

**LILLIAN BARBOSA DE QUEIROZ ROSSANESE**

**“INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES  
CYP1A1, CYP1B1 E CYP2C9 NA SUSCETIBILIDADE  
AO ADENOCARCINOMA COLORRETAL  
ESPORÁDICO”.**

**CAMPINAS  
2007**

**LILLIAN BARBOSA DE QUEIROZ ROSSANESE**

***“INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES  
CYP1A1, CYP1B1 E CYP2C9 NA SUSCETIBILIDADE  
AO ADENOCARCINOMA COLORRETAL  
ESPORÁDICO”.***

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências médicas, área de Farmacologia.

**ORIENTADORA: PROFA. DR. CARMEN SÍLVIA BERTUZZO**

**CAMPINAS**  
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA  
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R734i      Rossanese, Lillian Barbosa de Queiroz  
Influência dos polimorfismos nos genes CYP1A1, CYP1B1 e  
CYP2C9 na suscetibilidade ao adenocarcinoma colorretal  
esporádico. / Lillian Barbosa de Queiroz Rossanese. Campinas,  
SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sistema enzimático do citocromo. 2. Tabaco. I.  
Bertuzzo, Carmen Silvia. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Influence polymorfisms in the genes CYP1A1, CYP1B1 e  
CYP2C9 susceptibility to colorectal cancer**

**Keywords:**

- Cytochrome enzyme system
- Tobacco

**Titulação: Mestrado em Farmacologia**

**Banca examinadora: Profª.Drª. Carmen Silvia Bertuzzo**

**Profº.Drº. Walter Pinto Junior**

**Profª Drª Ana Paula Zampieri Silva de Pietri**

**Data da defesa: 29 - 08 - 2007**



---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

**Orientador:**

**Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo**

---

**Membros:**

**Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo**

**Prof. Dr. Walter Pinto Júnior**

**Profa. Dra. Ana Paula Zampieiri Silva de Pietri**

*Carmen Sílvia Bertuzzo*  
*Walter Pinto Júnior*  
*Ana Paula Zampieiri Silva de Pietri*

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas.

**Data: 29/08/2007**

---

Aos meus pais, Nelson e Ivanilde,  
E cujo trabalho e anos de dedicação  
Ininterrupta aos filhos, permitiram-me  
chegar a este degrau neste dia.



## **A**GRADEDECIMENTOS

À Deus, pela graça de cada novo dia.

À professora Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, pela orientação, amizade e confiança ao longo desses anos.

A prof<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Zampiere Silva de Pietri e Prof<sup>o</sup> Dr. Walter Pinto Junior por participarem da banca examinadora. Obrigada pelos apontamentos e contribuições.

Aos meus pais, Nelson e Ivanilde, pelo incentivo e carinho para a conclusão deste trabalho.

Ao meu marido Renner, pelo alicerce, por estar junto comigo em cada momento. Eu amo você!

A minha irmã Fabiana, pelo carinho, incentivo e por ter me mostrado o caminho para a Pós-Graduação nesta Universidade.

A Viviane, Tiago, Reinaldo, Ricardo, Ortência, Tia Jacina e Tia Erilda pelo incentivo.

Aos meus lindos sobrinhos, João Ricardo e Ludmilla, pelos momentos de descontração.

A minha amiga-irmã Roberta, pela amizade e incentivo.

À amiga Marilza, por sua disposição em ajudar e me treinar nos primeiros passos na Biologia Molecular.

Ao Renato pela ajuda na execução da metodologia e amizade.

Ao Anderson, Fábio e Rodrigo Secolin pelo auxílio e amizade.

Ao João Paulo, Juliana, Catarina, Marília e Isabela pelo apoio.

A Cyntia "Letícia" e Luciana pelo incentivo, dedicação, amizade e paciência nestes últimos dias.

Ao Clube de "*Lulus*": Aline, Claudia Estela, Daniela, Elisangela, Isabel, Lucila, Cíntia, Carol Lincoln, Karina e Lidiane pela amizade e momentos de descontração.

A Equipe da Genética Médica e Forense pelo apoio.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular pelo convívio.

A todos funcionários do Departamento de Genética Médica, cujo trabalho tornou possível a consecução desta pesquisa.

“ É o Senhor, teu Deus, que marcha adiante de ti,  
com um fogo devorador... a terra que ides conquistar  
é um país de montanhas e de vales, impregnado das chuvas do céu.”  
Deuteronômio

# SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
1-Considerações Gerais.....	21
2- Aspectos Clínicos.....	22
3- Aspectos Ambientais.....	24
4- Aspectos Genéticos .....	25
4.1- Citocromo P450.....	26
4.2- O gene CYP1A1.....	28
4.3- O gene CYP1B1 .....	30
4.4- O gene CYP2C9.....	31
5- Citocromo P450 e CCR.....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>CASUÍSTICA</b> .....	36
1-Aspectos Éticos.....	37
2- Avaliação Clínica.....	37
<b>MÉTODOS</b> .....	40
1- Extração de DNA .....	41

2-Amplificação Gênica .....	43
3-Digestão Enzimática .....	45
4- Análise Estatística.....	49
<b>RESULTADOS</b> .....	50
1- Caracterização da amostra .....	51
2- Análise polimorfismos nos genes CYP1A1,CYP1B1 e CYP2C9.....	55
2.1-Polimorfismo M1 no gene CYP1A1 .....	55
2.2-Polimorfismo M2 no gene CYP1A1 .....	56
2.3- Distribuição Genotípica dos alelos M1 e M2 no gene CYP1A1 .....	57
2.4-Polimorfismo 1B1*3 no gene CYP1B1 .....	57
2.5-Polimorfismo 2C9*2 no gene CYP2C9.....	59
2.6-Polimorfismo 2C9*3 no gene CYP2C9.....	60
2.7-Distribuição Genotípica dos alelos *2 e *3 no gene CYP2C9.....	61
<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>CONCLUSÕES</b> .....	70
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	72
<b>ANEXOS</b> .....	82

# LISTA DE ABREVIATURAS

---

CCR: Câncer Colorretal

EUA: Estados Unidos da América

HPAs: Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

CYP: Citocromo P-450

AHH: aril hidrocarboneto hidroxilase

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxirribunucleotídeos

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

pb: Pares de Bases

r.p.m.: rotação por minuto

APC: *adenomatosis polyposis coli*

MSH2: *mut L homolog 1, colon câncer e nonpolyposis type2*

H-ras: Harvey rãs

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1: Principais CYP humanos e substratos que atuam .....	27
Tabela 2: Sequência dos primers utilizados para amplificação gênica ....	43
Tabela 3: Descrição das temperaturas de desnaturação, pareamento e extensão dos polimorfismos estudados .....	44
Tabela 4: Descrição enzimas utilizadas na digestão enzimática.....	45
Tabela 5: Distribuição dos 102 pacientes com CCR de acordo com a idade, o sexo, a etnia e o hábito tabagista .....	51
Tabela 6: Distribuição dos 102 pacientes com CCR de acordo com a localização, o estadio e a diferenciação do tumor.....	54
Tabela 7: Prevalência do polimorfismo M1 na amostra analisada .....	55
Tabela 8: Prevalência do polimorfismo M2 na amostra analisada .....	56
Tabela 9: Distribuição genotípica dos alelos M1 e M2 do gene CYP1A1 em uma amostra de portadores de CCR e na amostra controle .....	57
Tabela 10: Prevalência do polimorfismo 1B1*3 na amostra analisada.....	58
Tabela 11: Prevalência do polimorfismo 2C9*2 na amostra analisada ....	59
Tabela 12: Prevalência do polimorfismo 2C9*3 na amostra analisada ....	60
Tabela 13: Distribuição genotípica dos alelos *2 e *3 do gene CYP2C9 em em uma amostra de portadores de CCR e na amostra controle .....	61

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1: Mecanismo de ação do citocromo P450 .....	28
Figura 2: Representação esquemática da influência dos fatores que conferem suscetibilidade no processo de carcinogênese ambiental.....	32
Figura 3: Eletroforese polimorfismo M1.....	46
Figura 4: Eletroforese polimorfismo M2.....	46
Figura 5: Eletroforese polimorfismo 1B1*3.....	47
Figura 6: Eletroforese polimorfismo 2C9*2.....	47
Figura 7: Eletroforese polimorfismo 2C9*3.....	48

## LISTA DE GRÁFICOS

---

Gráfico 1: Distribuição da idade de manifestação do CCR em 102 pacientes .....	52
Gráfico 2: Prevalência do polimorfismo M1 do gene CYP1A1 .....	55
Gráfico 3: Prevalência do polimorfismo M2 do gene CYP1A .....	56
Gráfico 4: Prevalência do polimorfismo 1B1*3 do gene CYP1B1.....	58
Gráfico 5: Prevalência do polimorfismo 2C9*2 do gene CYP2C9 .....	59
Gráfico 6: Prevalência do polimorfismo 2C9*3 do gene CYP2C9 .....	60
Gráfico 7: Análise por Regressão Logística Multivariada dos polimorfismos com o estadiamento do tumor .....	62
Gráfico 8: Análise por Regressão Logística Multivariada dos polimorfismos associada ao tabagismo dos pacientes e estadiamento .....	63



## RESUMO

O Câncer colorretal (CCR) refere-se a uma neoplasia que atinge o cólon e o reto, apesar das diferenças epidemiológicas e biológicas entre o câncer do cólon e reto, as duas condições são combinadas, pois não se faz uma separação clara dos dois locais anatômicos; assim, o câncer do colón e/ou do reto é classificado como câncer colorretal.

Dados epidemiológicos atestam a importância de fatores ambientais na patologia do CCR Esporádico. Os polimorfismos de P450 e a suscetibilidade ao câncer podem estar associados ainda, pelo fato dessas isoenzimas participarem também de transformação de compostos endógenos relevantes durante o processo de diferenciação da célula transformada, até o estágio maligno.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência dos polimorfismos m1 e m2 no gene CYP1A1, 2C9\*2 e 2C9\*3 no gene CYP2C9 e o 1B1\*3 no CYP1B1 e correlacionar a presença desses polimorfismos com o hábito tabagista e o estadiamento clínico da doença.

A análise dos polimorfismos foi realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase associada a digestões enzimáticas específicas. Foram avaliados 102 pacientes com CCR esporádico e 230 portadores de sangue sem história familiar de CCR.

Nossos resultados indicaram que indivíduos sem os alelos M1 e M2 do gene CYP1A1 teriam um efeito protetor com relação ao CCR, enquanto que os indivíduos portadores de um alelo M1 ou M2 e os homozigotos M2 teriam um aumento de risco que seriam respectivamente de 6, quase 3 (2,89) e quase 4 vezes (3.70). Com relação ao gene CYP2C9, o genótipo N/N (sem as mutações \*2 e \*3) teria um efeito protetor, enquanto que o heterozigoto \*3 traria um risco 6 vezes maior (5.90) e o homozigoto \*3, três vezes.

A presença dos alelos M1 e M2 parecem estar relacionados a um pior prognóstico da doença, enquanto que \*3 do CYP2C9 traria um melhor prognóstico. Maiores estudos são necessários para confirmar esses achados.

No caso do polimorfismo 1B1\*3 do gene CYP1B1, parece não haver relação com o fenótipo CCR.



## **A**BSTRACT

The colorectal cancer (CRC) characterizes a neoplasia which reaches the colon and the rectum tissues. It is classified as so, despite the biological and epidemiological differences between the colon and rectum cancer, because there is not a clear anatomical separation of these areas.

The importance of external factors in the pathology of the sporadic CRC has been certified by epidemiological data. Thus, P450 polymorphisms might be associated to cancer due to the fact that these proteins play a role in transforming endogenous compounds during the process of differentiation of transformed cells, until its malignant stage.

The objective of this work was to evaluate the prevalence of the polymorphisms M1 and M2 in *CYP1A1* gene, 2C9\*2 and 2C9\*3 in *CYP2C9* gene and 1B1\*3 in *CYP1B1* gene. Also, the correlation among the presence of these polymorphisms, the tobaccoism and the clinical stagnancy of the illness was performed.

Polymerase chain reactions (PCRs) followed by specific enzymatic digestions were performed in order to analyze the polymorphisms. We evaluated 102 patients with sporadic CRC and 230 control individuals without familial history of CRC. Our results indicated that individuals that did not carry M1 and M2 variants of *CYP1A1* gene presented a protective effect against CRC, while individuals who presented M1 or M2 variants had a 6 and almost 3 (2.89) times increasing of the risk, respectively, while patients with both M2 alleles had an almost 4 times (3.70) increasing risk.

Analysis of *CYP2C9* gene showed that genotype N/N (without \* 2 and \* 3 mutations) presented a protective effect, while individuals heterozygotes for \* 3 mutation had an increase close to 6 times (5.90) of their risk. Homozygotes for the same mutation would present a 3 times increased risk.

M1 and M2 alleles presence seems to be related to a worse prognostic of the illness, while the presence of \* 3 mutation in *CYP2C9* gene would result in a

better prognostic. Other studies are necessary to confirm these findings. Polymorphism 1B1\*3 of *CYP1B1* gene does not seem to be related to CRC phenotype.



# INTRODUÇÃO

## **1- Considerações Gerais**

O câncer não é uma doença única; constitui um conjunto de alterações, cujo fator comum é o crescimento desordenado de células, que invadem os órgãos e tecidos, podendo provocar metástases em algumas regiões do corpo (PIERCE, 2004).

O Câncer colorretal (CCR) refere-se a uma neoplasia que atinge o cólon e o reto. Apesar das diferenças epidemiológicas e biológicas existentes entre o câncer do cólon e reto, as duas condições são combinadas, pois não se faz uma separação clara dos dois locais anatômicos; assim, o câncer do colon e/ou do reto é classificado como câncer colorretal (Winawer et al., 1995).

O CCR é um problema de saúde importante devido a sua alta incidência, gravidade e pela tendência em ser diagnosticado em estágio avançado. O CCR é o segundo tipo mais comum de câncer diagnosticado. A cada ano somam-se 945 mil casos novos no mundo (SACHSE, 2002). Sendo considerado o segundo mais prevalente no mundo, com uma estimativa de 2,4 milhões de pessoas vivas diagnosticadas nos últimos cinco anos. Nos países desenvolvidos a incidência de CCR é maior do que nos países em desenvolvimento, sendo que a sobrevida cumulativa em cinco anos é de cerca de 40% a 50% (INCA, 2007).

Nos Estados Unidos da América (EUA), o CCR é a lesão maligna mais freqüente no trato gastrointestinal (Hurstone et al., 2000), caracterizando a segunda causa de morte relacionada com câncer. Em 2002, mais de 56.000 pessoas nos EUA desenvolveram CCR. (Center for Disease Control and Prevention, 2007).

Estima-se que cerca de 15% de todos os tipos de neoplasias em ambos os sexos se desenvolvem no aparelho digestivo e, aproximadamente, 1/3 delas ocorrem no reto (PETROS, 1999).

As estimativas de incidência de câncer no Brasil para o ano de 2006, publicadas pelo INCA, apontam o câncer colorretal como o quinto tumor maligno mais freqüente entre homens (com 11.390 casos novos) e quarto entre as mulheres (13.970 casos novos). A maior incidência de casos ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas as possibilidades de desenvolvimento já aumentam a partir dos 40 anos (INCA, 2007).

Melhores chances de cura ocorrem quando há o diagnóstico precoce da doença, o que acontece na minoria dos casos, embora o CCR apresente uma lesão precursora benigna – o pólipó adenomatoso – e a sua identificação e remoção reduzem a mortalidade pela doença (Morson et al., 1976).

A estimativa de novos casos de CCR é mais elevada na América do Norte, Europa, e na parte sul da América do Sul (Moshkowitz et al., 2005). Essa distribuição mundial pode estar correlacionada com a idade da população, já que o CCR acomete principalmente em faixa etária alta.

## **2- Aspectos Clínicos**

O CCR usualmente se apresenta como um conjunto de sinais e sintomas que incluem anemia, dor abdominal, massa abdominal, melena, constipação, diarreia, náuseas, vômitos, fraqueza e tenesmo (INCA, 2007).

A sobrevida é influenciada principalmente pelo comprometimento linfonodal e pela profundidade de infiltração da neoplasia na parede intestinal (Freitas et al., 1997). Esses fatores são classificados no sistema TNM, que

considera a extensão do acometimento do tumor na parede do cólon e em tecidos e órgãos adjacentes (T), comprometimento linfonodal (N) e a identificação da presença ou ausência de metástases em órgãos a distância (M). Cinco grupos de pacientes podem ser identificados por este sistema (estádios 0, I, II, III e IV), sendo que as maiores probabilidades de sobrevivência são observadas naqueles com os estádios 0 e I e as menores probabilidades de sobrevivência com o estágio IV da doença (ZINKIN, 1983). O sistema TNM é o principal elemento que norteia a indicação de tratamento coadjuvante (Greene et al., 2002).

O tratamento do CCR é multidisciplinar e consiste de procedimento cirúrgico, quimioterapia e radioterapia, sendo as duas últimas terapias associadas à cirurgia. A ressecção cirúrgica do local afetado e a realização de uma colostomia permanente é a mais freqüente e efetiva terapia para o CCR. O tratamento adjuvante é empregado quando o tratamento cirúrgico tem caráter curativo e visa minimizar os riscos de recaída local e à distância. As modalidades de tratamento adjuvante recomendadas são a quimioterapia, em CCR e radioterapia em tumores do reto (Nelson et al., 2001).

Existe uma associação entre o padrão da dieta e o CCR. Os principais fatores de risco para CCR são dieta com alto teor de gordura, carne vermelha, baixo teor de cálcio e fibras, obesidade, sedentarismo e ingestão exagerada de bebida alcoólica (Turner et al., 2004). Mais de 90% do CCR ocorrem em indivíduos com mais de 50 anos, entretanto, 75% ocorrem em indivíduos sem outros fatores de risco além da idade, o que caracteriza o CCR (Winawer et al., 1997).

Estima-se que grande parte das neoplasias resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo a contribuição exclusivamente genética responsáveis por apenas 5% de todos os tumores. A fração

restante pode ser atribuída a fatores ambientais externos que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética (Gertig & Hunter, 1998).

### **3-Aspectos Ambientais**

O papel dos fatores ambientais no câncer é sugerido por diferenças na incidência de cânceres específicos por todo o mundo. Há forte evidência da influência de fatores ambientais no CCR. Muitos estudos epidemiológicos demonstram que o risco de câncer em migrantes de áreas de baixo risco para áreas de alto risco de câncer aumenta ao nível do risco de seu novo país na próxima geração e que esse aumento ainda poderia ocorrer em até uma década. Além disso, as taxas crescentes de incidência do CCR em países em desenvolvimento nas últimas décadas provavelmente são resultado de mudanças de fatores exógenos como a dieta e o estilo de vida ou mesmo o envelhecimento da população (Slattery et al.,2004).

No Japão as taxas gerais de câncer são consideravelmente menores que no Havaí. Entretanto, em uma única geração japonesa após a migração para o Havaí, essas pessoas desenvolveram câncer em taxas similares às dos havaianos nativos (PIERCE, 2004).

Alguns fatores ambientais parecem agir como carcinógenos diretos ou aumentar a frequência de mutações somáticas, predispondo ou determinando o aparecimento da neoplasia (Harden et al.,1995; HILL, 1995). Embora o CCR não seja visto como uma doença ocupacional, foi observado o aumento de sua ocorrência em trabalhadores expostos a metais, plásticos, fibras de vidro e solventes (Schottenfeld et al.,1980; Swanson et al.,1985), sugerindo que a exposição a estes agentes possa influenciar a origem da doença.

Existe uma associação entre o padrão da dieta e o CCR. É possível que os próprios alimentos constituam uma fonte de substratos que possa ser metabolizados por bactérias do cólon, por enzimas presentes na mucosa colônica (De Waziers et al., 1991). Dentre esses substratos estão os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), como o benzopireno, produzidos entre outras formas, pela exposição de carnes a temperaturas de pirólise durante o cozimento (Schiffman & Felton, 1990; Gerhardsson et al., 1991).

Componentes específicos da dieta, derivados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas heterocíclicas foram propostos como fatores de risco específicos para CCR (Chen et al., 2005).

#### **4- Aspectos Genéticos**

Anormalidades em oncogenes ou genes supressores tumorais (Fearon et al., 1992; Finley et al., 1989; Guillem et al., 1995), instabilidade de microsátélites (Ionov et al., 1993; Guillem et al., 1995) e a desregulação de sinais das vias de transdução parecem estar associados à doença.

Anormalidades gênicas de alta penetrância, particularmente as mutações nos genes *adenomatosis polyposis coli* (APC), *mut L homolog 1*, *colon câncer* e *nonpolyposis type2* (MSH2) foram descritas em pacientes com CC familiar (Burt et al., 1990; Burt & Groden, 1993; Peltomaki et al., 1993). Mutações em oncogenes, como o Harvey rãs (H-ras), no gene supressor tumoral P53 e polimorfismos de genes associados com o metabolismo de carcinógenos, como os genes da superfamília de enzimas Citocromo P450 podem parecer estar associados ao CCR.

O estudo de variações interindividuais na capacidade de

metabolização de xenobióticos, entre os que se encontram diversas drogas, carcinógenos, pesticidas e alcalóides etc., permitiu a identificação de inúmeros polimorfismos genéticos, que afetam os níveis de expressão ou a atividade catalítica dessas enzimas (Santiago et al., 2002). A metabolização xenobiótica ocorre através de dois tipos de enzimas. As de metabolismo mediado pelas oxidases de função mista – ou de Fase I e as enzimas de conjugação ou fase II (Hou et al.,2005).

#### **4.1- Citocromo P450**

A super-família de genes do citocromo P-450 representa uma das principais classes de biotransformação da Fase I, através de suas mais de 500 isoenzimas (tabela 2).

Tais enzimas participam tanto da biossíntese, como da degradação de esteróides, ácidos graxos, aminas e metabólicos vegetais (INGELMAN-SULDBERG, 2002). Devido à importância do seu papel na ativação de inúmeros procarcinógenos, pesquisa extensiva têm sido concentrada na relação entre a distribuição de variantes polimórficas de diferentes isoenzimas de P-450 e a suscetibilidade ao câncer, tendo sido principalmente avaliados os genes *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP1B1* e *CYP2C9*.

O complexo do Citocromo P450 está altamente distribuído em animais, plantas e protistas e existe na natureza desde antes a divisão entre organismos eucariotas e procariotas (Ladero et al.,1998). Foi identificado em 1958 como um pigmento celular reduzido e unido a membrana com um pico de absorção de 450nm. Posteriormente, em 1964, foi nomeado Citocromo P450 por Omura e Sato (Santiago et al., 2002).

Foram descritas 74 famílias, das quais 14 estão presentes em mamíferos e ainda são subdivididas em 26 subfamílias. Nos mamíferos são

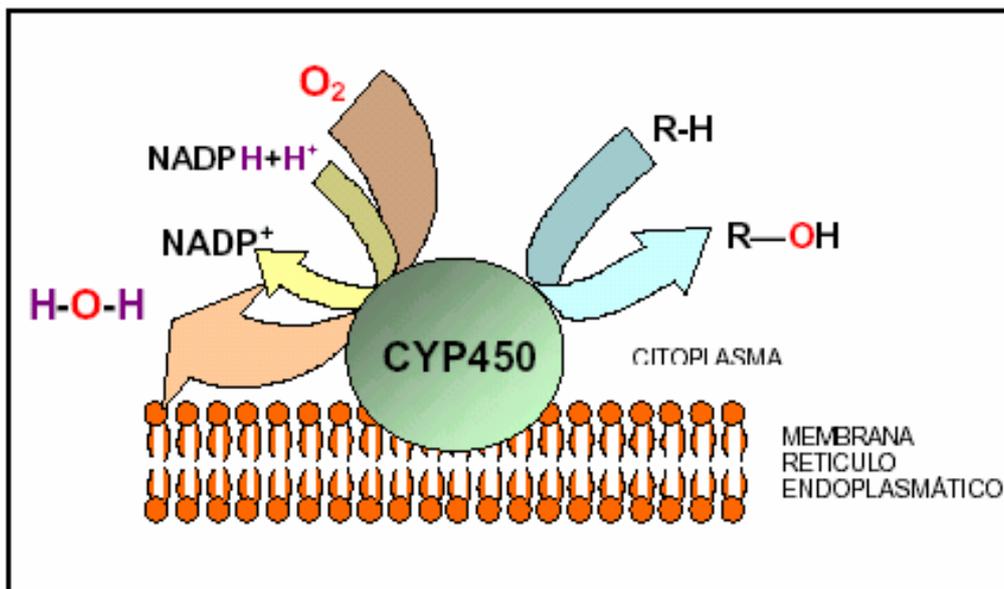
encontradas em grande variedade de órgãos, glândulas e tecidos, podendo-se destacar o cérebro, testículos, mucosa intestinal e fígado (Santiago et al., 2002; CON, 2005).

**Tabela 1:** Principais CYP humanos e substratos em que atuam

<b>Subfamília</b>	<b>Enzima</b>	<b>Substrato</b>
CYP1A	1A1	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
	1A2	Cafeína, fenacetina
CYP1B	1B1	Alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, 17 b-estradiol
CYP2A	2A6	Cumarina, nicotina, nitrosamina encontrada no tabaco
CYP2B	2B6	4-hidroxilação de ciclofosfamida
CYP2C	2C19	S-Mefenitoina, omeprazol, diazepam, certos herbicidas
	2C9	Fenitoina, drogas anti-flamatorias,
	2C8	ácido retinoico, HPAs
CYP2D	2D6	Antipertensivos, antidepressivos
CYP2E	2E1	Álcool, tetracloreto de carbono
CYP3A	3A4	60% de drogas usadas clinicamente como eritromicina, lidocaina, cortisol, testosterona
	3A5	Mesmo padrão de substratos que CYP3A4
	3A7	Forma fetal: metaboliza substratos de CYP3A4
CYP4A	4A1	Ácidos graxos, clofibrato

(Santiago et al., 2002)

O Citocromo P450 funciona como uma monoxigenase, ou seja, cataliza reações onde somente se incorpora um átomo de oxigênio e o outro reduz em H<sub>2</sub>O. Utiliza substratos para atuar como redutores dos átomos de O<sub>2</sub>, e principalmente aceita um dos oxigênios e em contraste proporciona átomos de H para reduzir o outro em H<sub>2</sub>O (Figura 1).



**Figura 1:** Mecanismo de ação do citocromo P450. Hidroxilação de uma droga lipossolúveis por ação do citocromo P450. O produto R<sup>3/4</sup> OH aumenta a solubilidade em água, facilitando sua excreção (adaptada de Santiago et al.,2002)

De fato, diferenças individuais na expressão das formas de P450 causam variação marcante no nível de carcinógenos ativados na célula. Sabe-se que a expressão e a atividade dessas enzimas são regulada por mecanismos genéticos distintos.

Os polimorfismos de P450 e a suscetibilidade ao câncer podem estar associados ainda pelo fato dessas isoenzimas participarem também de transformação de compostos endógenos relevantes durante o processo de diferenciação da célula transformada, até o estágio maligno (Louro et al., 2002).

#### 4.2- O gene *CYP1A1*

O gene *CYP1A1*, localizado no cromossomo 15, região 15q22.24 codifica a enzima P4501A1, uma isoenzima de P450 que catalisa a oxidação de HAPs (Kawajiri, 1986).

A indução de *CYP1A1* ocorre via ligação do composto indutor ao receptor de aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH), o receptor ativa então a transcrição de vários genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização de xenobióticos (DALY,2003).

A enzima *CYP1A1* é considerada primariamente uma enzima extra hepática em humanos, sendo induzida no pulmão, linfócitos e na placenta após exposição aos HPAs, incluindo aqueles presentes na fumaça do cigarro (Sivaraman et al., 1994)

A bioativação de vários HPAs é iniciada com a estimulação do receptor AHH e esse, por sua vez, ativa a transcrição da *P4501A1*, epóxido hidrolase e outras enzimas. Além dos HPAs, a *CYP1A1* é também induzida por xenobióticos. A atividade catalítica e o modo de indução de *CYP1A1* parecem ser altamente conservados em animais superiores, confirmando sua importante função fisiológica. O padrão de atividade e capacidade indutora desta enzima em humanos, relacionada à formação de metabólitos de HAPs capazes de reagir com a molécula de DNA é, portanto, de grande importância para a estimativa do risco de desenvolvimento de Câncer (Slattery et al.,2004).

Cerca de 10% da população caucasóide apresenta uma forma polimórfica da enzima *CYP1A1* a qual vêm sendo associada ao risco de neoplasias de brônquios, laringe e cavidade oral, particularmente em indivíduos fumantes (Nebert et al.,1996).

O gene *CYP1A1* tem 7 exons distribuídos em 6 Kb de comprimento. Produz um mRNA de 2601 bp. Os polimorfismos M1 e M2 foram identificados e têm sido associados ao aumento da atividade da enzima e ao aumento da ativação de carcinógenos aumentando o risco de câncer (Slattery, M.L, 2004)

O CCR parece ter seu risco influenciado pelo polimorfismo *MspI*, enquanto outros envolvendo os cânceres das vias aéreas e de mama sugerem ausência desta associação (Bailey et al.,1998).Os polimorfismos no gene *CYP1A1* está associado com um significativo aumento no risco de CCR na população Japonesa, mas pode haver incidência alta em outras populações. (Slattery et al.2004).

#### **4.3- O gene *CYP1B1***

O gene *CYP1B1* está localizado no cromossomo 2, na região 2p22p21 e possui 3 éxons e 2 íntrons (Tang et al.,1996). O RNAm *CYP1B1*, aparentemente não é expresso no fígado, mas em tecidos extrahepáticos, incluindo coração, rim, próstata, ovário, colo do útero e glândulas mamárias (Guengerich et al., 2003).

O *CYP1B1* ativa vários carcinógenos ambientais nos tecidos epiteliais (Sasaki et al., 2004). Componentes de substâncias procarginogênicas requerem a ativação metabólica de enzimas oxidantes, para serem transformadas potencialmente carcinógenas. Estudos anteriores mostraram que os polimorfismos no *CYP1B1* induzem a hiperativação da atividade metabólica e aumentam a incidência de vários cânceres (Guengerich et al., 2003).

Vários polimorfismos foram descritos no gene *CYP1B1*. O polimorfismo *CYP1B1\*3*, aumenta a atividade enzimática do gene *CYP1B1*, este aumento foi demonstrado em alguns cânceres, incluindo o CCR (Gibson et al., 2003).

Estudos relataram a associação do *CYP1B1* com o câncer de pulmão, rim, cérebro, mama e CCR (Chang, et al., 2005).

#### 4.4-O gene *CYP2C9*

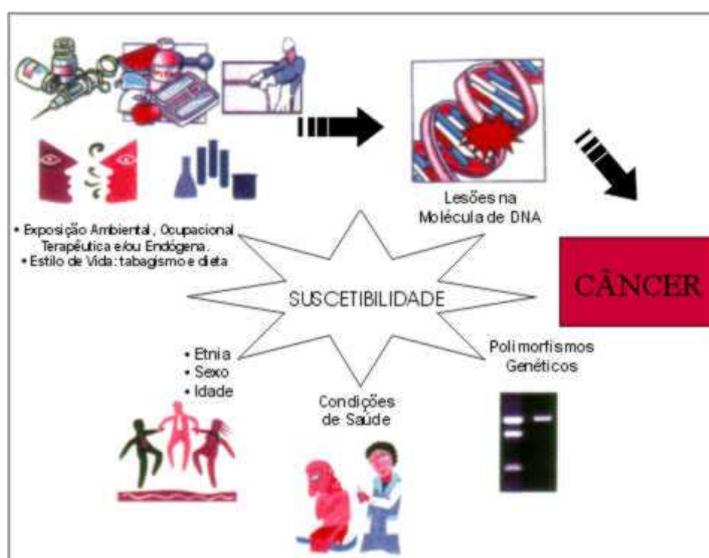
O gene *CYP2C9* pertence à família CYP2C e foi mapeado no cromossomo 10, região 10q24 (Gray *et al.*, 1995). Ele participa do metabolismo de importantes drogas como as fenitoína, S-warfarina, tolbutamida, losartan, torasemida e antiinflamatórios não esteróides (AINEs), incluindo o diclofenaco (Leung *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2007)

A subfamília CYP2C representa 20% dos citocromos encontrados no fígado humano, sendo que a CYP2C9 também é expresso no epitélio intestinal humano (Goldstem & Morais, 1994). O gene *CYP2C9* está envolvido na bioativação de vários carcinógenos como PAHs e aminas heterocíclicas aromáticas (SCHWARZ, 2003). Foram descritos 30 alelos CYP2C9 em humanos, dos quais dois apresentam maior frequência o CYP2C9\*2 (Arg144Cys), CYP2C9\*3 (Ile359Leu).

A atividade enzimática está relacionada a presença de polimorfismos no gene *CYP2C9*. Indivíduos que possuem o alelo selvagem CYP2C9\*1 mostram elevada capacidade metabólica, quando comparados com os alelos variantes CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3. Em caucasóides foram relatados a frequência de 8 a 12,5% do alelo CYP2C9\*2 e 3 a 8,5% do alelo CYP2C9\*3. A análise *in vitro*, mostrou que a presença do alelo CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3, diminuem 30 e 80%, respectivamente, a atividade metabólica da enzima CYP2C9. A diminuição da atividade metabólica da enzima CYP2C9 foi associada com o aumento do risco de adenoma câncer colorretal, principalmente na presença do hábito tabagista (Tranah, 2005).

## 5-CITOCROMO P-450 E CCR

Dados epidemiológicos atestam a importância dos fatores ambientais na patogênese do CCR. Esses fatores ambientais incluem a ingestão e inalação de carcinógenos e a interação desses com enzimas bacterianas. A maior parte dos carcinógenos ambientais são potencialmente fracos, mas quando metabolizados no organismo se tornam potencialmente mutagênicos (figura 2) (Butler et al., 2001).



**Figura 2:** Representação esquemática da influência dos fatores que conferem suscetibilidade no processo de carcinogênese ambiental, iniciando-se com a exposição ambiental, ocupacional, terapêutica e/ou endógena aliadas ou não ao estilo de vida (hábito tabagista e dieta). Os compostos mutagênicos/carcinogênicos presentes interagem com a molécula de DNA, RNA e proteínas e podem causar lesões que, somadas às possíveis alterações em genes críticos (preexistentes ou não), levam ao desenvolvimento do câncer. Sabe-se que toda esta via pode ser influenciada por outras condições, tais como etnia, idade, sexo, estado de saúde (doenças crônicas, desnutrição) e ainda por polimorfismos genéticos.

As suscetibilidades individuais, baseadas nos polimorfismos dos genes que influenciam a ativação ou inativação de carcinógenos, têm mostrado aumento de risco para o surgimento cânceres (Filho & Zago, 2005). A maior parte dos polimorfismos genéticos relatados na epidemiologia de câncer regulam a ação de enzimas metabólicas e de reparo do DNA (Butler et al., 2001). Vários estudos relatam a presença dos polimorfismos dos genes CYPs em cânceres de pulmão, esôfago, rim, endométrio e CCR. Recentemente, muitos estudos relacionam a presença de polimorfismos genéticos e o risco para o CCR (Chen et al., 2005).



## *OBJETIVOS*

Avaliar a prevalência dos polimorfismos M1, M2 no gene CYP1A1, 1B1\*3 no gene CYP1B1, 2C9\*2 e 2C9\*3 no gene CYP2C9 em indivíduos com adenocarcinoma colorretal esporádico em relação a uma amostra controle.

Correlacionar a presença desses polimorfismos com o hábito tabagista e o estadiamento clínico da doença.



CASUÍSTICA

Foram estudados todos os pacientes com CCR que foram diagnosticados com adenocarcinoma esporádico, por ocasião do diagnóstico ou durante o seguimento clínico, no ambulatório de Proctologia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, no período de 18 de agosto de 1999 a 10 de agosto de 2001. Foram excluídos da casuística os pacientes com alterações intestinais, antecedentes familiares de CCR e aqueles que não aceitaram participar do estudo proposto.

O grupo controle, constituído por doadores de sangue atendidos no Hemocentro da UNICAMP, com idade entre 50 e 60 anos, que não referiram perda de peso, sintomas gastro-intestinais ou antecedente familiar de CCR, e que não apresentaram doenças consideradas pré-neoplásicas, como polipose familiar, síndrome de Lynch e doenças inflamatórias intestinais.

## **1-Aspectos éticos**

Os procedimentos foram realizados após a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Parecer 64/2006).

## **2-Avaliação clínica**

Os dados relativos à identificação, idade, sexo, etnia, os exames laboratoriais necessários ao diagnóstico, a determinação do tipo histológico

e do grau de diferenciação do estadio do tumor foram obtidos a partir dos prontuários de cada paciente.

Foram considerados tabagistas os pacientes que mantiveram o hábito tabagista até o momento do diagnóstico do CCR ou que pararam de fumar pelo menos cinco anos antes. Foram considerados não tabagistas aqueles que nunca fumaram, ex-tabagistas, ou seja, aqueles que mantiveram o hábito tabagista até, no máximo, cinco anos antes do diagnóstico do CCR, de acordo com o proposto por Freedman *et al.* 2002.

O estudo foi constituído por um grupo de pacientes com CCR e um grupo controle, O diagnóstico do CCR foi realizado 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 o proposto por Broders, 1925.

Foi considerada a localização do tumor descrito no exame anátomo-patológico da peça cirúrgica. Foram considerados como proximais os tumores localizados em cólons ascendentes, transversos ou descendentes, 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, ultra-sonografia, tomografia computadorizada do abdome e pelve, Raio-X do tórax e dos achados intra-operatórios, de acordo com o proposto por Zinkin, 1983 e Astler & Coller (1954) para os sistemas TNM e Astler-Coller respectivamente (Anexo I, II e III).

Os pacientes foram distribuídos de acordo com a idade, sexo, etnia, hábito tabagista, localização do tumor, estádios TNM e Astler Coller e o grau de diferenciação do tumor.

Para caracterização do grupo controle foram relacionadas informações com relação a idade, sexo, etnia e histórico clínico e familiar através de interrogatório. Baseado nessas informações fez-se a distribuição dos indivíduos em faixas.



## MÉTODOS

Foi realizada a coleta de sangue periférico para a extração do DNA e subsequente análise molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e digestão com enzimas de restrição específicas.

### **1-Extração de DNA**

Procedemos à extração de DNA genômico conforme o método descrito por Woodhead et al. (1986), com modificações.

Dois tubos Vacuntainer com cerca de 5 mL de sangue periférico foram coletados, contendo, cada um deles EDTA 15% para impedir a coagulação sangüínea. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2.000 r.p.m. à temperatura ambiente para a separação e retirada do plasma. Em seguida, uma alíquota de 500 µL do sedimento foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL. A essa alíquota foi adicionado 1,0 mL de tampão de lise celular (Sacarose 320mM, Tris - HCl pH7,5 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, Triton 100X). A solução foi então homogeneizada por 10 a 15 segundos e levada a centrifuga a 8000 r.p.m. por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, por inversão do tubo. Esse processo foi repetido por duas vezes. Ao precipitado formado foram adicionados 395µL de tampão de digestão (Tris - HCl pH 7,5 EDTA 10mM, 10mM, NaCl 10mM, SDS 0,5%) e 5 µL de proteinase K (20mg/mL). A reação então foi homogeneizada e incubada em banho-maria à temperatura de 55°C. Após 2 horas, foram adicionados 200 µL de LiCl 7,5N em cada amostra e as soluções foram levadas à temperatura de – 20°C por 15 minutos. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 r.p.m. e o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos. Após a transferência, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado e o tubo foi invertido até formação de um precipitado visível. Foi realizada uma centrifugação a 13000 r.p.m. por 5 minutos e o sobrenadante foi

desprezado por inversão do tubo. Ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 70% e nova centrifugação foi realizada (13000 r.p.m./5 min). O sobrenadante foi novamente descartado. O DNA obtido foi deixado à temperatura ambiente para a evaporação do etanol residual e ressuspenso em água estéril. A eficiência da extração foi avaliada em gel de agarose a 0,8%.

## 2- Amplificação Gênica

A PCR, Reação em Cadeia da Polimerase, consiste em uma reação cíclica, onde há variação de tempo e temperatura, que resulta na amplificação do material genético, ou seja, na obtenção de várias cópias do fragmento desejado. Para que ocorra a amplificação é preciso que participem da reação, além do DNA genômico, a partir do qual esta será feita; uma solução de desoxinucleotídeos (dNTP), que servem de matéria-prima para a confecção das novas cadeias de DNA; a Taq DNA polimerase, enzima responsável pela amplificação; cloreto de magnésio, co-fator da enzima; os primers, que flanqueiam a região de interesse, e um tampão para dar condições ótimas à reação. O ciclo da PCR é composto pelas seguintes fases: uma de desnaturação, na qual ocorrerá a separação da dupla fita de DNA; uma de anelamento, na qual ocorre a hibridização dos primers, e uma de extensão, onde ocorre a amplificação propriamente dita da seqüência de interesse. A PCR foi realizada com a utilização de 10mM de Tris-HCl pH 8.4, 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50mM de KCl, 0.4 mM de cada nucleosídeo trifosfato, 2 $\mu$ L de DNA genômico de cada indivíduo e 400 ng de cada iniciador. Os *primers* que foram utilizados estão descritos na tabela 2. As temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão estão descritas na tabela 3.

**Tabela 2:** Seqüência dos primers utilizados para amplificação gênica

<i>Gene</i>	Polimorfismo		<b>Seqüência</b>	Referência
<b>CYP1A1</b>	<b>M1</b>	Sense	5' CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT 3'	Song et al.; 2006
		Anti-sense	5' TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT 3'	
	<b>M2</b>	Sense	5' TTC CAC CCG TTG CAG GAT AGC C3'	Song et al.;; 2006
		Anti-sense	5' CTG TCT CCC TCT GGT TAG AGG AAG 3'	
<b>CYP1B1</b>	<b>1B1*3</b>	Sense	5'TCA CTT GCT TTT CTC TCT CC 3'	Lai et al.;
		Anti-sense	5'AAT TTC AGC TTG CCT CTT G 3'	2001
<b>CYP2C9</b>	<b>*2</b>	Sense	5'TAC AAA TAC AAT GAA AAT ATC ATG 3'	Taube <i>et al.</i> ; 2000
		Anti-sense	5'CTA ACA ACC AGA CTC ATA ATG 3'	
	<b>*3</b>	Sense	5'AAT AAT AAT ATG CAC GAG GTC CAG AGG TAC 3'	Taube et al.;
		Anti-sense	GAT ACT ATG AAT TTG GGA CTT C 3'	

**Tabela 3:** Descrição das temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão dos polimorfismos estudados

<b>Polimorfismo</b>	<b>Desnaturação Inicial</b>	<b>Número Ciclos</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensão</b>	<b>Extensão Final</b>	<b>Referência</b>
M1	94 <sup>o</sup> C (5 minutos)	30X	94 <sup>o</sup> C (1 minuto)	61 <sup>o</sup> C (1 minuto)	72 <sup>o</sup> C (1 minuto)	72 <sup>o</sup> C (10 minutos)	Song et al.; 2006
M2	94 <sup>o</sup> C (5 minutos)	35X	94 <sup>o</sup> C (30 segundos)	65 <sup>o</sup> C (30 segundos)	72 <sup>o</sup> C (30 segundos)	72 <sup>o</sup> C (10 minutos)	Song et al.; 2006
1B1*3	94 <sup>o</sup> C (5 minutos)	40X	94 <sup>o</sup> C (30 segundos)	60 <sup>o</sup> C (30 segundos)	72 <sup>o</sup> C (40 segundos)	72 <sup>o</sup> C (7 minutos)	Lai et al.; 2001
2C9*2	94 <sup>o</sup> C (5 minutos)	35X	94 <sup>o</sup> C (30 segundos)	58 <sup>o</sup> C (30 segundos)	72 <sup>o</sup> C (40 segundos)	72 <sup>o</sup> C (7 minutos)	Taube et al.; 2000
2C9*3	94 <sup>o</sup> C (5 minutos)	35X	94 <sup>o</sup> C (30 segundos)	56 <sup>o</sup> C (30 segundos)	72 <sup>o</sup> C (40 segundos)	72 <sup>o</sup> C (7 minutos)	Taube et al.; 2000

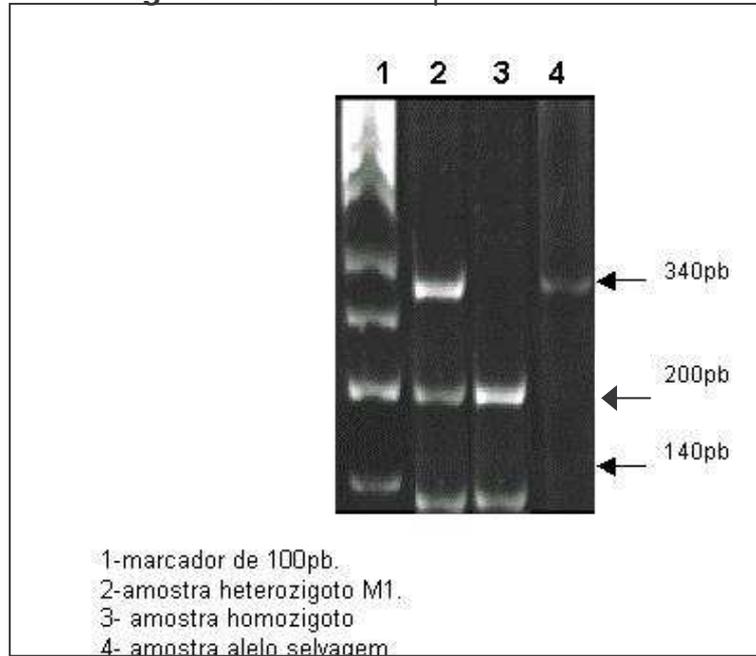
### 3- Digestão enzimática

Após a PCR, as amostras foram submetidas à digestão com enzima de restrição específica, eletroforese e interpretação dos resultados. As enzimas utilizadas e os tamanhos dos fragmentos estão sumarizadas na tabela 4. Nas figuras 3 a 7 encontram-se figuras das eletroforeses das digestões enzimáticas específicas para a detecção das mutações. Os tamanhos dos fragmentos estão sinalizados nas figuras e a relação dos fragmentos normais e mutantes de cada mutação na Tabela 4.

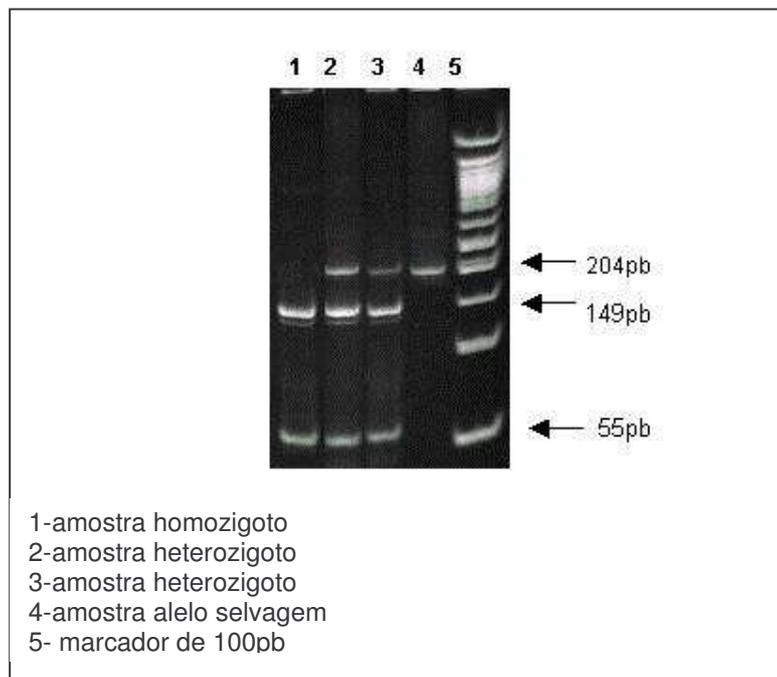
**Tabela 4:** Descrição das enzimas utilizadas na digestão enzimática

<b>Gene</b>	Polimorfismo	Enzima	<b>Fragmento Normal</b>	<b>Fragmento Mutante</b>
<b>CYP1A1</b>	<b>M1</b>	<i>MspI</i>	340pb	200 e 140pb
	<b>M2</b>	<i>BsrDI</i>	204 pb	149 e 55bp
<b>CYP1B1</b>	<b>1B1*3</b>	<i>Eco571</i>	650 pb	310 e 340 pb
<b>CYP2C9</b>	<b>2C9*2</b>	<i>Avall</i>	251pb	229 pb
	<b>2C9*3</b>	<i>Nsil</i>	160pb	140 pb

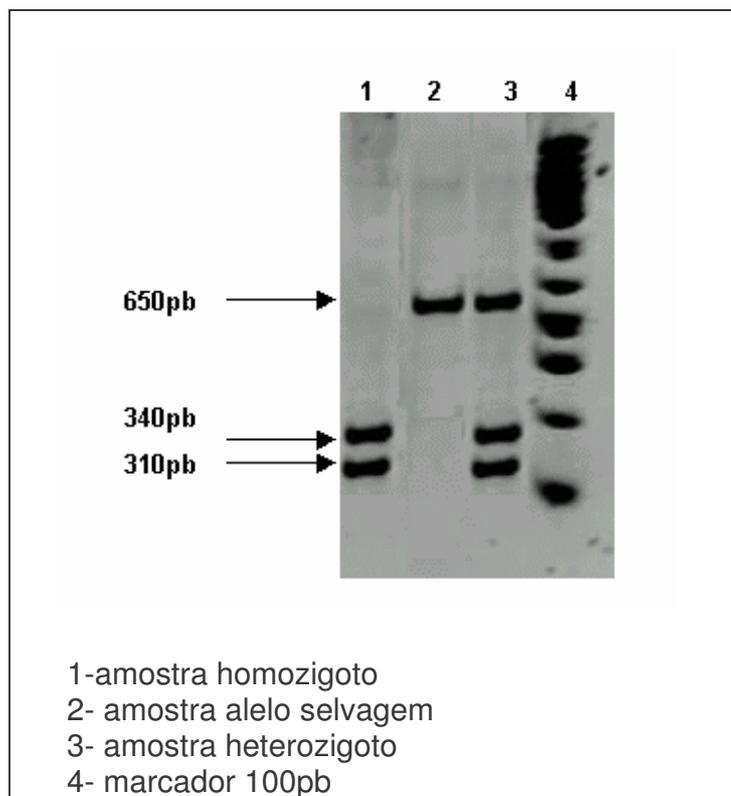
**Figura 3:** Eletroforese polimorfismo M1



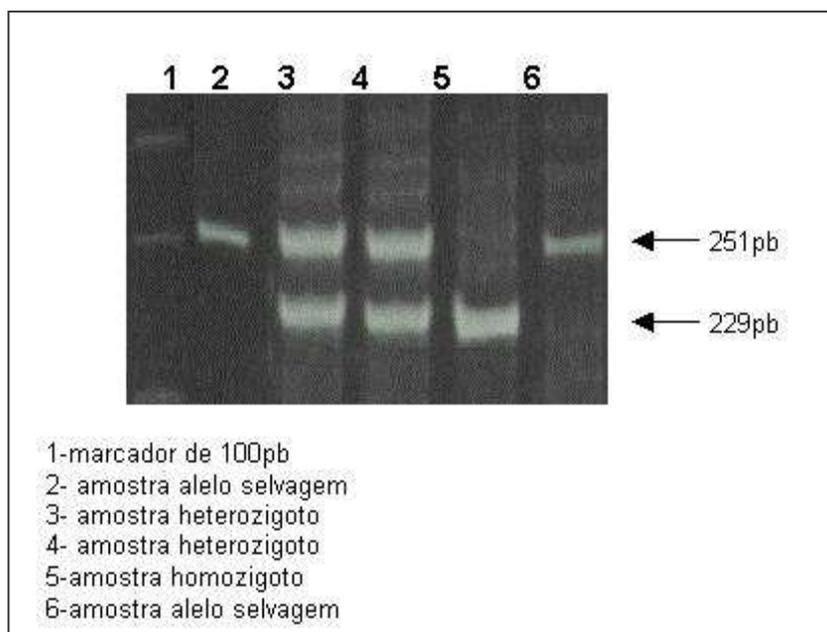
**Figura 4:** Eletroforese polimorfismo M2



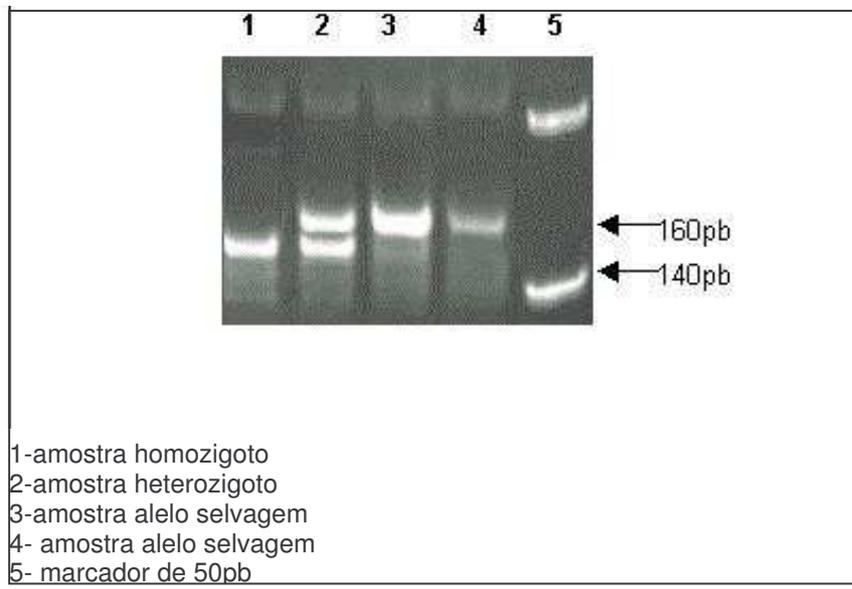
**Figura 5: Eletroforese polimorfismo 1B1\*3**



**Figura 6: Eletroforese polimorfismo 2C9\*2**



**Figura 7: Eletroforese polimorfismo 2C9\*3**



#### **4- Análise estatística**

O significado das diferenças estatísticas entre grupos foi calculado por meio do “Chi-Square Test Statistic”.

As determinações dos riscos de ocorrência do CCR, a que os pacientes e controles foram submetidos, foram obtidas por meio das razões das chances (Ors) e foram calculadas considerando um intervalo de confiança de 95%.

Os valores das Ors foram corrigidos por meio de modelos de regressão logística multivariada, tendo como variável dependente o grupo paciente e controles e como variáveis independentes a idade, o sexo , hábito tabagista e os genótipos.

Todas as análises foram realizadas com a utilização do programa estatístico Exacttest (EDN Data) e a regressão logística multivariada no programa Ploner *et al.* (2006) versão 1.06



## RESULTADOS

## 1- Caracterização da amostra

As distribuições dos pacientes com CCR de acordo com a idade, sexo, etnia e o hábito de fumar estão resumidos na tabela 5.

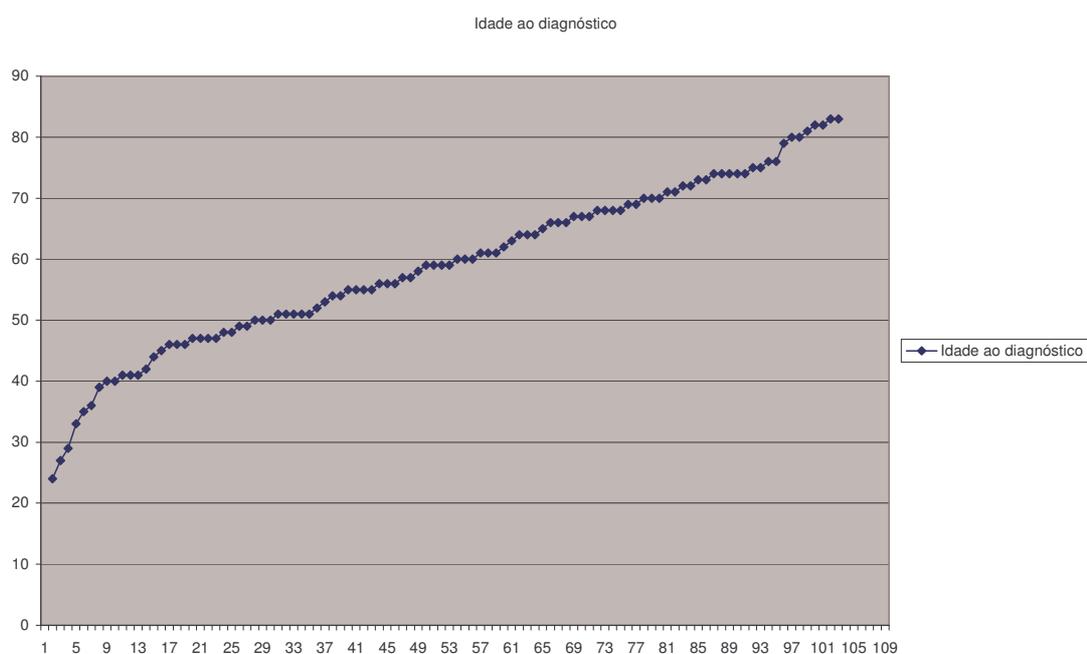
**Tabela 5:** Distribuição dos 102 pacientes com CCR de acordo com a idade, o sexo, a etnia e o hábito tabagista.

Variáveis	Número de pacientes (%)
<b>Idade (anos)</b>	
<60	52 (51,0)
≥60	50 (49,0)
<b>Sexo</b>	
Masculino	55 (53,9)
Feminino	47 (46,1)
<b>Etnia</b>	
Caucasóide	90 (88,3)
Negróide	10 (9,8)
Asiática	2 (1,9)
<b>Hábito de fumar</b>	
Tabagista	32 (31,4)
Não Tabagista	10 (9,8)
Ex-Tabagista	60 (58,8)

A idade de manifestação da doença nos pacientes variou de 24 e 83 anos (média de 58,9; com desvio padrão de 13,6 anos; mediana 59,0 anos). Cerca

de 25,5% da casuística foi constituída por pacientes com idade de manifestação menor do que 50 anos. A Distribuição da idade ao diagnóstico dos pacientes está apresentada no Gráfico 1.

No grupo controle a idade dos indivíduos variou entre 50 e 60 anos (média de 53,9; desvio padrão de 2,9 anos; mediana: 53,0 anos). Cento e três foram do sexo feminino e Cento e vinte sete foram do sexo masculino. Cento e noventa e oito caucasóides, trinta e um negróides e um asiático.



**Gráfico 1:** Distribuição da idade de manifestação do CCR em 102 pacientes.

A distribuição dos pacientes por sexo mostrou um discreto predomínio da doença em pacientes do sexo masculino em relação aos do feminino. Já a distribuição dos pacientes por etnia e hábito tabagista mostrou que a doença ocorreu predominantemente em caucasóides e em tabagistas e ex-tabagistas.

As distribuições dos 102 pacientes com CCR incluídos no estudo, de acordo com os aspectos anátomo-patológico do tumor, estão apresentadas na Tabela 6.

A distribuição dos pacientes por localização do tumor mostrou que cerca de dois terços da amostra ocorreu em localização distal no cólon.

As distribuições dos pacientes por estadios dos sistemas TNM e Astler-Cooler mostraram que cerca de metade do número deles apresentou a doenças em estádios avançados (III e IV, C1 e C2, respectivamente). Os estadiamentos do tumor não foram realizados em alguns pacientes devido à falta de dados relativos à extensão e ao acometimento de linfonodos ou órgãos a ele adjacentes ou distantes.

Já a distribuição por tipo histológico do tumor mostrou que em apenas 11,8% da amostra ele foi pouco diferenciado.

**Tabela 6:** Distribuição dos 102 pacientes com CCR de acordo com a localização, o estadiamento e a diferenciação do tumor.

<b>Variáveis</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
<b>Localização do tumor</b>	
Proximal	31 (30,4)
Distal	68 (66,7)
Mais de uma	3 (2,9)
<b>Estadio TNM</b>	
I	16 (15,7)
II	31 (30,4)
III	25 (24,5)
IV	23 (22,5)
Não identificado	7 (6,9)
<b>Estádio Astler-Coller</b>	
B1	17 (16,7)
B2	37 (36,3)
C1	7 (6,9)
C2	30 (29,4)
Não identificado	11 (10,7)
<b>Diferenciação do tumor</b>	
Bem diferenciado	26 (25,5)
Moderadamente diferenciado	63 (61,8)
Pouco diferenciado	12 (11,8)
Não identificada	1 (0,9)

## 2- Análise dos polimorfismos nos genes *CYP1A1*, *CYP1B1* e *CYP2C9*

### 2.1- Polimorfismo M1 no gene *CYP1A1*

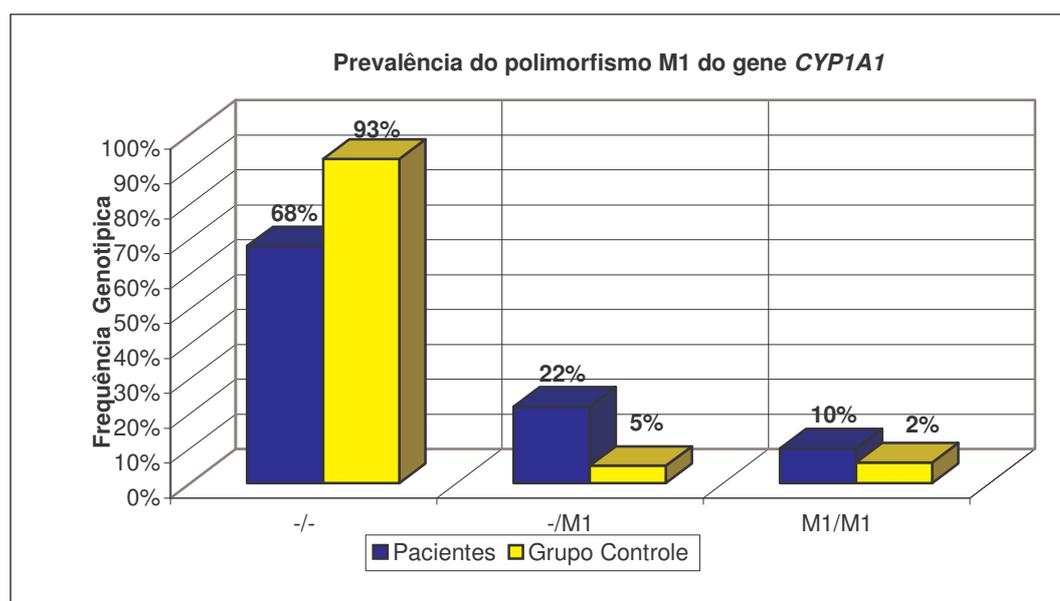
A frequência gênica do alelo M1 foi de 0.21 nos indivíduos portadores de CCR e 0.8 nos indivíduos do grupo controle (Tabela 8).

A Frequência Genotípica do polimorfismo M1 do gene *CYP1A1* está resumida no gráfico 2.

**Tabela 7:** Prevalência do alelo M1 em uma amostra de portadores de CCR esporádico e em uma amostra controle.

Alelo	Número de Alelos (%)	
	Indivíduos CCR	Grupo Controle
M1	43 (21)	37 (08)
Não M1	161 (79)	423 (92)
Total	204	460

$$\chi_{(1)}^{2 \text{ corr. Yates}} = 21,45 \text{ P}=0,0000036$$



**Gráfico 2:** Prevalência Genotípica do polimorfismo M1 do gene *CYP1A1* nas amostras teste e controle.

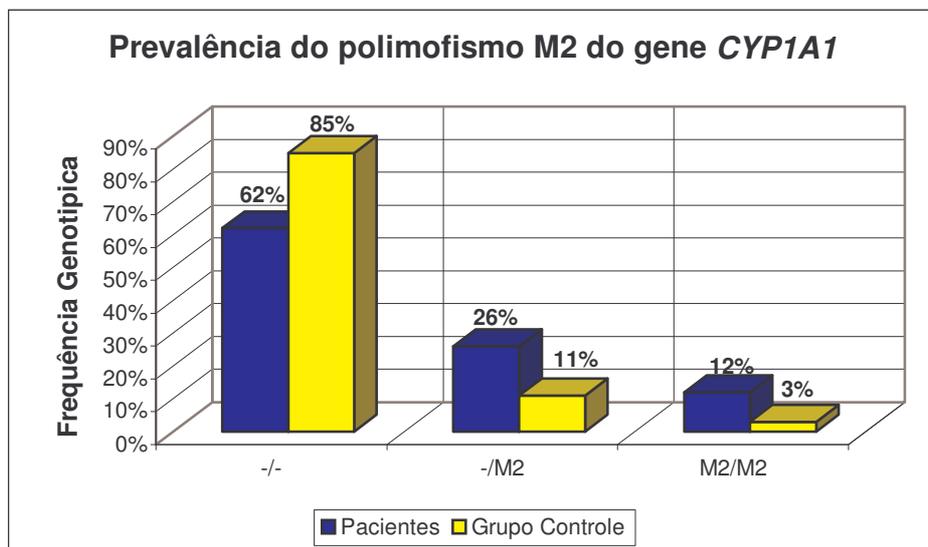
## 2.2- Polimorfismo M2 no gene CYP1A1

A prevalência do alelo M2 foi de 25% nos indivíduos portadores de CCR e 9% nos indivíduos do grupo controle (Tabela 9). A frequência genotípica do polimorfismo M2 do gene CYP1A1 está resumida no gráfico 3.

**Tabela 8:** Prevalência do alelo M2 na amostra teste e controle analisadas.

Alelo	Número de alelos (%)	
	Indivíduos CCR	Grupo Controle
M2	51 (25)	42 (09)
Não M2	153 (75)	418 (91)
Total	204	460

$$\chi_{(1)}^{2 \text{ corr. Yates}} = 28,25 \text{ P} = 0,0000001$$



**Gráfico 3:** Prevalência Genotípica do polimorfismo M2 do gene CYP1A1 na amostra teste e controle.

### 2.3- Distribuição Genotípica dos alelos M1 e M2 no gene CYP1A1

Como os polimorfismos M1 e M2 ocorrem no mesmo gene, na verdade eles são alelos e por isso devem ser analisados em conjunto (Tabela 10). Tanto a amostra de pacientes, como a controle, não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi_{(3)}^2 = 8.54$   $P < 0.05$  e  $\chi_{(3)}^2 = 30.13$   $P < 0,00001$ ).

**Tabela 9:** Distribuição genotípica dos alelos M1 e M2 do gene CYP1A1 em uma amostra de portadores de CCR esporádico e na amostra controle.

Alelo	Número de Alelos (%)		$\chi^2$	P	OR (IC)
	Indivíduos CCR	Grupo Controle			
N/N	35 (34.3)	177(76.9)	53.67	0.0000	0.16 (0.09-0.27)
M1/N	18 (17.6)	07 (03.1)	19.60	0.000009	6.83 (2.57-18.76)
M1/M1	10 (09.8)	12 (05.2)	1.72	0.18	1.97 (0.76-5.11)
M1/M2	05 (04.9)	06 (02.6)	0.55	0.22	1.92 (0.45-7.75)
M2/N	22 (21.6)	20 (08.7)	9.46	0.002	2.89 (1.42-5.86)
M2/M2	12 (11.8)	08 (03.5)	7.17	0.007	3.70 (1.35-10.30)
Total	102	230			

$$\chi_{(3)}^2 = 60,81 \text{ P}=0,00000000$$

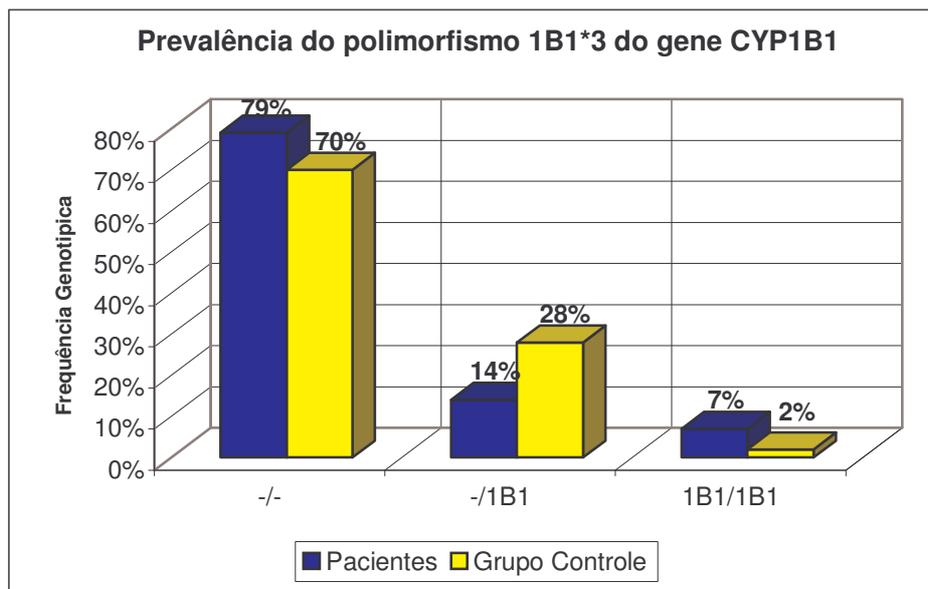
### 2.4- Polimorfismo 1B1\*3 no gene CYP1B1

A frequência gênica do alelo 1B1\*3 foi de 0.14 nos indivíduos portadores de CCR e 0.16 nos indivíduos do grupo controle (Tabela 11). Tanto a amostra de pacientes, quanto à amostra controle estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi_{(2)}^2 = 5.57$ ;  $P=0,061$  e  $\chi_{(2)}^2 = 0.13$ ;  $P=0.94$ , respectivamente). A Frequência Genotípica do polimorfismo 1B1\*3 do gene CYP1B1 está resumida no gráfico 4.

**Tabela 10:** Prevalência do alelo 1B1\*3 na amostra analisada.

Alelo	Número de Alelos (%)	
	Indivíduos CCR	Grupo Controle
1B1*3	28 (14)	74 (16)
Não 1B1*3	176 (86)	386 (84)
Total	204	460

$$\chi_{(1)}^{2 \text{ corr. Yates}} = 0.44 \text{ P}=0,50$$



**Gráfico 4:** Prevalência Genotípica do polimorfismo 1B1\*3 do gene CYP1B1 na amostra teste e controle.

## 2.5- Polimorfismo 2C9\*2 no gene CYP2C9

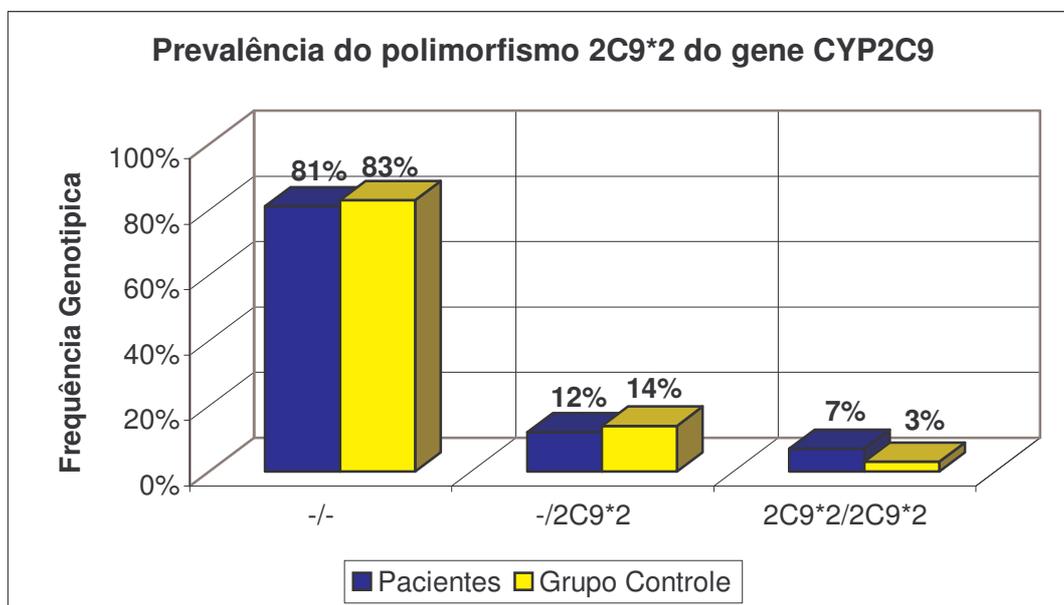
A frequência gênica do alelo 2C9\*2 foi de 0.13 nos indivíduos portadores de CCR e 0.11 nos indivíduos do grupo controle (Tabela 12).

A Prevalência Genotípica do polimorfismo 2C9\*2 do gene CYP2C9 está resumida no gráfico 5.

**Tabela 11:** Prevalência do alelo 2C9\*2 na amostra analisada.

Alelo	Número de Alelos (%)	
	Indivíduos CCR	Grupo Controle
2C9*2	26 (13)	48 (11)
Não 2C9*2	178 (87)	412 (89)
Total	204	460

$$\chi_{(1)}^{2 \text{ corr. Yates}} = 0,55 \text{ P}=0,46$$



**Gráfico 5:** Prevalência do polimorfismo 2C9\*2 do gene CYP2C9 na amostra teste e controle.

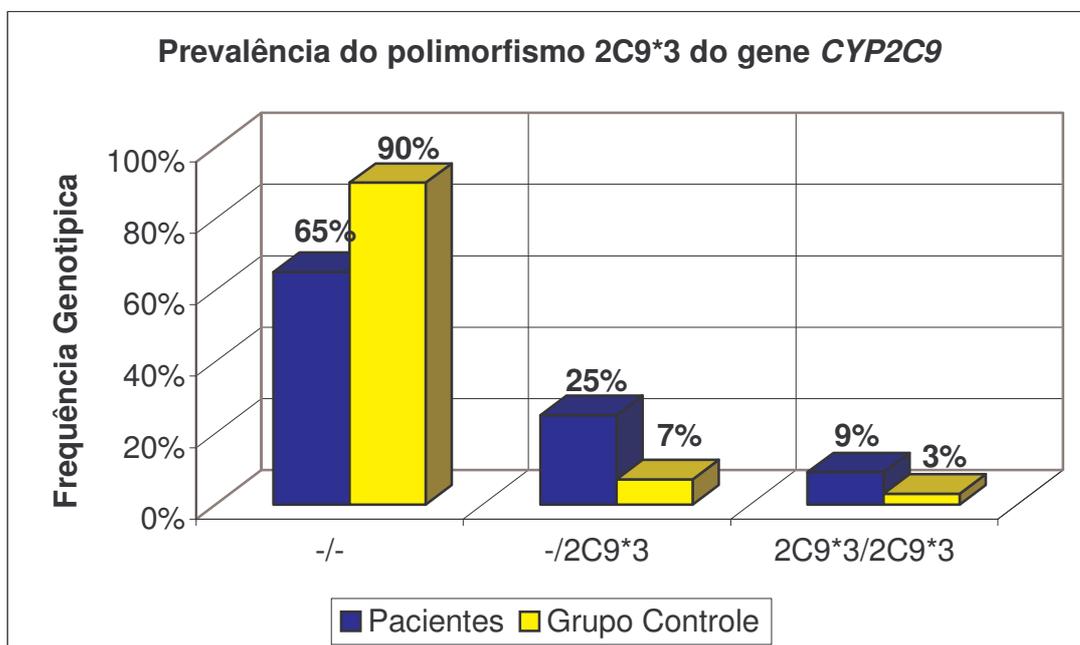
## 2.6- Polimorfismo 2C9\*3 no gene CYP2C9

A freqüência gênica do alelo 2C9\*3 nos cromossomos analisados foi de 22% nos indivíduos portadores de CCR e 7% nos indivíduos do grupo controle (Tabela 13). A Prevalência Genotípica do polimorfismo 2C9\*3 do gene CYP2C9 está resumida no gráfico 6.

**Tabela 12:** Prevalência do alelo 2C9\*3 na amostra analisada.

Alelo	Número de Alelos (%)	
	Indivíduos CCR	Grupo Controle
2C9*3	44 (22)	30 (07)
Não 2C9*3	160 (78)	430 (93)
Total	204	460

$$\chi_{(1)}^{2 \text{ corr. Yates}} = 30.81; P=0,0000000$$



**Gráfico 6:** Prevalência genotípica do polimorfismo 2C9\*3 do gene CYP2C9 na amostra teste e controle.

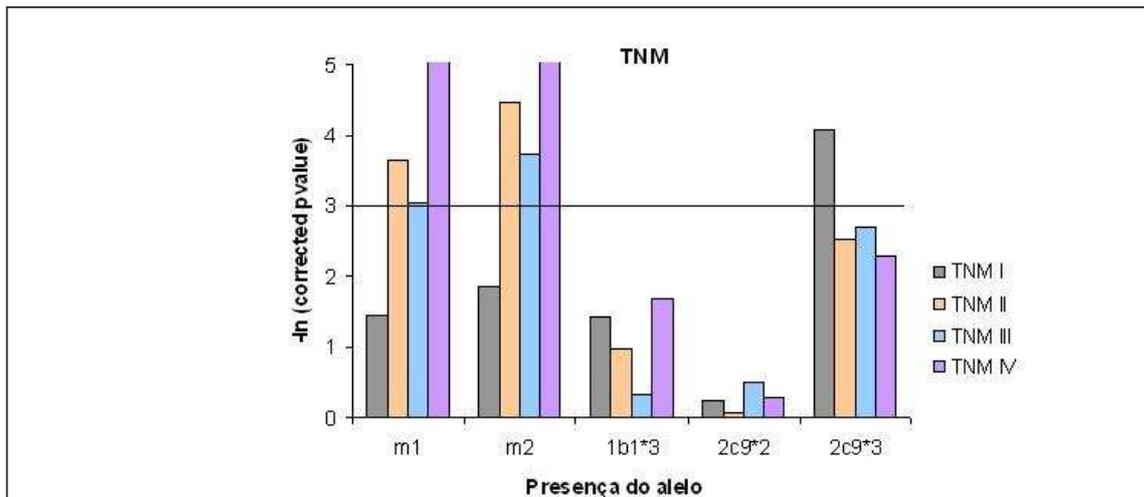
## 2.7- Distribuição Genotípica dos alelos \*2 e \*3 no gene CYP2C9

Como os polimorfismos \*2 e \*3 ocorrem no mesmo gene, na verdade eles são alelos e por isso devem ser analisados em conjunto (Tabela 14). Tanto as amostras de pacientes, como a controle, não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi_{(3)}^2 = 9.07$   $P < 0.05$ , e  $\chi_{(3)}^2 = 12.82$   $P < 0,02$ ).

**Tabela 13:** Distribuição genotípica dos alelos \*2 e \*3 do gene CYP2C9 em uma amostra de portadores de CCR esporádico e na amostra controle.

Alelo	Número de Alelos (%)		$\chi^2$	P	OR (IC)
	Indivíduos CCR	Grupo Controle			
N/N	49 (48,0)	175 (76,1)	24.07	0.0000009	0.29 (0.17-0.49)
*2/N	11 (10,8)	26 (11,3)	0.02	0.96	0.95 (0.42-2.11)
*2/*2	07 (06,9)	06 (02,6)	2.36	0.06	2.75 (0.80-10.16)
*2/*3	01 (1,0)	04 (01,8)	0.27	0.97	0.56 (0.02-5.75)
*3/N	25 (24,5)	12 (05,2)	24.65	0.0000007	5.90 (2.68-13.15)
*3/*3	09 (08,8)	07 (03,0)	3.96	0.04	3.08 (1.01-9.51)
Total	102	230			

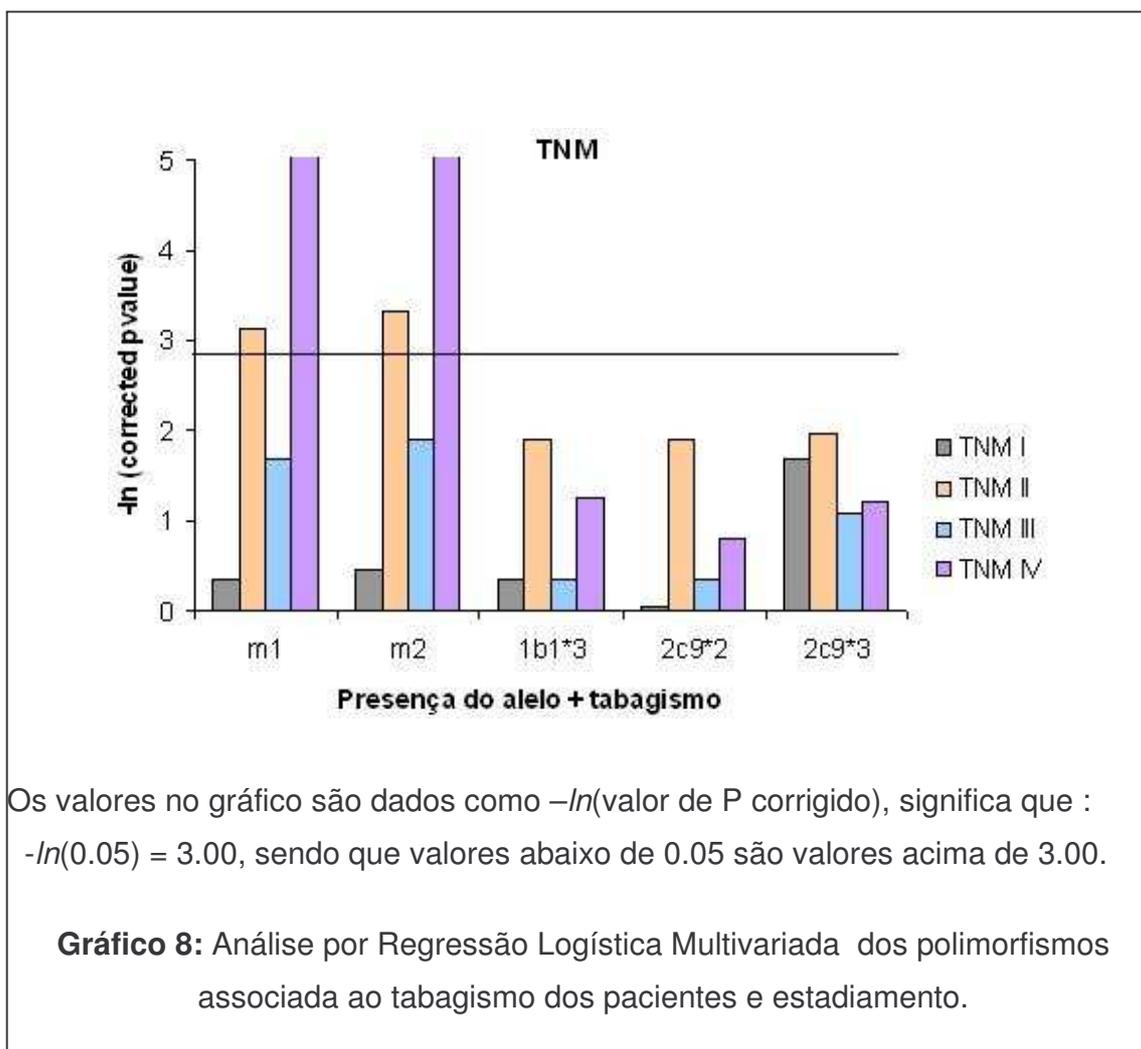
Na regressão logística multivariada verificamos que quando adicionamos a variável estadiamento (Gráfico 7), o polimorfismo M1 mostrou-se um fator de risco nos estadiamentos TNM II e IV, o M2 para os estadiamentos II, III e IV e o polimorfismo 2C9\*3 para o estadiamento TNM I.

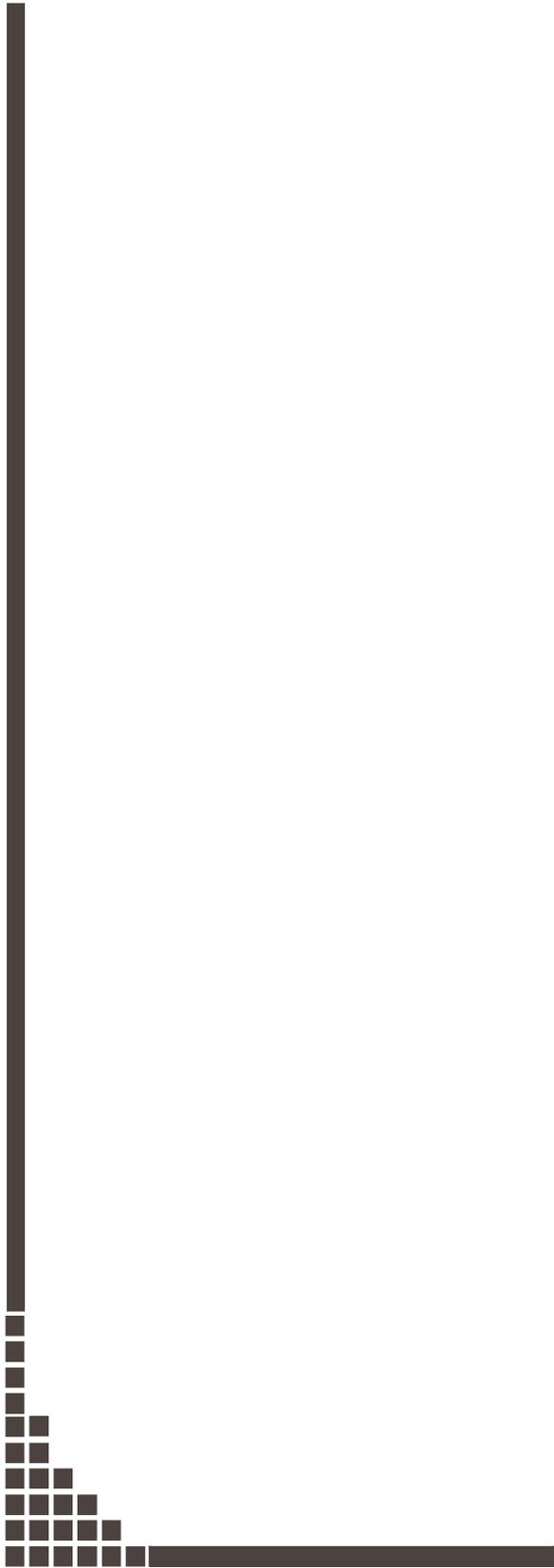


Os valores no gráfico são dados como  $-\ln(\text{valor de P corrigido})$ , significa que :  $-\ln(0.05) = 3.00$ , sendo que valores abaixo de 3.00 são valores acima de 0.05.

**Gráfico 7:** Análise por Regressão Logística Multivariada dos polimorfismos com o estadiamento do tumor

Quando adicionamos a variável tabagismo ao estadiamento (Gráfico 8), verificamos que apenas os polimorfismos M1 e M2 persistem como fatores de risco.





## DISCUSSÃO

O CCR tem sido uma das neoplasias malignas mais estudadas nas últimas décadas, devido à sua ocorrência e à alta mortalidade a ele atribuída. Sendo assim, seu comportamento biológico está entre os melhores estabelecidos dentre as neoplasias malignas, em países do hemisfério norte. Entretanto, vários de seus aspectos, como a etiologia e a fisiopatologia, ainda estão por ser determinado com exatidão.

Quando nossos pacientes foram distribuídos por idade, notamos que a idade média de manifestação, 59 anos, foi semelhante à observada em pacientes do hemisfério norte, 60 anos (Gertig & Hunter,1998). Entretanto 14 pacientes de nossa amostra apresentaram idade inferior a 45 anos, sendo que em 90% dos casos da doença, em países desenvolvidos, ocorrem em indivíduos com idade maior ou igual a 45 anos. Não podemos afastar a hipótese de que nos casos com idade de manifestação menor que 45 anos, apesar de não haver recorrência familiar, poderia ter ocorrido mutação de novo no gene APC e na verdade tratar-se de casos hereditários.

A distribuição dos nossos casos por etnia mostrou que a doença ocorreu predominantemente em caucasóides, de forma semelhante às descrições obtidas em países desenvolvidos(De Chello & Sheehan;2007). Temos sempre que fazer a ressalva de que a determinação da etnia é sempre muito difícil. No presente estudo, a diferenciação entre caucasóide e negróide foi baseada na cor da pele.

Também observamos que a maioria dos pacientes da nossa amostra com CCR eram tabagistas ou foram tabagistas no passado. A associação entre tabagismo e o risco de ocorrência do CCR foi observada, de forma consistente, em estudos controlados conduzidos por Heineman et al. 1995.

Observamos que em cerca de 70% dos nossos pacientes apresentaram tumores distais. Tumores proximais, em cólon ascendente, transverso e descendente, e combinações de tumores proximais e distais foram identificados nos 30% restantes. Freqüências similares de tumores proximais e distais, 38% e

62% respectivamente, foram descritas para a doença em outros países (Loktionov et al.,2001).

Quando os nossos pacientes foram distribuídos de acordo com o estadio da doença, cerca de metade do número deles a apresentou em suas formas mais avançadas, de acordo com descrições prévias (Deakin et al.,1996)

Também observamos que 88% dos tumores nos pacientes foram classificados como bem ou moderadamente diferenciados e apenas 12% como pouco diferenciados. Freqüências similares de tumores bem ou moderadamente diferenciados, 65 a 88%, e pouco diferenciados 12 a 17%, foram descritas por Loktionov et al. ,1998.

Em seu conjunto, os resultados clínicos deste estudo indicam que os nosso pacientes com CCR apresentaram características clínicas e anátomos-patológicas do tumor semelhantes às da doença em países desenvolvidos e, portanto, constituíram um grupo representativo da doença, em nosso meio.

Com relação à análise dos polimorfismos, verificamos que as mutações analisadas do gene CYP1A1 e CYP2C9, tanto na amostra controle quanto nos pacientes, não se encontravam em equilíbrio de Hardy e Weinberg. Esse fato pode ser explicado pelo fato de que as duas amostras foram selecionadas. Uma vez que esses polimorfismos se mostraram relacionados ao fenótipo, ao selecionar a amostra controle sem antecedentes familiares de CCR, estaremos selecionando uma amostra com menor prevalência de mutações e o inverso ocorreria na amostra de pacientes. No caso do gene CYP1B1, como ele parece não estar relacionado com o fenótipo CCR, sua mutação está em equilíbrio tanto na amostra selecionada quanto no grupo controle.

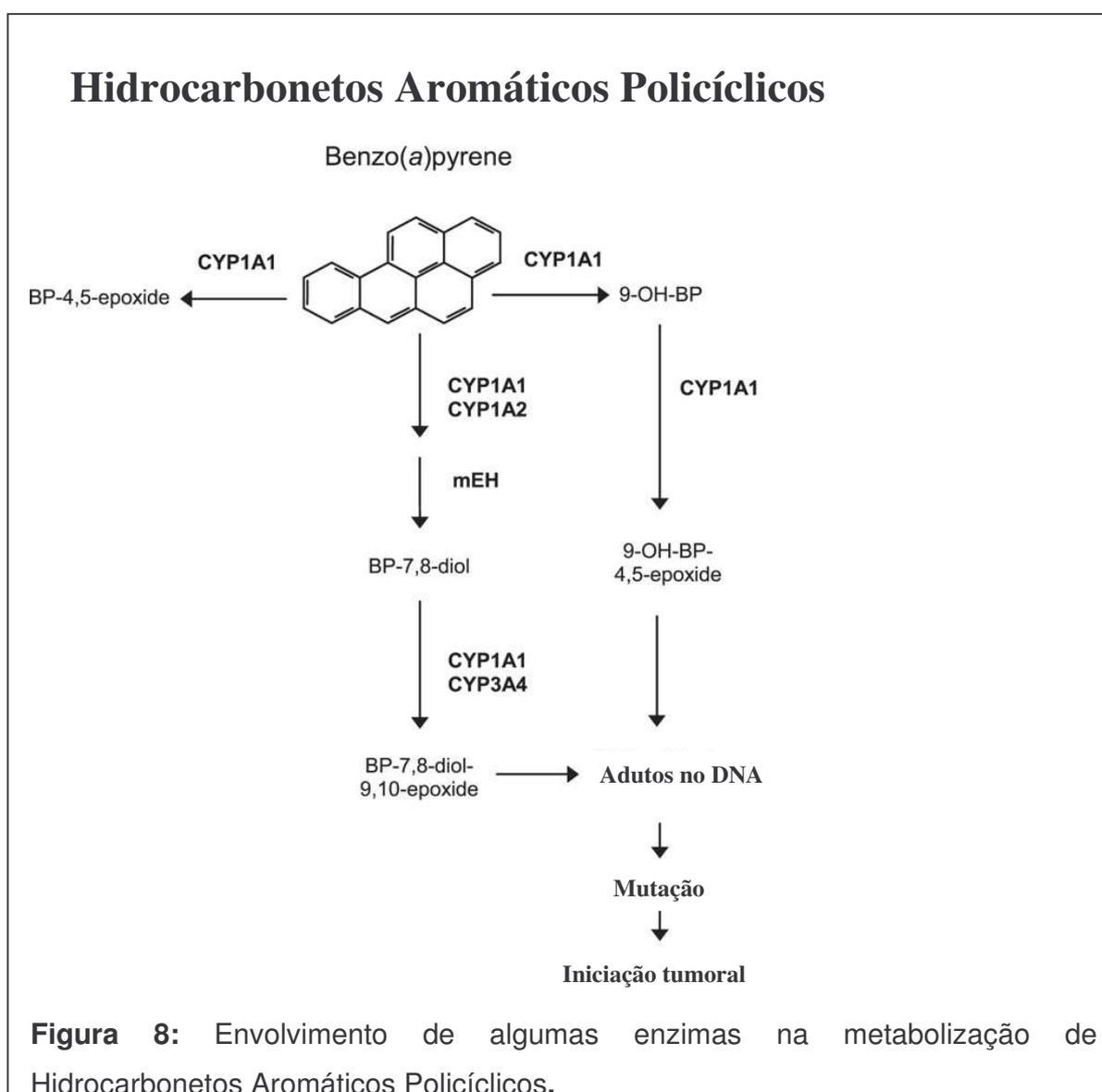
Na análise dos alelos M1 e M2, do gene CYP1A1, observamos que na análise dos alelos separadamente encontramos uma maior incidência dos alelos

mutantes entre os pacientes. Quando realizamos a análise por genótipos, verificamos que no grupo de pacientes temos uma diminuição do genótipo N/N (sem M1 e M2) e um acúmulo dos heterozigotos tanto M1 quanto M2 e de homozigotos M2, quando comparado ao grupo controle. Com isso, indivíduos sem os alelos M1 e M2, teriam um efeito protetor com relação ao CCR, enquanto que os indivíduos portadores de um alelo M1 ou M2 e os homozigotos M2 teriam um aumento de risco que seriam respectivamente de 6, quase 3 (2,89) e quase 4 vezes (3.70).

Esse aumento do risco pode ser explicado pelo fato de que os mutantes M1 e M2 levam a um aumento da atividade enzimática. Como podemos avaliar no Esquema 1, o CYP1A1 estaria envolvido na metabolização dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos, resultando em vários compostos, sendo que alguns podem formar adutos no DNA, que levariam a mutações, que poderiam levar a iniciação tumoral. Estes resultados foram similares com os estudos de Sivaraman et al., 1994; Slattery et al., 2004; Nan et al. 2005 e Li et al., 2004.

No Caso do CYP2C9, na análise individualizada dos mutantes, apenas o alelo \*3 parecer estar relacionado ao CCR ( $\chi^2_{(1)} \text{ corr. Yates} = 30.81$ ;  $P=0,0000000$ ). Tanto o alelo \*2 quanto o \*3 levam a uma diminuição da atividade enzimática, mas o alelo \*3 seria o mais deficitário (80%). Os genótipos que estariam associados ao fenótipo seriam o heterozigoto e o homozigoto para a mutação \*3. O genótipo N/N (sem as mutações \*2 e \*3) teria um efeito protetor, enquanto que o heterozigoto \*3 traria um risco 6 vezes maior (5.90) e o homozigoto \*3, três vezes. O homozigoto \*2 apresentou um  $P = 0.06$  (próximo 0.05- limítrofe), mas a OR mostrou um risco quase 3 vezes maior (2.75). Talvez com um aumento do tamanho amostral esse efeito se mostre significativo em termos estatísticos. Nosso achados é similar ao encontrado por Sache et al., 2002.

Um viés que poderia estar ocorrendo em nossa análise é o fato de termos em nossa amostra de pacientes 14 indivíduos com idade inferior a 45 anos. No caso dos polimorfismos M1 e M2 do CYP1A1, refizemos a análise excluindo esses pacientes, e as associações encontradas persistiram e até ampliaram a significância dos valores estatísticos ( $\chi_{(3)}^2 = 63.25$ ;  $P=0,0000000$ ). O mesmo ocorrendo com relação aos polimorfismos do gene CYP2C9 ( $\chi_{(3)}^2 = 44.27$ ;  $P=0,0000000$ ).



Também observamos uma associação quanto a presença dos polimorfismos M1 e M2 e o grau de estadiamento IV em nossos pacientes, uma vez que existe uma grande presença desses polimorfismos nos estadiamentos mais avançados da doença. Já o polimorfismo 2C9\*3 para o estadiamento TNM I, parecendo estar então relacionado com um melhor prognóstico da doença. Esses resultados seriam apenas iniciais, sendo necessário estudos de acompanhamento com maior número de pacientes em cada estadiamento.



## CONCLUSÕES

- Nossos resultados indicam que indivíduos sem os alelos M1 e M2 do gene CYP1A1 teriam um efeito protetor com relação ao CCR, enquanto que os indivíduos portadores de um alelo M1 ou M2 e os homozigotos M2 teriam um aumento de risco que seriam respectivamente de 6, quase 3 (2,89) e quase 4 vezes (3.70).

-Com relação ao gene CYP2C9, o genótipo N/N (sem as mutações \*2 e \*3) teria um efeito protetor, enquanto que o heterozigoto \*3 traria um risco 6 vezes maior (5.90) e o homozigoto \*3 , três vezes.

- No caso do polimorfismo 1B1\*3 do gene CYP1B1, parece não haver relação com o fenótipo CCR,

- Nossos resultados sugerem que a presença dos alelos M1 e M2 parecem estar relacionados a um pior prognóstico da doença, enquanto que \*3 do CYP2C9 traria um melhor prognóstico. Maiores estudos são necessários para confirmar esses achados.



**R**EFERÊNCIAS  
**B**IBLIOGRÁFICAS

Astler, V. B. & Coller, F. A.: **The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum.** *Ann. Surg.* 1954, 846-851.

Bailey, R. L.; Roodi, N.; Verrier, C. S.; Yee, C. J.; Lau, A. F. and Parl, F. F.: **Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasian and African Americans.** *Cancer Res.* 1998, 58:65-70.

Broders, A. C. (1925): **The grading of carcinoma.** *Minn. Med.* 8:726-730.

Burt, R. W. & Groden, J.: **The genetic and molecular diagnosis of adenomatous polyposis coli.** *Gastroenterology.* 1993, 104:1211-1214.

Burt, R. W.; Bishop, D. T.; Lynch, H. T.; Rozen, P. & Winawer, S. J.: **Risk and surveillance of individuals with heritable factors for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer.** *Bull World Health Organ.* 1990, 68(5):655-655.

Butler, W. J.; Ryan, P. and Roberts-Thompson, C.: **Risk for colorectal carcinoma.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2001, 16:631-635.

Center For Disease Control And Prevention, 2007. Disponível em <http://www.cdc.gov>. Acessado em 22 de maio de 2007.

Chang, H.; Su, J.; Huang, C. C.; Liu, L. C.; Tsai, C. H.; Chou, M. C. et al.: **Using a combination of cytochrome P4501B1 and  $\beta$ -catenin for early diagnosis and prevention of colorectal cancer.** *Cancer Detection and Prevention.* 2005, 29:562-569.

Chen, K.; Jiang, Q. and He H.: **Relationship between metabolic enzyme polymorphism and colorectal cancer.** *World J Gastroenterol.* 2005, 11:331-335.

Coon, M.J. (2005): **Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:1-25. Review.

Daly, A. K. (2003): **Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes.** *Blackwell Publishing Fundamental & Clinical Pharmacology.* 17:27-41.

De Chello, L. M. & Sheehan, T. J.: **Spatial analysis of colorectal cancer incidence and proportion of late-stage in Massachusetts residents: 1995-1998.** *Int J Health Geogr.* 2007, Jun 4;6:20.

De Waziers, M.; Elder, J.; Hendrickse, C.; Peckhan, D.; Baldwin, D.; Pantin, C.; et al.: **Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers.** *Carcinogenesis.* 1996, 17 (4):881-884.

Deakin, M.; Elder, J.; Hendrickse, C.; Peckhan, D.; Baldwin, D.; Pantin, C.; et al.: **Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer.** *Carcinogenesis.* 1996, 17 (4):881-884.

Fearon, E.R.; Hamilton, S.R.; Vogelstein, B.: **Clonal analysis of human colorectal tumors.** *Science.* 1992, 238:138-144.

Filho, V.W. And Zago, M. A.: **Modern Cancer Epidemiology Genetic polymorphism and environment.** *Cancer Contemporary Epidemiological Reserch.* 2005, 39:490-497.

Finley, G.G.; Schulz, N.T.; Hill, S.A.; Geiser, J.R.; Pipas, J.M.; Meisler, A.I.: **Expression of the myc gene family in different stages of human colorectal cancer.** *Oncogene.* 1989, 4(8):963-971.

Freedman, A. N.; Michalek, A. M.; Marshall, J. R.; Mettlin, C. J.; Petrelli, N. J.; Zhang, Z-F.; et al.: **The relationship between smoking exposure and p53 overexpression in colorectal cancer.** *Br. J. Cancer.* 2002, 73:902-908.

Freitas, L. L. L.; Lopes, A.; Rossi, B. M.; Nakagawa, W. T.; Bachega, W. Jr.: **Adenocarcinoma de cólon: fatores prognóstico em 60 pacientes tratados com cirurgia curativa.** *Revista Col. Bras. Cir.* 1997, 24:29-32.

Gerhardsson De Verdier, M.; Hagman, U.; Peters, R. K.; Steineck, G.; Overvik, E.: **Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm.** *Int. J. Cancer.* 1991, 49: 520-525.

Gertig, D. M. & Hunter, D. J.: **Genes and environment in the of colorectal cancer.** *Cancer Biology.* 1998, 8:285-298.

Gibson, P.; Gill, J. H.; Khan, P. A.; Seargent, J. M.; Martin, S. W.; Batman, P. A.ç et al.: **Cytochrome P4501B1 is overexpressed in human implications for drug development.** *Molecular Cancer Therapeutics.* 2003, 2:527-534.

Goldstem, J. A. & De Morais,S. M.: **Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily.** *Pharmacogenetics.* 2002, 23:1839-1849.

Gray, I. C.; Nobile, C; Muresu, R; Ford, S.; Spurr, N. K.: **A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24.** *Genomics.* 1995, 28:328-332.

Greene, F. L.; Page, D. L.; Fleming, I. D.; Fritz, A. G.; Balch, C. M.; Haller, D. G.; et al.: **AJCC Cancer Staging Manual.** 2002, 6 th ed. New York: Sapinger-Verlarg.

Guengerich,F.P.; Chun,Y.; Kim,D.; Gillam,E.M.J. And Shimada,T.: **Cytochrome P4501B1: a target inhibition in anticarcinogenesis strategies.** *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2003, 523:173-182.

Guillem, J. G.; Paty,P. B.; Rosen, N. Molecular biology of colorectal cancer. In: Cohen, A.M.; Winawer,S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L.: **Cancer of the colon, rectum, and anus.** New York, McGraw-Hill, 1995. p.149-156.

Harnden, P.; Allam, A.; Joyce, A. D.; Patel, A.; Selby, P. & Southgate, J.: **Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease.** *Histopathology.* 1995 Aug;27(2):169-74.

Heineman E. F., Gao Y. T., Dosemeci M., Mclaughlin J. K.: **Occupational risk factors for brain tumors among women in Shanghai, China.** *J Occup Environ Med.* 1995, Mar;37(3):288-93.

Hill, M.J.: **Dietary Factors: The Intestinal Milieu.** In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. *Cancer of the Colon, Rectum, and Anus.* 1995, p.27-34.

Hou, L.; Chatterjee, N.; Huang, W. Y.; Baccarelli, A.; Yadavalli, S.; Yeager, M.; et al. **CYP1A1 Val<sub>462</sub> and NQO1 Ser<sub>187</sub> polymorphisms, cigarette use, and risk for colorectal adenoma.** *Carcinogenesis.* 2005, 26:1122-1128.

Hubner, R. A.; Muir, K. K.; Liu, J. F.; Logan, R. F. A.; Grainge, M.; Armitage, N.; et al.: **Genetic Variants of UGT6 Influence Risk of Colorectal Adenoma Recurrence.** *Clin Cancer Res.* 2006, 21:12-6585-6589.

Hurstone, D. P.; Lobo, A. J.; Karegeh, M. A.: **High-magnification-choromoscopic-colonoscopy: A role for screening and treatment in attenuated familial adematous polyposis ?.** *Journal of Gastroenterology and hepatology.* 2000, 17:929-930.

Inca -Instituto Nacional Do Câncer.: **Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil.** Disponível em <<http://www.inca.org.Br>>. Acesso em 04 jan 2007.

Ingelman-Sundberg, M. (2002): **Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity.** *Toxicology.* 181:447-452.

Ionov, Y.; Penado, M. A.; Malkhosyan, S.; Shibata, D.; Peruchi, M.: **Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis.** *Nature.* 1993, 363 (6429):558-561.

Kawajiri, K.; Watanabe, J.; Gotoh, O.; Tagashira, Y.; Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y.: **Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene.** *Eur J Biochem.* 1986 Sep 1;159(2):219-25.

Kawajiri, K.; Nakachi, K.; Imai, K.; Watanabe, J. and Hayashi,S.: **The CYP1A1 gene and cancer susceptibility.** *Critical Rev Oncol.Hemat.* 1993,14:77-87.

Ladero, J. M.; Garcia-Agundez, J. A., Benitez, J.: **Enzymatic polymorphisms and lung cancer.** *Med Clin.* 1998; 111:465-470.

Lai, J.; Vesprini, D.; Chu, W.; Jernstrom, H. and Narod, S. A.: **CYP gene polymorphisms and early menarche.** *Molecular Genetics and Metabolism.* 2001, 74:449-457.

Leung, A. Y. H.; Chow, H. C. H.; Kwong, Y. L.; Lie, A. K. W.; Fung, A. T. K.; Chow, W. H.; et al.: **Genetic polymorphism in exon 4 of cytochrome P450 may be associated with warfarin sensitivity in Chinese patients.** *Blood.*2001, 98:2584-2587.

Li,Y.; Millikan, R. C.; Bell, D. A.; Cui, L.; Tse, C. K. J.; Newman, L. ; et al.: **Cigarette smoking, cytochrome P450 polymorphisms, and breast cancer among African-American and white women.** *Breast Cancer Research* .2004, 6:R460-R473.

Liao, L.-H.; Zhang, H.; Lai, M. P.; Lau, K. W.; Lai, A. K. C.; Zhang, J. H.; et al.: **The association of CYP2C9 gene polymorphisms with colorectal carcinoma in Han Chinese.** *Clinica Chimica Acta.*2007, 380:191-196.

Loktionov, A.; Watson, M. A.; Ter, M.; Stebbings, W. S. L.; Speakman, C. T. M.; Bingham,S.A. **Glutathione transferase null genotype, brocoli, and lower prevalence of colorrectal adenomas.** *Câncer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 7:647:652, 1998.

Louro, L. D.; Lierena Jr, J. C.; Vieira-Mello, M. S.; Ashton-Prolla, P. ; Conforti-Fróes, N.: **Genética Molecular do Câncer.** 2º,São Paulo:MSG Produção Editorial.2002.p.31-47.

Miller, M. S.; Juchau, M. R.; Guengerich, F.P.; Nebert, D.W.; Raucy, J. L.: **Drug metabolic enzymes in developmental toxicology.** *Fundam Appl Toxicol.* 1996, 34(2):165-75. Review.

Morson, B.C. (1976): **Genesis of Colorectal Cancer.** *Clin Gastroenterol.* 5(3):505-525.

Moshkowitz, M. & Abner, N.: **Differences in Incidence and Distribution of Colorectal Cancer among Races and Ethnic Societies: Lifestyle, genes or both?** . *Digestion.* 2005, Nov (23).

Nan, H. M.; Park, J. W.; Song, Y.I.; Yun, H. Y.; Park, J.S.; Hyun, T.; et al.: **Kimchi and soybean pastes are risk factors of gastric cancer.** *World J Gastroenterol.* 2005, 11(21):3175-81.

Nelson, H.; Petrelli, N.; Carlin, A.; Couture, J.; Flesman, J. and Guillem, J.: **Guidelines 200 for colon and rectal cancer surgery.** *J. Natl. Cancer Inst.* 2001, 93:583-596.

Omura, T. & Sato, R.: **The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes.** *J Biol Chem.* 1964, 239:2379-2385.

Peltomaki, P.; Aaltonen, L. A.; Sistonen, P.; Pylkkanen, L.; Mecklin, J. P.; Jarvinen, H.; et al.: **Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer.** *Science.* 1993, 260:810-812.

Petros, J. G.; Augustinos, P.; Lopex, M. J.: **Pelvic exenteration for carcinoma of the colon and rectum.** *Semin Surg Oncol.* 1999, 17(3) 206-212.

Pierce, B. (2004): **Genética: um enfoque conceitual.** 1º, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 432-438.

Sachse, C.; Smith, G.; Wilkie, M. J. V.; Barrett, J. H.; Bishop, D. T.; Wolf, C. R. and The Colorectal Cancer Study Group.: **A pharmacogenetic study to investigate**

**the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer.** *Carcinogenesis*. 2002, 23:1839-1849.

Santiago, C.; Brandrés, F. & Gómez-Gallego, F.: **Polimorfismos de Citocromo P450: papel como marcador biológico.** *Medicine del trabajo*. 2002; 11:130-140.

Sasaki, M.; Tanaka, Y.; Kaneuchi, M.; Sakuragi, N. and Dahiya, R.: **CYP1B1 gene polymorphism have higher risk for endometrial cancer, and positive correlations with receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  expressions.** *Cancer Research*. 2003, 63:3913-3918.

Sasaki, M.; Tanaka, Y.; Okino, S. T.; Nomoto, M.; Yonezawa, S.; Nakagawa, M.; et al.: **Polymorphisms of the CYP1B1 gene as risk factors for human renal cell cancer.** *Clinical Research*. 2004, 10:2015-2019.

Schiffman, M. H. & Felton, J. S.: **Fried foods and the risk of colon cancer.** *Am. J. Epidemiol.* 1990, 131:376-378.

Schottenfeld, D.; Warshauer, M. E.; Zaubler, A. G.: **Study of cancer mortality and incidence in wood shop workers of the General Motors Corporation: report prepared for the Occupational Health Advisory Board of United Auto Workers**, 1980.

Schwarz, U.I.: **Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C9 gene.** *Eur J Clin Inves*. 2003, 33:23-30.

Sivaraman, L.; Leatham, M. P.; Yee, J.; Wilkens, L. R.; Lau, A. F.; Le Marchand L.: **CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer.** *Cancer Res*. 1994 Jul 15;54(14):3692-5.

Slattery, M.L.; Samowitz, W.; Ma, K.; Murtaugh, M.; Sweeney, C.; Levin, T. R.; et al.: **CYP1A1, cigarette smoking, and colon and rectal cancer.** *Am J Epidemiol*. 2004, 160(9):842-852.

Slattery, M.L.; Samowitz, W.; Murtaugh, M.; Sweeney, C.; Levin, L. R. and Neuhausen, S.: **CYP1A1, cigarette smoking and rectal cancer.** *American Journal of Epidemiology*.2004,160:842-852.

Song, N.; Tan, W.; Xing, D. and Lin, D.: **CYP 1A1 polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China.** *Carcinogenesis*. 2001, 22(1):11-6.

Swanson, G.M.; Belle, S. H.; Burrows, R. W.: **Colon cancer incidence among model markers and pattern markers in the automobile manufacturing industry; a continuing dilemma.** *J. Occup. Med.* 1985, 27:567-569.

Tang, Y. M.; Wo, Y. Y. P.; Stewart, J.; Hawkins, A. L.; Griffin, C. A.; Suter, T. R.; et al.: **Isolation and characterization of the human cytochrome P-450 CYP1A1 gene.** *J. Biol. Chem.* 271:28324-28330.

Taube, J.; Halsall, D. and Baglin, T.: **Influence of cytochrome P-450 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment.** *Blood*. 2000, 96:1816-1819.

Tranah, G. J.; Chan, A. T.; Giovannucci, E.; Ma, J.; Fuchs, C. and Hunter, D.J. : **Epoxide hydrolase and CYP2C9 polymorphisms, cigarette smoking and risk of colorectal carcinoma in the nurses health study and physicians Health study.** *Molecular Carcinogenesis*. 2005, 44:21-30.

Turner, F.; Smith, G.; Satche, C.; Lightfoot, T.; Garner, R.C. Wolf, C.R.; et al.: **Vegetable, Fruit and meat consumption and potential risk modifying genes in relation to colorectal cancer.** *Int. J. Cancer*. 2004, 112:259-264.

Waye, J. D.; Tedesco, F. J.; Avella, J. R.; Villalobos, M. M.: **Diagnostic implications of the spatial distribution of colonic mass lesions (polyps and cancers). A prospective colonoscopic study.** *Gastrointest Endosc*.1980;26:95-97.

Winawer, S. J.; Cohen, A. M.: **Overview of adenocarcinoma of the colon and rectum.** *McGraw-Hill*.1995, p 7-10.

Winawer, S. J.; Fletcher, R. H.; Miller, L.; Godlee, F.; Stolar, M.H.; Mulrow, C.D.; et al.: **Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale.** *Gastroenterology*. 1997, 112(2):594-642.

Woodhead, J. L.; Fallon, R.; Figuered, H.; Longdale, J.; Malcon, A. D. B. **Alternative methodology of gene diagnosis.** In: Daves, K. E. *Human genetic disease-a practical approach*. 1986, pp51- 64.

Wrongdiagnosis. **Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no mundo.** Disponível em < [www.wrongdiagnosis.com/](http://www.wrongdiagnosis.com/) >. Acesso em 10 jun 2007.

Zinkin, L. D. (1983): **A critical review of the classification and staging of colorectal cancer.** *Dis. Colum Rectum*, 26:37-43.



**A**nexos

**Anexo 1:** Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o CCR.

---

<b>T<sub>x</sub></b>	Informações insuficientes para a avaliação do tumor primário
<b>pT<sub>0</sub></b>	Nenhuma evidência de tumor primário
<b>pT<sub>is</sub></b>	Carcinoma in situ
<b>pT<sub>1</sub></b>	Tumor se estende até a submucosa
<b>pT<sub>2</sub></b>	Tumor se estende até a mucosa própria
<b>pT<sub>3</sub></b>	Tumor ultrapassa a muscular própria até a subserosa ou tecidos pericólicos não peritoniais ou perirretais
<b>pT<sub>4</sub></b>	Tumor se estende diretamente até outros órgãos ou tecidos, ou perfura o peritônio visceral
<b>N<sub>x</sub></b>	Informações insuficientes para a avaliação de linfonodos regionais
<b>pN<sub>0</sub></b>	Linfonodos sem metástases
<b>pN<sub>1</sub></b>	Metástases em 1 a 3 linfonodos pericólicos ou perirretais
<b>pN<sub>2</sub></b>	Metástases em 4 ou mais linfonodos pericólicos ou perirretais
<b>pN<sub>3</sub></b>	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
<b>M<sub>x</sub></b>	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
<b>M<sub>0</sub></b>	Sem metástases distantes
<b>M<sub>1</sub></b>	Metástase distante presente

---

**Anexo 2:** Grupos de estadiamento e características TNM do CCR.

<b>Estadio</b>	<b>Código</b>
Estadio 0	$pT_{is,p}N_0,M_0$
Estadio I	$pT_{1,p}N_0,M_0$
Estadio II	$pT_{2,p}N_0,M_0$
	$pT_{3,p}N_0,M_0$
Estadio III	$pT_{4,p}N_0,M_0$
	qualquer $pT_{,p}N_1,M_0$
Estadio IV	qualquer $pT_{,p}N_2,M_0$
	qualquer $pT_{,p}N_3,M_0$
	qualquer $pT$ , qualquer $pN,M_1$

**Anexo 3:** Critérios de classificação do sistema de estadiamento de Astler-Coller do CCR

<b>Estádio</b>	<b>Invasão</b>
A	Tumor confinado à mucosa
B1	Não ultrapassa a muscular própria; sem metástases em linfonodos
B2	Ultrapassa a muscular própria; sem metástases em linfonodos
C1	Não ultrapassa a muscular própria; presença de metástases em linfonodos
C2	Ultrapassa a muscular própria; presença de metástases em linfonodos

CEP, 28/03/06.  
(Grupo I)

**PARECER PROJETO:** Nº 064/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0044.0.146.000-06

#### **I-IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO: “INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DOS GENES CYP1A1, CYP1B1 E CYP2C9 NA SUSCETIBILIDADE AO ADENOCARCINOMA COLORRETAL ESPORÁDICO”**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Lillian Barbosa de Queiroz Rossanese

**INSTITUIÇÃO:** Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 10/02/06

#### **II - OBJETIVOS**

Investigar a presença das mutações m1 e m2 no gene CYP1A1, a presença dos polimorfismos \*2 e \*3 no gene CYP2C9 e o polimorfismo no códon 432 no gene CYP1B1 em uma amostra de 102 indivíduos com câncer colorretal esporádico e 300 indivíduos controle.

#### **III - SUMÁRIO**

Neste estudo, será investigado a presença das mutações m1 e m2 no gene CYP1A1, a presença dos polimorfismos \*2 e \*3 no gene CYP2C9 e o polimorfismo no códon 432 no gene CYP1B1, relacionando-os com o grau histológico dos tumores e a apresentação clínica da doença em 102 indivíduos com CCR esporádico e 300 indivíduos controle utilizando material genético do banco do Laboratório de Genética Molecular da FCM-UNICAMP. Os dados serão analisados através de testes estatísticos adequados.

#### **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

É um estudo observacional, prospectivo e analítico que utilizará amostras de peças do Banco do Laboratório de Genética Molecular, o que dispensa a utilização do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Apresenta orçamento. O protocolo atende a Resolução 196/96,

#### **V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter

aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o 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.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

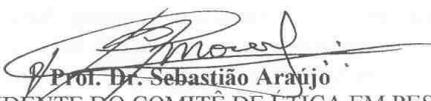
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de março de 2006.

  
Prof. Dr. Sebastião Araújo  
VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

**Anexo 4: Pacientes portadores Cancer Colorretal esporádico**

Nº Caso	Paciente	Sexo	Etnia	Idade ao diagnóstico	CYP1A1		CYP1B1	CYP2C9		Estadiamento		Hábito Tabagista	Grau de diferenciação ao adenocarcinoma
					m1	m2	1b1*3	2c9*2	2c9*3	TNM	Astler-Coller		
29	A.O.S.F.	F	C	70	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	II	B2	NT	moderadamente diferenciado
30	J.J.S.	M	N	83	+/+	-/-	+/-	-/-	-/-	IV	NR	NT	pouco diferenciado
31	J.T.	M	C	73	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	I	B1	NT	bem diferenciado
32	V.E.	M	C	59	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	IV	C2	T	bem diferenciado
33	M.A.I.P.	F	C	55	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	I	B1	T	bem diferenciado
34	J.S.M.	M	C	57	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	III	C2	NT	moderadamente diferenciado
35	M.V.	M	A	51	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	0	A	T	bem diferenciado
36	L.A.R.S.	F	C	24	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	III	C2	NT	moderadamente diferenciado
37	A.G.S.	F	C	55	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	I	B1	NT	moderadamente diferenciado
38	A.C.S.	F	C	62	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	III	C2	NT	NA
39	A.C.F.	M	C	68	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	II	B2	NT	moderadamente diferenciado
40	A.V.F.	M	C	46	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	II	B2	T	moderadamente diferenciado
41	L.F.S.	M	C	70	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	II	B2	ET	bem diferenciado
42	O.P.	M	C	48	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	NR	NR	ET	bem diferenciado
43	M.V.	F	C	70	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	II	B2	NT	bem diferenciado
44	A.P.	M	C	45	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	III	C2	T	bem diferenciado
45	O.F.	F	C	76	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	III	C2	NT	moderadamente diferenciado
46	V.S.C.	F	N	59	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	I	B1	ET	moderadamente diferenciado
47	M.P.	M	C	49	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	III	C1	NT	bem diferenciado
48	R.S.S.	M	C	35	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	IV	C2	NT	moderadamente diferenciado
49	J.O.E.	M	C	74	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	II	B2	T	moderadamente diferenciado
50	G.P.A.	F	C	56	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	I	B1	T	moderadamente diferenciado
51	D.F.A.	M	C	50	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	I	B2	ET	pouco diferenciado
52	D.J.S.	M	CC	55	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	II	B2	NT	pouco diferenciado
53	P.A.R.	M	C	75	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	I	B1	NT	moderadamente diferenciado
54	L.B.O.	M	C	55	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	II	C2	NT	moderadamente diferenciado
55	L.S.	F	C	58	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	I	C2	NT	moderadamente diferenciado
56	J.A.P.C.	F	C	54	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	I	B2	T	moderadamente diferenciado

Nº Caso	Paciente	Sexo	Etnia	Idade ao diagnóstico	CYP1A1		CYP1B1	CYP2C9		Estadiamento		Hábito Tabagista	Grau de diferenciação ao adenocarcinoma
					m1	m2	1b1*3	2c9*2	2c9*3	TNM	Astler-Coller		
57	E.M.S.	F	C	69	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	III	B2	NT	moderadamente diferenciado
58	R.F.R.	F	C	27	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	II	NR	NT	bem diferenciado
59	G.M.	M	C	68	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	II	B2	T	moderadamente diferenciado
60	I.T.L.	F	C	75	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	I	C2	NT	moderadamente diferenciado
61	M.I.F.M.	F	C	67	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	IV	C1	NT	moderadamente diferenciado
62	M.F.C.	F	C	57	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	III	B2	T	moderadamente diferenciado
63	J.M.A.	F	N	71	-/-	+/+	-/-	+/-	-/-	IV	C2	NT	moderadamente diferenciado
64	M.M.S.S.	F	C	40	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	II	C2	T	moderadamente diferenciado
65	E.S.	F	C	50	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	NR	B2	T	moderadamente diferenciado
66	A.C.S.	M	C	51	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	II	B1	T	moderadamente diferenciado
67	G.B.M.N.	M	C	36	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	NR	C2	NT	pouco diferenciado
68	R.N.M.C.	F	C	29	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	III	C2	NT	moderadamente diferenciado
69	B.A.	M	C	47	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	II	C2	T	moderadamente diferenciado
70	L.B.L.	F	C	41	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	III	B2	NT	moderadamente diferenciado
71	E.S.F.	F	C	52	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	II	B2	NT	pouco diferenciado
72	A.M.S.	F	N	60	-/-	-/-	+/+	-/-	+/-	I	C2	NT	bem diferenciado
73	C.G.S.	F	C	74	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	III	C1	NT	moderadamente diferenciado
74	O.C.	M	C	56	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	IV	B2	NT	moderadamente diferenciado
75	M.B.F.	F	C	65	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	IV	C2	T	moderadamente diferenciado
76	J.J.L.	M	C	59	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	II	B1	ET	moderadamente diferenciado
77	M.F.S.	F	C	50	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	II	NR	NT	bem diferenciado
78	J.B.C.S.	F	C	61	+/-	-/-	-/-	+/+	-/-	III	C2	NT	pouco diferenciado
79	N.M.C.P.	F	C	47	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	III	C2	NT	moderadamente diferenciado
80	A.M.	M	C	69	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	IV	NR	ET	moderadamente diferenciado
81	A.C.G.	M	C	60	+/-	-/-	+/+	-/-	-/-	III	C2	ET	moderadamente diferenciado
82	J.M.A.	M	C	66	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	IV	NR	NT	bem diferenciado
83	A.B.	M	C	71	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	IV	NR	ET	moderadamente diferenciado
84	A.R.G.	F	C	42	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	III	C2	T	pouco diferenciado
85	J.M.F.	M	C	60	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	IV	C2	ET	moderadamente diferenciado
86	M.A.G.	M	N	49	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	NR	NR	NT	pouco diferenciado

Nº Caso	Paciente	Sexo	Etnia	Idade ao diagnóstico	CYP1A1		CYP1B1	CYP2C9		Estadiamento		Hábito Tabagista	Grau de diferenciação ao adenocarcinoma
					m1	m2	1b1*3	2c9*2	2c9*3	TNM	Astler-Coller		
87	J.C.	M	C	72	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	IV	C2	T	moderadamente diferenciado
88	A.D.A.	F	N	83	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	IV	NR	NT	moderadamente diferenciado
89	M.C.T.S.	F	C	61	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	NR	NR	NT	moderadamente diferenciado
90	A.B.	M	C	44	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	III	C2	NT	moderadamente diferenciado
91	D.G.	M	N	67	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	II	B2	T	moderadamente diferenciado
92	I.A.P.S.	F	C	41	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	NR	NR	NT	bem diferenciado
93	J.E.G.	M	C	63	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	II	B2	T	pouco diferenciado
94	J.P.R.	M	C	74	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	NR	NR	NT	moderadamente diferenciado
95	M.G.	M	C	79	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	I	B1	T	moderadamente diferenciado
96	N.A.F.	M	C	56	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	II	B2	T	moderadamente diferenciado
97	J.B.G.G.	M	C	48	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	II	B2	T	bem diferenciado
98	J.G.S.	M	C	68	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-	IV	NR	T	bem diferenciado
99	L.R.R.	M	C	39	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	II	B2	T	moderadamente diferenciado
100	O.L.	M	C	64	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	IV	C2	NT	moderadamente diferenciado
101	S.T.	M	C	74	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	III	C1	T	bem diferenciado
102	H.S.S.J.	F	C	66	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-	IV	C2	ET	moderadamente diferenciado