A66G, que leva a substituição da isoleucina por metionina (I22M), no final do íntron 6. O polimorfismo A66G (rs1801394) está associado a maior concentração da Hcy, em razão de possíveis distúrbios da atividade catalítica proteica (Leclerc et al., 1998; Gaughan et al., 2001).

O genótipo homozigoto variante 66GG foi identificado em 19% a 29% de indivíduos da população em geral. Foi também identificado em 8% a 10% dos japoneses (Wilson et al., 1999; Hobbs et al., 2000; Gaughan et al., 2001, Geisel et al., 2001; Ray et al., 2001; Hassold et al 2001, O’Leary et al., 2002, Le Marchand et al., 2002; Rady et al., 2002). Em afro-americanos e em hispânicos a prevalência do genótipo homozigoto variante foi de 42% e de 50% respectivamente. No Brasil, o genótipo GG foi identificado em 15% de 220 crianças normais (Aléssio et al., 2004) e em 17,1% das mulheres de baixa renda do Estado de São Paulo (Almeida, 2010). Ainda, a frequência do alelo 2756G foi de 0,36 em 148 crianças brasileiras (De Godoy et al., 2010). As frequências do alelo 66G, em norte americanos, foram de 0,52 e 0,28 em brancos e em negros não hispânicos, respectivamente (*Human Genome Epidemiology Network in www.cdc.gov/genomics/hugenet/default*).

Num único estudo, o genótipo *MTRR* A66G não foi associado com CCR quando três grupos étnicos foram avaliados em conjunto. Entretanto quando foi estudado apenas a etnia branca, foi observado uma tendência limítrofe para o

risco de CCR com o aumento do número de alelos variantes (OR para GG *versus* AA=1,9; 95 % IC: 1,0-3,8 p=0,07) (Le Marchand et al., 2002).

1.9.4- Timidilato sintase

O gene que codifica a enzima TS está localizado no cromossomo 18 (18p11.32) e possui papel crucial na síntese de DNA, em razão do envolvimento no mecanismo de autoregulação transcricional (Chu et al., 1991). Catalisa a conversão intracelular de deoxiuridilato a deoxitimidilato, na qual é a única fonte de timidilato, sendo precursor essencial para a síntese de DNA. O metabólito ativo do 5fluorouracil, 5-fluorodeoxiuridilato (5-FdUMP), liga-se a TS e inibe a formação de um complexo estável. O gene *TS* é polimórfico com sequencias duplas (2R) ou triplas (3R) em “*tandem*” de 28 pares de bases na região regulatória 5’ (rs34743033).

A região polimórfica parece funcional e pode modular a expressão da proteína, com maior eficiência conferida pelo alelo 3R (Ulrich et al., 2002). A maior expressão da proteína pode aumentar a conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) para deoxitimidina monofosfato (dTMP), minimizando tanto o nível de uracil que pode ser incorporado ao DNA como quebras de DNA. Essa conversão requer 5-10-methilenotetrahidrofolato como doador metil.

O genótipo homozigoto 3R3R foi identificado em 2% a 3% dos asiáticos, em 3% de Europeus e em 6% de Afro-americanos. Em brancos norte-americanos a frequência do genótipo 2R2R variou de 19% a 23% e de 14% a 20% em africanos e em afro-americanos (Horie et al., 1995; Marsh et al., 1999; Marsh et al., 2000; Luo et al., 2002; Trinh et al., 2002; Skibola et al., 2002; Ulrich et al., 2002).

A frequência do alelo 3R variou de 0,38 a 0,54 entre caucasianos, de 0,49 entre quenianos e 0,82 entre chineses (Marsh et al., 1999; Marsh et al., 2000). Em termos de risco para o desenvolvimento de ACRE, aqueles indivíduos

carreadores do genótipo 2R2R detêm uma OR de 0,52, ou seja, esse genótipo apresenta efeito protetor para o desenvolvimento do tumor. Um dado interessante é que a ingestão de folato parece não influir decisivamente no risco de ACRE associado ao polimorfismo (Chen et al. 2003)

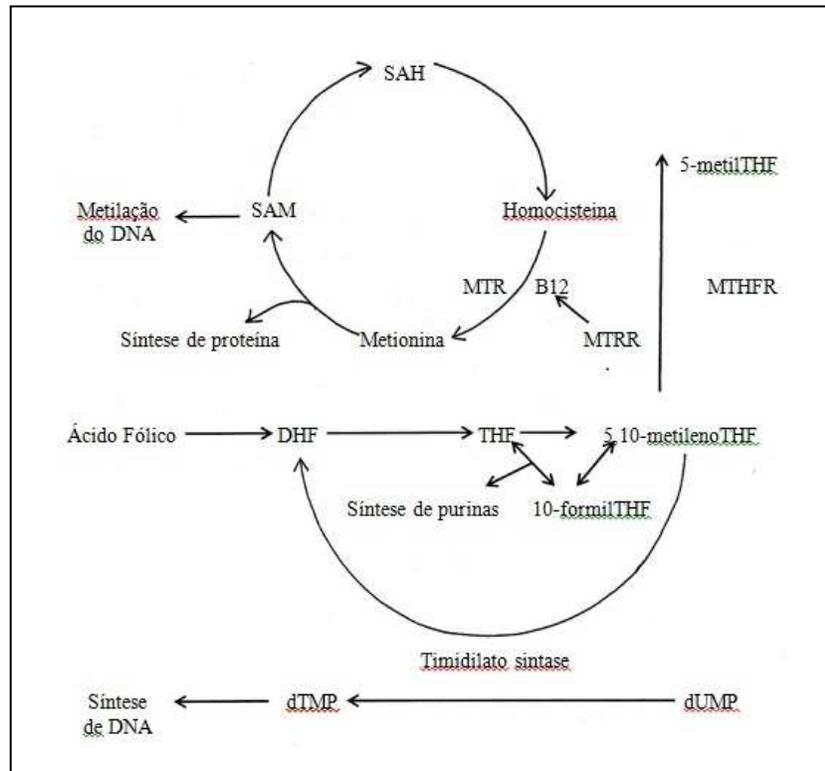


Figura 2- Metabolismo do ácido fólico, metionina e homocisteína. MTHFR: metilenotetrahydrofolato redutase, THF: ácido tetrahydrofólico, MTR: metionina sintase, MTRR: metionina sintase redutase, DHF: ácido dihydrotetrafolico, SAM: S-adenosilmetionina, SAH: S-adenosilhomocisteína, B12: vitamina B12, dTMP: deoxitimidina monofosfato, dUMP: deoxiuridina monofosfato.

Todos os seres humanos são praticamente idênticos no nível genético, e o conjunto completo de genes e outros aspectos da sequência do nosso DNA são essencialmente os mesmos. A maior parte do DNA de qualquer indivíduo

(99,5%) é exatamente a mesma comparada com qualquer outro indivíduo (Goldstein e Cavalleri, 2005). As diferenças na sequência de DNA entre indivíduos são chamadas de polimorfismos. Polimorfismos são definidos como variantes genéticas que estão presentes na população em uma frequência maior que 1%, enquanto que variantes de sequência de DNA que estão presentes em uma frequência menor que 1% na população são arbitrariamente chamados de mutação (Schafer e Hawkins, 1998).

Todas as enzimas envolvidas com o metabolismo do ácido fólico, metionina e homocisteína são codificadas por genes polimórficos (Frosst et al., 1995; Goyette et al., 1998; Van Der Put et al., 1997; Chen et al., 1997; Leclerc et al., 1998; Ulrich et al., 2002). Assim, o “*status*” de folato pode ser potencialmente perturbado por estes genes polimórficos. Dois mecanismos foram propostos para explicar como a deficiência de folato pode concorrer para o aumento do risco de malignidade: **a)** por hipometilação do DNA e ativação de proto-oncogenes, e/ou **b)** por indução de um acréscimo inadequado de uracil durante a síntese de DNA, levando a uma reparação catastrófica do DNA (quebra e/ou dano cromossomal) (Blount et al., 1997; Fang e Xiao, 2003). Entretanto as evidências que sustentam esses mecanismos em humanos são limitadas.

Os papéis dos polimorfismos gênicos relacionados com o metabolismo do ácido fólico no risco do ACRE são contraditórios e parecem ser modulados pela quantidade de ácido fólico disponível (Ma et al., 1997; Ma et al., 1999; Gershoni-Baruch et al., 2000; Choi e Mason, 2000; Friso et al., 2002; Pufulete et al., 2003; Sharp e Little, 2004).

A origem racial da população brasileira é altamente heterogênea, composta por indígenas e imigrantes da Europa, África e Ásia (Arruda et al., 1998; Alves-Silva et al., 2000; Carvalho-Silva et al., 2001), e os estudos sobre a influência dos polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS* no risco de ocorrência do CCR foram realizados fundamentalmente em populações caucasóides e asiáticas.

Vale ainda enfatizar que as neoplasias constituem a segunda causa de óbito na região sudeste do Brasil (Duncan et al., 1992) e que doenças relacionadas à exposição ocupacional a agentes químicos foram descritas em pacientes desta região, de forma aparentemente mais frequente do que em outras regiões do país (Lorand et al., 1984; Augusto, 1987; Ruiz et al., 1994).

Ainda, já é de muito conhecido que dieta carente em ácido fólico está associada com a origem do CCR (Franceschi et al., 1998) e que a carência de folato é característica de nossa população (Matos e Martins, 2000).

Frente ao exposto, foram definidos os objetivos do estudo.



2- OBJETIVOS

Foi avaliado um grupo de pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal esporádico (ACRE) e um grupo de indivíduos normais, que serviram como controles, tendo como objetivos:

- Verificar se os polimorfismos *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e *TS* 2R3R influenciaram o risco de ocorrência do ACRE;
- Verificar se os polimorfismos gênicos estiveram associados à idade, ao sexo, à raça, à localização, ao grau de diferenciação e ao estágio do tumor de pacientes com ACRE.



3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram avaliados 113 pacientes classificados como ACRE atendidos por ocasião do diagnóstico, no ambulatório de Proctologia do Departamento de Cirurgia e no ambulatório de Oncologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), que serviram como casuística de estudo prévio conduzido por pesquisadores do nosso grupo, no período de março de 1992 a julho de 2003. Foram excluídos da casuística os pacientes que apresentavam polipose adenomatosa colônica, síndrome de Lynch, doenças inflamatórias intestinais, e aqueles que não aceitaram participar do estudo proposto.

Foi também estudado um grupo controle, constituído por 188 doadores de sangue atendidos no Hemocentro da Unicamp, com idade entre 50 anos e 60 anos, que não referiram perda de peso, sintomas gastrointestinais ou antecedente familiar de CCR, e que não apresentaram doenças consideradas pré-neoplásicas, como a polipose adenomatosa colônica, a síndrome de Lynch e as doenças inflamatórias intestinais. Esses indivíduos também serviram como controles de estudo anterior.

3.1- Avaliação clínica

Os dados relativos à identificação, à idade, ao sexo, à raça e aos exames laboratoriais necessários ao diagnóstico, ao tipo histológico, ao grau de diferenciação e ao estágio do tumor, foram obtidos dos prontuários de cada paciente. Para o grupo controle, os dados relativos à identificação, à idade, ao sexo, à raça e à história clínica e familiar foram obtidos por interrogatório específico.

3.2- Avaliação do tumor

O diagnóstico de ACRE foi estabelecido em cortes histológicos de fragmentos do tumor incluídos em parafina e corados por hematoxilina e eosina e a classificação do grau de diferenciação do tumor foi realizada de acordo com os

critérios propostos por Albert Broders (Broders, 1925). Foi considerada a localização do tumor descrita no exame anátomo-patológico da peça cirúrgica. Foram considerados como proximais os tumores localizados em cólons ascendente, transverso ou descendente, e como distais os localizados em sigmóide ou reto.

O estadiamento do tumor foi realizado com base nos resultados obtidos do exame histológico da peça cirúrgica, da ultrassonografia e tomografia computadorizada do abdome e pelve, do raio-x de tórax e dos achados intra-operatórios, de acordo com o proposto por Greene et al para o sistema TNM (Greene et al., 2002). (Anexos 2 e 3)

Os pacientes foram distribuídos de acordo com a idade, o sexo, a raça, a localização, o grau de diferenciação e o estágio do tumor.

Os controles foram distribuídos de acordo com a idade, o sexo e a raça.

3.3- Análise molecular dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS 2R3R*

A genotipagem foi realizada no Laboratório de Genética do Câncer da Disciplina de Oncologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, coordenado pela Prof^a. Dra. Carmen Silvia Passos Lima.

3.3.1- Extração do DNA

O DNA genômico foi obtido de amostras de sangue periférico dos pacientes com ACRE e dos indivíduos controle, por extração com cloreto de lítio.

A extração de DNA seguiu o método descrito por John Woodhead (Woodhead et al., 1986), apresentado a seguir:

Um tubo do tipo “*Vacutainer*” com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e cerca de 5,0ml de sangue periférico foi coletado de cada paciente e controle. Centrifugou-se a amostra por dez minutos a 2800rpm em temperatura ambiente para a separação do plasma. Em seguida, foram adicionados ao sedimento 5ml de tampão de lise I (Tris-HCl 10 mM pH8,9, KCl 10mM, MgCl₂ 10mM, EDTA 2mM) e 125µl de Triton X-100. O sedimento contendo as células foi homogeneizado nesta solução, a qual foi centrifugada a 2000rpm a 4°C por dez minutos. O sedimento formado devido ao processo de centrifugação foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* em 5,0ml do mesmo tampão (tampão de lise I), e a solução seguida de nova centrifugação com as mesmas condições descritas acima. Esse processo foi realizado continuamente até a obtenção de um sedimento sem impurezas, sendo então homogeneizado em 800µl de tampão de lise II (Tris-HCl 10mM pH 8.0, MgCl₂ 10mM NaCl 0,4M, EDTA 2mM e 25µl de SDS 20%), incubando-se a solução a 55°C por dez minutos. Após esta incubação foram adicionados 300µl de NaCl 5M, seguindo-se duas extrações com 0,5 volume de uma mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), centrifugando-se sempre a 12.000rpm por cinco minutos em temperatura ambiente. A seguir, foram realizadas mais duas lavagens com mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado pela adição de um volume de acetato de sódio 3M pH 5,5 e dois volumes de etanol absoluto gelado, mantendo-se em congelador a -20°C, por uma hora. Após este período, a solução foi centrifugada a 12.000rpm por cinco minutos em temperatura ambiente. O sedimento foi então lavado com 1ml de etanol a 70%. Após a retirada do etanol a 70%, o sedimento de DNA ficou em temperatura ambiente para secagem. Uma vez seco, o DNA foi homogeneizado em água Milli Q estéril, para uma concentração final de aproximadamente 100ng/µl. Esse DNA foi colocado em banho-maria a 37°C por uma noite, para que se dissolvesse por completo. A seguir, analisou-se o DNA dissolvido em gel de agarose a 0,8%, contendo brometo de etídio, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X para subsequente visualização sob luz ultravioleta.

3.3.2- Identificação dos genótipos dos polimorfismos do gene *MTHFR*

O polimorfismo *MTHFR* A1298C foi analisado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e digestão enzimática, conforme descrição previa (Yi et al., 2002). Para a amplificação da região de interesse do gene, foram utilizados os iniciadores direto (5'-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC-3') e reverso (5'-CACTTTGTGACCATTCGGTTTG-3'). As condições para a PCR para a amplificação do DNA foram as mesmas descritas anteriormente. Os produtos da reação sofreram digestão enzimática com a enzima MbolI (Fermentas, Ontário, CA) e, posteriormente, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de poliacríamida a 20%. Fragmentos de 84 pares de bases (pb), 31pb, 30pb e 18pb corresponderam ao alelo variante, enquanto que o alelo selvagem foi caracterizado por fragmentos de 56pb, 31pb, 30pb, 28pb e 18pb (Figura 3).

Os genótipos do polimorfismo *MTHFR* C677T foram analisados por meio de PCR, seguida de digestão enzimática, como descrito previamente (Ioannidis et al., 2001). A amplificação por PCR do DNA genômico foi realizado utilizando-se o iniciador (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3') e seu reverso (5'-AGGACGGTGCGGTCAGAGTG-3'). Trinta e cinco ciclos de incubação foram realizados por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 68°C e 2 minutos a 72°C com um alongamento de sete minutos a 72°C ao final dos ciclos. O produto foi submetido à digestão enzimática com a enzima HinfI (Fermentas, Ontário, CA). Os genótipos foram analisados por eletroforese em gel de poliacríamida a 7% (brometo de etídio). Fragmentos de 175 e 23pb corresponderam ao alelo variante enquanto que o alelo selvagem foi caracterizado por fragmentos de 198pb (Figura 4).

3.3.3- Identificação dos genótipos do polimorfismo do gene *MTR*

Os genótipos do polimorfismo do gene *MTR* A2756G foram analisados por PCR utilizando-se 0,5mg a 1,0mg de DNA genômico humano e 0,2mM do iniciador direto (5'-TGTTCCCAGCTGTTAGATGAAAATC-3') e do iniciador reverso

(5'-GATCCAAAGCCTTTTACTCCTC-3'). As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação por cinco minutos a 94° C e 40 ciclos a 95°C por 60 segundos, 60°C por 90 segundos e 72°C por 60 segundos. Isto foi seguido por uma extensão de cinco minutos a 72°C. A digestão dos fragmentos foi realizada utilizando 1,3µL tampão e 20 unidades de enzima de restrição *HaeIII* (*New England Biolabs*, Massachusetts, EUA) adicionado a 12µL do produto da PCR e incubados a 37°C por pelo menos duas horas. Os produtos de digestão foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 3% após serem corados com brometo de etídio. O alelo selvagem produziu um fragmento de 211pb e o alelo variante produziu dois fragmentos de 80pb e 131pb (Figura 5).

O método utilizado para a identificação dos genótipos do polimorfismo *MTR* A2756G foi o descrito por Christine Skibola et al. (2002) (Skibola et al., 2002).

3.3.4- Identificação dos genótipos do polimorfismo do gene *MTRR*

A identificação dos genótipos do polimorfismo A66G foi determinada por PCR e digestão enzimática, como descrito (Brown et al., 2000). Foram utilizados o iniciador direto (5'-GCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT-3') e o iniciador reverso (5'-GTGAAGATCTGCAGAAAATCCATGTA-3'). Os fragmentos obtidos pela enzima *NdeI* (*Bethesda Research Laboratories, Boehringer Mannheim Biochemicals, International Biotechnologies, and New England Biolabs*) foram submetidos a digestão enzimática. Os fragmentos foram analisados em eletroforese em gel de poliacrilamida a 2% corados com brometo de etídio (Brown et al., 2000). Fragmentos de 150pb correspondem ao alelo selvagem. Já os fragmentos de 123 pb e 27 pb correspondem ao alelo variante do gene (Figura 6).

3.3.5- Identificação dos genótipos do polimorfismo do gene *TS* 2R3R

Presença de sequências em “*tandem repeat*” na região 5'-terminal da região reguladora do gene *TS* foi detectada por meio de protocolo descrito por Nobuyuki Horie et al (Horie et al, 1995). Foram utilizados 0,5-1,0 g de DNA e 0,2mM de iniciador direto (5'-TGCGTGCCTGCGTTTCACCC-3') e reverso (5'-TTGTGCCCAAGCAGCCCGCGGCCATGGCAGCGCCGCGG-3'). A PCR iniciou com um ciclo de cinco minutos de desnaturação a 94°C seguido de 30 ciclos: 94°C por um minuto, 60°C por um minuto e 72°C por dois minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 3% corados com brometo de etídio. Homozigotos para a repetição do par (2R2R) produziram fragmentos de 220pb. Heterozigotos (2R3R) produziram fragmentos de 220pb e fragmentos de 250pb, e homozigotos para a repetição tripla (3R3R) produziram fragmentos de 250pb (Figura 7).

Os pacientes foram distribuídos de acordo com os genótipos dos referidos polimorfismos isolados e agrupados. Os genótipos dos referidos polimorfismos foram também avaliados, isolados e agrupados, em pacientes estratificados por aspectos clínicos e biológicos do tumor.

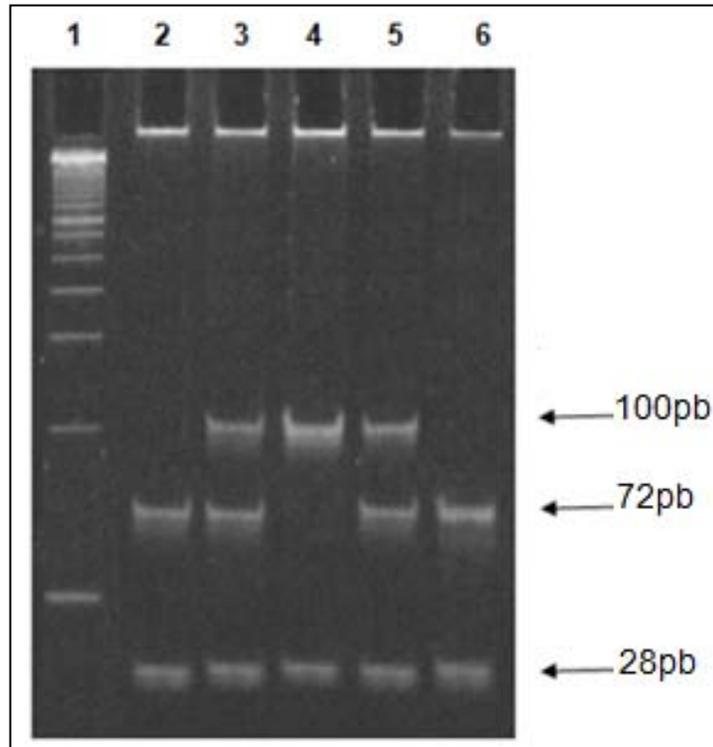


Figura 3- Identificação dos genótipos do polimorfismo A1298C do gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*): Produtos da digestão da região de interesse com a enzima MbolI analisados em gel de poliacrilamida 7% e corados com brometo de etídio. Fragmentos de 72 pares de bases (pb) e 28pb correspondem ao alelo selvagem A. Já os fragmentos de 100pb e 28pb correspondem ao alelo variante C. O marcador de tamanho de DNA “*ladder*” 50pb está apresentado na coluna 1. Indivíduos com genótipo homocigoto selvagem AA estão apresentados nas colunas 2 e 6. Indivíduos com genótipo heterocigoto AC estão apresentados nas colunas 3 e 5. Indivíduo com genótipo homocigoto variante CC está apresentado na coluna 4.

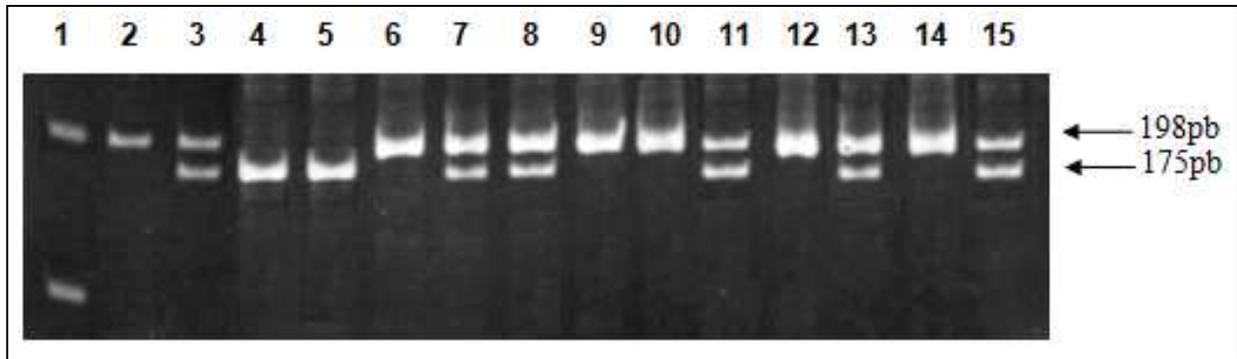


Figura 4- Identificação dos genótipos do polimorfismo C677T do gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*): Produtos da digestão da região de interesse com a enzima *HinfI* analisados em gel de agarose 3% e corados com brometo de etídio. Fragmentos com 198 pares de bases (pb) correspondem ao alelo selvagem C. Já fragmentos de 175pb e 23pb (não visualizados) correspondem ao alelo variante T. O marcador de tamanho de DNA “*ladder*” 100pb está apresentado na coluna 1. Indivíduos com genótipo homocigoto selvagem CC estão apresentados nas colunas 2, 6, 9, 10, 12 e 14. Indivíduos com genótipo heterocigotos CT estão apresentados nas colunas 3, 7, 8, 11, 13 e 15. Indivíduos com genótipo homocigoto variante TT estão apresentados nas colunas 4 e 5.

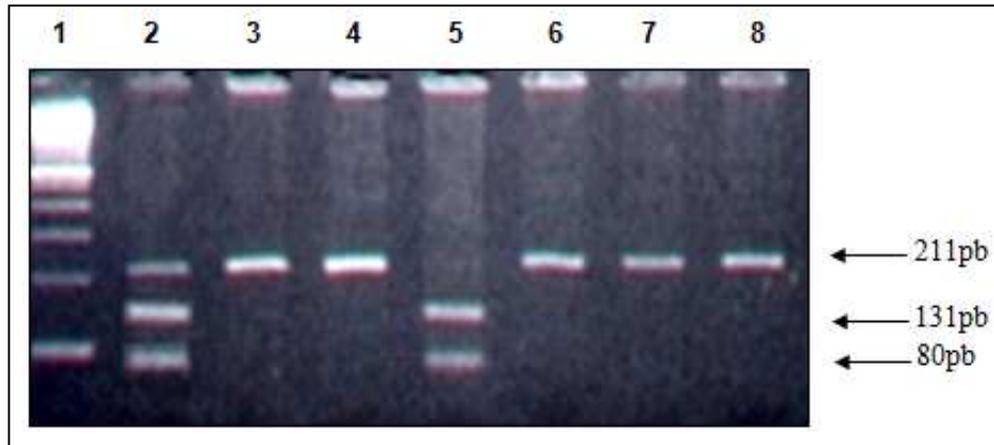


Figura 5- Identificação dos genótipos do polimorfismo A2756G do gene metionina sintase (*MTR*): Produtos da digestão da região de interesse com a enzima HaeIII analisados em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídio. Fragmentos com 211 pares de bases (pb) correspondem ao alelo selvagem A. Já fragmentos de 131 e 80pb correspondem ao alelo variante G. O marcador de tamanho de DNA “*ladder*” 100pb está apresentado na coluna 1. Indivíduo com genótipo heterozigoto AG está apresentado na coluna 2. Indivíduos com genótipo homozigoto selvagem AA estão apresentados nas colunas 3, 4, 6, 7 e 8. Indivíduo com genótipo homozigoto variante GG está apresentado na coluna 5.

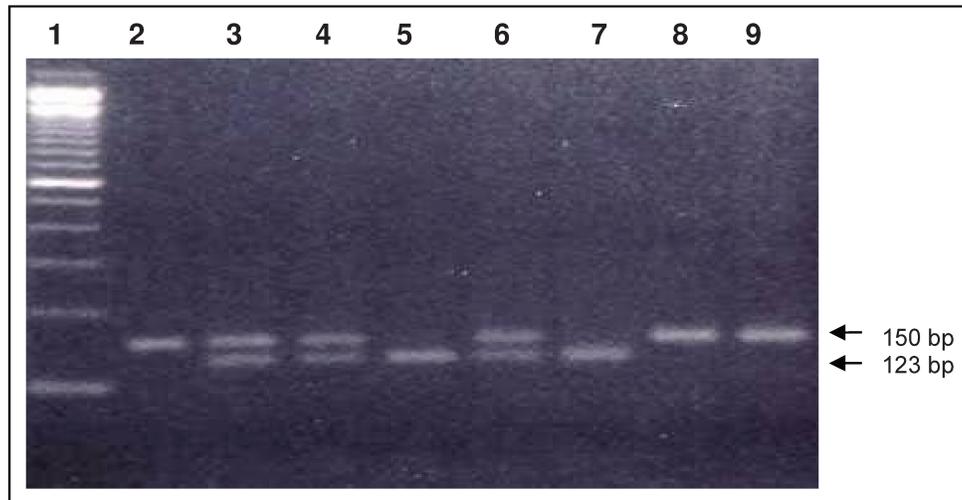


Figura 6- Identificação dos genótipos do polimorfismo A66G do gene metionina sintase redutase (*MTRR*): Produtos da digestão da região de interesse com a enzima *NdeI* analisados em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídio. Fragmentos com 150 pares de bases (pb) correspondem ao alelo selvagem A. Já os fragmentos de 123 e 27pb (não visualizados) correspondem ao alelo variante G. O marcador de tamanho de DNA “*ladder*” 100pb está apresentado na coluna 1. Indivíduos com genótipo homozigoto selvagem estão apresentados nas colunas 2, 8 e 9. Indivíduos com genótipo heterozigoto estão apresentados nas colunas 3, 4 e 6. Indivíduos com genótipo homozigoto variante está apresentado nas colunas 5 e 7.

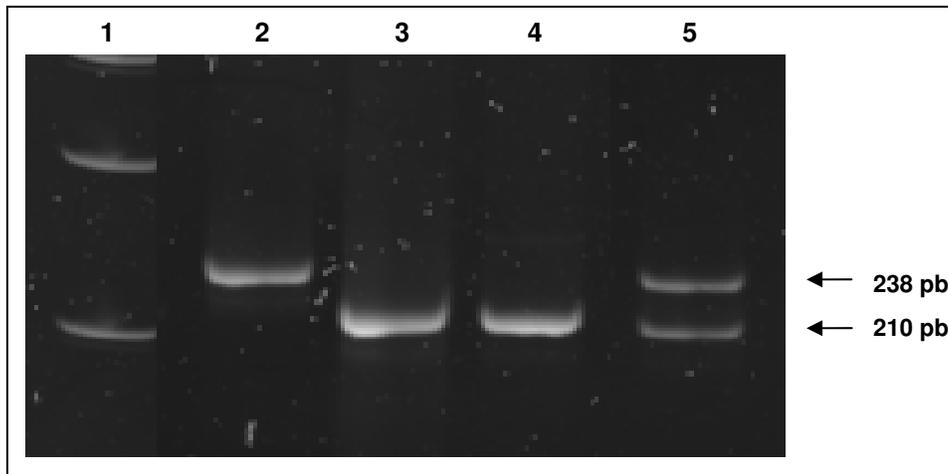


Figura 7- Identificação dos genótipos do polimorfismo 2R3R do gene timidilato sintase (*TS*): Produtos da amplificação das regiões de interesse do gene analisados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. Os fragmentos de 238 pb correspondem ao alelo variante 3R. Fragmentos com 210 pares de bases (pb) correspondem ao alelo selvagem 2R. O marcador de tamanho de DNA “*ladder*” 100pb está apresentado na coluna 1. Indivíduo com genótipo homocigoto variante está apresentado na coluna 2. Indivíduos com genótipo homocigoto selvagem estão apresentados nas colunas 3 e 4. Indivíduos com genótipo heterocigoto está apresentado na coluna 5.

3.4- Aspectos éticos

As informações clínicas e as amostras de pacientes e controles foram obtidas do Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética do Câncer da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Os procedimentos foram realizados após a obtenção de aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (Apêndice 1).

3.5- Análise estatística

O teste de verificação do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi realizado com o intuito de verificar se ocorreu distribuição preferencial de algum dos genótipos avaliados no grupo de pacientes e controles utilizados no estudo (Beiguelman, 1994). O significado estatístico das diferenças entre grupos foi calculado por meio do teste da probabilidade exata de *Fisher* ou qui-quadrado com correção de *Yates*.

As determinações dos riscos de ocorrência do ACRE, a que pacientes e controles foram submetidos, foram obtidas por meio das razões das chances (ORs) e calculadas considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%. Os valores das ORs foram corrigidos por meio de regressão logística multivariada, tendo como variável dependente o grupo (pacientes e controles) e como variáveis independentes, sexo, idade e raça.

As análises foram realizadas através do programa estatístico “*Statistical Package for the Social Sciences / Predictive Analytics SoftWare*” (IBM SPSS / PASW) na versão 18.0 (Chicago IL USA).



4- RESULTADOS

4.1- Dados clínicos e biológicos do tumor em pacientes

As distribuições individualizadas dos 113 pacientes incluídos no estudo, de acordo com os aspectos clínicos, anátomo-patológicos e biológicos do tumor, estão apresentadas no Apêndice 2.

As características clínicas dos 113 pacientes com ACRE avaliados no período do estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Distribuição dos 113 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico de acordo com a idade, o sexo e a raça.

Variáveis	Número de pacientes (%)
Idade (anos)	
<50	26 (23,0)
≥50	87 (77,0)
Sexo	
Masculino	60 (53,0)
Feminino	53 (47,0)
Raça	
Caucasóide	101 (89,38)
Afro-Brasileiro	12 (10,62)

Os pacientes apresentaram a idade entre 24 e 83 anos (média ± DP: 59±13 anos; mediana: 59 anos; 101 caucasianos e 12 Afro-Brasileiros). Houve uma discreta predominância de pacientes com idade menor do que 60 anos (61 casos; 54%). Ainda, cerca de 23% da casuística foi constituída por pacientes com idade menor do que 50 anos. A distribuição dos pacientes por sexo

mostrou um discreto predomínio da doença em pacientes do sexo masculino em relação aos do sexo feminino.

Já as distribuições dos pacientes por raça mostrou que a doença ocorreu predominantemente em caucasóides.

As distribuições dos 113 pacientes com ACRE incluídos no estudo, de acordo com os aspectos anátomo-patológicos e biológicos do tumor estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2- Distribuição dos 113 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico de acordo com a localização, a diferenciação e o estágio do tumor.

Variáveis	Número de pacientes (%)
Localização do tumor	
Cólon	54 (47,8)
Reto	59 (52,2)
Grau de diferenciação	
I	33 (29,2)
II	69 (61,0)
III	11 (9,8)
Estágio TNM	
I	17 (15,1)
II	43 (38,0)
III	33 (29,2)
IV	20 (17,7)

Observamos distribuições similares do tumor em cólon e reto e de tumores localizados e avançados. Houve predomínio de tumores moderadamente diferenciados em nossa amostra.

As distribuições dos pacientes estratificados por idade, sexo, raça, grau de diferenciação e estágio da doença de acordo com a localização do tumor, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Distribuição dos 113 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por características clínicas e biológicas de acordo com a localização do tumor.

	Reto n=59 (52,2%)	Cólon n=54 (47,8%)	Valor de p
Idade			0,25
<50 anos	13 (22,0)	18 (33,3)	
≥50 anos	46 (78,0)	36 (66,7)	
Sexo			0,75
Masculino	30 (50,8)	30 (55,6)	
Feminino	29 (49,2)	24 (44,4)	
Raça			0,17
Caucasianos	50 (84,7)	51 (94,4)	
Afro-brasileiros	9 (15,3)	3 (5,6)	
Diferenciação			0,72
GI	19 (32,2)	14 (25,9)	
GII	35 (59,3)	34 (63,0)	
GIII	5 (8,5)	6 (11,1)	
Estágio			0,09
ECI	11 (18,6)	6 (11,1)	
ECII	26 (44,1)	17 (31,5)	
ECIII	16 (27,1)	17 (31,5)	
ECIV	6 (10,2)	14 (25,9)	

Não foram observadas diferenças significativas clínicas e biológicas quando tumores de cólon e de reto foram considerados. Entretanto observamos na nossa casuística, tanto em tumores de cólon e reto, uma maior frequência de tumores moderadamente diferenciados, de pacientes caucasianos e de pacientes com idade de 50 anos ou mais. Outro achado foi uma maior frequência de tumores iniciais (estágios I e II) em pacientes portadores de tumores de localização retal.

4.2- Dados clínicos em controles

As distribuições individualizadas dos 188 controles, de acordo com os aspectos clínicos, estão apresentadas no Apêndice 3.

As características clínicas dos 188 controles avaliados no período do estudo estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4- Distribuição dos 188 controles de acordo com a idade, o sexo e a raça.

Variáveis	Número de controles (%)
Idade (anos)	
<50	1 (0,53)
≥50	187 (99,46)
Sexo	
Masculino	121 (64,36)
Feminino	67 (35,63)
Raça	
Caucasóide	161 (85,63)
Afro-Brasileiro	27 (14,36)

A idade destes indivíduos variou entre 49 anos e 60 anos (média \pm DP: 53,9 \pm 2,9 anos; mediana: 53 anos). Apenas um caso tinha idade menor do que 50 anos. Cento e vinte um foram do sexo masculino (64,36%) e sessenta e sete do sexo feminino (35,63%). Cento e sessenta e um eram caucasóides (85,63%) e vinte e sete afro-brasileiros (14,36%).

4.3- Análise molecular dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS*

4.3.1- Polimorfismos gênicos em pacientes e controles

As distribuições individualizadas dos 113 pacientes e dos 188 controles, de acordo com os genótipos dos polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS* estão apresentadas nos Apêndices 2 e 3, respectivamente.

Comparou-se a distribuição dos genótipos dos polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS* na população analisada com a esperada pelo teorema de Hardy-Weinberg, aplicando-se o teste estatístico (Tabela 5).

Tabela 5- Resultados das análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os loci dos polimorfismos *MTHFR* A1298C e C677T, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e *TS* 2R3R em amostras dos 113 pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal esporádico e dos 188 controles.

Genes	Pacientes		Controles	
	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>P</i>
<i>MTHFR</i> A1298C	0,79	>0,20	5,11	0,05 < <i>p</i> > 0,10
<i>MTHFR</i> C677T	0,14	>0,20	0,001	>0,20
<i>MTR</i> A2756G	1,92	>0,20	4,67	0,05 < <i>p</i> > 0,10
<i>MTRR</i> A66G	0,08	>0,20	1,89	>0,20
<i>TS</i> 2R3R	0,35	>0,20	2,93	>0,20

As amostras de nossos controles estiveram em equilíbrio para os *loci* dos referidos polimorfismos gênicos, indicando que as amostras foram representativas da população em geral que procuraram assistência médica em nosso hospital.

As amostras dos pacientes também estiveram em equilíbrio sugerindo que as frequências dos genótipos de cada polimorfismo foram as mesmas encontradas nos controles.

As frequências dos genótipos isolados dos polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS* em pacientes e controles estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6- Frequências dos genótipos isolados dos polimorfismos *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e *TS* 2R3R em 113 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico e controles.

	Pacientes n=113 (%)	Controles n=188 (%)	Valor de p	OR* Ajustada	(95% IC)
<i>MTHFR</i> A1298C					
AA	67 (59,3)	127 (67,55)	0,66	0,11	(0,39-1,10)
AC	38 (33,6)	49 (26,06)	0,10	1,57	(0,91-2,70)
CC	8 (7,1)	12 (6,38)	0,93	1,04	(0,39-2,74)
AC + CC	46 (40,70)	61 (32,44)	0,11	1,52	(0,90-2,55)
<i>MTHFR</i> C677T					
CC	48 (42,5)	92 (48,93)	0,19	0,72	(0,43-1,18)
CT	50 (44,2)	79 (42,02)	0,38	1,24	(0,75-2,06)
TT	15 (13,3)	17 (9,04)	0,46	1,35	(0,59-3,06)
CT + TT	65 (57,52)	96 (51,06)	0,19	1,38	(0,84-2,28)
<i>MTR</i> A2756G					
AA	82 (72,6)	144 (76,60)	0,22	0,69	(0,39-1,23)
AG	26 (23,0)	37 (19,68)	0,41	1,29	(0,70-2,36)
GG	5 (4,4)	7 (3,72)	0,31	1,89	(0,55-6,50)
AG + GG	31 (27,43)	44 (23,40)	0,22	1,43	(0,80-2,53)
<i>MTRR</i> A66G					
AA	26 (23,0)	53 (28,19)	0,50	0,82	(0,46-1,46)
AG	55 (48,7)	102 (54,26)	0,21	0,72	(0,44-1,19)
GG	32 (28,3)	33 (17,55)	0,02	1,98	(1,09-3,62)
AG + GG	87 (76,99)	135 (71,80)	0,50	1,21	(0,68-2,15)
<i>TS</i> 2R3R					
2R2R	28 (24,8)	38 (20,21)	0,66	1,13	(0,62-2,07)
2R3R	53 (46,9)	80 (42,55)	0,54	1,16	(0,70-1,91)
3R3R	32 (28,3)	70 (37,23)	0,31	0,76	(0,44-1,29)
2R3R + 3R3R	85 (75,22)	150 (79,78)	0,54	0,85	(0,52-1,41)

OR*, ajustado para idade, sexo e raça; 95% IC, intervalo de confiança

A frequência do genótipo *MTRR* GG foi maior em pacientes do que em controles. Indivíduos com esse genótipo estiveram sob risco 1,99 vezes maior de ACRE do que os demais.

As frequências dos genótipos combinados dos polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS* em pacientes e controles estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7- Frequências dos genótipos combinados dos polimorfismos *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS* e suas associações nos 113 pacientes portadores de câncer colorretal esporádico e nos 188 controles.

Genótipos	Pacientes n=113 (%)	Controles n=188 (%)	Valor de <i>p</i>	OR* Ajustada	95% IC
<i>MTHFR</i> A1298C + C677T					
AA + CC	19 (52,8)	47 (74,6)		1,00	Referência
AC+CC + CT+TT	17 (47,2)	16 (25,4)	0,01	3,26	(1,27-8,40)
<i>MTHFR</i> C677T + <i>MTR</i> A2756G					
CC + AA	37 (64,9)	68 (77,3)		1,00	Referência
CT+TT + AG+GG	20 (35,1)	20 (22,7)	0,04	2,22	(1,00-4,88)
<i>MTHFR</i> A1298C + C677T + <i>MTR</i> A2756G					
AA + CC + AA	14 (70,0)	39 (92,9)		1,00	Referência
AC+CC+CT+TT+AG+GG	6 (30,0)	3 (7,1)	0,009	10,92	(1,80-66,27)
<i>MTHFR</i> A1298C + C677T + <i>MTRR</i> A66G					
AA + CC + AA	1 (6,7)	14 (50,0)		1,00	Referência
AC+CC+CT+TT+AG+GG	14 (93,3)	14 (50,0)	0,02	14,88	(1,67-132,6)

OR*, ajustada para idade, sexo e raça; 95% IC, intervalo de confiança

As frequências dos polimorfismos combinados: MTHFR 1298AC+CC + MTHFR 677CT+TT, MTHFR 677CT+TT + MTR 2756AG+GG, MTHFR 1298AC+CC + MTHFR 677CT+TT + MTR 2756AG+GG e MTHFR 1298AC+CC + MTHFR 677CT+TT + MTRR 66AG+GG foram maiores em pacientes com ACRE do que em controles. Os pacientes portadores dos genótipos variantes ou heterozigotos dessas associações apresentaram um risco de 3,26 (95% IC; 1,27-8,40), de 2,22 (95% IC;1,00-4,88), de 10,92 (95% IC;1,80-66,27) e de 14,88 (95% IC;1,67-132,6) vezes maior de desenvolver ACRE do que os pacientes carreadores de genótipos selvagens, respectivamente.

4.3.2- Polimorfismos gênicos em pacientes estratificados por aspectos clínicos

Os genótipos em estudo dos 113 pacientes foram avaliados em função da idade e da raça, conforme demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8- Frequências dos genótipos nos 113 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por idade e raça.

Genótipos	Idade em anos			Raça		
	<50 (%)	≥50 (%)	Valor de p*	Caucasiana (%)	Afro Brasileira (%)	Valor de p*
<i>MTHFR A1298C</i>						
AA	14 (53,8)	53 (60,9)	1,00	62 (61,4)	5 (41,7)	0,22
AC	11 (42,3)	27 (31,0)	0,30	33 (32,7)	5 (41,7)	0,53
CC	1 (3,9)	7 (8,1)	0,75	6 (5,9)	2 (16,7)	0,20
AC + CC	12 (46,2)	34 (39,1)	0,42	39 (38,6)	7 (58,3)	0,22
<i>MTHFR C677T</i>						
CC	6 (23,1)	42 (48,3)	1,00	42 (41,6)	6 (50,0)	0,80
CT	16 (61,5)	34 (39,1)	0,02	44 (43,6)	6 (50,0)	0,91
TT	4 (15,4)	11 (12,6)	0,30	15 (14,9)	0 (0,0)	0,36
CT + TT	20 (76,9)	45 (51,7)	0,03	59 (58,4)	6 (50,0)	0,80
<i>MTR A2756G</i>						
AA	14 (53,9)	68 (78,2)	1,00	73 (72,3)	9 (75)	1,00
AG	9 (34,6)	17 (19,5)	0,07	24 (23,8)	2 (16,7)	0,73
GG	3 (11,5)	2 (2,3)	0,03	4 (4,0)	1 (8,3)	0,44
AG + GG	12 (46,2)	19 (21,8)	0,02	28 (27,7)	3 (25)	1,00
<i>MTRR A66G</i>						
AA	7 (26,9)	19 (21,8)	1,00	24 (23,8)	2 (16,7)	0,73
AG	11 (42,3)	44 (50,6)	0,46	52 (51,5)	3 (25,0)	0,15
GG	8 (30,8)	24 (27,6)	0,95	25 (24,8)	7 (58,3)	0,04
AG + GG	19 (73,1)	68 (78,2)	0,63	77 (76,2)	10 (83,3)	0,73
<i>TS 2R3R</i>						
2R2R	7 (26,9)	21 (24,1)	1,00	26 (25,7)	2 (16,7)	0,73
2R3R	13 (50,0)	40 (46,0)	0,91	45 (44,6)	8 (66,7)	0,25
3R3R	6 (23,1)	26 (29,9)	0,54	30 (29,7)	2 (16,7)	0,50
2R3R + 3R3R	19 (73,1)	66 (75,9)	0,84	56 (55,4)	4 (33,3)	0,25
<i>MTHFR* + MTRR</i>						
AA + AA	5 (31,3)	9 (28,1)	1,00	14 (32,6)	1 (16,7)	1,00
AC+CC + AG+GG	11 (68,8)	23 (71,9)	1,00	29 (67,4)	5 (83,3)	0,30
<i>MTHFR† + TS</i>						
CC+2R2R	2 (22,2)	14 (30,4)	1,00	8 (16,3)	1 (16,7)	1,00
CT+TT+2R3R+3R3R	7 (77,8)	32 (69,6)	1,00	41 (83,7)	5 (83,3)	1,00

*p ajustado por análise multivariada; **MTHFR A1298C*; †*MTHFR C677T*

Observamos uma predominância dos genótipos CT + TT do polimorfismo *MTHFR* 677 (76,9% versus 51,7%; p=0,03), bem como dos genótipos AG+GG do polimorfismo *MTR* 2756 em pacientes com ACRE com idade inferior a 50 anos quando comparados com pacientes mais velhos (46,2% versus 21,8%; p=0,02). Os genótipos foram também mais frequentes em pacientes jovens do que em controles (76,5% versus 51,1%, p=0,02; 46,2% versus 23,4%, p=0,02, respectivamente). Indivíduos com os genótipos variantes dos genes estiveram associados com risco aumentado para o desenvolvimento de ACRE, de 2,12 vezes (95% IC; 1,04-4,34) e 1,42 vezes (95% IC; 0,99-2,05) em idade precoce (menor que 50 anos), respectivamente.

Além disso, identificamos uma predominância do genótipo homozigoto variante *MTRR* G66G em pacientes Afro-Brasileiros comparados com caucasianos (58,3% versus 24,8%; p=0,04). A frequência do genótipo foi também maior do que a observada em controles (58,3% versus 17,5%, p=0,003). Afro-Brasileiros com esse genótipo estiveram sob risco de 1,98 vezes (95% IC; 1,01-3,88) maior de desenvolver ACRE do que os demais.

4.3.3- Polimorfismos gênicos em pacientes estratificados por aspectos biológicos do tumor

As frequências dos genótipos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS* em pacientes estratificados por aspectos biológicos do tumor (localização, diferenciação e estágio) estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9- Frequências dos genótipos nos 113 pacientes com adenocarcinoma color-retal esporádico estratificados por localização, diferenciação e estágio.

Genótipos	Localização		Diferenciação				Estágio		
	Cólon	Recto	P*	I + II	III	p	I+II	III+IV	P*
MTHFR A1298C									
AA	39(72,2)	28(47,5)	0,01	60(58,8)	7(63,6)	1,00	30(50,0)	37(69,8)	0,05
AC	12(22,2)	26(44,1)	0,02	34(33,5)	4(36,4)	1,00	23(38,3)	15(28,3)	0,35
CC	3(5,6)	5(8,5)	0,72	8(7,8)	0(0,0)	1,00	7(11,7)	1(1,9)	0,07
CC + AC	15(27,8)	31(52,5)	0,01	42(41,6)	4(36,4)	1,00	30(50,0)	16(30,2)	0,05
MTHFR C677T									
CC	17(31,5)	31(52,5)	0,03	40(39,2)	8(72,7)	0,05	32(53,3)	16(30,2)	0,02
CT	28(51,9)	22(37,3)	0,17	47(46,1)	3(27,3)	0,34	23(38,3)	27(50,9)	0,25
TT	9(16,6)	6(10,2)	0,46	15(14,7)	0(0,0)	0,35	5(8,3)	10(18,9)	0,17
TT + CT	37(68,5)	28(47,5)	0,03	62(60,8)	3(27,3)	0,05	28(46,7)	37(69,8)	0,02
MTR A2756G									
AA	40(74,1)	42(71,2)	0,90	78(76,5)	4(36,4)	0,01	45(75,0)	37(69,8)	0,69
AG	12(22,2)	14(23,7)	1,00	21(20,6)	5(45,5)	0,12	13(21,7)	13(24,5)	0,89
GG	2(3,7)	3(5,1)	1,00	3(2,9)	2(18,2)	0,07	2(3,3)	3(5,7)	0,06
GG + AG	14(25,9)	17(28,8)	0,90	24(23,5)	7(63,6)	0,009	15(25,0)	16(30,2)	0,69
MTRR A66G									
AA	14(25,9)	12(20,3)	0,63	24(23,5)	2(18,2)	1,00	14(23,3)	12(22,6)	1,00
AG	26(48,1)	29(49,2)	1,00	50(49,0)	5(45,5)	1,00	29(48,3)	26(49,1)	1,00
GG	14(25,9)	18(30,5)	0,74	28(27,5)	4(36,4)	0,50	17(28,3)	15(28,3)	1,00
GG + AG	40(74,1)	47(79,7)	0,63	78(76,5)	9(81,8)	1,00	46(76,7)	41(77,4)	1,00
TS 2R3R									
2R2R	14(25,9)	14(23,7)	0,96	27(26,5)	1(9,1)	0,29	11(18,3)	17(32,1)	0,14
2R3R	23(42,6)	30(50,8)	0,49	48(47,1)	5(45,5)	1,00	29(48,3)	24(45,3)	0,89
3R3R	17(31,5)	15(25,4)	0,48	27(26,5)	5(45,5)	0,29	20(33,3)	12(22,6)	0,29
3R3R+2R3R	31(57,4)	29(49,2)	0,49	54(52,9)	6(54,5)	1,00	31(51,7)	29(54,7)	0,89
MTHFR* + MTRR									
AA + AA	10(47,6)	4(14,8)	1,00	14(30,4)	1(50,0)	1,00	6(21,4)	8(40,0)	1,00
AC+CC+AG+GG	11(52,4)	23(85,2)	0,03	32(69,6)	2(100,0)	1,00	22(78,6)	12(60,0)	0,28
MTHFR† + TS									
CC+2R2R	1(4,0)	8(26,7)	1,00	8(15,7)	1(25,0)	1,00	5(18,5)	4(14,3)	1,00
CT+TT+2R3R+3R3R	24(96,0)	22(73,3)	0,03	43(84,3)	3(75,0)	0,52	22(81,5)	24(85,7)	0,73

*p ajustado por análise multivariada; *MTHFR A1298C; †MTHFR 677T

A estratificação dos polimorfismos estudados por variáveis biológicas do tumor permitiu evidenciar que os genótipos AC+CC do polimorfismo *MTHFR* 1298 foi mais frequentemente observado em tumores de reto do que os de cólon (52,5% versus 27,8%; $p=0,01$) e em controles (52,5% versus 32,5%, $p=0,008$). Por outro lado, observamos uma maior frequência do genótipo CT+TT do polimorfismo *MTHFR* 677 em portadores de tumores de cólon quando comparados com portadores de tumores retais (68,5% versus 47,5%; $p=0,03$) e quando comparados com controles (68,5% versus 51,5%; $p=0,03$). Indivíduos com o genótipo *MTHFR* 1298 AC+CC estiveram sob um risco de 1,42 (95% IC: 1,07-1,90) vezes maior de apresentar câncer retal e aqueles com o genótipo *MTHFR* 677 CT+TT estiveram sob um risco de 1,55 (95% IC: 1,02-2,40) vezes maior de câncer de cólon do que portadores de outros genótipos. Além disso, a frequência dos genótipos combinados do *MTHFR* 1298 AC+CC e *MTRR* 66 AG+GG, foi maior em pacientes com tumores de reto, enquanto que a associação dos genótipos *MTHFR* 677 CT+TT e *TS* 2R3R + 3R3R foi mais comum em pacientes portadores de tumores de cólon. As frequências dos respectivos genótipos combinados foram maiores do que nos controles (85,2% versus 54,5%, $p=0,006$; 96,0% versus 78,4%, $p=0,004$). Portadores dos genótipos heterozigotos e variante combinados do *MTHFR* A1298C mais *MTRR* A66G e *MTHFR* C677T mais *TS* 2R3R estavam sob um risco de 3,07 (95% IC: 1,21-7,80) vezes maior de apresentar câncer de reto e um risco de 5,39 (95% IC: 0,76-38,14) vezes maior de câncer de cólon, respectivamente, do que os transportadores dos genótipos selvagens. O genótipo combinado *MTR* 2756 AG + GG foi mais comum em pacientes com tumores indiferenciados do que em pacientes com tumores de grau I e II e controles (63,6% versus 23,4%, $p=0,007$). Portadores dos genótipos heterozigotos ou variante tinham um risco de 2,11 (95% IC: 0,96-4,62) vezes maior de apresentar tumores indiferenciados do que os pacientes com outros genótipos. Um excesso do genótipo *MTHFR* 677 CT + TT foi observado em pacientes com tumores avançados em comparação com tumores estágio I e II, comparados com os controles (69,8% versus 51,1%, $p=0,02$). Portadores do alelo variante tinham um risco de 1,62 (95% IC: 1,05-2,50) vezes maior de tumores avançados do que outros.



5- DISCUSSÃO

O ACRE é uma das neoplasias malignas mais estudadas nas últimas décadas, devido à sua ocorrência e a alta mortalidade a ela atribuída. Sendo assim, suas características clínicas estão entre as melhores estabelecidas dentre as neoplasias malignas, particularmente em países do hemisfério norte. Na literatura, não há descrições sobre as características da doença em países do hemisfério sul no que se refere ao perfil genético e, sobretudo, na investigação de polimorfismos do metabolismo do ácido fólico, o que plenamente justifica a realização deste estudo.

Partimos do princípio de que os genótipos do *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e do *TS* 2R3R, envolvidos no metabolismo do ácido fólico, alteram o risco e as características clínicas e biológicas do tumor em pacientes brasileiros portadores de ACRE, apesar de haver inúmeras evidências contraditórias sobre o tema. Além disso, observamos prevalências variáveis em grupos raciais diferentes e também em regiões geográficas distintas (Sharp e Little, 2004). As enzimas codificadas pelos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS*, podem apresentar alterações significativas na sua função, em razão de diferentes combinações entre alelos variantes e selvagens, propiciando uma possível anormalidade quando da síntese do DNA, nas enzimas de reparação ou na metilação (Horie et al., 1995; Frosst et al., 1995; Chen et al., 1996; Rozen, 1996; Molloy et al., 1997; Van Der Put et al., 1998; Weisberg et al., 1998; Friedman et al., 1999; Harmon et al., 1999; Wilson et al., 1999; Brown et al., 2000; Ulrich et al., 2000; Chen et al., 2001; Kawakami et al., 2001; Brown et al., 2004). Diante dessas possíveis anormalidades a consequência é a alteração no risco de doenças malignas, seja conferindo uma proteção ou aumentando o risco de desenvolver a doença (Zing e Jones, 1997; Sharp e Little, 2004; Narayanan et al., 2004).

A grande maioria dos estudos epidemiológicos prévios foram conduzidos predominantemente em populações asiáticas e caucasianas, e o papel dos polimorfismos dos genótipos do *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e do *TS* 2R3R são conflitantes com relação ao risco

de ACRE (Chen et al., 1996; Ma et al., 1997; Ma et al., 1999; Park et al., 1999; Slattery et al., 1999; Iacopetta et al., 2001; Marsh et al., 2001; Ryan et al., 2001). Padrão de dieta e modo de vida, muito provavelmente, contribuem para a variabilidade do risco de ACRE em inúmeros estudos, porém o poder de impacto destes fatores talvez não sejam os mais importantes.

A população brasileira é caracterizada por uma forte miscigenação racial, ou seja, uma heterogeneidade peculiar à custa de imigrantes europeus, africanos, asiáticos e índios americanos, motivo deveras interessante para a investigação de polimorfismos genômicos (Alves-Silva et al., 2000). O ACRE é a segunda causa de óbito da região Sudeste do Brasil, e nessa região em particular, há um baixo consumo diário de frutas e vegetais pela população nativa e, como consequência, uma deficiência de folato. Portanto, a lógica científica estabelece as bases para uma investigação mais aprofundada e detalhada se os polimorfismos do metabolismo do ácido fólico desempenham algum papel na susceptibilidade ao ACRE. Para tanto, o estudo foi desenhado para identificar a frequência dos genótipos do *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e do *TS* 2R3R num grupo de 113 pacientes portadores de ACRE e em 188 indivíduos sadios (grupo controle). Os sujeitos da pesquisa tinham como residência fixa o estado de São Paulo, região na qual se têm evidências de uma ingestão deficitária de ácido fólico (Mattos e Martins, 2000).

Num primeiro momento, poder-se-ia inferir que a amostra de nosso estudo não seria representativa em razão do número de pacientes portadores de ACRE estudados. Entretanto, vários estudos prévios foram realizados com um número limitado de pacientes, como o estudo de Le Marchand et al. com 77 hawaianos, como o de Matsuo et al. com 142 japoneses, como o estudo conduzido por Otani et al. com 106 japoneses, como o de Burcos et al. com 120 pacientes romenos e o estudo de Park et al. com 200 pacientes coreanos (Le Marchand et al., 2002; Matsuo et al., 2002; Otani et al., 2005; Burcos et al., 2010). Com exceção do estudo populacional conduzido por Le Marchand et al., todos os demais foram baseados em série de casos controle recrutados em um

centro hospitalar. Os estudos invariavelmente possuem um número significativo (via de regra, o dobro do número de sujeitos de pesquisa) de indivíduos alocados no grupo controle, permitindo considerar amostras aparentemente pequenas, como representativas da população em estudo, obviamente após análise estatística adequada. As diferenças entre os resultados obtidos em diversos estudos podem ter sido determinadas por diferenças étnicas, tamanho amostral e padrão da dieta em populações distintas.

Inicialmente as frequências dos genótipos *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G e do *TS* 2R3R foram similares em ambos os grupos, sugerindo que esses polimorfismos não alteram o risco para ACRE em nossa região. Resultado similar foi observado previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Lima et al., 2007), no estudo “*The Fukuoka Colorectal Cancer Study*” (Yin et al., 2004) e recentemente por Fernández-Peralta et al. (Fernández-Peralta et al., 2010) com relação ao genótipo *MTHFR* A1298C. Da mesma forma, os resultados dos estudos conduzidos por Fernández-Peralta et al. e pelo nosso grupo, quando da análise do genótipo *MTHFR* C677T, não foram diferentes de nossos achados. Para os genótipos *MTR* A2756G e *TS* 2R3R os resultados foram semelhantes a quatro estudos prévios (Iacopetta et al., 2001; Marsh et al., 2001; Villafranca et al., 2001; Taioli et al., 2009).

Por outro lado, observamos estudos sugerindo que os alelos variantes dos genótipos *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T e *MTR* A2756G conferem um efeito protetor para o desenvolvimento de ACRE, enquanto que o risco estaria aumentado naqueles pacientes carreadores de homozigotos variantes do genótipo *MTHFR* A1298C nos estudos conduzidos por Oyama et al. e Curtin et al. (Oyama et al., 2004; Curtin et al., 2007), e nos homozigotos variantes do genótipo *MTHFR* C677T, segundo os resultados observados pelos estudos de Ryan et al., Shannon et al. e Heijmans et al. (Ryan et al., 2001; Shannon et al., 2002; Heijmans et al., 2003). Obviamente que essas diferenças geram hipóteses das mais diversas possíveis, desde problemas imputados no que se refere ao delineamento do estudo, no número de pacientes incluídos e até mesmo no estilo de vida dos indivíduos.

Entretanto, nos parece mais crível atribuir parte dessas divergências nos resultados em razão das diferenças de origem racial da população estudada, principalmente por encontrarmos diferentes frequências dos genótipos estudados nos controles dos estudos. Para exemplificar, a prevalência do genótipo CC do polimorfismo *MTHFR* A1298C é de 7% a 12% para brancos americanos (Robien e Ulrich, 2003), de 6% para brasileiros (Friedman et al., 1999), de 4% a 5% para hispânicos (Barber et al., 2000; Volcik et al., 2000; Peng et al., 2001), de 2% a 4% para afro-americanos (Sharp et al., 2002), de 1% para hawaianos, japoneses e chineses (Le Marchand et al., 2002; Robien e Ulrich, 2003), de 4% a 12% para europeus, enquanto que para escoceses foi de 15% a 18% (Sharp et al., 2002). Para o genótipo TT do polimorfismo *MTHFR* C677T, a prevalência é de 1% para negros americanos e populações da América do Sul, de 20% para hispânicos americanos, colombianos e ameríndios brasileiros, 12% para japoneses, enquanto que os brancos europeus e australianos possuem de 8% a 20% de prevalência do genótipo homozigoto variante. Além disso, há uma tendência de aumento da prevalência do genótipo variante em europeus do norte, quando comparados aos do sul (Botto e Yang, 2000).

Para o polimorfismo *MTR* A2756G a prevalência do genótipo variante GG em japoneses, chineses e coreanos varia de 2% a 3% (Van Der Put et al., 1997; Ma et al., 1997; Zhang e Daí, 2001; Le Marchand et al., 2002), de 3% em europeus, de 10% a 11% em canadenses, enquanto que em norte-americanos a prevalência é de 1% a 5% (*Human Genome Epidemiology Network*, 2011).

No caso do polimorfismo *MTRR* A66G, a prevalência do genótipo variante GG em japoneses hawaianos e em hawaianos varia de 8% a 10% (Wilson et al., 1999; Hobbs et al., 2000; Gaughan et al., 2001; Geisel et al., 2001; Ray et al., 2001; Hassold et al., 2001; O'Leary et al., 2002; Le Marchand et al., 2002; Rady et al., 2002), enquanto que na maioria dos estudos a prevalência gira em torno de 19% a 29%. Entretanto, em afro-americanos e em hispânicos a prevalência do genótipo homozigoto variante é de 42% e de 50% respectivamente.

Com relação ao polimorfismo *TS 2R3R*, a prevalência do genótipo 2R2R em brancos americanos e na população britânica variou de 19% a 23% (Horie et al., 1995; Marsh et al., 1999; Marsh et al., 2000; Luo et al., 2002; Trinh et al., 2002; Skibola et al., 2002; Ulrich et al., 2002; Chen et al., 2003) e de 14% a 20% em africanos e em afro-americanos. Para o homocigoto variante a prevalência em chineses é de 2% a 4%, enquanto que é de 10% em brancos americanos (Ulrich et al., 2002).

Essa hipótese é sustentada por uma elegante revisão realizada por Sharp e Little, "*Human Genome Epidemiology (HuGE)*", onde demonstra com clareza de detalhes as diferenças observadas em várias populações de etnias diferentes (Sharp e Little, 2004). Outro viés que deve ser levado em conta é o modo de vida e o padrão de dieta de determinados países, onde diferenças consideráveis são observadas (Van Staveren et al., 1982; Bingham, 1987; Acevedo e Bressani, 1989; Sharp et al., 2008; El Awady et al., 2009). Com olhar mais atento sobre a nossa população brasileira, identificamos uma alta e complexa heterogeneidade racial, com a presença de índios, europeus (das mais diversas regiões), africanos, asiáticos e, como consequência, a miscigenação (Alves-Silva et al., 2000). Além disso, há fortes evidências de que nossa população nativa, e em especial da região dos pacientes de nosso estudo (região sudeste), se caracterizam por uma baixa ingestão de ácido fólico (Mattos e Martins, 2000). Portanto, as justificativas descritas sustentam a peculiaridade de nossos resultados, quais sejam; padrão de dieta e raça, elementos balizadores de um possível conjunto de características ímpares da população brasileira. Essa hipótese se torna mais robusta, teoricamente, quando observamos e comparamos com os resultados de populações homogêneas e com adequada ingestão de ácido fólico, particularmente em países do hemisfério norte (Bingham, 1987; Sharp et al., 2008).

Recentemente, uma meta-análise de 52 estudos englobando 24.896 pacientes e 33.862 controles foi realizada, e na estratificação por raça se observou que em populações europeias, o polimorfismo *MTR A2756G* confere

proteção para o desenvolvimento de ACRE (Yu et al., 2010). Esse dado é mais uma evidência de que o fator raça se constitui como um elemento importante para o risco de ACRE.

Com relação ao genótipo *MTRR* A66G, observamos que o homocigoto variante 66GG foi mais comumente encontrado em pacientes portadores de ACRE quando comparado ao grupo controle, à semelhança de outros estudos publicados (Le Marchand et al., 2002; Matsuo et al., 2002; Koushik et al., 2006). Pacientes carreadores do genótipo *MTRR* G66G tiveram um risco para desenvolver ACRE de 1,99 vezes maior comparado com outras combinações do genótipo *MTRR*. Por outro lado, o alelo variante desse genótipo não conferiu qualquer risco para o desenvolvimento de ACRE, como observado por outros pesquisadores (Burcos et al., 2010; Wettergren et al., 2010).

Num segundo momento, avaliamos as associações entre os genótipos estudados objetivando identificar uma possível interação entre eles que eventualmente possa conferir uma proteção ou um risco aumentado no desenvolvimento do ACRE. Importante frisar que há praticamente um vácuo acadêmico nessa vertente de pesquisa, pois não encontramos estudos que se ocupassem de análises de associações de quatro ou mais genes. Obviamente que a justificativa no nosso entendimento, salvo melhor juízo, se sustenta pela complexidade estatística das análises, pelos fatores de viés, pelo custo, pelo importante número de pacientes a serem estudados e, conseqüentemente, com resultados e conclusões difíceis de interpretar. No nosso caso, o número de sujeitos da pesquisa foi o fator limitante nessa avaliação, prejudicando as conclusões de algumas das análises.

A combinação do *MTHFR* 1298AC+CC mais *MTHFR* 677CT+TT, a associação do *MTHFR* 677CT+TT mais *MTR* 2756AG+GG, a do *MTHFR* 1298AC+CC mais *MTHFR* 677CT+TT mais *MTR* 2756AG+GG e a combinação do *MTHFR* 1298AC+CC mais *MTHFR* 677CT+TT mais *MTRR* 66AG+GG foi mais frequentemente observada em pacientes portadores de

ACRE do que os controles do estudo. Além disso, essas associações descritas também foram associadas com risco aumentado para ACRE, com 3,26, 2,22, 10,92 e 14,88 vezes, respectivamente. A associação *MTHFR* 677CT+TT mais *MTR* 2756AG+GG não influenciou o risco de desenvolvimento do ACRE em três estudos publicados (Le Marchand et al., 2002; Matsuo et al., 2002; Ulvik et al., 2004), enquanto que a associação dos genótipos *MTHFR* 1298AC+CC mais *MTHFR* 677CT+TT foi associado com risco aumentado em um estudo egípcio (El Awady et al., 2009), enquanto que Keku et al. encontraram resultados contraditórios (Keku et al., 2002). Este é o primeiro estudo que avalia essas associações como fator de susceptibilidade para o ACRE na população brasileira. Mais uma vez, diferenças observadas nas combinações avaliadas em nosso estudo comparadas com algumas associações previamente estudadas podem ser resultado da raça dos indivíduos que participaram do estudo, do modo de vida e do padrão dietético (Slattery et al., 1999; Toffoli et al., 2003; Curtin et al., 2004; Narayanam et al., 2004; Wang et al., 2006).

Avançando ainda mais, estratificamos os pacientes pelo local do tumor primário; cólon ou reto. Observamos que o genótipo *MTHFR* 1298AC+CC ou em combinação com o genótipo *MTRR* 66AG+GG foi associado com câncer retal, enquanto que o genótipo *MTHFR* 677CT+TT ou em combinação com o genótipo *TS* 2R3R+3R3R foi associado preferencialmente com tumores proximais (cólon). Além disso, identificamos o genótipo *MTR* 2756AG+GG mais frequentemente associado com tumores indiferenciados e o genótipo *MTHFR* 677CT+TT com tumores avançados (estádios III e IV) à semelhança dos achados obtidos pelo estudo de Haghghi et al. (Haghghi et al., 2008).

Os genótipos *MTHFR* 1298AC+CC (Yin et al., 2004) e *MTHFR* 677CT+TT (Cao et al., 2008) foram previamente relatados por estarem associados com câncer de cólon, enquanto que resultados divergentes foram observados em outros estudos (Slattery et al., 1999; Keku et al., 2002; Toffoli et al., 2003.). O “*The Fukuoka Colorectal Cancer Study*” demonstra que o homozigoto variante do polimorfismo *MTHFR* C677T é fator protetor para câncer

retal e o homocigoto selvagem do polimorfismo *MTHFR* A1298C foi associado com risco para câncer retal (Yin et al., 2004).

Dados semelhantes foram observados em tumores avançados com o genótipo *MTHFR* 677CT+TT (Haghighi et al., 2008) bem como a maior frequência desse em pacientes da nossa casuística com idade menor que 50 anos, corroborado também por estudos prévios (Ma et al., 1997; Shannon et al., 2002; Lima et al., 2007).

Essas informações sugerem que esses genótipos possam alterar as características clínicas dos pacientes e padrões biológicos do ACRE no universo estudado.

As observações e resultados encontrados em nosso estudo demonstraram que os polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS* quando isolados ou em combinação estiveram associados com risco aumentado para o desenvolvimento de ACRE. De fato, as enzimas *MTHFR*, *MTR* e *MTRR* são essenciais para o processo de metilação no tecido colônico (Blount et al., 1997; Toyota et al., 1999). Os alelos variantes afetam as atividades enzimáticas com conseqüente menor produção de grupos metil e risco aumentado de ACRE (Sharp e Little, 2004).

A enzima timidilato sintase é fundamental para a síntese e reparação de DNA, e seu alelo variante (3R) é o responsável pela atividade enzimática, apesar do alelo selvagem (2R) também afetar a atividade enzimática (Kawakami et al., 2001; Brown et al., 2004).

A deficiência de folato observada em nossos sujeitos de pesquisa pode afetar as atividades enzimáticas responsáveis pela reparação, síntese e metilação do DNA. Em princípio, dois mecanismos são considerados para justificar o modo pelo qual a deficiência de folatos pode afetar o risco de malignização; por hipometilação do DNA e ativação de proto-oncogene ou induzindo uma falsa incorporação do uracil durante a síntese de DNA determinando uma reparação

catastrófica, quebra do DNA e dano cromossomal (Zing e Jones, 1997; Blount et al., 1997; Brown et al., 2000). Acredita-se que os alelos variantes dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *TS* envolvidos na produção de enzimas dependentes de folatos possa estar associado com risco aumentado de ACRE no Brasil por ativação de qualquer proto-oncogene envolvido na origem da doença por hipometilação do DNA e por anormalidades em sua síntese e reparação.

Evidentemente que há a necessidade de se conduzir estudos prospectivos robustos objetivando avaliar as interações gene-gene, gene-fatores ambientais dos polimorfismos envolvidos no metabolismo de ácido fólico na susceptibilidade do câncer, em especial o ACRE, na população brasileira.

Se confirmados os resultados, podemos identificar grupos de indivíduos com alto risco para a ocorrência de ACRE, que podem se beneficiar de programas de prevenção ou de diagnóstico precoce da doença.



6- CONCLUSÃO

- O polimorfismo *MTRR* A66G isolado alterou o risco para ACRE em nossa amostra.

- O genótipo GG do polimorfismo *MTRR* A66G isolado alterou o risco de ACRE em Afro-Brasileiros de nossa amostra.

- Os polimorfismos *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e *TS* 2R3R, quando associados, alteraram o risco para ACRE em nossa amostra.

- Os polimorfismos *MTHFR* C677T e *MTR* A2756G, quando isolados, alteraram o risco de ocorrência do tumor em idade precoce (menor do que 50 anos) em nossa amostra.

- Os polimorfismos *MTHFR* A1298C e *MTHFR* C677T, quando isolados, alteraram o risco de câncer de reto e o risco de câncer de cólon, respectivamente em nossa amostra.

- Os polimorfismos *MTHFR* A1298C e *MTRR* A66G, quando associados, alteraram o risco de câncer de reto em nossa amostra.

- Os polimorfismos *MTHFR* C677T e *TS* 2R3R, quando associados, alteraram o risco de câncer de cólon em nossa amostra.

- O polimorfismo *MTR* A2756G isolado alterou o risco do ACRE indiferenciado em nossa amostra.

- O polimorfismo *MTHFR* C677T isolado alterou o risco do ACRE avançado em nossa amostra.

Estudos prospectivos mais robustos, avaliando as interações gene-gene e gene-modo de vida devem ser conduzidos para verificar os papéis dos referidos polimorfismos gênicos no risco de CCR em nosso país.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Hopkins K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Fundamentos de Biologia Celular; uma introdução à biologia molecular da célula. 2a Ed. Artes Médicas 2006;740p.

Acevedo E, Bressani R. Ingestión de fibra dietética en los países del istmo centroamericano: implicaciones nutricionales. Arch Latinoam Nutr. 1989;3:392-404.

Aléssio ACM, Annichino-Bizzacchi JMA, Bydlowski SP, Eberlin MN, Vellasco AP, Hoehr NF. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. Am J Med Gen. 2004;128A:256-60.

Almeida LC. Frequência de polimorfismos relacionados ao metabolismo do folato e fatores associados às concentrações de homocisteína em mulheres de baixa renda em São Paulo [Tese - Doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2010.

Alves-Silva J, Da Silva-Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. Am J Hum Genet. 2000;67:444-61.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2011. Atlanta GA: American Cancer Society. 2011;60p.

Angus SP, Wheeler LJ, Ranmal SA, Zhang X, Markey MP, Mathews CK, et al. The retinoblastoma tumor suppressor targets dNTP metabolism to regulate DNA replication. J Biol Chem. 2002;277:44376-84.

Aries V, Crowther JS, Drasar BS, Hill MJ. Degradation of bile salts by human intestinal bacteria. Gut. 1969;10(7):575-6.

Arruda VR, Grignolli CE, Gonçalves MS, Soares MC, Menezes R, Saad STO, et al. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase μ (GSTM1) and θ (GSTT 1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? Clin Genet. 1998;54:210-4.

Augusto LGS. Benzenismo em trabalhadores do parque industrial de Cubatão; causas e providências. *Bol Soc Bras Hematol Hemot.* 1987;9(144):106.

Barber R, Shalat S, Hendricks K, Joggerst B, Larsen R, Suarez L, et al. Investigation of folate pathway gene polymorphisms and the incidence of neural tube defects in a Texas Hispanic population. *Mol Genet Metab.* 2000;70:45-52.

Begg CB. Statistical considerations in the interpretation of clinical trials. In: Cohen AM, Winawer SJ, Friedman MA, Gunderson LL (eds.). *Cancer of the Colon, Rectum, and Anus.* New York: McGraw-Hill. 1995;415-21.

Beiguelman B. *Genética de Populações Humanas.* Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética. 2008;235p.

Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:1814-21.

Bingham S. Definitions and intakes of dietary fiber. *Am J Clin Nutr.* 1987; 45:1226-31.

Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implication for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:3290-5.

Boletim Epidemiológico Paulista (Bepa). Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 2009;(6):68.

Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000;151(9):862-77.

Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydro-folate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation*. 1998;98(23):2520-6.

Broders AC. The grading of carcinoma. *Minn Med*. 1925;8:726-30.

Brown CA, McKinney KQ, Kaufmann JS, Gravel RA, Rozen R. A common polymorphism in methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease. *J Cardiovasc Risk*. 2000;7(3):197-200.

Brown MO, Lanier AP, Becker TM. Colorectal cancer incidence and survival among Alaska natives 1969-1993. *Int J Epidemiol*. 1998;27(3):388-96.

Brown KS, Kluijtmans LAJ, Young IS, McNulty H, Mitchell LE, Yarnell JW, et al. The thymidylate synthase tandem repeat polymorphism is not associated with homocysteine concentrations in healthy young subjects. *Hum Genet*. 2004;114:182-5.

Burcos T, Toma M, Stavarachi M, Cimponeriu D, Apostol P, Popa E, et al. MTRR polymorphism and the risk for colorectal and breast cancer in Romanian patients: a preliminary study. *Chirurgia*. 2010;105(3):379-82.

Burdy G, Panis Y, Alves A, Nemeth J, Lavergne-Slove A, Valleur P. Identifying patients with T3–T4 node-negative colon cancer at high risk of recurrence. *Dis Colon Rectum*. 2001;44:1682-8.

Burt RW, Bishop DT, Cannon LA, Dowdle MA, Lee RG, Skolnick MH. Dominant inheritance of adenomatous colonic polyps and colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1985;312(24):1540-4.

Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci*. 2006;119:395-402

Cao HX, Gao CM, Takezaki T, Wu JZ, Ding JH, Liu YT, et al. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and susceptibility to colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008;9:203-8.

Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, Nebel S, Bresalier RS, Howell SB, et al. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology*. 1999;117(1):123-31.

Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SDJ. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet*. 2001;68:281-6.

Chang SC, Lin PC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Li AF. Role of MTHFR polymorphisms and folate levels in different phenotypes of sporadic colorectal cancers. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22(5):483-9.

Chen HS, Sheen-Chen SM. Obstruction and perforation in colorectal adenocarcinoma: An analysis of prognosis and current trends. *Surgery*. 2000;127(4):370-6.

Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 1996; 56:4862-4.

Chen J, Giovannucci E, Hankinson SE, Ma J, Willett WC, Spiegelman D, et al. A prospective study of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms, and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis*. 1998;19:2129-32.

Chen J, Stampfer MJ, Ma J, Selhub J, Malinow MR, Hennekens CH, et al. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001;154(3):667-72.

Chen J, Hunter DJ, Stampfer MJ, Kyte C, Chan W, Wetmur JG, et al. Polymorphism in the Thymidylate Synthase Promoter Enhancer Region Modifies the Risk and Survival of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12:958-62.

Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem.* 1997;272:3628-34.

Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr.* 2000;130(2):129-32.

Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr.* 2002;132(8):2413S-8S.

Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood PC, et al. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:8977-81.

Citarda F, Tomaselli G, Capocaccia R, Barcherini S, Crespi M, Group TI. Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut.* 2001;48(6):812-5.

Cohen AM. Overview of Colorectal Cancer Treatment. In: Cohen AM, Winawer SJ, Friedman MA, Gunderson LL (eds.). *Cancer of the Colon, Rectum, and Anus.* New York, McGraw-Hill. 1995;413-4.

Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7):979-94.

Cotton SC, Sharp L, Little J, Brockton N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGe review. *Am J Epidemiol.* 2000;151:7-32.

Curtin K, Bigler J, Slattery ML, Caan B, Potter JD, Ulrich CM. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms: diet, estrogen, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:285-92.

Curtin K, Slattery ML, Ulrich CM, Bigler J, Levin TR, Wolff RK, et al. Genetic polymorphisms in one-carbon metabolism: associations with CpG island methylator phenotype (CIMP) in colon cancer and the modifying effects of diet. *Carcinogenesis*. 2007;28(8):1672-9.

De Godoy BA, Longo D, Dos Santos PAC, Brandalize APC, Schuller-Faccini L. MTRR A66G como fator de risco para transtornos do espectro autista em uma amostra do sul do Brasil [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.

De La Chapelle A. Microsatellite instability. *N Engl J Med*. 2003;349(3):209-10.

De Waziers I, Cugnenc PH, Berger A, Leroux JP, Beaune PH. Drug metabolizing enzyme expression in human normal, peritumoral and tumoral colorectal tissue samples. *Carcinogenesis*. 1991;12(5):905-9.

Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol*. 1932;35:323-32.

Duncan BB, Schmidt MI, Polanczyk CA, Mengue SS. Altos coeficientes de mortalidade em populações adultas brasileiras: uma comparação internacional. *Rev Ass Med Bras*. 1992;38:138-44.

El Awady MK, Karim AM, Hanna LS, El Hussein LA, El Sahar M, Menem HAA, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and the risk of colorectal carcinoma in a sample of Egyptian individuals. *Cancer Biomarkers*. 2009;5(6):233-40.

Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumor site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet*. 2000;355(9217):1745-50.

Esser S, Reilly WT, Riley IB, Eyvazzadeh C, Arcona S. The role of sentinel lymph node mapping in staging of colon and rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2001;44(6):850-4.

Fang JY, Xiao SD. Folic acid, polymorphism of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. *J Gastroenterol.* 2003;38(9):821–9.

Fearon E, Cho K, Nigro J, Kern S, Simons J, Ruppert J, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science.* 1990;(247):49-56.

Feig BW, Curley S, Lucci A, Hunt KK, Vauthey JN, Mansfield PF, et al. A caution regarding lymphatic mapping in patients with colon cancer. *Am J Surg.* 2001;182(6):707-12.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2893-917.

Fernández-Peralta AM, Daimiel L, Nejda N, Iglesias D, Medina Arana V, González-Aguillera JJ. Association of polymorphisms MTHFR C677T and A1298C with risk of colorectal cancer, genetic and epigenetic characteristic of tumors, and response to chemotherapy. *Int J Colorectal Dis.* 2010;25(2):141-51.

Fielding PP. Staging Systems. In: Cohen AM, Winawer SJ, Friedman MA, Gunderson LL (eds.). *Cancer of the Colon, Rectum, and Anus.* New York, McGraw-Hill. 1995;207-15.

Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr.* 1998;157 (Suppl. 2): S40-S44.

Fisher JA, Fikry C, Troxel AB. Cutting Cost and Increasing Access to Colorectal Cancer Screening: Another Approach to Following the Guidelines. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;(1):108-13.

Franceschi S, Parpinel M, La Vecchia C, Favero A, Talamini R, Negri E. Role of different types of vegetables and fruit in the prevention of cancer of the colon, rectum and breast. *Epidemiology.* 1998;9(3):338-41.

Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S, et al. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr.* 1999;129:1656-61.

Friso S, Choi SW, Dolnikowski GG, Selhub J. A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2002;74: 4526–31

Frosst P, Blom HJ, Milos P, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995;1:111-3.

Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1994;331(25):1669-74.

Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, et al. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Ann J Pathol.* 1998;153(4):1063-78.

Garcia-Valdecasas JC, Llovera JM, deLacy AM, Reverter JC, Grande L, Fuster E, et al. Obstructing colorectal carcinomas: prospective study. *Dis Colon Rectum.* 1991;34:759-62.

Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barboux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis.* 2001;157:451-6.

Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, Knapp JP, Bodis M, Hübner U, et al. Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39(8):698-704.

Gerhardsson de Verdier M, Hagman U, Peters RK, Steineck G, Overvik E. Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm. *Int J Cancer*. 1991;49:520-5.

Gershoni-Baruch R, Dagan E, Israeli D, Kasinetz L, Kadouri E, Friedman E. Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women. *Eur J Cancer*. 2000;6(18): 2313-6.

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med*. 1994;121(4):241-6.

Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Aspirin use and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med*. 1995;333(10):609-14.

Gismondi V, Meta M, Bonelli L, Radice P, Sala P, Bertario L, et al. Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer*. 2004;109:680-4.

Goldstein DB, Cavalleri GL. Understanding human diversity. *Nature* 2005;437: 1241-42.

Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*. 1998;9:652-6.

Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:101-28.

Greene F, Stewart A, Norton H. A new TNM staging strategy for node-positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients. *Ann Surg*. 2002; 236(4):416-21.

Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & Dev.* 2005;19:877-90.

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000;342:69-77.

Gudnason V, Stansbie D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S. C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group. *Atherosclerosis.* 1998;136(2):347-54.

Habr-Gama A. Câncer colorretal - a importância de sua prevenção. *Arq Gastroenterol.* 2005;42(1):2-3.

Haghighi MM, Mohebbi SR, Khatami F, Ghiasi S, Derakhshan F, Atarian H, et al. Reverse association between MTHFR polymorphism (C677T) with sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology.* 2008;1(2):57-63.

Hampel H, Peltomaki P. Hereditary colorectal cancer: risk assessment and management. *Clinical Genetics.* 2000;58(2):89-97.

Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JW, Young IS, et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol.* 1999;17(4):298-309.

Harnden DG. Inherited susceptibility to mutation. In: Phillips DH (ed). *Environmental Mutagenesis.* Oxford, Bios Scientific; 1995;61-81.

Harris MJ, Coggan M, Langton L, Wilson SR, Board PG. Polymorphism of the Pi Class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. *Pharmacogenetics.* 1998;8(1):27-31.

Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg.* 1997;185:55-9.

Hassold TJ, Burrage LC, Chan ER, Judis LM, Schwartz S, James SJ, et al., Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. *Am J Hum Genet.* 2001;69(2):434-9.

Heijmans BT, Boer JMA, Suchiman HED, Cornelisse CJ, Westendorp RGJ, Kromhout D, et al. A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Res.* 2003;63:1249-53.

Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer.* 1999;86(12):2668-73.

Herrero-Jimenez P, Tomita-Mitchel A, Furth EE, Morgenthaler S, Thilly WG. Population risk and physiological rate parameters for colon cancer. The union of an explicit model for carcinogenesis with the public health records of the United States. *Mutat Res.* 2000;447(1):73-116.

Hill MJ. Dietary factors; The intestinal milieu. In: Cohen AM, Winaver SJ, Friedman MA, Gunderson LL (eds.) *Cancer of the Colon, Rectum, and Anus.* New York, McGraw-Hill; 1995;27-34.

Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet.* 2000;67(3):623-30.

Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct.* 1995;20:191-7.

Houlston RS, Tomlinson IPM. Polymorphisms and colorectal risk. *Gastroenterology*. 2001;121(2):282-301.

Huang Y, Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y. Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet*. 2007;52(1):73-85.

Human Genome Epidemiology Network [Acessado em 04 fevereiro 2011] Disponível em: URL:<http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/default.htm>

Iacopetta B, Grieu F, Joseph D, Elsaleh H. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Br J Cancer*. 2001;85:827-30.

Iacopetta B, Heyworth J, Girschik J, Grieu F, Clayforth C, Fritschi L. The MTHFR C677T and Δ DNMT3B C-149T polymorphism confer different risks for right- and left-sided colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2009;125:84-90.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil: 2012 [Acessado em 18 abril 2012] Disponível em: URL:<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012>.

Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet*. 2001;29(3):306-9.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:69-90.

Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1994;331:213-21.

Jiricny J, Nyström-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10:157-61.

Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(10):2992-3003.

Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, et al. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal and somatic G:C->T:A mutations. *Hum Mol Genet*. 2002;11:2961-7.

Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. *Genética Médica*. 3a ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2004. 415p.

Jorgensen OD, Kronborg O, Fenger C. The Funen Adenoma Follow-up Study. Incidence and death from colorectal carcinoma in an adenoma surveillance program. *Scand J Gastroenterol*. 1993;28(10):869-74.

Joseph NE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Wang H, Mayer RJ, MacDonald JS, et al. Accuracy of determining nodal negativity in colorectal cancer on the basis of the number of nodes retrieved on resection. *Ann Surg Oncol*. 2003;10(3):213-8.

Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res*. 2001;7:4096-101.

Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase, codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002(11):1611-20.

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell*. 1996;87:159-70.

Klerk M, Livers KJ, Kluijtmans LA, Blom HG, den Heijer M, Schouten EG, et al. The 2756A>G variant in the gene encoding methionine synthase: its relation with plasma homocysteine levels and risk of coronary heart disease in Dutch case-control study. *Thromb Res*. 2003;110:87-91.

Knekt P, Hakama M, Jarvinen R, Pukalla E, Heliovaara M. Smoking and risk of colorectal cancer. *Br J Haematol.* 1998;78(1):136-9.

Kono S, Chen K. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma. *Cancer Sci.* 2005; 96: 535-42.

Koushik A, Kraft P, Fuchs CS, Hankinson SE, Willett WC, Giovannucci EL, et al. Nonsynonymous polymorphisms in genes in the one carbon metabolism pathway and associations with colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:2408-17.

Kune S, Kune GA, Watson L. The Melbourne colorectal cancer study: incidence findings by age, sex, site, migrants and religion. *Int J Epidemiol.* 1986;15(4):483-93.

Lanza G, Matteuzzi M, Gafà R, Orvieto E, Maestri I, Santini A, et al. Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int J Cancer.* 1998;79:390-5.

Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LN, Seifried A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal risk (United States) *Cancer Causes Control.* 2002;13: 239-48.

Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:3059-64.

Leclerc D, Odievre M, Wu Q, Wilson A, Huizenga JJ, Rozen R, et al. Molecular cloning, expression and physical mapping of the human methionine synthase reductase gene. *Gene.* 1999;240:75-88.

Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998;396:643-9.

Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, Ahnen DJ, Garewal H, Chejfec G. Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. *N Engl J Med.* 2000;343(3):162-8.

Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural Invasion Is an Independent Predictor of Outcome in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5131-7.

Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse CJ, et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1998;339:223-8.

Lima CSP, Nascimento H, Bonadia LC, Teori MT, Coy CS, Góes JR, et al. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and the age of onset of sporadic colorectal adenocarcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22(7):757-63.

Lorand I, Souza CA, Costa FF. Haematological toxicity associated with agricultural chemicals in Brazil. *Lancet.* 1984;18:404.

Luo HR, Lu XM, Yao YG, Horie N, Takeishi K, Jorde LB, et al. Length polymorphism of thymidylate synthase regulatory region in Chinese populations and evolution of the novel alleles. *Biochem Genet.* 2002;40(1-2):41-51.

Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 1997;57(6):1098-102.

Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene; association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(9):825-9.

Marsh S, Collie-Duguid ESR, Li T, Liu X, McLeod HL. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics.* 1999;58:310-2.

Marsh S, Ameyaw MM, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Hum Mutat.* 2000;16(6):528.

Marsh S, McKay JA, Cassidy J, McLeod HL. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2001;19(2):383-6.

Martomo SA, Mathews CK. Effects of biological DNA precursor pool assymetry upon accuracy of DNA replication in vitro. *Mutat Res.* 2002;499:197-211.

Matevska N, Josifovski T, Kapedanovska A, Sterjev Z, Serafimoska Z, Panovski M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and risk of colorectal cancer in the Macedonian population. *Balkan J Med Genetics.* 2008;11(2):17-24.

Matsuo K, Hamajima N, Hirai T, Kato T, Inoue M, Takezaki T, et al. Methionine synthase reductase gene A66G polymorphism is associated with risk of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2002;3(4):353-9.

Matthews RG, Sheppard C, Goulding C. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur J Pediatr.* 1998;157(Suppl 2):54-9.

Mattos LL, Martins IS. Dietary fiber consumption in an adult population. *Rev Saude Publica.* 2000;34:50-5.

McMichael AJ, Giles GG. Cancer in migrants to Australia: extending the descriptive epidemiological data. *Cancer Res.* 1988;48(3):751-6.

Merkel S, Mansmann U, Papadopoulos T, Wittekind C, Hohenberger W, Hermanek P. The prognostic inhomogeneity of colorectal carcinomas stage III. a proposal for subdivison of stage III. *Cancer.* 2001;92(11):2754-9.

Meyers M, Wagner MW, Hwang HS, Kinsella TJ, Boothman DA. Role of the hMLHD1 DNA mismatch repair protein in fluoropyrimidine-mediated cell death and cell cycle responses. *Cancer Res.* 2001;61:5193-201.

Molloy AM, Daly S, Mills JS, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, et al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet.* 1997;349:1591-3.

Morson BC. Precancerous and early malignant lesions of the large intestine. *Br J Surg.* 1968;55:725-31.

Nagaraja D, Diwakar L. Letter to editor: The influence of MTR A2756G polymorphism on plasma homocysteine in young south Indians. *Clin Chim Acta.* 2008;395:172-4.

Narayanan S, McConnell J, Little J, Sharp L, Piyathilake CJ, Powers H, et al. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(9):1436-43.

Nilbert M, Planck M, Fernebro E, Borg A, Johnson A. Microsatellite instability is rare in rectal carcinomas and signifies hereditary cancer. *Eur J Cancer.* 1999;35(6):942-5.

Noe M, Schroy P, Demierre MF, Babayan R, Geller AC. Increased cancer risk for individuals with a family history of prostate cancer, colorectal cancer, and melanoma and their associated screening recommendations and practices. *Cancer Causes Control.* 2008;19(1):1-12.

Nussbaum RL, McInnes RR, Huntington FW. *Thompson & Thompson Genética Médica*, 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002;460p.

O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet.* 2002;107(2):151-5.

Otani T, Iwasaki M, Hanaoka T, Kobayashi M, Ishihara J, Natsukawa S, et al. Folate, vitamin B6, vitamin B12, and vitamin B2 intake, genetic polymorphisms of related enzymes, and risk of colorectal cancer in a hospital based case-control study in Japan. *Nutr Cancer.* 2005;53(1):42-50.

Oyama K, Kwakami K, Maeda K, Ishiguro K, Watanabe G. The association between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and promoter methylation in proximal colon cancer. *Anticancer Res.* 2004;24:649-54.

Paramo JC, Summerall J, Poppiti R, Mesko TW. Validation of sentinel node mapping in patients with colon cancer. *Ann Surg Oncol.* 2002;9(6):550-4.

Park KS, Mok JW, Kim JC. The 677C > T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer risk. *Genet Test.* 1999;3:233-6.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.

Peltomaki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res.* 2001;488:77-85.

Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21:1174-9.

Peltomaki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition Update of ICG-HNPCC/InSiGHT mutation database. *Dis Markers.* 2004;20:269-76.

Peng F, Labelle LA, Rainey BJ, Tsongalis GJ. Single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. *Int J Mol Med.* 2001;8(5):509-11.

Pietra N, Sarli L, Costi R, Ouchemi C, Grattarola M, Peracchia A. Role of follow-up in management of local recurrence of colorectal cancer, a prospective randomized study. *Dis Colon Rectum*. 1998;41:1127–33.

Pinho M, Rossi BM. Câncer colorretal: modelo ideal para a compreensão da carcinogênese. In: Rossi BM, Pinho P (eds.) *Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião*. São Paulo, Lemar, 1999:143-72.

Plaschke J, Schwanebeck U, Pistorius S, Saeger HD, Schackert HK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of sporadic and hereditary colorectal cancer with or without microsatellite instability. *Cancer Lett*. 2003;191(2):179-85.

Ponz de Leon M, Scapoli C, Zanghieri G, Sassatelli L, Sachetti C, Barrai I. Genetic transmission of colorectal cancer: exploratory data analysis from a population bases registry. *J Med Genet*. 1992;29(8):531-8.

Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005;23(3):609-18.

Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(11):916-32.

Pufulete M, Al Ghnaniem R, Leather AJ, Appleby P, Gout S, Terry C, et al. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology*. 2003;124: 1240-8.

Rachet B, Maringe C, Nur U, Quaresma M, Shah A, Woods LM, et al. Population-based cancer survival trends in England and Wales up to 2007: an assessment of the NHS cancer plan for England. *Lancet Oncol*. 2009;10(4):351-69.

Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet*. 2002;107(2):162-8.

Rashid A, Issa JP. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology*. 2004;127(5):1578-88.

Ray JG, Langman LJ, Vermeulen MJ, Evrovski J, Yeo EL, Cole DE. Genetics University of Toronto Thrombophilia Study in Women (GUTTSI): genetic and other risk factors for venous thromboembolism in women. *Curr Control Trials Cardiovasc Med*. 2001;2(3):141-9.

Robien K, Ulrich CM. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *Am J Epidemiol*. 2003;157:571-82.

Rosenberg L, Louik C, Shapiro S. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and reduced risk of a large bowel carcinoma. *Cancer*. 1998;82(12):2326-33.

Rossi BM, Lopes A, Ferreira FO, Nakagawa WT, Ferreira CCN, Casali da Rocha JC et al. hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2002;9:555-61.

Rozen P, Shomrat R, Strul H, Naiman T, Karminsky N, Legum C, et al. Prevalence of the I1307K APC gene variant in Israeli Jews of differing ethnic origin and risk for colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1999;116(1):54-7.

Rozen R. Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1996;19:589-94.

Ruiz MA, Augusto LGS, Vassallo J, Lorand-Metze I, Souza CA. Bone marrow morphology in neutropenic patients due to chronic exposition to organic solvents (Benzene): early lesions. *Path Res Pract*. 1994;190:151-4.

Ryan BM, Molloy AM, McManus R, Arfin Q, Kelleher D, Scott JM, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in colorectal cancer: role in tumor development and significance of allelic loss in tumor progression. *Int J Gastrointest Cancer*. 2001;30(3):105-11.

Sachse C, Smith G, Wilkie MJ, Barrett JH, Waxman R, Sullivan F, et al. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2002;23(11):1839-49.

Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(9):917-23.

Schafer A, Hawkins JR. DNA variation and the future of human genetics. *Nature Biotechnology*. 1998;16:33-9.

Schottenfeld D. Epidemiology. In: Cohen AM, Winawer SJ, Friedman MA, Gunderson LL (eds.). *Cancer of the Colon, Rectum, and Anus*. New York, McGraw-Hill; 1995;11-24.

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Fundação Oncocentro de São Paulo. Mortalidade por câncer no Estado de São Paulo: tendência temporal e características regionais 1987 a 2003. *Cadernos FOSP*. 2005;(4).

Seitz HK, Simanowski UA, Garzon FT, Rideout JM, Peters TJ, Koch A, et al. Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal carcinogenesis in the rat. *Gastroenterology*. 1990;98(2):406-13.

Shannon B, Gnanasampanthan S, Beilby J, Iacopetta B. A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut*. 2002;50(4):520-4.

Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2004;159(5):423-43.

Sharp L, Little J, Brockton NT, Masson LF, Haites NE, Cassidy J, et al. Dietary intake of folate and related micronutrients, genetic polymorphisms in MTHFR and colorectal cancer: a population-based case-control study in Scotland. *J Nut*. 2002;132(11S):3542S.

Sharp L, Little J, Brockton NT, Masson LF, Haites NE, Cassidy J, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, intakes of folate and related B vitamins and colorectal cancer: a case-control study in a population with relatively low folate intake. *British J Nut.* 2008;99(2):379-89.

Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G Jr, et al. The DCC Protein and Prognosis in Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 1996; 335:1727-32.

Shike M. Dietary Factors. In: Cohen AM, Winawer SJ, Friedman MA, Gunderson LL (eds.) *Cancer of the Colon, Rectum, and Anus.* New York, McGraw-Hill. 1995; 5-40.

Singh PN, Fraser GE. Dietary risk factor for colon cancer in a low-risk population. *Am J Epidemiol.* 1998;148(8):761-74.

Sinicrope FA, Sargent DJ. Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Curr Opin Oncol.* 2009;21(4):369-73.

Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Robert AC, Law GR, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxyl- methyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;99(10):3786-91.

Slattery ML, Potter J, Caan B, Edwards S, Coates A, Ma K, et al. Energy balance and colon cancer beyond physical activity. *Cancer Res.* 1997;57(1): 75-80.

Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetra - hydrofolate reductase, diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8:513-8.

Smalley W, Ray WA, Daugherty J, Griffin MR. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: a population-based study. *Arch Intern Med.* 1999;159(2):161-6.

Smith G, Stanley LA, Sim E, Strange RC, Wolf CR. Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility. *Cancer Surv.* 1995;25:27-65.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind CH (eds.) *TNM Classification of Malignant Tumors.* 7th ed. Wiley-Blackwell, Oxford; 2009;310p.

Solomon C, Burt RW. Familial Adenomatous Polyposis: 2010 [Acessado em 12 junho 2010] Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/?db=GeneTests>

Sparks A, Morin P, Vogelstein B, Kinzler K. Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58:1130-4.

Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer.* 1986;57:1866-70.

Stryer L. *Bioquímica.* (3a ed) Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 1992. 881p.

Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology.* 1987;93(5):1009-13.

Taioli E, Garza MA, Ahn YO, Bishop DT, Bost J, Budai B, et al. Meta and Pooled Analyses of the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism and Colorectal Cancer: A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2009;(170):1207-21.

Tepper JE, O'Connell MJ, Niedzwicki D, Hollis DR, Benson III AB, Cummings B, et al. Adjuvant therapy in rectal cancer: analysis by treatment, stage, and local control-final- Final report of Intergroup 0114. *J Clin Oncol.* 2002;20:1744-50.

Thiis-Evensen E, Hoff GS, Sauar J, Langmark F, Majak BM, Vatn MH. Population-based surveillance by colonoscopy: effect on the incidence of colorectal cancer. Telemark Polyp Study I. *Scand J Gastroenterol.* 1999; 34(4):414-20.

Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med.* 1991;325(23):1593-6.

Toffoli G, Gafà R, Russo A, Lanza G, Dolcetti R, Sartor F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C →T polymorphism and risk of proximal colon cancer in North Italy. *Clin Cancer Res.* 2003;9(2):743-8.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:8681-6.

Trinh BN, Ong CN, Coetzee GA, Yu MC, Laird PW. Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels. *Hum Genet.* 2002;111(3):299-302.

Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analysis of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82:650-61.

Ulrich C, Bigler J, Velicer C, Greene EA, Farin FM, Potter JD. Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:1381-5.

Ulrich C, Bigler J, Bostick R, Fosdick L, Potter JD. Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res.* 2002;62:3361-4.

Ulvik A, Vollset S, Hansen S, Gislefoss R, Jellum E, Ueland PM. Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C →T and methionine synthase 2756A →G polymorphisms: a study of 2,168 case-control pairs from the JANUS cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(12):2175-80.

Van der Put NM, Van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *Q J Med.* 1997;90(8):511-7.

Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common Mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998;62:1044-51.

Van Staveren WA, Hautvast JGAJ, Katan MB, Van Montfort MAJ, Van Oosten-Vander Goes HGC. Dietary fiber consumption in an adult Dutch population. *J Am Diet Assoc.* 1982;80:324-30.

Villafranca E, Okruzhnov Y, Domingues MA, García-Foncillas J, Azinovic I, Martínez E, et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19(6): 1779-86.

Volcik KA, Blanton SH, Tyerman GH, Jong ST, Rott EJ, Page TZ, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and spina bifida: evaluation of level of defect and maternal genotypic risk in Hispanics. *Am J Genet.* 2000;95:21-7.

Wang J, Gajalakshimi V, Jiang J, Kuriki K, Suzuki S, Nagaya T, et al. Associations between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 genetic polymorphisms and environmental factors with reference to susceptibility to colorectal cancer; a case-control study in an Indian population. *Int J Cancer.* 2006;118(4): 991-7.

Waters GS, Geisinger KR, Garske DD, Loggie BW, Levine EA. Sentinel Lymph node mapping for carcinoma of the colon: a pilot study. *Am Surg.* 2000; 66:943-5.

Warner EE, Evans SR. The sentinel nodes biopsy and colon cancer revisited. *Cancer J.* 2002;(6):435-7.

Wayer J. Evolução do câncer do cólon. In: Habr-Gama A, Gama-Rodrigues JJ, Betarello A (eds.) *Câncer do Estômago e do Intestino Grosso: Prevenção e Detecção.* São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda. 1980;73-6.

Weber W, Laffer U, Metzger U. Adjuvant portal liver infusion with 5-fluorouracil and mitomycin in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 1993;(5c):1839-40.

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 1998;64:169-72.

Wettergren Y, Odin E, Carlsson G, Gustavsson B. MTHFR, MTR, and MTRR polymorphisms in relation to p16INK4A hypermethylation in mucosa of patients with colorectal cancer. *Mol Med.* 2010;16(9-10):425-32.

Whittemore AS, Wu-Williams AH, Lee M, Gallagher RP, Deng-ao J, Loun Z, et al. Diet, physical activity, and colorectal cancer among Chinese in North America and China. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(11):915-6.

Wijnen J, Khan PD, Vasen H, van der Klift H, Mulder A, van Leeuwen-Cornelisse I, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer families not complying with the Amsterdam criteria show extremely low frequency of mismatch-repair-gene mutations. *Am J Hum Genet.* 1997;61:329-35.

Willet W. *Nutritional Epidemiology.* New York: Oxford University Press. 1990; 69-71.

Willett C, Tepper JE, Cohen A, Orlow E, Welch C. Obstructive and perforative colonic carcinoma: patterns of failure. *J Clin Oncol.* 1985;3:379-84.

Wilmink AB. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1997;40(4):483-93.

Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab.* 1999;67:317-23.

Winawer SJ, Sherlock P. Malignant neoplasms of the small and large intestine. In: Sleisenger MH & Fordtran JS (eds.) *Gastrointestinal Disease.* Philadelphia, WB Sanders Company; 1983;1220-49.

Winawer SJ, Enker WE, Lightdale CJ. Malignant tumors of the colon and rectum. In: Berk JE (ed.) Gastroenterology. Philadelphia, WB Saunders Company. 1985;2531-74.

Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. N Engl J Med. 1993;329(27):1977-81.

Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. N Engl J Med. 1996;334(2):82-7.

Wolmark N, Wieand HS, Rockette HE, Fisher B, Glass A, Lawrence W, et al. The prognostic significance of tumor location and bowel obstruction in Dukes B and C colorectal cancer: findings from the NSABP clinical trials. Ann Surg. 1983; 198:743-52.

Wong JH, Severino R, Honnebier MB, Tom P, Namiki TS. Number of nodes examined and staging accuracy in colorectal carcinoma. J Clin Oncol.1999; 1:2896-900.

Woodhead JL, Fallon R, Figuered H, Longdale J, Malcom AD. Alternative Methodology of Gene Diagnosis. In: Davies KE (ed) Human Genetic Diseases - A Practical Approach: Oxford: IRL Press. 1986;51-64.

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR; 2007.537p.

World Health Organization. acessado em março 2012 Disponível em: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

Yi P, Pogrinbny IP, James SJ. Multiplex: PCR for silmultaneous detection of 677CT and 1298AC polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of cancer risk. Cancer Letters. 2002;181:209-13.

Yin G, Kono S, Toyomura K, Hagiwara T, Nagano J, Mizoue T, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and colorectal cancer. The Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Science*. 2004;95(11):908-13.

Yu K, Zhang J, Zhang J, Dou C, Gu S, Xie Y, et al. Methionine synthase A2756G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Eur Journal Human Genetics*. 2010;18(3):370-8.

Zhang G, Dai C. Gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular diseases. *Thromb Res*. 2001;104:187-95.

Zing JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1997;18:869-82.

Zinkin LD. A critical review of the classification and staging of colorectal cancer. *Dis Colum Rectum*. 1983;26:37-43.

8- ANEXOS

**CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO SISTEMA DE ESTADIAMENTO TNM
PARA O CÂNCER COLORRETAL**

T	Tumor primário
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
pT0	Não há evidência de tumor primário
pTis	Ca " <i>in situ</i> ": intra-epitelial ou invasão da lâmina própria
pT1	Tumor que invade a submucosa
pT2	Tumor que invade a muscular própria
pT3	Tumor que invade a serosa ou os tecidos pericólicos ou perirretais não peritonizados.
pT4	Tumor que invade diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou que perfura o peritônio visceral
N	Linfonodos regionais
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais
N2	Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais
M	Metástases à distância
Mx	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

**GRUPOS DE ESTADIAMENTO E CARACTERÍSTICAS TNM DO
CÂNCER COLORRETAL**

Estágio	Descrição
EC 0	Tis N0 M0
EC I	T1, T2 N0 M0
EC IIA	T3 N0 M0
EC IIB	T4 N0 M0
EC IIIA	T1, T2 N1 M0
EC IIIB	T3, T4 N1 M0
EC IIIC	Qualquer T N2 M0
EC IV	Qualquer T Qualquer N M1

CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CCR BASEADA NA NORMATIZAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS)

	Adenocarcinoma
	Adenocarcinoma mucinoso
	Adenocarcinoma de células em anel de sinete
Tumores Epiteliais	Carcinoma de células escamosas
	Carcinoma adenoescamoso
	Carcinoma indiferenciado
	Carcinoma inclassificável
	Argentafin
Tumores Carcinóides	Não argentafin
	Misto
Tumores Não Epiteliais	Leiomiossarcoma
	Outros
Neoplasias Linfóides e Hematopoiéticas	
Inclassificável	



9- APÊNDICES



CEP, 21/12/10.
(PARECER CEP: Nº 227/2003)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES CYP1A1, NAT1 E NAT2, ASSOCIADOS AO METABOLISMO DE CARCINÓGENOS NA SUSCEPTIBILIDADE AO ADENOCARCINOMA COLORRETAL ESPORÁDICO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sandro Nunes Angelo

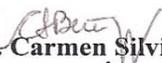
II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou adendo que inclui o projeto “INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DOS GENES METILENO TETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR A1298C R MTHFR C677T), METIONINA SINTASE (MTR A2756G), METIONINA SINTASE REDUTASE (MTRR A66G) E THIMIDILATO SINTASE (TYMS 2R/3R) NO RISCO DO CANCER COLORRETAL ESPORÁDICO”, sob responsabilidade do aluno José Luiz Miranda Guimarães, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de dezembro de 2010.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

**DISTRIBUIÇÃO DOS 113 PACIENTES COM ADENOCARCINOMA
COLORRETAL ESPORÁDICO, DE ACORDO COM A IDADE, SEXO, RAÇA,
LOCAL DO TUMOR, ESTADIAMENTO (TNM), GRAU DE DIFERENCIAÇÃO E
OS GENÓTIPOS *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G,
MTRR A66G e *TS* 2R3R**

Pcte.	Idade	Sexo	Raça	Local	TNM	Gr.	<i>MTHFR</i> A1298C	<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTR</i> A2756G	<i>MTRR</i> A66G	<i>TS</i> 2R3R
1	61	F	N	S	IV	II	AC	CC	AA	GG	2R3R
2	72	M	C	R	IV	I	AA	CT	AA	GG	3R3R
3	74	M	C	S	III	I	AA	CT	AA	AG	3R3R
4	41	F	C	C	IV	II	AC	CT	AG	AG	2R3R
5	81	M	C	R	II	I	AA	CT	AG	AA	2R3R
6	46	F	C	T	III	II	AC	CT	AG	AG	2R2R
7	47	F	C	S	II	II	AA	CT	AA	AA	3R3R
8	76	F	C	S	IV	II	AA	TT	AA	AG	2R2R
9	67	F	C	R	II	II	AA	CC	AA	GG	3R3R
10	51	F	N	R	II	I	AC	CT	AA	GG	2R3R
11	80	M	C	R	II	II	AC	CC	AA	AG	2R3R
12	68	F	C	A	II	I	AA	TT	AA	AG	2R3R
13	46	F	C	S	III	II	AA	TT	AA	GG	2R2R
14	66	F	C	R	III	II	AA	CT	AA	AG	2R3R
15	53	F	C	S	I	II	AA	CC	AA	AG	2R3R
16	47	M	C	R	II	I	AC	CT	AA	AG	2R3R
17	33	M	C	A	III	II	AA	TT	AA	AA	2R3R
18	64	M	C	R	II	II	CC	CC	AA	AA	2R3R
19	51	F	C	S	II	I	AA	CT	AG	AG	3R3R
20	40	F	C	R	III	II	AC	CT	AA	AG	2R2R

Pcte.	Idade	Sexo	Raça	Local	TNM	Gr.	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
21	59	M	C	R	II	II	AA	TT	AA	GG	2R3R
22	80	M	C	S	I	I	AA	TT	AG	GG	2R2R
23	54	F	C	S	IV	I	AA	CT	AA	AG	3R3R
24	64	M	C	R	III	III	AC	CC	AG	AG	3R3R
25	70	F	C	A	II	II	AA	CT	AA	AG	2R2R
26	83	M	C	R	IV	III	AA	CC	AA	AG	2R2R
27	73	M	C	R	I	I	AC	CC	AG	GG	2R3R
28	59	M	C	C	II	I	AC	CC	GG	AG	2R3R
29	55	F	C	R	I	I	AC	CC	AA	AA	3R3R
30	57	M	C	S	III	II	AA	CT	AG	GG	2R2R
31	24	F	C	R	III	II	AA	CT	AG	AG	2R3R
32	55	F	C	R	I	I	AC	CC	AG	AG	2R2R
33	68	M	C	R	II	II	AC	CC	AA	AG	2R3R
34	46	M	C	A	II	II	AC	CC	AA	GG	3R3R
35	70	M	C	D	II	I	AC	CC	AA	AG	3R3R
36	48	M	C	S	III	I	AA	CT	AA	AA	2R3R
37	70	F	C	S	II	I	AA	CT	AA	AA	2R3R
38	45	M	C	R	III	I	AA	CT	AG	AA	3R3R
39	76	F	C	R	III	II	AC	CT	AA	AG	2R3R
40	59	F	N	R	I	I	AC	CT	AA	AG	2R3R
41	49	M	C	R	III	I	AC	CT	AA	AG	2R3R
42	35	M	C	A	IV	II	AC	CT	AG	AA	2R3R
43	50	M	C	A	I	III	AA	CC	AA	AG	3R3R
44	55	F	C	R	II	II	CC	CC	AA	AG	3R3R
45	55	M	C	R	II	II	AA	CT	AA	AA	2R3R
46	58	M	C	R	I	II	AC	CC	AA	AG	2R2R

Pcte.	Idade	Sexo	Raça	Local	TNM	Gr.	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
47	54	F	C	R	I	II	AC	CC	AA	AG	3R3R
48	69	F	C	R	III	II	AC	CC	AA	AA	2R3R
49	68	M	C	A	II	II	AC	CT	AA	AA	2R2R
50	75	F	C	R	II	II	AA	CC	AG	GG	2R2R
51	67	F	C	C	IV	II	AA	CT	AA	AA	2R3R
52	57	F	C	A	III	II	AA	CT	AA	AG	2R3R
53	71	F	C	S	IV	II	AA	TT	AA	GG	3R3R
54	40	F	C	R	II	II	AA	CT	GG	GG	2R3R
55	50	F	C	D	II	II	CC	CC	AA	AA	3R3R
56	51	M	C	A	II	II	AA	CT	AG	AA	2R3R
57	36	M	C	D	III	III	AA	CT	AG	GG	3R3R
58	29	F	C	R	III	II	AA	TT	GG	AA	2R2R
59	47	M	C	R	II	II	AA	CC	AG	AG	2R2R
60	41	F	C	A	IV	II	AC	CT	AG	GG	2R2R
61	52	F	C	R	II	III	AC	CT	AG	AA	3R3R
62	60	F	N	R	I	I	AA	CT	AG	AG	2R3R
63	74	F	C	S	III	II	AA	TT	AA	AG	3R3R
64	56	M	C	C	IV	II	AA	CC	AA	AG	3R3R
65	65	F	C	S	IV	II	AA	CT	AA	AG	2R2R
66	59	M	C	R	II	II	AA	CC	AA	AG	2R3R
67	50	F	C	R	II	I	AC	CT	AA	GG	2R2R
68	61	F	C	R	III	III	AA	CC	GG	GG	2R3R
69	69	M	C	S	IV	II	AA	CT	AA	GG	2R2R
70	60	M	C	D	III	II	AA	CT	AA	AG	2R2R
71	66	M	C	R	I	I	CC	CC	AA	GG	2R3R
72	71	M	C	R	II	II	AA	CT	AA	AG	2R3R

Pcte.	Idade	Sexo	Raça	Local	TNM	Gr.	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
73	42	F	C	A	III	III	AA	CC	AA	AG	2R3R
74	60	M	C	R	IV	II	AA	CC	AG	AG	2R3R
75	49	M	N	T	III	III	AC	CT	GG	GG	2R3R
76	72	M	C	S	III	II	AA	CC	AA	AA	2R3R
77	83	F	N	R	IV	II	AA	CT	AA	GG	2R2R
78	61	F	C	R	II	II	AA	CC	AA	AG	2R3R
79	44	M	C	A	III	II	AA	CT	AA	AG	2R2R
80	67	M	N	R	II	II	AA	CC	AA	GG	2R3R
81	41	F	C	R	III	I	AA	TT	AG	GG	2R3R
82	74	M	C	R	I	I	AA	TT	AA	GG	3R3R
83	79	M	C	D	I	II	AA	CT	AA	GG	2R3R
84	56	M	C	R	II	II	AA	CT	AA	GG	2R2R
85	48	M	C	S	II	I	CC	CC	AA	GG	3R3R
86	68	M	C	S	IV	I	AA	CT	AG	AG	2R2R
87	39	M	C	D	II	II	AA	CT	AA	AG	3R3R
88	64	M	C	A	III	II	AA	CC	AA	AG	2R3R
89	74	M	C	R	III	I	AA	CC	AA	GG	2R2R
90	66	F	C	C	IV	II	AA	CT	AA	AG	2R3R
91	51	M	C	R	II	III	AC	CC	AG	AA	2R3R
92	65	M	C	R	II	II	AC	CT	AA	AG	2R2R
93	58	M	C	S	II	II	AA	CT	AA	AA	3R3R
94	72	F	C	R	I	I	AC	CC	AA	AG	2R2R
95	44	F	C	R	IV	II	AC	CC	AA	AG	2R3R

Pcte.	Idade	Sexo	Raça	Local	TNM	Gr.	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
96	57	F	C	R	II	II	AC	CT	AA	AG	2R3R
97	54	F	N	R	II	II	CC	CC	AA	AA	3R3R
98	58	F	N	R	III	II	AC	CC	AA	AA	2R3R
99	66	F	C	C	II	III	AA	CC	AA	AG	3R3R
100	50	M	N	R	III	II	AA	CC	AA	GG	2R2R
101	77	F	C	S	II	II	AC	CC	AA	AG	2R3R
102	41	M	C	T	I	II	AC	CC	AA	AA	2R3R
103	76	M	C	S	III	I	CC	CC	AA	AG	2R2R
104	75	F	C	R	I	II	AA	TT	AA	AG	3R3R
105	50	F	C	R	III	II	AC	CC	AA	AA	3R3R
106	55	M	C	S	IV	I	AA	TT	AA	AA	2R3R
107	54	F	N	S	I	II	AA	CT	AA	GG	3R3R
108	63	M	C	R	IV	II	AC	CT	AA	GG	3R3R
109	82	M	C	C	III	I	AA	TT	AG	AA	2R3R
110	51	M	C	R	III	I	AA	TT	AA	AG	3R3R
111	82	M	N	R	II	II	CC	CC	AG	AG	2R3R
112	73	M	C	R	II	I	AC	CC	AA	AG	3R3R
113	63	M	C	A	II	III	AA	CC	AG	GG	2R3R

F: feminino; **M:** masculino; **C:** caucasiano; **N:** negróide (Afro-Brasileiro)

**DISTRIBUIÇÃO DOS 188 DOADORES DE SANGUE, QUE SERVIRAM COMO
CONTROLES, DE ACORDO COM A IDADE, O SEXO, A RAÇA E OS
GENÓTIPOS *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G,
MTRR A66G e *TS* 2R3R**

Controle	Idade	Sexo	Raça	<i>MTHFR</i> A1298C	<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTR</i> A2756G	<i>MTRR</i> A66G	<i>TS</i> 2R3R
1	57	F	C	AA	CC	AA	AG	3R3R
2	51	M	C	AA	CT	AA	AG	3R3R
3	54	M	N	AA	CT	AG	AG	3R3R
4	57	F	C	AC	CC	AG	AG	2R3R
5	51	F	C	CC	CC	GG	AA	2R2R
6	59	M	N	AC	CC	GG	AA	3R3R
7	55	M	C	AA	CT	AA	AG	2R3R
8	50	F	C	AA	CT	AA	AA	2R3R
9	57	M	C	AA	CT	AA	AG	3R3R
10	54	M	C	AA	TT	AA	AG	3R3R
11	54	M	C	AA	CC	AA	AG	2R2R
12	52	M	C	AA	CT	AA	AG	2R3R
13	59	M	C	CC	CC	AG	AG	2R2R
14	53	F	C	AC	CC	AG	AG	2R2R
15	52	M	C	AC	CC	GG	GG	2R3R
16	53	M	C	AA	CC	AG	AG	2R2R
17	51	M	N	AC	CC	AG	AA	2R3R
18	52	F	C	AA	CC	AA	AA	2R3R
19	57	M	C	AA	CC	AA	AG	2R3R

Controle	Idade	Sexo	Raça	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
20	53	M	C	AC	CC	AA	AG	3R3R
21	56	M	N	AA	CC	AA	AG	3R3R
22	55	M	C	AC	CC	AA	AA	2R2R
23	50	M	C	AC	CC	AA	AA	2R3R
24	51	F	C	AA	CT	AA	AA	2R3R
25	56	M	C	AC	CC	AG	AA	2R3R
26	50	M	C	AA	CT	AG	AA	3R3R
27	57	F	N	AA	CC	AA	AA	3R3R
28	58	M	C	AA	CT	AA	AA	2R3R
29	53	M	C	AA	CT	AA	AG	2R3R
30	57	M	C	AA	CT	AA	AG	2R2R
31	55	M	C	AA	TT	AA	AG	2R3R
32	50	M	N	AA	CT	AG	AA	3R3R
33	56	M	C	AA	CC	GG	AA	2R2R
34	56	M	C	AA	CC	AA	AG	3R3R
35	51	M	C	AA	CC	AA	AG	3R3R
36	51	M	C	AA	CC	AA	AG	2R3R
37	50	M	N	AA	CC	AA	AA	3R3R
38	58	F	C	AA	CT	AA	AG	2R3R
39	52	M	C	AA	CT	AA	AG	3R3R
40	50	M	C	CC	CC	AA	AG	2R2R
41	55	M	C	AA	CC	AA	AG	2R2R
42	57	F	C	AC	CT	AA	GG	3R3R

Controle	Idade	Sexo	Raça	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
43	53	M	C	AA	CC	AA	AG	3R3R
44	55	M	C	AC	CT	AA	GG	3R3R
45	52	F	C	AC	CT	AA	AA	2R3R
46	52	M	C	AA	CC	AA	AA	3R3R
47	51	M	C	AA	CT	AA	AA	2R3R
48	55	M	C	AA	CT	AA	AA	2R3R
49	53	M	C	AA	CT	AA	GG	2R3R
50	51	M	C	AA	CC	AA	AA	2R3R
51	56	F	C	AA	CT	AA	AA	2R3R
52	56	F	C	AA	TT	AA	AA	2R3R
53	52	F	C	CC	CC	AA	AG	2R3R
54	50	M	N	AA	TT	AA	AA	3R3R
55	58	M	C	AC	CT	AA	AG	3R3R
56	53	M	N	AA	TT	AG	GG	2R3R
57	52	M	C	AA	CT	AA	AG	2R2R
58	56	F	C	AC	CC	AG	AG	3R3R
59	56	M	C	AA	TT	AA	AA	2R2R
60	51	M	C	AA	TT	AG	AG	2R3R
61	55	M	C	AA	CC	AA	AG	2R2R
62	56	M	C	AC	CT	AG	AG	2R3R
63	51	F	C	CC	CC	AG	AG	2R2R
64	50	F	N	AC	CT	AA	AG	2R3R
65	50	M	C	AC	CC	AA	AG	2R3R

Controle	Idade	Sexo	Raça	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
66	55	M	C	AC	CC	AA	AG	2R2R
67	59	M	C	AC	CC	AA	AA	2R3R
68	58	M	N	AA	CT	AA	AG	2R2R
69	50	M	N	AA	TT	AA	AG	3R3R
70	51	M	N	AC	CT	AA	AG	2R3R
71	53	M	N	AC	CC	AA	AG	2R2R
72	55	M	C	AC	CC	AA	AA	3R3R
73	56	M	C	AA	CC	AG	AA	3R3R
74	52	M	C	AA	CT	AA	AG	2R3R
75	58	M	C	AA	CT	AA	GG	2R2R
76	50	M	C	AA	CT	AA	AG	2R2R
77	50	F	C	AA	CT	AA	AA	2R3R
78	50	M	C	AA	CC	AA	AG	2R3R
79	51	M	N	AA	CT	AA	AG	3R3R
80	52	M	C	AA	CC	AA	GG	2R3R
81	57	M	C	AA	CC	AA	AG	2R3R
82	56	M	C	AA	CC	AA	GG	2R3R
83	52	M	N	AA	CT	AA	AA	3R3R
84	56	M	C	AA	CT	GG	AG	2R3R
85	57	M	C	AA	CC	AA	AG	3R3R
86	51	M	C	AA	CC	AA	AG	3R3R
87	56	M	C	AA	CT	AA	GG	3R3R
88	51	M	C	CC	CC	AA	GG	3R3R

Controle	Idade	Sexo	Raça	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
89	50	M	C	AA	CC	AA	AG	2R3R
90	50	M	C	AA	CT	AA	AG	3R3R
91	50	M	C	AA	CC	AA	AG	3R3R
92	59	F	C	AC	CT	AG	AG	2R3R
93	51	F	N	AA	CT	AA	AG	2R3R
94	58	M	C	AC	CT	AA	AG	2R3R
95	56	M	C	AC	CT	AG	AG	2R3R
96	49	F	C	CC	CC	AA	AG	3R3R
97	58	M	C	AA	CT	AA	AG	3R3R
98	51	M	C	AA	CT	AA	AA	3R3R
99	50	M	N	AC	CC	AA	GG	2R3R
100	60	M	C	AA	TT	AA	AA	2R2R
101	51	M	C	AA	TT	AA	AA	2R3R
102	50	M	C	AA	CT	GG	GG	2R2R
103	56	M	C	AC	CC	AA	GG	2R2R
104	52	M	C	AA	TT	AA	AA	3R3R
105	50	M	C	AA	CC	AA	AA	2R3R
106	50	M	C	AC	CT	AA	AG	3R3R
107	52	M	N	CC	CC	AG	GG	3R3R
108	59	M	C	AA	TT	AA	AG	2R3R
109	54	M	C	AC	CT	AA	AA	2R3R
110	51	F	C	AC	CC	AA	AA	3R3R
111	55	M	N	AC	CC	AG	GG	3R3R

Controle	Idade	Sexo	Raça	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
112	54	M	C	AC	CC	AA	AG	2R2R
113	50	M	C	AA	CT	AA	AG	2R3R
114	51	M	C	AC	CT	AA	AG	3R3R
115	54	F	C	AC	CT	AA	AG	2R2R
116	60	M	N	AC	CC	AG	AG	2R3R
117	51	M	C	AA	CT	AA	GG	3R3R
118	55	M	C	AA	CT	AA	AA	2R3R
119	52	M	N	AA	CC	AG	AG	2R3R
120	55	M	C	AC	CC	AA	AG	2R2R
121	53	F	C	AA	CC	AA	AG	2R3R
122	54	F	C	AC	CC	AG	AG	3R3R
123	53	M	C	AA	CC	AA	AG	2R2R
124	53	M	C	AA	CT	AA	GG	3R3R
125	50	M	C	AA	CT	AA	AG	3R3R
126	52	M	C	AC	CC	AA	AG	3R3R
127	59	M	C	AA	CT	AA	AG	3R3R
128	54	M	C	AA	CC	AA	AG	2R2R
129	51	M	C	AA	CT	AG	AG	3R3R
130	51	M	C	AC	CC	AA	GG	2R3R
131	58	M	C	AC	CC	AA	AG	3R3R
132	52	M	C	AA	CT	AA	AG	3R3R
133	58	F	C	AA	CC	AA	AG	2R2R
134	55	M	C	AA	CC	AA	AG	2R3R

Controle	Idade	Sexo	Raça	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
135	58	F	C	AA	CC	AA	AA	3R3R
136	55	M	C	AC	CC	AG	GG	3R3R
137	56	M	C	AA	CT	AA	GG	2R3R
138	55	M	N	AA	CC	AA	AG	2R3R
139	52	M	C	AA	CT	AA	GG	3R3R
140	54	F	C	CC	CC	AA	AA	2R3R
141	56	F	C	AA	TT	AG	AA	3R3R
142	57	F	C	AA	TT	AG	AA	2R2R
143	53	F	C	AA	CT	AA	AG	3R3R
144	54	F	N	AC	CC	AA	AA	3R3R
145	52	M	C	AA	CC	AA	GG	2R2R
146	54	F	C	AA	TT	AG	AA	3R3R
147	52	M	C	AA	CC	AA	GG	2R3R
148	55	M	N	AC	CC	GG	GG	3R3R
149	50	M	C	AA	CT	AA	AG	2R3R
150	59	M	C	AA	CT	AA	AG	2R2R
151	51	M	C	AA	CT	AA	AG	3R3R
152	53	F	C	AA	CC	AA	AA	2R3R
153	59	M	C	AA	CT	AG	GG	2R2R
154	50	F	C	AA	CC	AG	AA	3R3R
155	55	F	C	AA	CC	AG	AA	2R3R
156	52	F	C	AA	CC	AG	GG	2R3R
157	55	F	C	AA	CT	AG	AG	2R3R

Controle	Idade	Sexo	Raça	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
158	56	F	C	AA	CT	AG	GG	2R2R
159	54	F	C	AA	CC	AG	AG	2R3R
160	60	M	C	AA	CC	AA	AG	2R3R
161	54	F	C	AA	CT	AA	AG	2R2R
162	58	F	C	AA	CT	AG	AA	2R2R
163	53	F	C	AA	CC	AA	AA	3R3R
164	53	F	C	AA	CT	AA	AG	3R3R
165	51	F	N	AC	CT	AA	AG	2R3R
166	56	F	C	AC	CT	AA	GG	2R3R
167	52	F	C	CC	CC	AA	GG	2R3R
168	58	F	C	AA	CT	AA	AG	2R3R
169	53	F	C	AA	CT	AA	AA	3R3R
170	55	M	C	AA	CT	AA	GG	3R3R
171	50	F	C	AA	TT	AA	AA	2R3R
172	50	F	C	AA	CT	AA	AG	2R3R
173	55	F	C	AC	CC	AA	AG	2R3R
174	53	F	C	CC	CC	AA	AG	2R3R
175	58	F	C	AC	CC	AA	AG	3R3R
176	51	F	C	AA	CT	AG	AG	2R3R
177	53	F	C	AA	CT	AA	AA	3R3R
178	53	F	C	AA	CT	AG	AG	3R3R
179	55	F	C	AA	TT	AA	AG	2R2R
180	56	F	C	AA	CT	AA	AA	3R3R

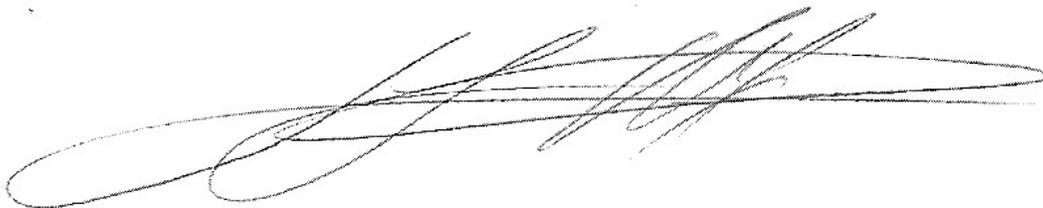
Controle	Idade	Sexo	Raça	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	MTR A2756G	MTRR A66G	TS 2R3R
181	57	F	C	AA	CT	AA	AG	2R3R
182	51	F	C	CC	CC	AA	AG	3R3R
183	55	F	C	AC	CC	AA	AG	2R3R
184	51	F	C	AC	CC	AA	GG	2R3R
185	54	F	C	AA	CT	AA	GG	2R3R
186	59	F	C	AA	CC	AA	AA	2R3R
187	56	F	N	AA	CC	AA	GG	2R2R
188	53	F	C	AA	CC	AA	AG	2R2R

F: feminino; **M:** masculino; **C:** caucasiano; **N:** negróide (Afro-Brasileiro)

Declaração

A cópia do artigo de minha autoria, submetido para publicação no periódico "Tumor Biology", que consta da minha Tese de Doutorado, intitulada **"Gene polymorphisms involved in folate and methionine metabolism and increased risk of sporadic colorectal adenocarcinoma"**, não infringe os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 29 de abril de 2011.



Dr. José Luiz Miranda Guimarães
Autor
RG n.º 1005420755



Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima
Orientadora
RG n.º 9675366

Gene polymorphisms involved in folate and methionine metabolism and increased risk of sporadic colorectal adenocarcinoma

José Luiz Miranda Guimarães · Maria de Lurdes Ayrizono · Cláudio Saddy Rodrigues Coy · Carmen Sílvia Passos Lima

Received: 14 February 2011 / Accepted: 29 April 2011 / Published online: 21 May 2011
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2011

Abstract This pilot study has compared the polymorphic genotype frequencies of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR* A1298C and C677T), methionine synthase (*MTR* A2756G), methionine synthase reductase (*MTRR* A66G), and thymidylate synthase (*TS* 2R/3R) in 113 patients with sporadic colorectal adenocarcinoma (SCA) and 188 healthy blood donors, used as matched controls. The aim was to assess the role of these genotypes in the increased risk of SCA among the southeastern Brazilian population. Carriers of genotype *MTRR* 66GG, or the combined variants *MTHFR* 1298AC+CC plus 677CT+TT, or *MTHFR* 677CT+TT plus *MTR* 2756AG+GG, or *MTHFR* 1298AC+CC plus 677CT+TT plus *MTR* 2756AG+GG, or yet, *MTHFR* 1298AC+CC plus 677CT+TT plus *MTRR* 66AG+GG, respectively, showed an increased risk of the order of 1.99-, 3.26-, 2.22-, 10.92-, and 14.88-fold of developing SCA when compared with carriers of the other studied polymorphic genotypes, whether in isolation or in combination. In addition, individuals with the *MTHFR*

677CT+TT or the *MTR* 2756AG+GG genotypes had a 2.12- and a 1.42-fold increased risks of SCA onset before 50 years of age. African-Brazilians with the *MTRR* 66GG genotype had a 1.98-fold increased risk of SCA while individuals with the *MTR* 2756AG+GG and the *MTHFR* 677CT+TT genotypes showed a 2.11- and a 1.62-fold increased risk of undifferentiated and advanced tumors at diagnosis, respectively. Carriers of genotype *MTHFR* 1298AC+CC or *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTRR* 66AG+GG had a 1.42- and a 3.07-fold increased risk of rectal tumor, respectively. Additionally, carriers of *MTHFR* 677CT+TT or *MTHFR* 677CT+TT plus *TS* 2R/3R+3R/3R had a 1.55- and a 5.39-fold increased risk for colon tumor, respectively, in comparison with carriers of the wild genotypes. These data suggest that all polymorphisms coding for folate and methionine-dependent enzymes, particularly when present in combination with other polymorphisms, have consistent roles in the increased risk of SCA among the southeastern population of Brazil.

Keywords Sporadic colorectal cancer · Gene polymorphism · Colorectal cancer risk · Folate · Methionine

Introduction

According to the estimates of the National Cancer Institute of the Ministry of Health of Brazil, it was expected 28,000 new cases of colorectal cancer in the year of 2010 in Brazil (13,310 new cases in men and 14,800 in women). These numbers correspond to an estimated risk of 14 new cases per 100,000 men and 15 per 100,000 women. The southern and southeastern regions are those with the highest yearly incidence of colorectal cancer (19 new cases per 100,000 men and 21 per 100,000 women) and with the highest

J. L. M. Guimarães (✉)

Service of Oncohematology, Department of Clinical Oncology from Hospital Santa Rita (Complexo Hospitalar Santa Casa), Grupo Hospitalar Conceição, Rua Capitão Pedro Werlang, 614, Partenon, Porto Alegre, Rio Grande do Sul Cep.: 91530110, Brazil
e-mail: guimajl@hotmail.com

M. d. Ayrizono · C. S. R. Coy

Department of Surgery, Faculty of the Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

C. S. P. Lima

Clinical Oncology Service, Department of Internal Medicine, Faculty of the Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

mortality rates associated with colorectal cancer (6.28/100,000 women and 7.04/100,000 men) [1].

Folate and methionine metabolism plays essential roles in DNA synthesis, repair, and methylation, and it is widely accepted that abnormalities in these processes are implicated in carcinogenesis of colorectal cancer [2, 3]. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is involved in DNA methylation and manipulates the levels of folate, one of the methyl group donors [4]. The MTHFR occupies a pivotal position, catalyzing the irreversible conversion of 5,10-methylene-THF to 5-methyl-THF. The 5-methyl-THF is the methyl group donor for the remethylation of homocysteine to methionine, which is catalyzed by the methionine synthase (MTR) in a reaction dependent on vitamin B12 as an intermediate methyl carrier [5]. The MTR may become inactive due to oxidation of vitamin B12 cofactor, and the restoration of MTR activity is dependent on reductive remethylation of vitamin B12 by the methionine synthase reductase (MTRR) [6]. The MTHFR substrate, 5,10-methylene-THF, is used by the thymidylate synthase (TS) in the methylation of dUMP to dTMP, which is the source of thymidine required for DNA synthesis and repair [7] (Fig. 1).

Polymorphisms in genes involved in these metabolic pathways have been seen with a variable prevalence in

different ethnic populations and geographic areas [3]. Distinct activities of the enzymes encoded by the wild and variant alleles of these genes, with possible abnormalities in DNA synthesis, repair, or methylation and altered risk for malignancies, have also been reported [3, 8, 9]. The previous epidemiological studies, conducted predominantly in Caucasian and Asian populations, are conflicting regarding the roles of the variants *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, and the *TS* polymorphisms in the risk for sporadic colorectal adenocarcinoma (SCA). Race, lifestyle, and diet may have introduced variables in the studies of genetic susceptibility to disease.

The Brazilian population is highly heterogeneous, consisting of indigenous Amerindians and immigrants from Europe, Africa, and Asia [10]. In addition, colorectal cancer is the second most common cause of death in southeastern Brazil [11]. A diet poor in vegetables and fruits has been reported in that region, thus suggesting a folate deficiency in the local population [12]. Therefore, it seemed important the genotyping of SCA patients and controls from such mixed population living in an area with decreased folate intake. Moreover, it was important to find out whether the *MTHFR* C677T and A1298C, the *MTR* A2756G, the *MTRR* A66G, and the *TS* 2R/3R polymorphisms actually altered the risk for SCA in such population.

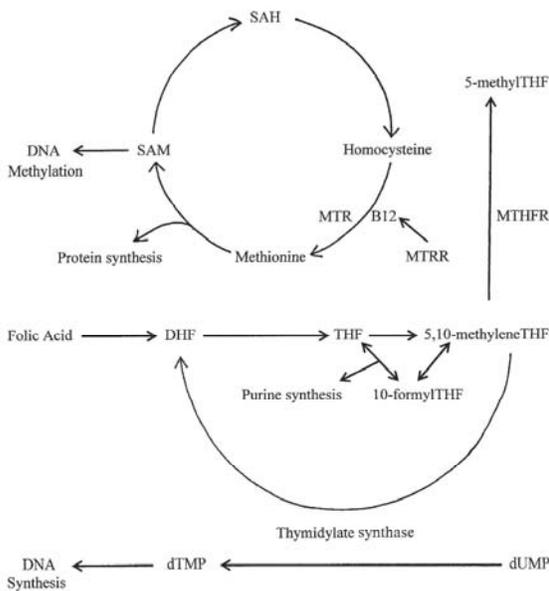


Fig. 1 Folate, methionine, and homocysteine metabolism. *MTHFR* methylenetetrahydrofolate reductase, *THF* tetrahydrofolic acid, *MTR* methionine synthase, *MTRR* methionine synthase reductase, *DHF* dihydrotetrafolate acid, *SAM* S-adenosylmethionine, *SAH* S-adenosyl-homocysteine, *B12* vitamin B12

Material and methods

Patients and controls

The case group was comprised of 113 consecutive SCA patients (60 men, 53 women; mean age \pm SD, 59 \pm 13 years; 101 Caucasians, 12 African-Brazilians) seen at the Clinical Oncology Service of the University Hospital (Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil) from March 1992 to July 2003. Patients with ulcerative colitis and Chron's disease, adenomatous polyposis, or with a family history of colorectal cancer were excluded from the study. The tumor diagnosis and the differentiation grade of the tumor were established by histological evaluation of tumor fragments using criteria according to World Health Organization [13].

The tumor location was obtained from the surgical records, and the tumor–node–metastasis was also applied in study. The control group consisted of 188 blood donors (121 males, 67 females; mean age \pm SD, 54 \pm 3 years; 161 Caucasians, 27 African-Brazilians) from the same University Hospital during the same period of the study, in order to provide a representative group of the general population in this region. The study was approved by the local ethical review board, in accordance with the tenets of the Helsinki Declaration.

Polymorphisms selection and analysis

Genomic DNA from the blood of patients and controls was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and by restriction fragment length polymorphism assays for identification of variants *MTHFR* A1298C (rs1801131), the *MTHFR* C677T (rs1801133), the *MTR* A2756G (rs1805087), and the *MTRR* A66G (rs1801394) as previously described [14–17]. The polymorphism involving the tandem-repeat sequences in the 5-terminal of the regulatory region of the *TS* gene was detected by the PCR variable number of tandem repeats (PCR-VNTR; rs34743033), in accordance with a previously described technique [7].

Statistical analysis

Hardy–Weinberg equilibrium was tested with the χ^2 statistics for the goodness of fit. Univariate and multivariate analyses were used to obtain odds ratio (OR), age, gender, and ethnic origin-adjusted ORs and 95% confidence interval (CI) for the associations with SCA. The statistical significance of differences in age, gender, ethnic origin, differentiation grade, location, and tumor stage in patients stratified by the *MTHFR*, the *MTR*, the *MTRR*, and the *TS* genotypes was calculated by the chi-square or Fischer exact test. Factors with $p \leq 0.05$ were considered significant. All analyses were performed using the statistical package IBM SPSS/PASW version 18.0 (Chicago, IL, USA).

Results

Both the patients' and controls' samples were in Hardy–Weinberg equilibrium for the analyzed polymorphisms (Table 1). Similar frequencies of the *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G, and *TS* 2R/3R genotypes were found in patients and controls. Individuals with the above distinct genetic variants were equally at higher risk for SCA than those who carry wild-type genotypes. In contrast, the *MTRR* 66GG genotype was more common in patients than in the controls. Carriers of the variant genotype had a 1.99-fold increased risk for SCA than

carriers of the wild and the heterozygous genotypes. Additionally, the frequencies of the combined *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTHFR* 677CT+TT, *MTHFR* 677CT+TT plus *MTR* 2756AG+GG, *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTHFR* 677CT+TT plus *MTR* 2756AG+GG, and *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTHFR* 677CT+TT plus *MTRR* 66AG+GG were also higher in patients than in the controls. Carriers of the heterozygous or variant genotypes had a 3.26-, 2.22-, 10.92-, and 14.88-fold increased risk for developing SCA than those with the wild genotypes (Table 2).

When SCA patients alone were considered, excesses of the *MTHFR* 677CT+TT and the *MTR* 2756AG+GG genotypes were seen in patients younger than 50 years, when compared with older patients. The heterozygous plus variant genotypes were also more frequent in younger patients than in the controls (76.9% versus 51.1%, $p=0.02$; 46.2% versus 23.4%, $p=0.02$, respectively). Individuals with the above variants had, respectively, a 2.12-fold (95% CI 1.04–4.34) and a 1.42-fold (95% CI 0.99–2.05) increased risk for developing SCA before 50 years of age than those with the wild genotype. The frequency of the *MTRR* 66GG genotype in African-Brazilians was higher than that found in Caucasians. The difference was even more prominent when the frequency of the *MTRR* 66GG genotype in African-Brazilians patients was compared with that found in the controls (58.3% versus 17.5%, $p=0.003$). African-Brazilians with this variant genotype were at an increased risk for SCA 1.98 (95% CI 1.01–3.88)-fold higher than those with the remaining *MTRR* variants (Table 3). The *MTR* 2756 AG+GG combined genotype was more common in patients with undifferentiated tumors than in patients with grades I and II tumors and the controls (63.6% versus 23.4%, $p=0.007$). Carriers of the heterozygous or variant genotypes had a 2.11-fold (95% CI 0.96–4.62) increased risk of presenting undifferentiated tumors than patients with the wild genotype. An excess of the *MTHFR* 677CT+TT was seen in patients with advanced tumors compared with those with grades I and II tumors and compared with controls (69.8% versus 51.1%, $p=0.02$). Carriers of the variant allele were at a risk 1.62-fold (95% CI 1.05–2.50) higher for advanced tumors at diagnosis than

Table 1 Analyses of the Hardy–Weinberg equilibrium at the *MTHFR* A1298C; and C677T; the *MTR* A2756G; the *MTRR* A66 G; and the *TS* 2R/3R; in samples of 113 colorectal cancer patients and 188 controls

Gene and locus	Patients		Controls	
	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>
<i>MTHFR</i> A1298C	0.79	>0.20	5.11	0.05< <i>p</i> >0.10
<i>MTHFR</i> C677T	0.14	>0.20	0.001	>0.20
<i>MTR</i> A2756G	1.92	>0.20	4.67	0.05< <i>p</i> >0.10
<i>MTRR</i> A66G	0.08	>0.20	1.89	>0.20
<i>TS</i> 2R/3R	0.35	>0.20	2.93	>0.20

Table 2 Frequencies of the *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, and *TYMS* genotypes in 113 colorectal cancer patients and 188 controls

Genotypes	Patients, n (%)	Controls, n (%)	p value	OR*	95% CI
<i>MTHFR</i> A1298C					
AA	67 (59.3)	127 (67.5)		1.00	Reference
AC	38 (33.6)	49 (26.1)	0.09	1.61	0.93–2.80
CC	8 (7.1)	12 (6.4)	0.70	1.22	0.45–3.27
AC+CC	46 (40.7)	61 (32.5)	0.11	1.52	0.91–2.56
<i>MTHFR</i> C677T					
CC	48 (42.5)	92 (48.9)		1.00	Reference
CT	50 (44.2)	79 (42.0)	0.26	1.35	0.80–2.28
TT	15 (13.3)	17 (9.1)	0.31	1.56	0.66–3.68
CT+TT	65 (57.5)	96 (51.1)	0.20	1.39	0.84–2.29
<i>MTR</i> A2756G					
AA	82 (72.6)	144 (76.6)		1.00	Reference
AG	26 (23.0)	37 (19.7)	0.35	1.34	0.73–2.47
GG	5 (4.4)	7 (3.7)	0.27	2.03	0.58–7.02
AG+GG	31 (27.4)	44 (23.4)	0.22	1.43	0.81–2.53
<i>MTRR</i> A66G					
AA	26 (23.0)	53 (28.2)		1.00	Reference
AG	55 (48.7)	102 (54.3)	0.99	0.99	0.54–1.83
GG	32 (28.3)	33 (17.5)	0.07	1.98	0.96–4.10
AG+GG	32 (28.3)	33 (17.5)	0.03	1.99	1.09–3.63
<i>TS</i> 2R/3R					
2R/2R	28 (24.8)	38 (20.2)		1.00	Reference
2R/3R	53 (46.9)	80 (42.6)	0.96	0.98	0.52–1.87
3R/3R	32 (28.3)	70 (37.2)	0.42	0.75	0.38–1.49
3R/2R+3R/3R	85 (75.2)	150 (79.8)	0.55	0.86	0.52–1.41
<i>MTHFR</i> A1298C+C677T					
AA+CC	19 (52.8)	47 (74.6)		1.00	Reference
AC+CC+CT+TT	17 (47.2)	16 (25.4)	0.01	3.26	1.27–8.40
<i>MTHFR</i> C677T+ <i>MTR</i> A2756G					
CC+AA	37 (64.9)	68 (77.3)		1.00	Reference
CT+TT+AG+GG	20 (55.1)	20 (22.7)	0.04	2.22	1.00–4.88
<i>MTHFR</i> A1298C+C677T+ <i>MTR</i> A2756G					
AA+CC+AA	14 (70.0)	39 (92.9)		1.00	Reference
AC+CC+CT+TT+AG+GG	6 (30.0)	3 (7.1)	0.009	10.92	1.80–66.27
<i>MTHFR</i> A1298C+C677T+ <i>MTRR</i> A66G					
AA+CC+AA	1 (6.7)	14 (50.0)		1.00	Reference
AC+CC+CT+TT+AG+GG	14 (93.3)	14 (50.0)	0.02	14.88	1.67–132.6

OR* adjusted odds ratio for age, gender, and ethnic group, 95% CI 95% confidence interval

carriers of the homozygous wild genotype. The frequency of the *MTHFR* 1298AC+CC in patients with rectal tumors was higher than in patients with colon tumors and that found in controls as well (52.5% versus 32.5%, $p=0.008$). An excess of the *MTHFR* 677CT+TT was seen in patients with colon tumors compared with those with rectal tumors and compared with controls (68.5% versus 51.1%, $p=0.03$). Individuals with the *MTHFR* 1298AC+CC genotype had a 1.42 (95% CI 1.07–1.90)-fold increased risk to present rectal cancer, and those with the *MTHFR* 677CT+TT genotype had a 1.55 (95% CI 1.02–2.4)-fold higher risk to develop colon cancer than the carriers of the remaining

genotypes. In addition, the frequency of the combined *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTRR* 66AG+GG genotype was higher in patients with rectal tumor whereas the combined *MTHFR* 677CT+TT plus *TS* 2R/3R+3R/3R was more common in patients with colon tumor. The above respective frequencies of the combined genotypes were higher in those patients than in the controls (85.2% versus 54.5%, $p=0.006$; 96.0% versus 78.4%, $p=0.004$). Carriers of the heterozygous as well as of the variant-combined genotypes of *MTHFR* A1298C plus *MTRR* A66G and *MTHFR* C677T plus *TS* 2R/3R were at a 3.07 (95% CI 1.21–7.80)-fold increased risk of presenting rectal cancer

Table 3 The frequencies of the genotypes in 113 colorectal patients stratified by age and ethnic origin

Genotypes	Age in years			Ethnic origin		
	<50	≥50	<i>p</i>	Caucasian	African	<i>p</i>
<i>MTHFR</i> A1298C						
AA	14 (53.8)	53 (60.9)	1.00	62 (61.4)	5 (41.7)	0.22
AC	11 (42.3)	27 (31.0)	0.30	33 (32.7)	5 (41.7)	0.53
CC	1 (3.9)	7 (8.1)	0.75	6 (5.9)	2 (16.7)	0.20
AC+CC	12 (46.2)	34 (39.1)	0.42	39 (38.6)	7 (58.3)	0.22
<i>MTHFR</i> C677T						
CC	6 (23.1)	42 (48.3)	1.00	42 (41.6)	6 (50.0)	0.80
CT	16 (61.5)	34 (39.1)	0.02	44 (43.6)	6 (50.0)	0.91
TT	4 (15.4)	11 (12.6)	0.30	15 (14.9)	0 (0.0)	0.36
CT+TT	20 (76.9)	45 (51.7)	0.03	59 (58.4)	6 (50.0)	0.80
<i>MTR</i> A2756G						
AA	14 (53.9)	68 (78.2)	1.00	73 (72.3)	9 (75)	1.00
AG	9 (34.6)	17 (19.5)	0.07	24 (23.8)	2 (16.7)	0.73
GG	3 (11.5)	2 (2.3)	0.03	4 (4.0)	1 (8.3)	0.44
AG+GG	12 (46.2)	19 (21.8)	0.02	28 (27.7)	3 (25)	1.00
<i>MTRR</i> A66G						
AA	7 (26.9)	19 (21.8)	1.00	24 (23.8)	2 (16.7)	0.73
AG	11 (42.3)	44 (50.6)	0.46	52 (51.5)	3 (25.0)	0.15
GG	8 (30.8)	24 (27.6)	0.95	25 (24.8)	7 (58.3)	0.04
AG+GG	19 (73.1)	68 (78.2)	0.63	77 (76.2)	10 (83.3)	0.73
<i>TS</i> 2R/3R						
2R/2R	7 (26.9)	21 (24.1)	1.00	26 (25.7)	2 (16.7)	0.73
2R/3R	13 (50.0)	40 (46.0)	0.91	45 (44.6)	8 (66.7)	0.25
3R/3R	6 (23.1)	26 (29.9)	0.54	30 (29.7)	2 (16.7)	0.50
2R/3R+3R/3R	19 (73.1)	66 (75.9)	0.84	56 (55.4)	4 (33.3)	0.25
<i>MTHFR</i> ^a + <i>MTRR</i>						
AA+AA	5 (31.3)	9 (28.1)	1.00	14 (32.6)	1 (16.7)	1.00
AC+CC+AG+GG	11 (68.8)	23 (71.9)	1.00	29 (67.4)	5 (83.3)	0.30
<i>MTHFR</i> ^b + <i>TS</i>						
CC+2R/2R	2 (22.2)	14 (30.4)	1.00	8 (16.3)	1 (16.7)	1.00
CT+TT+2R3R+3R3R	7 (77.8)	32 (69.6)	1.00	41 (83.7)	5 (83.3)	1.00

p values are presented herein after adjustment by the multivariate analysis

^a*MTHFR* A1298C

^b*MTHFR* C677T

and a 5.39 (95% CI 0.76–38.14)-fold increased risk of presenting colon cancer, respectively, than carriers of the wild genotypes (Table 4).

Discussion

In this study, we investigated whether the genotypes of the *MTHFR* A1298C, the *MTHFR* C677T, the *MTR* A2756G, the *MTRR* A66G, and the *TS* 2R/3R genotypes, involved in folate and methionine metabolism, do alter the risk for SCA as well as the tumor characteristics in the Brazilian population of the southeastern region. The group of patients was similar to the group of controls concerning their ethnic origin. Differences in gender distribution (53.1% of men among patients and 64.4% of men among controls)

and in the mean age (59 years in patients and 54 years in controls) was found in our sample. However, we do not believe that it has consistently altered the risks for SCA associated with genotypes found in study, since all ORs were adjusted for demographical differences (age, gender, and ethnical origin) of individuals by the multivariate analysis.

We initially found similar frequencies of the *MTHFR* A1298C, the *MTHFR* C677T, the *MTR* A2756G, the *MTRR* A66G, and the *TS* 2R/3R genotypes in our patients and controls, suggesting that polymorphisms alone did not alter the risk for SCA in our region. Similar results were previously seen in evaluations of the variants *MTHFR* A1298C [18], *MTHFR* C677T [19], *MTR* A2756G [20], and the *TS* 2R/3R [21] polymorphisms in SCA risk. In contrast, genotypes *MTHFR* 1298CC [22], *MTHFR* 677TT

Table 4 The frequencies of the genotypes in 113 colorectal patients stratified by tumor grade, stage and tumor location

Genotypes	Tumor grade			Stage			Tumor location		
	I+II	III	<i>p</i>	I+II	III+IV	<i>p</i>	Colon	Rectum	<i>p</i>
MTHFR A1298C									
AA	60 (58.8)	7 (63.6)	1.00	30 (50.0)	37 (69.8)	0.05	39 (72.2)	28 (47.5)	0.01
AC	34 (33.5)	4 (36.4)	1.00	23 (38.3)	15 (28.3)	0.35	12 (22.2)	26 (44.1)	0.02
CC	8 (7.8)	0 (0.0)	1.00	7 (11.7)	1 (1.9)	0.07	3 (5.6)	5 (8.5)	0.72
AC+CC	42 (41.6)	4 (36.4)	1.00	30 (50.0)	16 (30.2)	0.05	15 (27.8)	31 (52.5)	0.01
MTHFR C677T									
CC	40 (39.2)	8 (72.7)	0.05	32 (53.3)	16 (30.2)	0.02	17 (31.5)	31 (52.5)	0.03
CT	47 (46.1)	3 (27.3)	0.34	23 (38.3)	27 (50.9)	0.25	28 (51.9)	22 (37.3)	0.17
TT	15 (14.7)	0 (0.0)	0.35	5 (8.3)	10 (18.9)	0.17	9 (16.6)	6 (10.2)	0.46
CT+TT	62 (60.8)	3 (27.3)	0.05	28 (46.7)	37 (69.8)	0.02	37 (68.5)	28 (47.5)	0.03
MTR A2756G									
AA	78 (76.5)	4 (36.4)	0.01	45 (75.0)	37 (69.8)	0.69	40 (74.1)	42 (71.2)	0.90
AG	21 (20.6)	5 (45.5)	0.12	13 (21.7)	13 (24.5)	0.89	12 (22.2)	14 (23.7)	1.00
GG	3 (2.9)	2 (18.2)	0.07	2 (3.3)	3 (5.7)	0.06	2 (3.7)	3 (5.1)	1.00
AG+GG	24 (23.5)	7 (63.6)	0.009	15 (25)	16 (30.2)	0.69	14 (25.9)	17 (28.8)	0.90
MTRR A66G									
AA	24 (23.5)	2 (18.2)	1.00	14 (23.3)	12 (22.6)	1.00	14 (25.9)	12 (20.3)	0.63
AG	50 (49.0)	5 (45.5)	1.00	29 (48.3)	26 (49.1)	1.00	26 (48.1)	29 (49.2)	1.00
GG	28 (27.5)	4 (36.4)	0.50	17 (28.3)	15 (28.3)	1.00	14 (25.9)	18 (30.5)	0.74
AG+GG	78 (76.5)	9 (81.8)	1.00	46 (76.7)	41 (77.4)	1.00	40 (74.1)	47 (79.7)	0.63
TS 2R/3R									
2R/2R	27 (26.5)	1 (9.1)	0.29	11 (18.3)	17 (32.1)	0.14	14 (25.9)	14 (23.7)	0.96
2R/3R	48 (47.1)	5 (45.5)	1.00	29 (48.3)	24 (45.3)	0.89	23 (42.6)	30 (50.8)	0.49
3R/3R	27 (26.5)	5 (45.5)	0.29	20 (33.3)	12 (22.6)	0.29	17 (31.5)	15 (25.4)	0.48
2R/3R+3R/3R	54 (52.9)	6 (54.5)	1.00	31 (51.7)	29 (54.7)	0.89	31 (57.4)	29 (49.2)	0.49
MTHFR^a+MTRR									
AA+AA	14 (30.4)	1 (50.0)	1.00	6 (21.4)	8 (40.0)	1.00	10 (47.6)	4 (14.8)	1.00
AC+CC+AG+GG	32 (69.6)	2 (100.0)	1.00	22 (78.6)	12 (60.0)	0.28	11 (52.4)	23 (85.2)	0.03
MTHFR^b+TS									
CC+2R/2R	8 (15.7)	1 (25.0)	1.00	5 (18.5)	4 (14.3)	1.00	1 (4.0)	8 (26.7)	
CT+TT+2R3R+3R3R	43 (84.3)	3 (75.0)	0.52	22 (81.5)	24 (85.7)	0.73	24 (96.0)	22 (73.3)	0.03

p values are presented herein after adjustment by the multivariate analysis

^aMTHFR A1298C

^bMTHFR C677T

[23], *MTR* 2756GG [24], and *TS* 2R/3R [25] have, in other studies, shown to protect subjects from colorectal cancer. Increased risk of developing the disease, in association with genotypes *MTHFR* 1298CC [26] and *MTHFR* 677TT [27], was also previously reported. The divergent results regarding effects of genetic polymorphisms upon SCA risk, obtained by our group and by others, could be attributed to the differences in racial origin of the population, as described in detail by reviewing *human genome epidemiology*, lifestyle, and pattern of diet in distinct countries [3, 28, 29]. In fact, Brazilian population is highly heterogeneous, consisting of indigenous Amerindians and immigrants from Europe,

Africa, and Asia. Furthermore, folate deficiency characterizes our dietary pattern [10, 12] whereas ethnical homogeneous populations and adequate ingestion of folate seem to characterize countries of the north hemisphere [28].

Additionally, excesses of the *MTRR* 66GG genotype and the combined variants such as *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTHFR* 677CT+TT, *MTHFR* 677CT+TT plus *MTR* 2756AG+GG, *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTHFR* 677CT+TT plus *MTR* 2756AG+GG, and *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTHFR* 677CT+TT plus *MTRR* 66AG+GG were observed in our SCA patients, when compared with controls in this study. The *MTRR* 66GG

was associated with increased risk for colorectal cancer in our study and in some others [30–32]. Moreover, no association of genotype *MTRR* 66GG with colorectal cancer has previously been reported by others [33, 34].

The following variant combinations: *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTHFR* 677CT+TT, *MTHFR* 677CT+TT plus *MTR* 2756AG+GG, *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTHFR* 677CT+TT plus *MTR* 2756AG+GG, and *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTHFR* 677CT+TT plus *MTRR* 66AG+GG were also associated with increased risk for SCA in our region, suggesting a synergic effect of these genes upon disease causation. The combined variants *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTHFR* 677CT+TT genotype was associated with increased risk for SCA in one study [35] but not in another [36]. No influence of the combined *MTHFR* 677CT+TT plus *MTR* 2756 AG+GG was also seen upon the risk of disease development [37]. To the best of our knowledge, there are no previous risk studies of SCA focusing on the roles of *MTHFR* A1298C or *MTHFR* C677T combined with *MTR* A2756G or *MTRR* A66G polymorphisms. Therefore, this pilot study seems to be the first one evaluating such associations as a risk factor for developing SCA. Again, differences in ethnic origin, lifestyle, and dietary habits in distinct countries may constitute plausible explanations for the differential results found among those studies.

Furthermore, we found associations between genotypes *MTHFR* 677CT+TT and *MTR* 2756AG+GG genotypes with an early disease onset (<50 years of age). Furthermore, we also found that the genotype *MTRR* 66GG was associated with an increased risk of SCA among African-Brazilians, the *MTR* 2756 AG+GG genotype with undifferentiated tumors, and the *MTHFR* 677CT+TT with advanced tumors at diagnosis. In addition, the *MTHFR* 1298AC+CC alone or in combination with *MTRR* 66AG+GG was associated with rectal cancer whereas *MTHFR* 677CT+TT genotype alone or in combination with *TS* 2R/3R+3R/3R was associated with colon tumor. These data suggest that these polymorphic genotypes may have altered clinical characteristics in patients and biological features in the SCA tumor samples.

Similar associations of the *MTHFR* 677CT+TT genotypes with age of disease onset [19], as well as with advanced tumor stage at diagnosis [38], have been previously reported. The same is true for the combined variants *MTHFR* 1298AC+CC [39] and *MTHFR* 677CT+TT [40] and their association with colonic tumors. In contrast, the *MTHFR* 1298AC+CC [36] and the *MTHFR* 677CT+TT genotypes were associated with decreased risk of proximal colon tumors [41, 42]. In the Fukuoka Colorectal Cancer Study, the *MTHFR* 677TT genotype was protective against rectal cancer, and *MTHFR* 1298CC was associated with increased risk of rectal cancer [39].

Nevertheless, there are no consistent additional studies focusing on the above-mentioned polymorphisms, whether alone or in combination, and its association with clinical and biological characteristics of SCA tumors.

Finally, we observed that the frequencies in subgroups of SCA patients of the variants *MTHFR* 1298AC+CC, *MTHFR* 677CT+TT, *MTR* 2756AG+GG, *MTRR* 66GG, *MTHFR* 1298AC+CC plus *MTR* 2756AG+GG, as well as *MTHFR* 677CT+TT plus *TS* 2R/3R+3R/3R were higher than those found in the controls, thus suggesting that such polymorphisms do alter, selectively, the risk for disease subtypes.

We have found in this study that all the tested polymorphisms, whether in isolation or in combination, were associated with increased SCA risk. In fact, the *MTHFR*, *MTR*, and *MTRR* enzymes are essential for DNA methylation of the colon tissue [3, 43, 44]. The variant alleles *MTHFR* 1298C, *MTHFR* 677T, *MTR* 2756G, and *MTRR* 66G are thought to affect the enzymatic activity, with a consequent decreased production of methyl groups and augmented risk for colorectal cancer [3]. The *TS* enzyme is required for DNA synthesis and repair [7]. The activity of the *TS* enzyme, encoded by the variant allele *TS* 3R, seems to be similar [17] or higher [45] than that encoded by the wild allele *TS* 2R. In fact, protection against acute lymphoblastic leukemia in carriers of the variant allele was previously reported [16]. However, folate deficiency, as seen in our population and others [12, 46], may affect the activity of enzymes involved in DNA methylation, DNA synthesis, and repair pathways. Two mechanisms have been proposed to explain how folate deficiencies may induce malignancy: (1) by causing DNA hypomethylation and proto-oncogene activation or (2) by inducing uracil misincorporation during DNA synthesis, which leads to catastrophic changes in DNA repair, DNA strand breakage, and chromosome damage [8, 43]. Therefore, we hypothesized that the variant alleles of the *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, and *TS* genes, which are involved in production of folate-dependent enzymes, may be associated with increased risk of SCA in the target population of our study. SCA would be induced by the activation of any potential proto-oncogene as a result of DNA hypomethylation and abnormalities in DNA synthesis and repair.

In our opinion, one of the strengths of this pilot study is the findings of preliminary associations between some specific variants of genes involved in folate and methionine metabolism with the increased risk of SCA in the southeastern Brazilian population. These findings may lead to the identification of individuals who should receive genetic counseling and additional guidance as to adopt a healthier lifestyle and diet aiming cancer prevention. It also suggests that perhaps such individuals should be periodically evaluated by a clinician in order to allow an early

SCA diagnosis. Another strength of this study was the association of colon and rectal cancer with distinct genetic polymorphisms, suggesting that they may have distinct causative factors. The limitations of this pilot study are the relatively small size of our sample and the lack of record of folate and vitamin B12 serum levels, which should be enrolled in pertinent analyses.

Conclusions

Our data provided preliminary evidence that the polymorphic variants *MTHFR* A1298C, the *MTHFR* C677T, the *MTR* A2756G, the *MTRR* A66G, and the *TS* 2R/3R have consistent roles in SCA susceptibility in the south and southeastern Brazilian population. However, a larger prospective study is required to further evaluate the role of gene–gene and gene–environment interactions (e.g., folate intake) in the incidence of SCA in our country.

Acknowledgments We thank Dr. Daniela Benzano for the statistical support and the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo for the research grants.

Conflicts of interest None

References

- Instituto Nacional Do Câncer (INCA). Estimativa da Incidência e mortalidade por câncer no Brasil. 2010. <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010>. Access in 18 Jan 2010.
- Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J Nutr Biochem*. 1999;10(2):66–88.
- Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2004;159(5):423–43.
- Kim YI, Pogribny IP, Salomon RN, Choi SW, Smith DE, James SJ, et al. Exon specific DNA hypomethylation of the p53 gene of rat colon induced by dimethylhydrazine: modulation by dietary folate. *Am J Pathol*. 1996;4(149):1129–37.
- Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet*. 1996;5(12):1867–74.
- Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:3059–64.
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct*. 1995;20:191–7.
- Zing JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1997;18:869–82.
- Narayanan S, McConnell J, Little J, Sharp L, Piyathilake CJ, Powers H, et al. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes *in vivo*. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2004;13(9):1436–43.
- Alves-Silva J, Da Silva-Santos M, Guimaraes PE, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*. 2000;67:444–61.
- Duncan BB, Schmidt MI, Polansky CA. High mortality rates among 284 Brazilian adult populations: an international comparison. *Rev Assoc Méd Bras*. 1992;38:138–44.
- Mattos LL, Martins IS. Dietary fiber consumption in an adult population. *Rev Saúde Pública*. 2000;34:50–5.
- Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. WHO classification of tumours, vol 2. Lyon: IARC; 2002.
- Frost P, Blom HJ, Milos P, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995;10:111–3.
- Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*. 1998;62:1044–51.
- Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;10:3786–91.
- Brown KS, Kluijtmans LAJ, Young IS, McNulty H, Mitchell LE, Yarnell JW, et al. The thymidylate synthase tandem repeat polymorphism is not associated with homocysteine concentrations in healthy young subjects. *Hum Genet*. 2004;114:182–5.
- Fernández-Peralta AM, Daimiel L, Nejdá N, Iglesias D, Arana VM, González-Aguilera JJ. Association of polymorphisms *MTHFR* C677T and A1298C with risk of colorectal cancer, genetic and epigenetic characteristic of tumors, and response to chemotherapy. *Int J Colorectal Dis*. 2010;25(2):141–51.
- Lima CSP, Nascimento H, Bonadia LC, Teori MT, Coy CSR, Góes JRN, et al. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene (*MTHFR*) and the age of onset of sporadic colorectal adenocarcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22:757–63.
- Taioli E, Garza MA, Ahn YO, Bishop DT, Bost J, Budai B, et al. Meta- and pooled analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphism and colorectal cancer: a HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol*. 2009;170:1207–21.
- Marsh S, McKay JA, Cassidy J, McLeod HL. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2001;19:383–6.
- Huang Y, Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y. Different roles of *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet*. 2007;52:73–85.
- Curtin K, Bigler J, Slattery ML, Caan B, Potter JD, Ulrich CM. *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms: diet, estrogen, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2004;13:285–92.
- Yu K, Zhang J, Zhang J, Dou C, Gu S, Xie Y, et al. Methionine synthase A2756G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet*. 2010;18:370–8.
- Adleff V, Hite E, Köves I, et al. Heterozygote deficiency in thymidylate synthase enhancer region polymorphism genotype distribution in Hungarian colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2004;108:852–6.
- Curtin K, Slattery ML, Ulrich CM, Bigler J, Levin TR, Wolff RK, et al. Genetic polymorphisms in one-carbon metabolism: associations with CpG island methylator phenotype (CIMP) in colon

- cancer and the modifying effects of diet. *Carcinogenesis*. 2007;28:1672–9.
27. Shannon B, Gnanasampanthan S, Beilby J, Iacopetta B. A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut*. 2002;50:520–4.
 28. Sharp L, Little JT, Brockton NT, Cotton SC, Masson LF, Haites NE, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, intakes of folate and related B vitamins and colorectal cancer: a case–control study in a population with relatively low folate intake. *Br J Nutr*. 2008;99:379–89.
 29. Acevedo E, Bressani R. Ingestión de fibra dietética en los países del istmo centroamericano: implicaciones nutricionales. *Arch Latinoam Nutr*. 1989;3:392–404.
 30. Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Seifried A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal risk (United States). *Cancer Causes Control*. 2002;13:239–48.
 31. Matsuo K, Hamajima N, Hirai T, Kato T, Inoue M, Takezaki T, et al. Methionine synthase reductase gene A66G polymorphism is associated with risk of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2002;3:353–9.
 32. Houshik A, Kraft P, Fuchs CS, Hankinson SE, Willett WC, Giovannucci EL, et al. Nonsynonymous polymorphisms in genes in the one-carbon metabolism pathway and associations with colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2006;15:2408–17.
 33. Burcoae T, Toma M, Stavarachi M, Cimponeriu D, Apostol P, Popa E, et al. *MTRR* polymorphism and the risk for colorectal and breast cancer in Romanian patients—a preliminary study. *Chirurgia*. 2010;105(3):379–82.
 34. Wettergren Y, Odin E, Carlsson G, Gustavsson B. MTHFR, MTR, and MTRR polymorphisms in relation to p16INK4A hypermethylation in mucosa of patients with colorectal cancer. *Mol Med*. 2010;16(9–10):425–32.
 35. El Awady MK, Karim AM, Hanna LS, El Husseiny LA, El Sahar M, Menem HAA, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and the risk of colorectal carcinoma in a sample of Egyptian individuals. *Cancer Biomark*. 2009;5(6):233–40.
 36. Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase, codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2002;11:1611–20.
 37. Ulvik A, Vollset S, Hansen S, Gislefoss R, Jellum E, Ueland PM. Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and methionine synthase 2756A→G polymorphisms: a study of 2,168 case–control pairs from the JANUS cohort. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2004;13:2175–80.
 38. Haghghi MM, Mohebbi SR, Khatami F, Ghiassi S, Derakhshan F, Atarian H, et al. Reverse association between *MTHFR* polymorphism (C677T) with sporadic colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol From Bed to Bench*. 2008;1(2):57–63.
 39. Yin G, Kono S, Toyomura K, Hagiwara T, Nagano J, Mizoue T, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and colorectal cancer: The Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Sci*. 2004;95(11):908–13.
 40. Cao HX, Gao CM, Takezaki T, Wu JZ, Ding JH, Liu YT, et al. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and susceptibility to colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008;9:203–8.
 41. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 1999;8:513–8.
 42. Toffoli G, Gafà R, Russo A. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and risk of proximal colon cancer in North Italy. *Clin Cancer Res*. 2003;9(2):743–8.
 43. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implication for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:3290–5.
 44. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:8681–6.
 45. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res*. 2001;7:4096–101.
 46. Bingham S. Definitions and intakes of dietary fiber. *Am J Clin Nutr*. 1987;45:1226–31.