



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

GABRIELA HELENA RODRIGUES FLEMING

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DE GENES DA
FAMÍLIA DAS GLUTATIONAS S
TRANSFERASES EM PACIENTES COM
CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO**

São José do Rio Preto
2018

Gabriela Helena Rodrigues Fleming

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DE GENES DA
FAMÍLIA DAS GLUTATIONAS S
TRANSFERASES EM PACIENTES COM
CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

**São José do Rio Preto
2018**

Rodrigues Fleming, Gabriela Helena
Avaliação molecular de genes da família das Glutathionas S
Transferases em pacientes com câncer colorretal esporádico
São José do Rio Preto, 2018.
78 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

1. Polimorfismos genéticos; 2. Neoplasias Colorretais; 3.
Xenobióticos; 4. Glutathionas S Transferase

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DE GENES DA
FAMÍLIA DAS GLUTATIONAS S
TRANSFERASES EM PACIENTES COM
CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO**

BANCA EXAMINADORA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE**

Presidente e Orientador: Eny Maria Goloni Bertollo

1º Examinador: Ana Elizabete Silva

2º Examinador: Márcia Maria Urbanin Castanhole
Nunes

1º Suplente: Claudia Regina Bonini Domingos

2º Suplente: Ana Livia Silva Galbiatti Dias

São José do Rio Preto
2018

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
EPÍGRAFE	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE QUADROS E TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
a. Casuística	10
b. Genotipagem.....	11
c. Análises estatísticas	14
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
8. ANEXOS	48
a. Anexo 1.....	49
b. Anexo 2.....	50
c. Anexo 3.....	51
d. Anexo 4.....	52

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Zirleide Donizeti Rossano Rodrigues e Olegario

*Aparecido Rodrigues por todo amor, carinho, dedicação e empenho com
minha educação para que eu fosse uma pessoa de bem .*

Ao meu marido, Rodrigo Garcia Fleming, por todo amor,
compreensão, dedicação e companheirismo.

À minha amiga, Glaucia Maria de Mendonça Fernandes, por todo
carinho, por cada palavra de amizade e total comprometimento em me
ajudar em todos os momentos que estivemos juntas.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a vida e colocado em uma família maravilhosa.

À Profª Drª Eny Maria Goloni Bertollo pela oportunidade de realizar o mestrado, de poder crescer como pessoa e profissional. Por todo carinho e acolhimento durante esse período de autoconhecimento e desenvolvimento do trabalho.

À Profª Dra. Érika Cristina Pavarino, por me receber com carinho no laboratório e contribuir bastante para a o meu crescimento pessoal e profissional.

À Profª Drª Márcia Maria Urbanin Castanhole e Ana Elizabete Silva por aceitarem compor a banca examinadora e compartilhar de seus conhecimentos.

Aos professores da Pós-Graduação da FAMERP por compartilharem seus conhecimentos, coordenadores Prof. Dr. Mário Abbud Filho e Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira e secretários José Antônio Silistino, Luiz Henrique de Oliveira Ferreira e Fabiana Cristina de Godoy.

À FAMERP, FUNFARME por meio de seus diretores Dr. Dulcimar Donizeti de Souza, Dr. Horácio José Ramalho e Dr. Jorge Fares.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro para desenvolver este projeto e à CAPES pela bolsa de mestrado.

À Profª Drª Rosa Sayoko Kawasaki Oyama, pelo compartilhamento dos seus conhecimentos e apoio ao desenvolvimento desse trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Ana Livia Silva Galbiati Dias e Prof^ª Dr^ª Márcia Maria Urbanin Castanhole Nunes, por compartilharem seus conhecimentos e principalmente pela amizade e apoio.

À Prof^ª Dr^ª Patrícia Matos Biselli Chicote pela paciência e por todo carinho em transmitir seus conhecimentos para meu crescimento pessoal e colaborar com a finalização do trabalho.

Aos meus colegas de trabalhos e amigos da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular, Letícia Muniz, Nathália Martines Tunissioli, Lennon Pereira Caires, Marlon Fraga Mattos, Carol Isak, Leonardo Prado Stuchi, Carlos Viesi do Nascimento e Maria Antônia dos Santos Bezerra.

À Daniela Manchini Nizato, bióloga que atuou na UPGEM no início do meu mestrado contribuiu bastante me ensinando no laboratório.

Aos médicos responsáveis pelo serviço de Coloproctologia e Cirurgia de Geral, Prof. Dr. João Gomes Netinho, Geni Satomi Cunrath, Luiz Sergio Ronchi, Marcelo Maia Caixeta de Melo, pela colaboração na coleta de amostras e dados dos pacientes. E a equipe de residentes da Coloproctologia pela colaboração.

Aos pacientes com câncer colorretal que colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A todos os meus amigos pelo companheirismo, apoio e ajuda.

EPÍGRAFE

*“Nunca se está errado fazendo a coisa
certa.”*

Mark Twain

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos tamanhos de pólipos e suas fases até o início do câncer..... 2

Figura 2: Esquema representativo do metabolismo de xenobióticos e suas principais enzimas – CYPs: Citocromos P450; mEH: Epóxide hidrolase microssomal; NATs: N-acetiltransferases; GSTs: Glutationa-S-Transferases; UGTs: UDP-Glucoroniltransferases; SLTs: Sulfotransferases: “MDRs: Multiple Drug Resistences”..... 6

Figura 3: Gel de agarose 2%, corado com *gel red* mostrando os padrões de migração eletroforética dos produtos de digestão enzimática para análise do polimorfismo do gene *GSTP1*..... 13

Figura 4: Gel de agarose 2%, corado com *gel red* demonstrando apenas os produtos da PCR multiplex para análise dos polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1*..... 13

Figura 5: Curva de *Kaplan-Meier* para análise de sobrevida dos pacientes com CCRE em relação ao polimorfismo *GSTT1* (A), *GSTM1* (B), *GSTP1* Ile105Val (C)..... 28

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Sequência de iniciadores e método para análise molecular dos polimorfismos *GSTP1* Ile105Val, *GSTT1* e *GSTM1*..... 11

Quadro 2: Concentração dos reagentes utilizados na PCR para análise molecular dos polimorfismos *GSTP1* Ile105Val, *GSTT1* e *GSTM1*..... 12

Quadro 3: Parâmetros de ciclagem das reações de PCR para análise dos polimorfismos no gene *GSTP1* Ile105Val, *GSTT1* e *GSTM1*..... 12

Tabela 1: Dados sócio-demográficos dos pacientes com câncer colorretal e indivíduos controles..... 19

Tabela 2: Associação dos polimorfismos nos genes *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1* com o câncer colorretal esporádico..... 20

Tabela 3: Interação entre os polimorfismos dos genes *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1* e hábitos tabagista ou etilista no risco para CCRE..... 21

Tabela 4: Distribuição dos parâmetros clínico-histopatológicos em relação aos polimorfismos nos genes *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes com câncer colorretal esporádico..... 22

Tabela 5: Distribuição dos sítios primários do câncer colorretal esporádico em relação aos polimorfismos nos genes *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1*..... 23

Tabela 6: Associação dos genótipos combinados *GSTT1/ GSTM* e *GSTT1 / GSTM / GSTP1* Ile105Val com o câncer colorretal esporádico..... 24

Tabela 7: Associação dos genótipos combinados *GSTT1/ GSTM* e *GSTT1 / GSTM / GSTP1* Ile105Val, com a progressão tumoral..... 25

Tabela 8: Distribuição dos genótipos combinados *GSTT1/ GSTM* e *GSTT1 / GSTM / GSTP1* Ile105Val de acordo com o sítio primário do CCRE..... 26

Tabela 9: Polimorfismos *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* Ile105Val em relação sobrevida de pacientes com câncer colorretal esporádico..... 27

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADH	Enzima álcool desidrogenase
AH	Aminas Heterocíclicas
CCR	Câncer Colorretal
CCRE	Câncer Colorretal Esporádico
CNPq	Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Desoxirribonucleic acid</i>)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (<i>São José do Rio Preto Medical School</i>)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (<i>São Paulo State Research Foundation</i>)
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
<i>GSTP1</i>	Glutathione S Transferase pi
<i>GSTT1</i>	Glutathione S Transferase Theta
<i>GSTM1</i>	Glutathione S Transferase mu
HAP	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IC95%	Intervalo de Confiança 95% (<i>Confidence Interval 95%</i>)
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PCR-RFLP	Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição

SCRC	Sporadic colorectal cancer
TNM	Classificação dos Tumores Malignos (<i>TNM classification</i>)
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (<i>Genetics and Molecular Biology Research Unit</i>)

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal é uma doença multifatorial, influenciado por fatores genéticos como polimorfismos genéticos e fatores ambientais como hábitos tabagista e etilista. Polimorfismos em genes de fase II, como os da família das Glutathione S Transferase envolvidos no metabolismo de eliminação de substâncias carcinogênicas podem contribuir com desenvolvimento do câncer colorretal esporádico.

Objetivos: Avaliar a associação de fatores de risco sócio-demográficos, do polimorfismo *GSTP1* Ile105Val e dos genótipos nulos *GSTT1* e *GSTMI* com o desenvolvimento do câncer colorretal esporádico (CCRE); investigar a interação entre esses polimorfismos e os hábitos tabagista e etilista; verificar a associação entre os polimorfismos e os parâmetros clínicos e histopatológicos do CCRE; avaliar a influência dos polimorfismos na sobrevida dos pacientes com CCRE. **Métodos:** Um estudo caso-controle foi realizado incluindo 970 indivíduos da população brasileira (232 pacientes com CCRE e 738 indivíduos controles). As técnicas de PCR Multiplex e PCR-RFLP foram realizadas para genotipagem dos polimorfismos. Os testes Qui-Quadrado e Regressão Logística Múltipla foram utilizados para as análises estatísticas. A sobrevida foi analisada pela Curva de Kaplan Meier e teste Log Rank. **Resultados:** Idade igual ou superior a 62 anos (OR=8,79; IC95%=5,90-13,09, $p<0,01$) e gênero feminino (OR=2,91; IC95%=1,74-4,37, $p<0,01$) foram associados com risco aumentado para o CCRE. A análise dos polimorfismos revelou associação entre o polimorfismo *GSTMI* e risco para desenvolvimento de CCRE (OR=1,45; IC95%=1,06-2,00; $p=0,02$) e entre o polimorfismo *GSTT1* e o risco reduzido para a doença (OR=0,65; IC95%=0,43-0,98; $p=0,04$). Foi evidenciada uma interação significativa entre a presença do alelo selvagem do polimorfismo *GSTP1* Ile105Val e o hábito tabagista no

risco para CCRE (OR=2,33; IC95%=1,34-4,05; p=0,05). Houve associação entre o genótipo nulo do *GSTMI* e a presença de tumores avançados (OR=2,33; IC95%=1,23-4,41; p=0,009) e aumento de risco de CCRE na presença da dupla combinação dos genótipos *GSTTI* não nulo / *GSTMI* nulo (OR=1,50; IC95%=1,03-2,19; p=0,03) e tripla combinação *GSTTI* não nulo / *GSTMI* nulo / *GSTPI* Val* (OR=1,85; IC95%=1,01-3,36; p=0,04). Os genótipos combinados *GSTTI* não nulo / *GSTMI* nulo (OR=2,40; IC95%=1,19-4,85; p=0,01) e *GSTTI* não nulo / *GSTMI* nulo / *GSTPI* Val* (OR=2,92; IC95%=1,05-8,12; p=0,04) foram associados à progressão tumoral. Os polimorfismos não foram associados com a sobrevida dos pacientes com CCRE. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo demonstram que indivíduos com idade igual ou superior a 62 anos e do gênero feminino são mais suscetíveis ao CCRE. Os polimorfismos de genótipos nulos *GSTTI* e *GSTMI* modulam a suscetibilidade para o CCRE na população estudada.

Palavras Chave: Polimorfismos genéticos, Neoplasias Colorretais, Xenobióticos, Glutathione S Transferase.

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer is a multifactorial disease, influenced by genetic factors such as genetic polymorphisms and environmental factors such as smoking and drinking habits. Polymorphisms in Phase II genes such as those in the Glutathione S transferase family involved in the metabolism of elimination of carcinogenic substances may contribute to the development of sporadic colorectal cancer. **Objectives:** To evaluate the association of risk of sociodemographic factors, *GSTP1* Ile105Val polymorphism, and *GSTT1* and *GSTMI* null genotypes with development of sporadic colorectal cancer (SCRC); to investigate the interaction among these polymorphisms with tobacco and alcohol consumption; to verify the association among these polymorphisms and clinical and histopathological parameters of SCRC and to evaluate the influence of the polymorphisms on overall survival time of SCRC patients. **Material and Method:** A case-control study was conducted including 970 individuals from Brazilian population (232 patients with SCRC and 738 controls). PCR Multiplex and PCR-RFLP techniques were performed for genotyping of the polymorphisms. **Results:** Age equal or over 62 years (OR = 8.79; (95% CI = 5.90-13.09, $p < 0.01$) and female gender (OR = 2.91, 95% CI = 1.74-4.37, $p < 0.01$) were associated with increased risk for SCRC. The analysis of the polymorphisms revealed association between the *GSTMI* polymorphisms and risk for SCRC (OR = 1.45; 95% CI = 1.06-2.00; $p=0.02$), and between *GSTT1* and reduced risk for the disease (OR = 0.65; 95% CI = 0.43-0.98; $p=0.04$). An interaction between the presence of the wild-type allele of *GSTP1* Ile105Val polymorphism and the tobacco consumption on risk for SCRC (OR = 2.33; 95% CI = 1.34-4.05; $p=0.05$) was observed. There was an association between the *GSTMI* null genotype and the presence of advanced tumors

(OR = 2.33, 95% CI = 1.23-4.41, p = 0.009), and increased risk of SCRC in the presence of combination of non-null *GSTT1* / null *GSTMI* genotypes (OR = 1.50; 95% CI = 1.03-2.19; p = 0.03) and non-null *GSTT1* / *GSTMI* null / *GSTPI* Val * (OR = 1.85; 95% CI = 1.01-3.36, p = 0.04). Combined genotypes non-null *GSTT1* / null *GSTMI* (OR = 2.40, 95% CI = 1.19-4.85, p = 0.01) and non-null *GSTT1* / null *GSTMI* / *GSTPI* Val * (OR = 2.92; 95% CI = 1.05-8.12, p = 0.04) were associated with tumor progression. Polymorphisms were not associated with the survival of patients with SCRC. **Conclusion:** The results of the present study demonstrate that individuals aged 62 years or older and the female gender are more susceptible to SCRC. Polymorphisms of null genotypes *GSTT1* and *GSTMI* modulate the susceptibility to SCRC in the population studied.

Keywords: Genetic polymorphisms, Colorretal Neoplasms, Xenobiotics, Glutathione S Transferase.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é um tipo de câncer que se desenvolve nas paredes internas do cólon e reto. É o terceiro mais frequente no mundo e o quinto tipo de câncer mais frequente no Brasil.^(1,2) O Instituto Nacional do Câncer estimou para o ano de 2018, 17.380 novos casos para gênero masculino e 18.980 novos casos para gênero feminino.

As formas mais comuns de câncer colorretal são a hereditária e a esporádica. Estima-se que até 20% dos casos sejam hereditários, destes, 5% de todas as neoplasias colorretais equivalem à forma não polipoide e 1% polipose adenomatosa familiar (FAP), como exemplo a Síndrome de Lynch, cujo os genes MSH₂, MLH₁, MSH₆, PMS₂ e EPCAM são os principais genes causadores da doença autossômica dominante.⁽³⁾ Já a forma esporádica corresponde a 80% dos casos.^(4,5)

O câncer colorretal esporádico (CCRE) tem como via precursora a sequência adenoma-carcinoma, onde os pólipos, que são lesões benignas se desenvolvem na parede do cólon e reto, apresentam tamanhos variados, e podem se transformar em uma displasia, desencadeando o desenvolvimento do câncer (Figura 1).^(2,6,7)

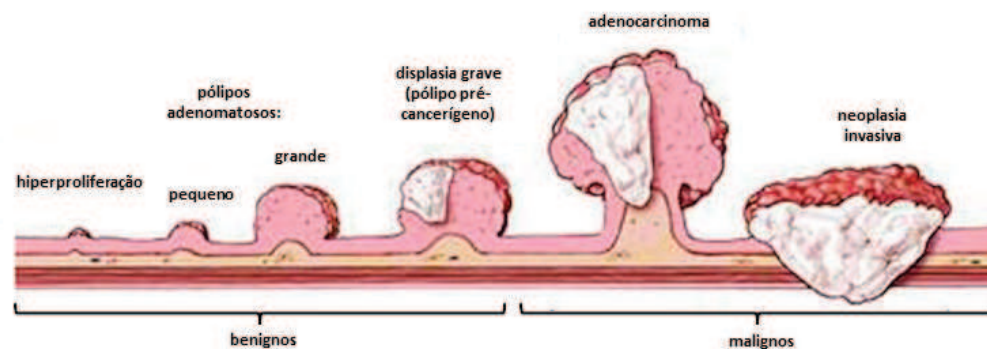


Figura 1: Representação dos tamanhos de pólipos e suas fases até o início do câncer. Modificado de <https://sintomasdocancer.com/cancer-de-colon>.⁽⁸⁾

Por ser uma doença multifatorial o CCRE é influenciado por fatores genéticos, como mutações em genes que participam de vias responsáveis por regular o crescimento celular, como genes supressores de tumor e proto-oncogenes^(9,10), polimorfismos genéticos, idade, gênero e fatores ambientais como estilo de vida e hábitos alimentares.⁽¹¹⁾ Esses fatores genéticos podem influenciar no efeito desencadeado pelo meio ambiente na predisposição à doença. Com isso, é possível observar que a incidência de CCRE aumenta de forma diferente entre as populações.^(1,12,13)

Entre os principais fatores de risco, a idade avançada, ou seja, acima de 60 anos, é um fator já estabelecido para o CCRE.^(2,14,15) Isso se deve ao processo de envelhecimento celular que aumenta as chances de danos celulares que desencadeiam o câncer.^(2,14,15) Pesquisas mostram que o consumo elevado de carne e gordura animal podem promover a carcinogênese de cólon e reto, e os hábitos sedentários de vida e a obesidade estão associados ao CCRE.^(11,16)

Outros dois importantes fatores de risco para o CCRE são os hábitos tabagista e etilista. O tabaco apresenta diversas substâncias carcinogênicas como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), nitrosaminas, entre outros. Além disso, sua metabolização pode gerar substâncias reativas como os nitratos biotransformados da nicotina. Juntamente com o acetaldeído proveniente da metabolização do álcool, essas substâncias reativas dificultam ou inviabilizam a detoxificação dos compostos carcinogênicos, aumentando a agressão ao DNA.^(14,17,18)

O tabaco contém cerca de 60 substâncias cancerígenas e é o principal fator de risco evitável de adoecimento e morte no mundo. Não há limite seguro para o uso do tabaco.⁽²⁾ Entre as substâncias do tabaco, 1% são carcinogênicas, sendo elas os HAP, aminas aromáticas e nitrosaminas. Estas estão relacionadas com a nicotina que participa

da carcinogênese por atuar como intermediária de macromoléculas pela sua nitroação, produzindo como resultado as nitrosaminas.^(17,19) Além disso, estudos evidenciaram que a nicotina aumenta a angiogênese favorecendo a proliferação das células cancerosas.⁽²⁰⁾

Estima-se que o consumo excessivo do álcool aumenta a chance de desenvolver CCRE em 60%⁽²¹⁾, pois o álcool é metabolizado em acetaldeído no cólon por meio das enzimas álcool desidrogenase (ADH), citocromo P450 2E1 (CYP2E1), enzima de fase I, ou catalase bacteriana, e em seguida é convertido em ácido acético. O acetaldeído é uma substância tóxica para o organismo, que implica na diminuição da absorção dos nutrientes pelo intestino e na degradação do folato, necessário para a síntese e reparo de DNA.⁽²²⁾ A ingestão de álcool é associada à formação dos pólipos no intestino devido ao efeito permeabilizante do álcool, que atua como um solvente aumentando a capacidade de penetração das substâncias xenobióticas nas células, as quais se ligam aos constituintes celulares formando adutos estáveis.^(23,24,25,26) O álcool afeta de forma diferente as porções do intestino grosso, sendo a porção do reto a de maior incidência de câncer entre os que possuem o hábito etilista.⁽²³⁾

Os compostos químicos carcinogênicos do tabaco e álcool incorporados no organismo são biotransformados para serem inativados e eliminados por meio do metabolismo dos xenobióticos (Figura 2). Este processo ocorre principalmente nos hepatócitos do fígado, responsáveis por detoxificar os componentes do tabaco e do álcool, que em sua maioria são xenobióticos lipofílicos, propriedade esta que facilita seu transporte pelas lipoproteínas na corrente sanguínea e sua penetração através das membranas. Eles são metabolizados em compostos hidrofílicos, que são intermediários reativos eletrolíticos, por meio de reação de oxidação na fase I, onde um grupo polar é adicionado ao composto original. Esse primeiro metabólito poderá ser eliminado ou

participar das reações de fase II, no qual será adicionada uma molécula de Glutathione reduzida (GSH), que resultarão em produtos de conjugação com substratos endógenos que são mais solúveis em água e mais facilmente excretados do que o composto original.^(27,28) A excreção de metabólitos para o controle homeostático e detoxificação de xenobióticos lipofílicos ocorre na Fase III.⁽²⁹⁾ As enzimas de Fase III são transportadores de membrana ativos, responsáveis pelo fluxo de compostos através das membranas celulares.⁽²⁹⁾

O metabolismo de substâncias provenientes do cigarro e do álcool por meio da CYP2E1 de fase I é um grande produtor de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem potencializar a carcinogênese colorretal por meio de suas interações com vários processos celulares e bioquímicos.⁽³⁰⁾ Para auxiliar no processo de minimização e eliminação dos efeitos carcinogênicos, a superfamília das Glutathione S Transferases citosólicas (GSTs) são acionadas na fase II (Figura 2).^(31,32)

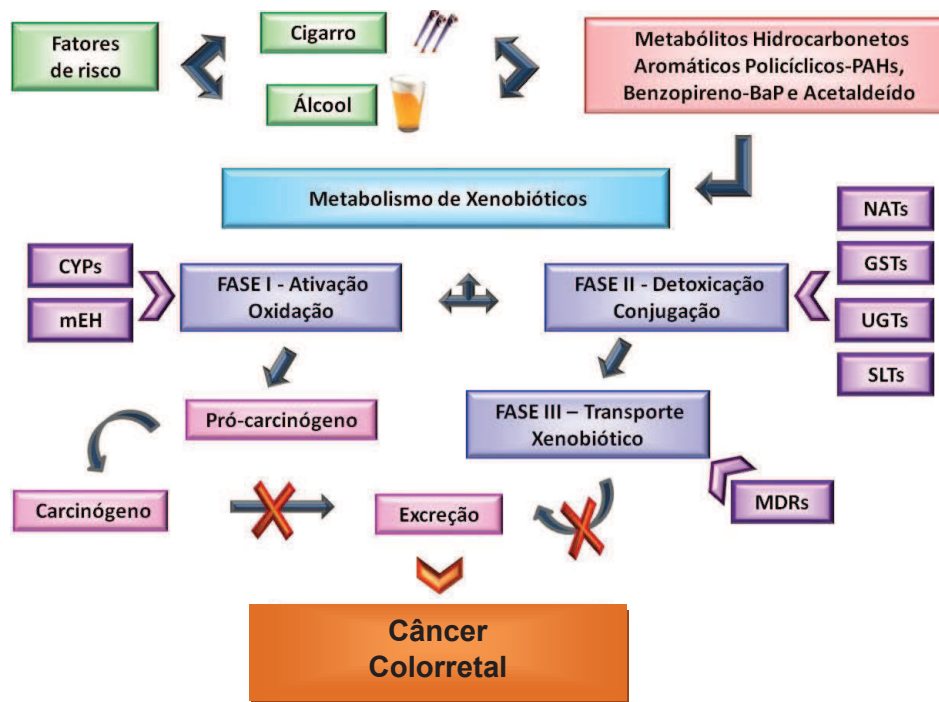


Figura 2: Esquema representativo do metabolismo de xenobióticos e suas principais enzimas – CYPs: Citocromos P450; mEH: Epóxide hidrolase microsossomal; NATs: N-acetiltransferases; GSTs: Glutationa-S-Transferases; UGTs: UDP-Glucoroniltransferases; SLTs: Sulfotransferases: “MDRs: Multiple Drug Resistences”. Russo A, 2011, com modificações.⁽³¹⁾

São muitos os genes que codificam enzimas responsáveis pela metabolização dos xenobióticos. Alguns dos principais genes atuantes na fase II são GSTs, como o mi (*GSTM1*), o theta (*GSTT1*) e o pi (*GSTP1*). Suas enzimas são responsáveis por catalisar a reação de conjugação entre a glutatona e os compostos químicos endógenos e exógenos.^(27,33) Altas concentrações de GSTs aumentam as chances de detoxificação das espécies reativas presentes no organismo. Entretanto, essa característica é reduzida na presença de deleção ou polimorfismo nesses genes. A expressão dos genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* causam a perda completa da atividade enzimática e a substituição de nucleotídeos no caso do *GSTP1* altera a sequência de aminoácidos da proteína,

reduzindo sua atividade enzimática levando a uma predisposição aos efeitos tóxicos dos xenobióticos.⁽²⁸⁾

O polimorfismo de genótipo nulo que ocorrem nos genes *GSTT1* e *GSTMI*, os quais estão localizados nas regiões 22q11.2 e 1p13.3, respectivamente.^(34,35,36) O polimorfismo no gene *GSTP1* é uma das GSTs mais expressas no organismo e está localizado na posição 11q13, onde ocorre a troca da base nitrogenada Adenina para Guanina na posição 313 do gene (A313G), resultando na substituição do aminoácido Isoleucina por Valina na posição 105 da proteína (Ile105Val) (rs1695).⁽³⁷⁾

Alguns estudos sugerem que polimorfismos em GSTs, é um fator de risco para o desenvolvimento de vários tipos de cânceres.^(38,39,40,41,42) Polimorfismos nos genes *GSTT1*, *GSTMI* e *GSTP1* tem grande importância na detoxificação e eliminação de substâncias carcinogênicas e estão intimamente associados com os hábitos de vida tabagista e etilista no risco para o desenvolvimento do CCR. ^(43,44) Assim, estudos sobre a presença dos polimorfismos, hábitos de vida e dados clínicos e histopatológicos são importantes na identificação de biomarcadores de suscetibilidade para o CCR.

2. OBJETIVOS

- Comparar os dados sócio-demográficos entre pacientes com câncer colorretal esporádico e controles.
- Avaliar a associação do polimorfismo *GSTP1* Ile105Val e dos polimorfismos de genótipo nulo *GSTT1* e *GSTMI* com o desenvolvimento do câncer colorretal esporádico.

- Avaliar a associação dos genótipos combinados *GSTT1/ GSTM1* e *GSTT1/ GSTM1/ GSTP1* com o desenvolvimento do câncer colorretal esporádico e parâmetros clínico-histopatológicos.
- Avaliar a interação entre esses polimorfismos com os hábitos tabagista e etilista no risco para esta doença.
- Avaliar a associação entre os polimorfismos e os parâmetros clínico-histopatológicos do câncer colorretal esporádico.
- Avaliar a influência dos polimorfismos na sobrevida de pacientes com câncer colorretal esporádico.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

a. Casuística

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP (Parecer nº 012/2012) (Anexo 1). Todos os 970 indivíduos que aceitaram participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). Os participantes responderam um questionário sobre as variáveis gênero, idade, etnia, profissão, tabagismo, etilismo e histórico pessoal e familiar de câncer (Anexo 3).

O grupo caso é formado por 232 indivíduos (112 homens e 120 mulheres), pacientes do Departamento de Coloproctologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, os quais receberam o diagnóstico clínico e/ou histopatológico de CCRE entre 2010 e 2016. O critério de exclusão foi tratamento prévio com quimioterapia e/ou radioterapia. O grupo controle inclui 738 indivíduos (370 homens e 368 mulheres), doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto, onde é realizado teste para 20 doenças de acordo com a portaria do Ministério da Saúde (<http://www.hemonline.com.br/portarias/rdG53/indexframe.htm>). O critério de exclusão para os controles foi história pessoal e familiar de câncer em pelo menos três gerações anteriores.

Foram considerados tabagistas aqueles indivíduos que fumaram pelo menos 100 cigarros durante toda a vida e etilistas aqueles que consomem mais de quatro doses por semana (uma dose corresponde: licor - 30mL; copo de vinho - 102mL, contendo 12% de álcool; ou lata de cerveja - 340mL).^(20,45)

O CCRE foi classificado de acordo com o TNM, que considera extensão do tumor (T), linfonodos afetados(N) e presença de metástase(M).⁽⁴⁶⁾ Foram considerados tumores avançados qualquer T, sem comprometimento de linfonodos e sem presença de metástase e tumores não avançados qualquer T e N com a presença de metástase.

b. Genotipagem

O DNA genômico foi isolado do sangue periférico por meio da técnica de extração salina.⁽⁴⁷⁾ Para análise do polimorfismo do gene *GSTP1* Ile105Val foi realizada a técnica de Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).^(48,49) A genotipagem dos polimorfismos de genótipo nulo dos genes *GSTT1* e *GSTM1* foi realizada por meio da técnica de PCR multiplex, utilizando o gene *CYP1A1* como controle da reação.⁽⁵⁰⁾ As sequências de iniciadores utilizados para a amplificação da região que apresenta estes polimorfismos e a enzima utilizada para identificar o sítios polimórfico do gene *GSTP1* estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1: Sequência de iniciadores e método para análise molecular dos polimorfismos *GSTP1* Ile105Val, *GSTT1* e *GSTM1*.

Polimorfismos	Sequências de <i>primers</i>	Método
<i>GSTP1</i> Ile105Val	Sense 5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3' Anti-sense: 5'-TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT-3'	PCR-RFLP. Enzima de restrição: BsmI
<i>GSTT1</i>	Sense: 5' -TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3' Anti-sense: 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA -3'	PCR multiplex
<i>GSTM1</i>	Sense: 5'- GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3' Anti-sense: 5'- GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'	PCR multiplex

As concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR para os polimorfismos estudados estão apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2: Concentração dos reagentes utilizados na PCR para análise molecular dos polimorfismos *GSTP1* Ile105Val, *GSTT1* e *GSTMI*.

Reagente da reação de PCR	<i>GSTP1</i> Ile105Val	<i>GSTT1/GSTMI</i>
Tampão	(NH ⁴) ₂ SO ₄ 1x	Kcl 1x
dntPs/base nitrogenada	0,8mM/0,2mM	0,8mM/0,2mM
Iniciadores	0,2 mol/μL	0,4 mols/μL
MgCl	2,5mM	1,5 mM
<i>Taq</i> DNA Polimerase	1,5 U/μL	1,5 U/μL
DNA	100 ng	100 ng

Os parâmetros de ciclagem de temperatura para a reação de PCR para os polimorfismos *GSTP1* Ile105Val, *GSTT1* e *GSTMI* estão apresentados no Quadro 3. As reações foram realizadas no termociclador (*MasterCycler Gradient Eppendorf*®).

Quadro 3: Parâmetros de ciclagem das reações de PCR para análise dos polimorfismos no gene *GSTP1* Ile105Val, *GSTT1* e *GSTMI*.

Etapas	<i>GSTP1</i> Ile105Val	<i>GSTT1/GSTMI</i>
Desnaturação (Temperatura/Tempo)	94°C por 30s	94 ° C / 1 min
Anelamento (Temperatura/Tempo)	62°C por 30s	59 ° C / 1 min
Extensão (Temperatura/Tempo)	72°C por 30s	72 ° C / 1 min

Os produtos da PCR foram realizados em gel de agarose 2%. Os padrões de bandas estão apresentados nas Figuras 3 e 4.

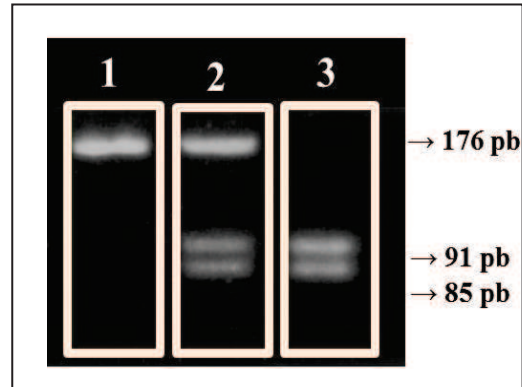


Figura 3: Gel de agarose 2%, corado com *gel red* mostrando os padrões de migração eletroforética dos produtos de digestão enzimática para análise do polimorfismo do gene *GSTP1*. Coluna 1: genótipo homocigoto selvagem (AA) apresentando apenas uma banda de 176pb; Colunas 2: genótipo heterocigoto (AG) apresentando as bandas de 176pb – 91pb – 85 pb; Coluna 3: genótipo homocigoto polimórfico (GG) apresentando as bandas de 91pb – 85pb.

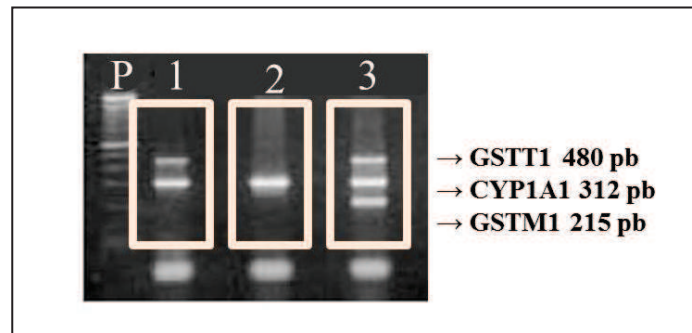


Figura 4: Gel de agarose 2%, corado com *gel red* demonstrando apenas os produtos da PCR multiplex para análise dos polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1*. Em todas as colunas estão presentes a banda de 312bp que representa o gene *CYP1A1*, utilizado como controle positivo da reação. Coluna P: marcador de peso padrão 100 pb. Coluna 1: apresenta uma banda de 480pb demonstrando a presença do alelo de *GSTT1*. Coluna 2: não apresenta as bandas de 480pb e 215pb demonstrando a deleção do alelo de *GSTT1* e do *GSTM1*. Coluna 3: apresenta as bandas de 480pb e 219pb demonstrando a presença do alelo de *GSTT1* e *GSTM1*.

c. Análises estatísticas

Os dados demográficos foram tabulados por porcentagem. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi avaliado pelo teste Qui-quadrado por meio do Programa BioEstat versão 5.0. O modelo de regressão logística binária, por meio do programa Minitab/ Windows - Versão 12.22, foi utilizado para avaliar a associação da idade, gênero, hábitos tabagista e etilista com CCRE, e também para avaliar a associação dos polimorfismos com o CCRE e com os parâmetros clínico-histopatológicos. A regressão logística múltipla binária, ajustada para idade, gênero e hábitos tabagista e etilista, também foi utilizada para avaliar a associação entre os modelos genéticos dos polimorfismos e o desenvolvimento do CCRE por meio do programa SNPStats (disponível em: <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web>). O efeito dos polimorfismos foi avaliado nos modelos (1) codominante (heterozigoto *versus* homozigoto selvagem e homozigoto polimórfico *versus* homozigoto selvagem); (2) dominante (heterozigoto + homozigoto polimórfico *versus* homozigoto selvagem); (3) recessivo (homozigoto polimórfico *versus* homozigoto selvagem + heterozigoto) e (4) overdominante (heterozigoto *versus* homozigoto selvagem + homozigoto polimórfico) (5) aditivo (homozigoto polimórfico com peso 2 + heterozigoto *versus* homozigoto selvagem). O programa SNPStats no modelo genotípico dominante foi usado para avaliar o potencial de interação dos polimorfismos e hábito tabagista, ajustado para idade, gênero e etilismo, bem como para avaliar a interação do polimorfismo e hábito etilista, ajustado para idade, gênero e tabagismo, no risco do CCRE.

As análises incluíram: idade (referência: <mediana do grupo caso>), gênero (referência: masculino), hábito tabagista (referência: não fumantes) e hábito etilista (referência: não etilistas).

O efeito dos polimorfismos no tempo de sobrevida dos pacientes com CCRE foi analisado por meio da Curva de Kaplan Meier e teste *Log Rank* utilizando o programa estatístico *StatsDirect* v. 2.7.2. Os resultados foram apresentados em *Odds Ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC – 95%). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados também na forma de artigo científico (Anexo 4), o qual será encaminhado à revista científica *World Journal of Gastroenterology* classificada como A2 atualmente pelo Qualis periódicos da CAPES.

A Tabela 1 apresenta os dados demográficos de pacientes com câncer colorretal e indivíduos controles. Idade igual ou acima de 62 anos (OR=8,79; IC95%=5,90-13,09; $p<0,01$) e gênero feminino (OR=2,91; IC95%=1,74-4,37; $p<0,01$) foram associados ao risco para CCRE.

As frequências genotípicas apresentaram-se em equilíbrio de HWE em ambos os grupos para o polimorfismo *GSTP1* Ile105Val (caso: $p=1,0$; controle: $p=0,29$). Os resultados da associação entre os três polimorfismos e o CCRE estão apresentados na Tabela 2. Portadores do genótipo *GSTM1* nulo apresentaram maior risco de desenvolver a doença (OR=1,45; IC95%=1,06-2,00; $p=0,02$). Por outro lado, o polimorfismo *GSTT1* apresentou associação com risco reduzido para o CCRE (OR=0,65; IC95%=0,43-0,98; $p=0,04$).

No presente estudo, foi evidenciada uma interação significativa entre a presença do alelo selvagem do polimorfismo *GSTP1* Ile105Val e o hábito tabagista no risco para CCRE (OR=2,33; IC95%=1,34-4,05; $p=0,05$). Entretanto, não houve interação entre os outros polimorfismos e os hábitos tabagista ou etilista no risco para a doença (Tabela 3).

Em relação aos parâmetros clínico-histopatológicos das amostras de CCRE incluídas neste estudo, o reto foi o sítio primário mais frequente (60%), além de tumores mais avançados (69,65%). As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados das análises de associação dos polimorfismos com esses parâmetros. É possível observar que houve uma associação entre o genótipo nulo do *GSTM1* e a presença de tumores mais

avançados (OR=2,33; IC95%=1,23-4,41; p=0,009). Os outros polimorfismos não foram associados com os parâmetros clínico-histopatológicos do CCRE.

Os resultados da análise dos genótipos combinados *GSTMI/GSTTI* e *GSTMI/GSTTI/GSTPI* Ile105Val no risco para CCRE, progressão tumoral e associação com o sítio primário estão apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8. Foi observado um aumento do risco para CCRE na presença da combinação dos genótipos *GSTTI* não nulo / *GSTMI* nulo (OR=1,50; IC95%=1,03-2,19; p=0,03) e para a combinação *GSTTI* não nulo / *GSTMI* nulo / *GSTPI* Val* (*com a presença de pelo menos um alelo polimórfico) (OR=1,85; IC95%=1,01-3,36; p=0,04). Os genótipos combinados *GSTTI* não nulo / *GSTMI* nulo (OR=2,40; IC95%=1,19-4,85; p=0,01) e *GSTTI* não nulo / *GSTMI* nulo / *GSTPI* Val* (OR=2,92; IC95%=1,05-8,12; p=0,04) foram associados à progressão tumoral.

A análise pela Curva Kaplan-Meier mostrou que o tempo de sobrevida de portadores dos alelos polimórficos *GSTPI* Ile105Val e dos genótipos nulos de *GSTMI* e de *GSTTI* não foi significativamente diferente do tempo de sobrevida dos não portadores desses polimorfismos (Tabela 9; Figura 5).

Tabela 1: Dados sócio-demográficos dos pacientes com câncer colorretal e indivíduos controles.

Variáveis	Caso (n=232) n (%)	Controle (n=738) n (%)	OR ⁺	IC 95%	Valor de p
Gênero					
Masculino	112 (48)	370 (50)	1,00		
Feminino	120 (52)	368 (50)	2,91	1,94-4,37	<0,01⁺⁺
Idade (Mediana)					
<62	112 (49)	621 (84)	1,00		
≥62	120 (51)	117 (16)	8,79	5,90-13,09	<0,01⁺⁺
Hábito Tabagista					
Não	130 (56)	465 (63)	1,00		
Sim	102 (44)	273 (37)	1,45	0,98-2,14	0,06
Hábito Etilista					
Não	132 (57)	395 (54)	1,00		
Sim	100 (43)	343 (46)	1,28	0,85-1,91	0,24

⁺Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista e polimorfismos.

⁺⁺Valor de p significativo.

Tabela 2: Associação dos polimorfismos nos genes *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1* com o câncer colorretal esporádico.

Polimorfismos	Genótipos	Controle n(%)	Caso n(%)	OR ⁺ (IC95%)	Valor de p
<i>GSTP1</i> Ile105Val					
Codominante	A/A	227 (43,7)	107 (46,1)	1,00	0,82
	A/G	224 (43,2)	102 (44)	1,06 (0,73-1,54)	
	G/G	68 (13,1)	23 (9,9)	0,88 (0,48-1,59)	
Dominante	A/A	227 (43,7)	107 (46,1)	1,00	0,92
	A/G-G/G	292 (56,3)	125 (53,9)	1,02 (0,71-1,45)	
Recessivo	A/A-A/G	451 (86,9)	209 (90,1)	1,00	0,58
	G/G	68 (13,1)	23 (9,9)	0,85 (0,48-1,50)	
Overdominante	A/A-G/G	295 (56,8)	130 (56)	1,00	0,65
	A/G	224 (43,2)	102 (44)	1,09 (0,76-1,55)	
Aditivo		---	---	0,97 (0,75-1,27)	0,85
<i>GSTT1</i>					
	+/+	573 (77,6)	192 (82,8)	1,00	0,04⁺⁺
	0/0	165 (22,4)	40 (17,2)	0,65 (0,43-0,98)	
<i>GSTM1</i>					
	+/+	385 (52,2)	100 (43,1)	1,00	0,02⁺⁺
	0/0	353 (47,8)	132 (56,9)	1,45 (1,06-2,00)	

⁺Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista.

⁺⁺Valor de p significativo.

Tabela 3: Interação entre os polimorfismos dos genes *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1* e hábitos tabagista ou etilista no risco para CCRE.

	Hábito Tabagista							Hábito Etilista						
	Não Fumante			Fumante			p de interação	Não Etilista			Etilista			p de interação
	Caso	Controle	OR ⁺ (95% CI)	Caso	Controle	OR ⁺ (IC95%)		Caso	Controle	OR ⁺ (95% CI)	Caso	Controle	OR ⁺ (IC95%)	
<i>GSTP1</i>														
A/A	50	136	1,00	57	91	2,33 (1,34-4,05)	0,05⁺⁺	59	116	1,00	48	111	1,31 (0,74-2,31)	0,58
A/G-G/G	80	177	1,40 (0,87-2,27)	45	115	1,59 (0,91-2,77)		73	147	1,12 (0,69-1,81)	52	145	1,19 (0,70-2,04)	
<i>GSTT1</i>														
+/+	110	362	1,00	82	211	1,42 (0,98-2,08)	0,64	108	300	1,00	84	273	0,76 (0,52-1,12)	0,82
0/0	20	103	0,60 (0,34-1,04)	20	62	1,03 (0,57-1,88)		24	95	0,63 (0,37-1,07)	16	70	0,53 (0,28-1,01)	
<i>GSTM1</i>														
+/+	52	231	1,00	48	154	1,40 (0,86-2,28)	0,7	56	206	1,00	44	179	0,76 (0,46-1,26)	0,88
0/0	78	234	1,38 (0,90-2,10)	54	119	2,19 (1,34-3,57)		76	189	1,42 (0,93-2,18)	56	164	1,14 (0,72-1,82)	

+Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista.

++Valor de p significativo.

Tabela 4: Distribuição dos parâmetros clínico-histopatológicos em relação aos polimorfismos nos genes *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes com câncer colorretal esporádico.

Progressão tumoral (TNM) (n=201)					
Modelos	Genótipos	Tumores não avançados n(%)	Tumores avançados n(%)	OR ⁺ (IC95%)	Valor de p
<i>GSTP1</i> Ile105Val		61 (30,35)	140 (69,65)		
Codominante	A/A	31 (51,7)	62 (44,9)	1,00	0,65
	A/G	23 (38,3)	65 (47,1)	1,37 (0,70-2,66)	
	G/G	6 (10)	11 (8)	1,14 (0,37-3,50)	
Dominante	A/A	31 (51,7)	62 (44,9)	1,00	0,38
	A/G-G/G	29 (48,3)	76 (55,1)	1,32 (0,71-2,48)	
Recessivo	A/A-A/G	54 (90)	127 (92)	1,00	1,0
	G/G	6 (10)	11 (8)	1,00 (0,34-2,95)	
Overdominante	A/A-G/G	37 (61,7)	73 (52,9)	1,00	0,37
	A/G	23 (38,3)	65 (47,1)	1,34 (0,70-2,56)	
Aditivo	---	---	---	1,18 (0,73-1,92)	0,5
<i>GSTT1</i>					
	+/+	47 (78,3)	118 (85,5)	1,00	
	0/0	13 (21,7)	20 (14,5)	0,57 (0,26-1,27)	0,17
<i>GSTM1</i>					
	+/+	34 (56,7)	53 (38,4)	1,00	
	0/0	26 (43,3)	85 (61,6)	2,33 (1,23-4,41)	0,009⁺⁺

+Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista.

++Valores de p significantes.

Tabela 5: Distribuição dos sítios primários do câncer colorretal esporádico em relação aos polimorfismos nos genes *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1*.

Modelo	Genótipo	Cólon	Reto	OR ⁺ (IC95%)	Valor de p
<i>GSTP1</i> Ile105Val					
Codominante	A/A	42 (46,1)	65 (46,1)	1,00	0,80
	A/G	38 (41,8)	64 (45,4)	0,96 (0,54-1,72)	
	G/G	11 (12,1)	12 (8,5)	0,73 (0,29-1,85)	
Dominante	A/A	42 (46,1)	65 (46,1)	1,00	0,74
	A/G-G/G	49 (53,9)	76 (53,9)	0,91 (0,53-1,57)	
Recessivo	A/A-A/G	80 (87,9)	129 (91,5)	1,00	0,52
	G/G	11 (12,1)	12 (8,5)	0,74 (0,31-1,81)	
Overdominante	A/A-G/G	53 (58,2)	77 (54,6)	1,00	0,95
	A/G	38 (41,8)	64 (45,4)	1,02 (0,59-1,77)	
Aditivo	---	---	---	0,89 (0,59-1,34)	0,59
<i>GSTT1</i>					
---	+/+	78 (85,7)	114 (80,8)	1,00	0,3
	0/0	13 (14,3)	27 (19,1)	1,47 (0,71-3,06)	
<i>GSTM1</i>					
---	+/+	45 (49,5)	55 (39)	1,00	0,14
	0/0	46 (50,5)	86 (61)	1,49 (0,87-2,57)	

+Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista.

Tabela 6: Associação dos genótipos combinados *GSTT1*/*GSTM1* e *GSTT1* / *GSTM1* / *GSTP1* Ile105Val com o câncer colorretal esporádico.

Combinação dupla de genótipos		Caso (n=198)	Controle (n=738)	OR ⁺	IC95%	Valor de p
<i>GSTT1</i>	<i>GTM1</i>					
(+)	(+)	68	303	1		
(+)	(-)	97	270	1,50	(1,03-2,19)	0,03⁺⁺
(-)	(+)	19	82	1,00	(0,55-1,84)	0,99
(-)	(-)	14	83	0,61	(0,32-1,19)	0,15
Combinação tripla de genótipos		Caso (n=198)	Controle (n=519)	OR ⁺	IC95%	Valor de p
<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTP1</i> Ile105Val				
(+)	(+)	Ile/Ile	32	96	1	
(+)	(+)	Val*	36	126	1,13	(0,61-2,10)
(-)	(+)	Ile/Ile	10	22	1,45	(0,56-3,77)
(-)	(+)	Val*	9	34	0,90	(0,36-2,25)
(+)	(-)	Ile/Ile	42	86	1,52	(0,81-2,83)
(+)	(-)	Val*	55	98	1,85	(1,01-3,36)
(-)	(-)	Ile/Ile	9	23	1,27	(0,48-3,40)
(-)	(-)	Val*	5	34	1,27	(0,11-1,08)

*Ile/Val ou Val/Ile

+Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista.

++Valor de p significativo.

Tabela 7: Associação dos genótipos combinados *GSTT1*/*GSTM* e *GSTT1* / *GSTM* / *GSTP1* Ile105Val com a progressão tumoral.

Progressão tumoral (TNM) (n=198)							
Combinação dupla de genótipos		Tumores não avançados (n=60)	Tumores avançados (n=138)	OR ⁺	IC95%	Valor de p	
<i>GSTT1</i>	<i>GTM1</i>						
(+)	(+)	26	42	1			
(+)	(-)	21	76	2,40	(1,19-4,85)	0,01⁺⁺	
(-)	(+)	8	11	0,74	(0,26-2,15)	0,58	
(-)	(-)	5	9	1,20	(0,35-4,10)	0,77	
Combinação tripla de genótipos			Tumores não avançados (n=60)	Tumores avançados (n=138)	OR ⁺	IC95%	Valor de p
<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTP1</i> Ile105Val					
(+)	(+)	Ile/Ile	12	20	1		
(+)	(+)	Val*	14	22	0,93	(0,34-2,56)	0,88
(-)	(+)	Ile/Ile	5	5	0,50	(0,12-2,18)	0,36
(-)	(+)	Val*	3	6	1,07	(0,21-5,31)	0,94
(+)	(-)	Ile/Ile	8	22	1,78	(0,65-4,86)	0,26
(+)	(-)	Val*	10	42	2,92	(1,05-8,12)	0,04⁺⁺
(-)	(-)	Ile/Ile	3	5	1,25	(0,25-6,19)	0,78
(-)	(-)	Val*	1	3	1,01	(0,14-7,42)	0,99

*Ile/Val ou Val/Ile

+Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista.

++Valor de p significativo.

Tabela 8: Distribuição dos genótipos combinados *GSTT1*/*GSTM1* e *GSTT1* / *GSTM1* / *GSTP1* Ile105Val de acordo com o sítio primário do CCRE.

Combinação dupla de genótipos			Cólon (n=81)	Reto (n=117)	OR ⁺	IC95%	Valor de p
<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i>						
(+)	(+)		34	34	1		
(+)	(-)		36	61	1,67	(0,88-3,18)	0,12
(-)	(+)		7	12	1,70	(0,59-4,94)	0,33
(-)	(-)		4	10	2,60	(0,72-9,46)	0,15
Combinação tripla de genótipos			Cólon (n=81)	Reto (n=117)	OR ⁺	IC95%	Valor de p
<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTP1</i> Ile105Val					
(+)	(+)	Ile/Ile	16	10	1		
(+)	(+)	Val*	12	17	1,81	(0,67-4,92)	0,24
(-)	(+)	Ile/Ile	18	22	1,41	(0,33-5,98)	0,65
(-)	(+)	Val*	2	7	4,57	(0,80-26,24)	0,09
(+)	(-)	Ile/Ile	11	19	2,58	(0,99-6,75)	0,05
(+)	(-)	Val*	19	33	2,06	(0,83-5,15)	0,12
(-)	(-)	Ile/Ile	1	7	5,47	(0,92-32,60)	0,06
(-)	(-)	Val*	2	2	1,88	(0,27-13,33)	0,52

*Ile/Val ou Val/Ile

+Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista.

Tabela 9. Polimorfismos *GSTT1*, *GSTMI* e *GSTPI* Ile105Val em relação sobrevida de pacientes com câncer colorretal esporádico.

Polimorfismos	Sobrevida (5 anos)	Valor de p <i>Log Rank</i>
<i>GSTPI</i>		
Ile105Val		
AA	61%	0,71
AG	70%	
GG	63%	
<i>GSTT1</i>		
Positivo	64%	0,99
Negativo	68%	
<i>GSTMI</i>		
Positivo	67%	0,44
Negativo	63%	

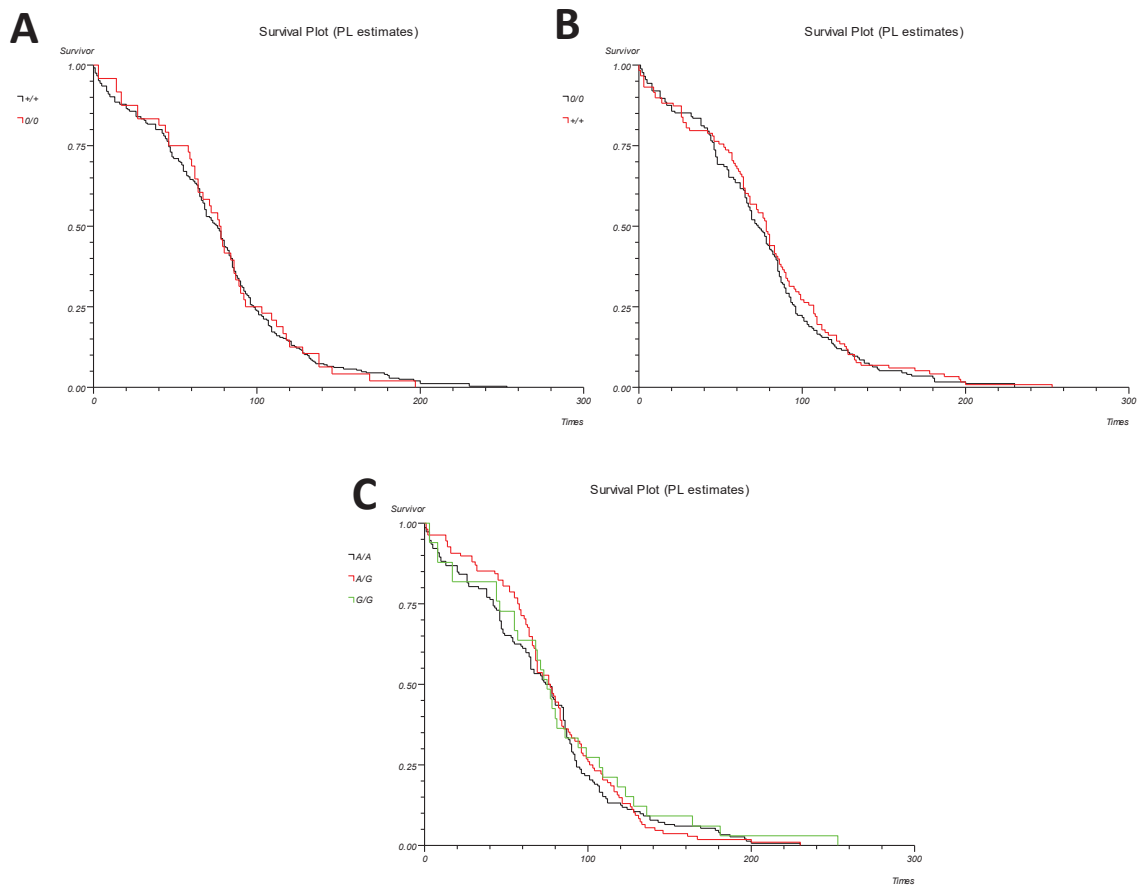


Figura 5: Curva de *Kaplan-Meier* para análise de sobrevida dos pacientes com CCRE em relação aos polimorfismos *GSTT1* (A), *GSTM1* (B), *GSTP1* Ile105Val (C).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que indivíduos com idade avançada (≥ 62 anos) são mais suscetíveis ao CCRE, o que corrobora com a literatura que considera a idade avançada como um fator etiológico para este tipo tumoral.^(2,14) Em relação ao gênero, as mulheres apresentam maior suscetibilidade ao CCRE. Outros estudos observaram proporção semelhante dos gêneros entre pacientes com CCRE e controles.^(51,52,53) É possível observar um crescimento no número de casos entre as mulheres devido ao aumento do consumo de cigarro e álcool.^(54,55) É importante salientar que o grupo de mulheres com CCRE avaliado neste estudo apresentaram média de idade de 62 ± 13 anos, o que pode sugerir que o fator hormonal pode contribuir para a CCRE. Alguns trabalhos associaram a pós-menopausa com a incidência de câncer colorretal em mulheres.^(56,57,58) Além disso, a terapia de reposição hormonal mostrou-se um fator de proteção para o CCRE.^(59,60,61,62) E uma metanálise associou efeito protetor de estrogênio da soja em mulheres com CCRE e na pós-menopausa.⁽⁶³⁾

Os hábitos tabagista e etilista, no presente estudo, não foram associados com o CCRE. Por outro lado, Koh e colaboradores⁽⁶⁴⁾ observaram um risco três vezes maior para o CCRE entre os fumantes em comparação aos que nunca fumaram. Alguns dados sobre o risco de CCRE devido ao consumo de álcool são inconsistentes, o que pode ser explicado pela variação da quantidade de ingestão de doses do álcool analisada nos diferentes estudos.^(23,65)

A análise do Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) revelou que o polimorfismo *GSTP1* Ile105Val está em equilíbrio em ambos os grupos caso e controle. Esse resultado foi semelhante ao observado por outros estudos em CCRE^(52,66) Em relação

aos polimorfismos *GSTT1* e *GSTMI*, o teste do EHW não foi possível, uma vez que a análise molecular não distinguiu indivíduos homocigotos selvagens e heterocigotos.⁽⁵¹⁾

No presente estudo, o polimorfismo do gene *GSTP1* não mostrou associação com CCRE, corroborando com outros trabalhos em população búlgara e chinesa.^(12,51,53,67) Entretanto, um estudo com população da Tunísia observou uma diferença significativa na frequência do polimorfismo entre os grupos caso e controle e este foi associado ao risco para o CCRE.⁽⁵²⁾ Por outro lado, um único estudo observou risco reduzido para o CCRE na presença do polimorfismo *GSTP1* Ile105Val, entretanto não existem dados consistentes para explicar a relevância biológica deste achado.⁽⁴⁸⁾

O polimorfismo do gene *GSTP1* resulta na alteração da sequência de aminoácidos da proteína e conseqüente redução da atividade enzimática e detoxificação ineficiente.⁽²⁸⁾ Entretanto, embora o polimorfismo *GSTP1* Ile105Val não tenha sido associado ao CCRE neste estudo, o nível de expressão desse gene pode ser um fator importante e este não é dependente do polimorfismo. Estudo em carcinoma hepatocelular (CHC) observou que o aumento da expressão do gene *GSTP1* *in vivo* e *in vitro* resultou em redução da proliferação celular em células tumorais, inibição da fosforilação de Akt e interrupção do ciclo celular em G1 / S por meio do aumento dos inibidores do ciclo celular p21 e p27.⁽⁶⁸⁾ A expressão elevada de *GSTP1* também foi associada com melhor prognóstico dos pacientes com HCC.⁽⁶⁸⁾ Além disso, a hipermetilação de *GSTP1* foi observada em vários tipos de cânceres como câncer de próstata, mama, pulmão e fígado.⁽⁶⁹⁾

Em relação aos polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTMI*, o genótipo nulo de *GSTT1* foi associado à redução do risco para o desenvolvimento do CCRE, enquanto, que a presença do genótipo nulo *GSTMI* foi associada ao aumento do risco de CCRE. A

ausência de algumas das isoenzimas de GST na mucosa colorretal normal resultante de genótipos nulos como a presença do polimorfismo *GSTM1* podem alterar a principal função de detoxificação das GSTs no metabolismo de xenobióticos.⁽¹³⁾ Em populações chinesa e iraniana foi evidenciado um risco aumentado para o CCRE na presença dos genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1*.^(51,70) Por outro lado, outros estudos não encontraram associação entre os genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* com o CCRE.^(12,48,52,71,72,73) O estudo caso-controle de Vlaykova e colaboradores⁽¹³⁾ não encontrou associação entre genótipo nulo *GSTM1* e o risco para CCRE; entretanto o genótipo nulo *GSTT1* foi associado com risco aumentado para o CCRE. Esses diferentes resultados podem estar relacionados ao tempo de exposição aos fatores ambientais e a heterogeneidade populacional.

Foi observado que o efeito dos polimorfismos de GST, quando combinados, pode aumentar em duas ou três vezes o risco para o CCRE.⁽⁶⁶⁾ O presente estudo demonstrou que as combinações de genótipos *GSTT1* não nulo/*GSTM1* nulo e *GSTT1* não nulo/*GSTM1* nulo/*GSTP1* Val*(presença de pelo menos um alelo polimórfico) estão associadas com o risco aumentado para o CCRE e com a progressão do tumor. Esses achados corroboram os resultados das análises individuais dos polimorfismos, que sugerem a influência do genótipo *GSTT1* não nulo no CCRE, uma vez que o genótipo nulo foi associado com risco reduzido para a doença.

Em população indiana foi encontrada associação entre os genótipos combinados de *GSTM1* nulo/*GSTT1* nulo e a combinação *GSTM1* nulo/*GSTT1* nulo/*GSTP1* Val* e o risco de CCRE⁽⁶⁶⁾. Este resultado também foi observado em trabalho de Vlaykova e colaboradores⁽¹³⁾ em população búlgara. Um estudo em população turca encontrou associação dos genótipos *GSTT1* nulo/*GSTM1* não nulo e *GSTT1* nulo/*GSTM1* não

nulo/ *GSTPI* Ile (homozigoto selvagem) e o CCRE.⁽¹²⁾ Cong e colaboradores⁽⁵¹⁾ observaram risco aumentado na presença dos genótipos *GSTTI/GSTMI*, enquanto que a combinação de genótipos *GSTTI* não-nulo / *GSTMI* nulo resultaram em um risco significativamente reduzido para o CCRE diferindo dos achados deste e de outros estudos. Por outro lado, outros trabalhos que analisaram o efeito dos genótipos combinados *GSTTI/GSTMI* não encontraram associação com o risco para o CCRE.^(52,71,72) Vários estudos têm avaliado o potencial de associação entre o CCRE e os genótipos combinados destes polimorfismos. Os resultados observados são diferentes, evidenciando a importância do estudo dos efeitos da combinação genotípica no CCRE.

No presente estudo, foi evidenciada uma interação significativa entre presença do alelo selvagem do polimorfismo *GSTPI* Ile105Val e o hábito tabagista no risco para o CCRE. Diferindo do resultado do presente estudo, um estudo em população chinesa não observou interação entre o *GSTPI* Ile105Val e o hábito tabagista e também etilista no risco de CCRE.⁽⁶⁴⁾ A literatura é escassa de estudos que avaliam a interação de fatores de risco com o polimorfismo *GSTPI* Ile105Val no desenvolvimento de CCRE. A relevância biológica deste achado não está clara, uma vez que a presença de pelo menos um alelo polimórfico do gene *GSTPI* combinada com a nulidade de *GSTMI* e a presença do alelo *GSTTI* foi associada ao aumento do risco para o CCRE. Ademais, o hábito tabagista não foi associado a este tipo tumoral no presente estudo.

Para os polimorfismos *GSTTI* e *GSTMI*, este estudo não evidenciou interação com os hábitos tabagista ou etilista no risco para CCRE. Estes resultados corroboram com outros dois estudos em populações coreana e japonesa que também não encontraram em essa interação em relação ao hábito tabagista.^(72,73) Quando analisada interação do hábito etilista e os genótipos nulos *GSTTI* e *GSTMI* para o risco de CCRE,

o estudo de Piao e colaboradores⁽⁷³⁾ não evidenciou essa relação. No entanto, um estudo realizado em Cingapura encontrou um risco aumentado para indivíduos tabagistas portadores de pelo menos dois genótipos nulos que causam a baixa atividade enzimática.⁽⁶⁴⁾

Os resultados controversos em relação aos polimorfismos podem sugerir que outros genes envolvidos no metabolismo dos xenobióticos podem apresentar maior relevância para o desenvolvimento do CCRE, como os polimorfismos em genes atuantes da fase I do metabolismo xenobiótico.^(14,74) Apesar dos polimorfismos estudados alterarem de forma a reduzir ou eliminar a atividade enzimática, outros genes podem atuar compensando a detoxificação das substâncias presentes no tabaco e no álcool.

Em relação aos parâmetros clínico-histopatológicos do CCRE, é possível observar que houve uma associação entre o genótipo nulo do *GSTM1* e a presença de tumores avançados. Um estudo demonstrou uma associação entre tumores mais avançados com a presença do genótipo nulo *GSTT1*.⁽⁷¹⁾ Entretanto, outros estudos que avaliaram os mesmos polimorfismos não encontraram associação entre os genótipos polimórficos e os parâmetros clínico-histopatológicos do CCRE.^(12,53,67,73)

Quando investigada a associação entre polimorfismos e os sítios primários do CCRE, nenhuma associação foi evidenciada. Corroborando com estes achados, um estudo de Vlaykova e colaboradores⁽¹³⁾ não relacionou os polimorfismos de genótipos nulo *GSTT1* e *GSTM1* com o sítio primário. Entretanto, Wang e colaboradores⁽⁶⁶⁾, observou aumento do risco para o câncer de reto na presença do genótipo nulo *GSTM1*, enquanto o genótipo nulo de *GSTT1* foi associado com o risco para o câncer de cólon.

Vale salientar que a predisposição para o CCRE é multifatorial e é resultante da interação entre variantes alélicas de genes de baixa penetrância e fatores ambientais como idade avançada, hábitos alimentares, tabagismo e etilismo.^(12,75,76) Portanto, os achados do presente estudo em relação à modulação da suscetibilidade para o CCRE na presença dos polimorfismos analisados, independente do hábito tabagista ou etilista, reforça a influência desses polimorfismos na etiologia do CCRE, mesmo que não tenham influência na sobrevida dos pacientes. Estes resultados poderão contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na carcinogênese colorretal.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Em relação aos dados sócio-demográficos analisados, concluímos que indivíduos com idade avançada e do gênero feminino são mais suscetíveis ao CCRE.

- A presença do genótipo nulo *GSTM1* está associada com aumento do risco para o câncer colorretal esporádico.- A combinação dos genótipos *GSTT1// GSTM1* e *GSTT1// GSTM1// GSTP1* está associada com o risco aumentado para o CCRE e progressão do tumor.

- O genótipo nulo de *GSTM1* é associado à presença de tumores mais avançados.

- Os polimorfismos não estão associados com o tempo de sobrevida dos pacientes com CCRE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Globocan. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Acessado em: 10 de dezembro de 2017
- 2 Instituto Nacional do Câncer: <http://www.inca.gov.br>. Acessado em: 20 de Fevereiro de 2018.
- 3 Tanakaya K. Current clinical topics of Lynch syndrome. *Int J Clin Oncol* 2018
- 4 National Cancer Institute: <http://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colorectal-genetics-pdq>. Acessado em: 10 de Janeiro de 2018.
- 5 Valadão M, Castro LS. Câncer colo-retal hereditário. *Rev Col Bras Cir* 2007; 34:193-2007.
- 6 Øines M, Helsingen LM, Bretthauer M, Emilsson L. Epidemiology and risk factors of colorectal polyps. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2017; 31:419-24.
- 7 Jass, J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50:113–130.
- 8 Sintomas do Câncer. <https://sintomasdocancer.com/cancer-de-colon>. Acessado em: 3 de Fevereiro de 2018.
- 9 Bhalla A, Zulfiqar M, Bluth MH. Molecular Diagnostics in Colorectal Carcinoma: Advances and Applications for 2018. *Clin Lab Med* 2018 38: 311-342
- 10 Huang D, Sun W, Zhou Y, Li P, Chen F, Chen H, et al. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2018; 37: 173-187
- 11 Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2016;7:105-14.
- 12 Gorukmez O, Yakut T, Gorukmez O, Topak A, Sahinturk S, Kanat O. Glutathione S-transferase T1, M1 and P1 Genetic Polymorphisms and Susceptibility to Colorectal Cancer in Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17:3855-9.

- 13 Vlaykova T, Gulubova M, Vlaykova D, Cirovski G, Yovchev Y, Dimov D, et al. Possible Influence of GSTM1 and GSTT1 Null Genotype on the Risk for Development of Sporadic Colorectal Cancer. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2009;23:1084-89.
- 14 Fernandes GMM, Russo A, Proença MA, Gazola NF, Rodrigues GH, Biselli-Chicote PM, et al. *CYP1A1*, *CYP2E1* and *EPHX1* polymorphisms in sporadic colorectal neoplasms. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 9974-83.
- 15 Pelucchi C, Tramacere I, Boffetta P, Negri E, La Vecchia. Alcohol consumption and cancer risk. *Nutr Cancer* 2011;63:983-90.
- 16 Silva M & Errante PG. Câncer colorretal: Fatores de risco, diagnóstico e tratamento. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa* 2016;13:133-40.
- 17 Liang PS, Chen TY and Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2009;124:2406–15.
- 18 Xue W, Warshawsk D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206:73-93.
- 19 Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2008;300:2765–78.
- 20 Ahrendt SA, Chow JT, Yang SC, Wu L, Zhang MJ, Jen J, et al. Alcohol Consumption and Cigarette Smoking Increase the Frequency of p53 Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 2000;60: 3155-59.
- 21 Slattery ML, Potter J, Caan B, Edwards S, Coates A, Ma KN, et al. Energy balance and colon cancer - Beyond physical activity. *Cancer Res* 1997;57:75–80.
- 22 Seitz HK, Becker P. Alcohol Metabolism and Cancer Risk. *Alcohol Res Health* 2007;30:38-47.

- 23 Rossi M, Jahanzaib Anwar M, Usman A, Keshavarzian A, Bishehsari F. Colorectal Cancer and Alcohol Consumption – Populations to Molecules. *Cancers* 2018;10:e38.
- 24 Fan C, Yu S, Zhang S, Ding X, Su J, Cheng Z. Association between folate intake and risk of head and neck squamous cell carcinoma: An overall and dose–response PRISMA meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:e8182.
- 25 Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncol* 2005;41:244–60.
- 26 Pufulete M, Al-Ghnanien 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.
- 27 Kanés AB, Kumar V. Patologia Nutricional e Ambiental. In: Abbas AK, Kumar V, Fausto N. *Bases Patológicas das Doenças*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. p. 433-90.
- 28 Gonzales FJ, Coughtrie M, Tukey RH. Metabolismo dos fármacos. In: *As bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12^a ed. Rio de Janeiro:AMGH; 2012. p.135-136
- 29 Bock KW. Homeostatic control of xeno- and endobiotics in the drug-metabolizing enzyme system. *Biochem Pharmacol* 2014;90:1-6.
- 30 Masters SB, Trevor AJ. Os álcoois. In: Katzung BG, Trevor AJ. *Farmacologia Básica e Clínica* - 13^a ed. Porto Alegre:AMGH; 2017. p. 385
- 31 Russo A. Avaliação de polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço [Dissertação]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2011.

- 32 Pal D, Kwatra D, Minocha M, Paturi DK, Budda B, Mitra AK. Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. *Life Sci* 2010; 23;88:959-71.
- 33 Strachan T Read A. *Genética Molecular Humana*. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
- 34 Ye Z, Song H, Higgins JP, Pharoah P, Donesh J. Five Glutathione transferase gene variant in 23, 452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *Plos Med* 2006;7:91.
- 35 Zheng T, Holford TR, Zhahm SH, Owens PH, Boyle P, Zhang Y, et al. Cigarette smoking glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Causes Control* 2002;13:637-45.
- 36 Seigard J, Ekstrom G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1999; 20:743-48
- 37 Hatagima A, Costa ECB, Marques CFS, Koifman RJ, Boffetta P, Koifman S. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: A case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol* 2008; 44: 200-7.
- 38 Dunna NR, Vuree S, Kagita S, D Surekha, Digumarti R, Rajappa S, et al. Association of GSTP1 gene (I105V) polymorphism with acute leukaemia. *J Genet*. 2012; 91: 60-3.
- 39 Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries LW, Lobo CR, et al. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1285-9.
- 40 Srivastava DS, Mandhani A, Mittal B, Mittal RD. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and susceptibility to prostate cancer in Northern India. *BJU Int* 2005; 95: 170-3.

- 41 Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY , Strickland PT, Hoffman S, Alberg AJ, et al. Association Between Glutathione S-Transferase M1, P1, and T1 Genetic Polymorphisms and Development of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 51 2-8.
- 42 Maggini V, G Buda, Galimberti S, Martino A, Orciuolo E, F Morabito, et al. Lack of association of NQO1 and GSTP1 polymorphisms with multiple myeloma risk. *Leuk Res* 2008; 32: 988-90.
- 43 Klusek J, Głuszek S, Klusek J. GST gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer development. *Contemp Oncol* 2014;18:219-21.
- 44 Andersen V, Holst R, Vogel U. Systematic review: diet–gene interactions and the risk of colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;37:383-91.
- 45 Kjaerhein K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10.900 Norwegian men. *Cancer Causes Control* 1998;9:99-108, 10.1023/A:1008809706062.
- 46 American Cancer Society. <https://www.cancer.org> Acessado em 13 de janeiro de 2018
- 47 Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado M, Hirata RDC. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem* 1998;44:1748-50.
- 48 Hezova R, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Brezkova V, Vasku A, et al. Common polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and susceptibility to colorectal cancer in the Central European population. *Eur J Med Res* 2012;17:17.
- 49 Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione-S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997;18:641–4.

- 50 Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996;107:229-33.
- 51 Cong N, Liu L, Xie Y, Shao W, Song J. Association between Glutathione S-Transferase T1, M1, and P1 Genotypes and the Risk of Colorectal Cancer. *J Korean Med Sci* 2014;29:1488-192.
- 52 Kassab A, Msolly A, Lakhdar R, Gharbi O, Miled A. Polymorphisms of glutathione-S-transferases M1, T1, P1 and susceptibility to colorectal cancer in a sample of the Tunisian population. *Med Oncol* 2014;31: 760.
- 53 Vlaykova,T, Miteva L, Gulubova M, Stanilova S. Ile105Val GSTP1 polymorphism and susceptibility to colorectal carcinoma in Bulgarian population. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 1209.
- 54 Osazuwa-Peters N, Massa ST, Christopher KM, Walker RJ, Varvares, MA. Race and sex disparities in long-term survival of oral and oropharyngeal cancer in the United States. *J cancer Res Clin Oncol* 2016;142:521-28.
- 55 Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *Br J Nutr* 2015;113:102-10.
- 56 Hendifar A, Yang D, Lenz F, Lurje G, Pohl A, Lenz C, et al. Gender disparities in metastatic colorectal cancer survival. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6391-97
- 57 Iida Y, Kawai K, Tsuno NH, Ishihara S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T. Proximal shift of colorectal cancer along with aging. *Clin Colorectal Cancer* 2014; 13: 213-8.
- 58 Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML,

- Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 321-33.
- 59 Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW Jr. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87: 517-23.
- 60 Chan JA, Meyerhardt JA, Chan AT, Giovannucci EL, Colditz GA, Fuchs CS. Hormone replacement therapy and survival after colorectal cancer diagnosis. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5680-6.
- 61 Mandelson MT, Miglioretti D, Newcomb PA, Harrison R, Potter JD. Hormone replacement therapy in relation to survival in women diagnosed with colon cancer. *Cancer Causes Control* 2003;14: 979-84.
- 62 Slattery ML, Anderson K, Samowitz W, Edwards SL, Curtin K, Caan B, Potter JD. Hormone replacement therapy and improved survival among postmenopausal women diagnosed with colon cancer (USA). *Cancer Causes Control* 1999; 10: 467-73.
- 63 Yan L, Spitznagel EL, Bosland MC. Soy consumption and colorectal cancer risk in humans: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(1):148-58.
- 64 Koh W-P, Nelson HH, Yuan J-M, Van den Berg D, Jin A, Wang R, et al. Glutathione S-transferase (GST) gene polymorphisms, cigarette smoking and colorectal cancer risk among Chinese in Singapore. *Carcinogenesis* 2011;32:1507-11.
- 65 Cai S, Li Y, Ding Y, Chen K, Jin M. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev* 2014 , 23:532-39.

- 66 Wang J, Jiang J, Zhao Y, Gajalakshmi V, Kuriki K, Suzuki S, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to colorectal cancer: a case-control study in an Indian population. *Cancer Epidemiol* 2011;35: 66-72.
- 67 Khabaz MN. The GSTP1 Ile105Val polymorphism is not associated with susceptibility to colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13: 2949-53.
- 68 Liu X, Tan N, Liao H, Pan G, Xu Q, Zhu R, et al. High GSTP1 inhibits cell proliferation by reducing Akt phosphorylation and is associated with a better prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(10):8957-8971. [PMID: 29507666 DOI:10.18632/oncotarget.23420]
- 69 Gurioli G, Martignano F, Salvi S, Constantini M, Gunelli R, Casadio V. GSTP1 methylation in cancer: a liquid biopsy biomarker?. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 0(0), pp. -. Retrieved 28 Mar. 2018, [PMID: 29305565 DOI:10.1515/cclm-2017-0703]
- 70 Saadat I & Saadat M. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes and the risk of gastric and colorectal cancers. *Cancer Lett* 2001; 169:21–26.
- 71 Nissar S, Sameer A, Rasool R, Chowdri N, Rashid F. Evaluation of deletion polymorphisms of glutathione S-transferase genes and colorectal cancer risk in ethnic Kashmiri population: A case–control study. *Indian J Cancer* 2016;53:524-8
- 72 Nisa H, Kono S, Yin G, Toyomura K, Nagano J, Mibu R, et al. Cigarette smoking, genetic polymorphisms and colorectal cancer risk: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *BMC Cancer* 2010;10:274.
- 73 Piao JM, Shin MH, Kweon SS, Kim HN, Choi JS, Bae WK, et al. Glutathione-S-transferase GSTM1, GSTT1 and the risk of gastrointestinal cancer in a Korean population. *World J Gastroenterol* 2009;15:5716-21.

- 74 Zhu X, Wang Z, He J, Wang W, Xue W, Wang Y, et al. Associations between CYP1A1 rs1048943 A > G and rs4646903 T > C genetic variations and colorectal cancer risk: Proof from 26 case-control studies. *Oncotarget* 2016; 7: 51365-74.
- 75 Hunter DJ, Riboli E, Haiman CA, Albanes D, Altshuler D, Chanock SJ, et al. A candidate gene approach to searching for low-penetrance breast and prostate cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2005;5:977-85
- 76 De la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:769-80.

ANEXOS

8. ANEXOS

a. Anexo 1



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94

Parecer n.º 012/2012

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo CEP 7273/2011 sob a responsabilidade de **Glaucia Maria de Mendonça Fernandes** com o título "Investigação Molecular e Epidemiológica de Genes do Metabolismo de Xenobióticos em pacientes com Câncer Colorretal Esporádico" está de acordo com a resolução do CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 14 de fevereiro de 2012.


Prof^a. Dr^a. **Beatriz Barco Tavares Jontaz Irigoyen**
Vice-Presidente do CEP/FAMERP

b. Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO*(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)*

Título: Investigação molecular e epidemiológica de genes do metabolismo de xenobióticos em pacientes com câncer colorretal esporádico.

Pesquisadores Responsáveis: Gláucia Maria de Mendonça Fernandes – Responsável// Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo – Geneticista – UPGEM – Pesquisador Colaborador// João Gomes Netinho – Departamento de Cirurgia – FAMERP.

A. Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do tumor colorretal esporádico, os pesquisadores da FAMERP de São José do Rio Preto, SP, estão desenvolvendo uma pesquisa científica que poderá melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto oferecer novas possibilidades de diagnóstico e de melhora na qualidade de vida;

B. Este estudo tem como objetivos: 1) Coletar informações da história e obter dados clínicos dos prontuários médicos dos pacientes com tumor colorretal atendidos no Serviço de Coloproctologia vinculado ao Departamento de Cirurgia do Hospital de Base de São José do Rio Preto. 2) Aplicar um questionário sobre os dados sociodemográficos e fatores de risco; 3) Analisar alterações em genes (material hereditário) com a finalidade de esclarecer o papel de fatores genéticos no desenvolvimento do tumor;

C. Para este estudo serão utilizados dois grupos de pessoas: 1) pacientes com tumor colorretal esporádico; 2) indivíduos saudáveis sem histórico de doenças crônicas, que constituirão o grupo controle;

D. O estudo será feito utilizando-se sangue, que será colhido com seringa descartável por enfermeira e o risco da colheita pode incluir inchaço e vermelhidão no local, sem qualquer outro risco para minha saúde;

E. O material (sangue) será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, minha privacidade e identidade serão preservadas;

F. O material genético (DNA), ou seja hereditário, extraído do sangue será armazenado de acordo com normas específicas para esse tipo de material, codificado (para não identificação dos nomes dos sujeitos da pesquisa) e utilizada para a pesquisa proposta. No caso de futuras investigações será solicitado autorização ao CEP;

G. Todas as informações por mim fornecidas por meio do questionário e os resultados serão mantidos em sigilo e que, estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas;

H. Se eu concordar em participar desta pesquisa e se eu concordar com a retirada e uso do meu sangue, do modo descrito acima, não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se eu não concordar, em doar o sangue para a pesquisa ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de nenhum modo, o meu tratamento;

I. Esse estudo é importante porque pode colaborar para conhecimento científico dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento desta patologia e o resultado individual não será relevante para o sujeito da pesquisa, mas reforço que contribuirá para o conhecimento da condição investigada. Após o término da pesquisa será realizada uma reunião com todos os sujeitos da pesquisa para divulgar os resultados obtidos.

J. Declaro que, após ter convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido a qualquer tipo de pressão.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome do(a) participante:

Representante legal:

RG do prontuário médico:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do(a) pesquisador:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Inscrição no Conselho Regional:

João Gomes Netinho - Departamento de Cirurgia
Gláucia Maria de Mendonça Fernandes
Av. Brigadeiro Faria Lima, no. 5416
FAMERP - Faculdade de Medicina de S.J. Rio Preto
São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000
Fone: (17) 3201-5726 ou ramal: 5720
e-mails: fernandes_glauucia@hotmail.com; jgnetinho@riopreto.com.br

Em caso de dúvidas contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (0xx17) 3201-5700, ramal 5720.

c. Anexo 3

Questionário do Projeto

I. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Prontuário: _____
 Data de nascimento: ____/____/____. Idade: _____. Local: _____
 Sexo: () Etnia: () Branco () Não-branco [pardo/negro] () Asiático. Escolaridade: _____
 Endereço: Rua _____ Nº: ____ Fone: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____ Estado: _____
 Profissão atual: _____ Tempo de atuação: _____
 Profissão anterior: _____ Tempo de atuação: _____

II. DADOS DO TUMOR

Local do tumor: _____ Data de diagnóstico: ____/____/____
 TNM: Clínico: T () N () M () Patológico: _____
 Tumor primário: () Sim () Não Local: _____
 Recidiva: () Sim () Não Local: _____
 Início do diagnóstico do câncer: Mês () Ano () Tipo: _____
 Cirurgia: () Sim () Não Tipo: _____ Data: ____/____/____
 Radioterapia: () Sim () Não Data de início - Período: ____/____/____ - ____/____/____
 Quimioterapia: () Sim () Não Data de início - Período: ____/____/____ - ____/____/____

III. FATORES DE RISCO AMBIENTAL

Exposição ao tabaco*: () Sim () Não () Ex-fumante Tipo: _____
 Início: _____ Término: _____ Duração: _____ Consumo diário: _____
 Consumo de álcool**: () Sim () Não () Ex-etilista Tipo: _____
 Início: _____ Término: _____ Duração: _____ Consumo semanal: _____
 Você teve algum trabalho em que se expôs a produtos químicos ou pesticidas? () Sim () Não

IV. HISTÓRICO MÉDICO PESSOAL E FAMILIAL

Antecedentes pessoais:	Antecedentes familiares:	Grau de Parentesco
() Diabetes mellitus há ____ anos	() Diabetes mellitus há ____ anos	_____
() Doença de Crohn há ____ anos	() Doença de Crohn há ____ anos	_____
() Retocolite Ulcerativa Crônica ____ anos	() Retocolite Ulcerativa Crônica há ____ anos	_____
() Pólipo () Adenoma () Câncer	() Pólipo () Adenoma () Câncer	_____
Tipo: _____	Tipo: _____	
Outras: _____	Outras: _____	
Tratamentos anteriores: () Sim () Não Tipo: _____		
Cirurgias anteriores: () Sim () Não Tipo: _____		
Uso de medicamentos: () Sim () Não Tipo: _____		

V. INFORMAÇÕES SOBRE ALIMENTAÇÃO

Você esteve em dieta no último ano ou antes em decorrência de alguma doença? () Sim () Não. Qual: _____
 Ingestão de carne x frequência na semana:
 () Bovina _____ x por semana () Suína _____ x por semana
 () Aves _____ x por semana () Peixes _____ x por semana

DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO

Data: ____/____/____

Responsável pelo procedimento: _____

d. Anexo 4

Artigo original

Tipo de Manuscrito: Estudo caso-controle

Título: Avaliação molecular de genes da família das Glutathionas S Transferases em pacientes com câncer colorretal esporádico.

Gabriela Helena Rodrigues Fleming, Glaucia Maria de Mendonça Fernandes, Anelise Russo, Patrícia Mattos Biselli-Chicote, João Gomes Netinho, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo.

Gabriela Helena Rodrigues Fleming, Glaucia Maria de Mendonça Fernandes, Anelise Russo, Patrícia Matos Biselli-Chicote, Érika Cristina Pavarino and Eny Maria Goloni-Bertollo, Unidade de Pesquisa em genética e Biologia Molecular - UPGEM, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São José do Rio Preto 15090-000, SP, Brasil.

João Gomes Netinho, Departamento de Cirurgia e Serviço de Coloproctologia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São José do Rio Preto 15090-000, SP, Brasil.

Auxílio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos 2011/23969-1 e 2012/02473-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processos 310582 / 2014-8).

Declaração do comitê de revisão institucional: O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP / FAMERP, protocolo nº 012/2012 (CAAE: 0237.0.140.00011).

Declaração de consentimento informado: Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento informado.

Declaração de conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Correspondência para: Eny Maria Goloni Bertollo, PhD, Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular - UPGEM, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro - CEP: 15090-000. eny.goloni@famerp.br

Telefone: +55 17 32015720

Fax: +55 17 32015708

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a associação entre fatores de risco sociodemográficos, polimorfismo *GSTP1* Ile105Val e genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1* e o desenvolvimento de câncer colorretal esporádico (CCRE); investigar a interação entre esses polimorfismos e o consumo de tabaco e álcool; verificar a associação entre esses polimorfismos e parâmetros clínicos e histopatológicos do CCRE; e avaliar a influência dos polimorfismos no tempo de sobrevida global de pacientes com CCRE.

MÉTODOS: Foi realizado estudo caso-controle em 970 indivíduos da população brasileira (232 pacientes com CCRE e 738 controles (indivíduos sem histórico de câncer)). As técnicas de PCR Multiplex e PCR-RFLP foram realizadas para análise dos polimorfismos.

RESULTADOS: Idade igual ou superior a 62 anos (OR = 8,79; IC95% = 5,90-13,09; $p < 0,01$) e gênero feminino (OR = 2,91; IC95% 1,74-4,37; $p < 0,01$) foram associados ao aumento do risco para CCRE. A análise dos polimorfismos revelou associação entre o genótipo nulo *GSTM1* e risco para CCRE (OR = 1,45; IC95% = 1,06-2,00; $p = 0,02$) e entre o genótipo nulo *GSTT1* e risco reduzido para a doença (OR = 0,65 IC95% = 0,43-0,98; $p = 0,04$). Foi observada uma interação entre a presença do alelo selvagem do polimorfismo Ile105Val *GSTP1* e o consumo de tabaco em risco para CCRE (OR = 2,33; IC 95% = 1,34-4,05; $p = 0,05$). Houve associação entre o genótipo nulo *GSTM1* e a presença de tumores

avanzados (OR = 2,33, IC95% = 1,23-4,41, p = 0,009) e aumento do risco de CCRE na presença da combinação de genótipos *GSTT1* não-nulos / *GSTM1* nulo (OR = 1,50; IC95% = 1,03-2,19; p = 0,03) e *GSTT1* não-nulo / *GSTM1* nulo / *GSTP1* Val * (OR = 1,85; IC95% = 1,01-3,36, p = 0,04). Os genótipos combinados *GSTT1* não nulo / *GSTM1* nulo (OR = 2,40, IC 95% = 1,19-4,85, p = 0,01) e *GSTT1* não nulo / *GSTM1* nulo / *GSTP1* Val * (OR = 2,92; IC95% = 1,05-8,12, p = 0,04) foram associados à progressão tumoral. Polimorfismos não foram associados à sobrevida de pacientes com CCRE.

CONCLUSÃO: Indivíduos com idade igual ou maior do que 62 anos e o gênero feminino são mais suscetíveis ao CCRE. Polimorfismos de genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1* podem modular a suscetibilidade ao CCRE na população estudada.

PALAVRAS-CHAVE: Polimorfismos genéticos, Neoplasias Colorretais, Hábito de Fumar, Álcool, Glutathione S Transferase (GST).

INTRODUÇÃO

O Câncer colorretal é o terceiro mais frequente no mundo¹ e o quinto tipo de câncer mais frequente no Brasil.² As estimativas para o ano de 2018 no Brasil são de 17.380 novos casos para gênero masculino e de 18.980 novos casos para gênero feminino.²

O Câncer Colorretal Esporádico (CCRE) se desenvolve nas paredes internas do cólon e reto e por ser uma doença multifatorial é influenciado por fatores genéticos, como polimorfismos em genes, idade, gênero e fatores ambientais.^(3,4) Esses fatores genéticos podem influenciar no efeito desencadeado pelo meio ambiente na predisposição à doença.^(5,6) Entre os principais fatores de risco está a idade avançada, ou seja, acima de 60 anos.^(2,7) Isso se deve ao processo de envelhecimento celular que aumenta as chances de ocorrerem danos às células que desencadeiam o câncer.⁽³⁾

Outros dois importantes fatores de risco para o CCRE são os hábitos tabagista e etilista.^[8,9,10] Os compostos químicos carcinógenos do tabaco e álcool incorporados no organismo são biotransformados para serem inativados e eliminados por meio do metabolismo dos xenobióticos. Este processo é responsável por detoxificar os componentes do tabaco e do álcool, que na maioria são xenobióticos lipofílicos, propriedade esta que facilita seu transporte pelas lipoproteínas na corrente sanguínea e sua penetração através das membranas. Eles são metabolizados em compostos hidrofílicos, por meio de reação de oxidação na fase I, onde um grupo polar é acrescentado ao composto original, produzindo intermediários reativos que podem ser eliminados ou participam das reações de fase II, no qual será adicionada uma molécula de Glutathione reduzida (GSH), que resultará em produtos mais solúveis em água e mais facilmente excretados do que o composto original.^(11,12)

São muitos os genes que codificam enzimas responsáveis pela metabolização dos xenobióticos. Alguns dos principais genes atuantes na fase II pertencem à superfamília Glutathione S Transferases citosólicas (GST), como o mi (*GSTM1*), o theta (*GSTT1*) e o pi (*GSTP1*). Suas enzimas são responsáveis por catalisar a reação de conjugação entre a glutathione e os compostos químicos endógenos e exógenos.^(11,13)

Entretanto, essa característica é reduzida na presença de deleção ou polimorfismos nesses genes. A expressão dos genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* causa a perda completa da atividade enzimática, enquanto a substituição de nucleotídeos como no caso do gene *GSTP1*, altera a sequência de aminoácidos da proteína, reduzindo sua atividade enzimática levando a uma predisposição aos efeitos tóxicos dos xenobióticos.⁽¹²⁾ Os genes *GSTT1* e *GSTM1* que apresentam polimorfismos de genótipo nulo estão presentes nas posições 22q11.2 e 1p13.3 respectivamente.^(14,15,16) O polimorfismo no gene *GSTP1* (rs1695) está localizado na posição 11q13, onde ocorre a troca da base nitrogenada Adenina para Guanina na posição 313 do gene (A313G) que promovem troca do aminoácido Isoleucina para Valina na posição 105 da proteína (Ile105Val).⁽¹⁷⁾

Polimorfismos nos genes *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1* tem grande importância na fase de detoxificação e eliminação de substâncias cancerígenas e estão intimamente associados com os hábitos de vida tabagista e etilista no risco para o desenvolvimento de CCRE.^(18,19) Assim, estudos sobre a presença dos polimorfismos, hábitos de vida e dados clínicos e histopatológicos são importantes na identificação de biomarcadores de suscetibilidade para o CCRE.

Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a associação de fatores de risco sociodemográficos, polimorfismo Ile105Val da *GSTP1* e genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1* com desenvolvimento de CCRE; investigar a interação entre esses polimorfismos com o consumo de tabaco e álcool; verificar a associação entre esses polimorfismos e parâmetros clínicos e histopatológicos do CCRE; e avaliar a influência dos polimorfismos no tempo de sobrevida global de pacientes do CCRE.

Materiais e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEP) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP (nº 216/2009). Os 970 indivíduos que aceitaram participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento e responderam questionário sobre as variáveis gênero, idade, etnia, profissão, tabagismo, etilismo, e histórico pessoal e familiar de câncer.

Populações do estudo

O grupo caso incluiu 232 indivíduos (112 homens e 120 mulheres), pacientes do Departamento de Coloproctologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, os quais receberam o diagnóstico clínico e/ou histopatológico confirmado de CCRE entre 2010 e 2016. O critério de exclusão foi tratamento prévio com quimioterapia e/ou radioterapia. O grupo controle inclui 738 indivíduos (370 homens e 368 mulheres), doadores de sangue no Hemocentro de São José do Rio Preto. O critério de exclusão para os controles foi história pessoal e familiar de câncer em pelo menos três gerações anteriores.

Foram considerados tabagistas aqueles indivíduos que fumaram pelo menos 100 cigarros durante toda a vida e etilistas aqueles que consomem mais de quatro doses por semana de quatro doses por semana (uma dose corresponde: licor - 30mL; copo de vinho - 102mL, contendo 12% de álcool; ou lata de cerveja - 340mL).^(20,21)

O CCRE foi classificado de acordo como TNM, extensão do tumor(T), linfonodos afetados (N) e presença de metástase (M).⁽²²⁾ Foram considerados tumores avançados qualquer T, sem comprometimento de linfonodos e sem presença de metástase e tumores não avançados qualquer T e N com a presença de metástase.

Análise Molecular

Polimorfismos GSTT1 e GSTM1: A análise dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) multiplex, usando o gene *CYP1A1* como controle positivo interno de amplificação.⁽²³⁾ Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com *gel red*.

Polimorfismo A313G do gene GSTP1: A análise do polimorfismo *GSTP1* A313G foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* - PCR-RFLP), utilizando-se os iniciadores descritos por Harries et al. (1997).⁽²⁴⁾ Em seguida foi realizada digestão com enzima *BsmI* e eletroforese em agarose 2,0%, corado com *gel red*. A presença de bandas de 91 e 85 pb, corresponde ao genótipo polimórfico GG, as bandas de 176, 91 e 85 pb correspondem ao genótipo heterozigoto AG e a banda de 176 pb, corresponde ao genótipo selvagem AA.

Análises estatísticas

Estatísticas descritivas incluíram os valores médios, desvio padrão para dados contínuos e porcentagem para dados categóricos. O equilíbrio de Hardy-

Weinberg (HWE) foi avaliado pelo teste Qui-quadrado por meio do Programa BioEstat versão 5.0. O modelo de regressão logística binária, por meio do programa Minitab/ Windows - Versão 12.22, foi utilizado para avaliar a associação da idade, gênero, hábitos tabagista e etilista com CCRE, e também para avaliar a associação dos polimorfismos com o CCRE e com os parâmetros clínico-histopatológicos. A regressão logística múltipla binária, ajustada para idade, gênero e hábitos tabagista e etilista, também foi utilizada para avaliar a associação entre os modelos genéticos dos polimorfismos e o desenvolvimento do CCRE por meio do programa SNPStats (disponível em: <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web>). O efeito dos polimorfismos foi avaliado nos modelos (1) codominante (heterozigoto *versus* homozigoto selvagem *versus* homozigoto polimórfico); (2) dominante (heterozigoto + homozigoto polimórfico *versus* homozigoto selvagem); (3) recessivo (homozigoto polimórfico *versus* homozigoto selvagem + heterozigoto) e (4) overdominante (heterozigoto *versus* homozigoto selvagem + homozigoto polimórfico) (5) aditivo (homozigoto polimórfico com peso 2 + heterozigoto *versus* homozigoto selvagem). O programa SNPStats no modelo genotípico dominante foi usado para avaliar o potencial de interação dos polimorfismos e hábito tabagista, ajustado para idade, gênero e etilismo, bem como para avaliar a interação do polimorfismo e hábito etilista, ajustado para idade, gênero e tabagismo, no risco do CCRE. O efeito dos polimorfismos no tempo de sobrevivência dos pacientes com CCRE foi analisado por meio da Curva de Kaplan Meier e teste Log Rank utilizando o programa StatsDirect versão 2.7.2. Os resultados foram apresentados em Odds Ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC - 95%). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados

Idade igual ou acima de 62 anos (OR=8,79; IC95%:5,90-13,09; $p<0,01$) e gênero feminino (OR=2,91; IC95%: 1,74-4,37; $p<0,01$) foram associados ao risco para CCRE, Tabela 1. As frequências genotípicas apresentaram-se em HWE em

ambos os grupos para o polimorfismo *GSTP1* Ile105Val (caso: $p=1$, controle: $p=0,29$).

Portadores do genótipo *GSTM1* nulo apresentaram maior risco de desenvolver a doença (OR: 1,45; IC95%: 1,06-2,00; $p=0,022$). Por outro lado, o polimorfismo *GSTT1* apresentou associação com risco reduzido para o CCRE (OR: 0,65; IC95%: 0,43-0,98; $p=0,037$), Tabela 1.

No presente estudo, foi evidenciada uma interação entre a presença do alelo selvagem do polimorfismo *GSTP1* Ile105Val e o hábito tabagista no risco para CCRE (OR: 2,33; IC: 1,34-4,05; $p=0,049$). Entretanto, não houve interação entre os outros polimorfismos e os hábitos tabagista ou etilista no risco para a doença, Tabela 2.

Em relação aos parâmetros clínico-histopatológicos das amostras de CCRE incluídas neste estudo, o reto foi o sítio primário mais frequente (60%), além de tumores mais avançados (69,65%). A análise dos polimorfismos em relação ao TNM está apresentada na Tabela 3. Houve uma associação apenas entre o genótipo nulo do *GSTM1* e a presença de tumores mais avançados (OR: 2,33; 1,23-4,41; $p=0,0087$).

Foi observado um aumento do risco para CCRE na presença da combinação dos genótipos *GSTT1* não nulo / *GSTM1* nulo (OR: 1,50; IC95%: 1,03-2,19; $p=0,033$) e para a combinação *GSTT1* não nulo / *GSTM1* nulo / *GSTP1* Val* (*com a presença de pelo menos um alelo polimórfico) (OR: 1,85; IC95%: 1,01-3,36; $p=0,045$). Os genótipos combinados *GSTT1* não nulo / *GSTM1* nulo (OR: 2,40; IC95%: 1,19-4,85; $p=0,015$) e *GSTT1* não nulo / *GSTM1* nulo / *GSTP1* Val* (OR: 2,92; IC95%: 1,05-8,12; $p=0,040$) foram associados à progressão tumoral, Tabela 4.

A análise pela Curva Kaplan-Meier mostrou que o tempo de sobrevivência de portadores dos alelos polimórficos *GSTP1* Ile105Val, e dos genótipos nulos de *GSTM1* e de *GSTT1*, não foram significativamente diferente do tempo de sobrevivência dos não portadores desses polimorfismos. (Tabela 5, Figura 1).

Discussão

No presente estudo foi observado que indivíduos com idade avançada (≥ 62 anos) são mais suscetíveis ao CCRE, o que corrobora com a literatura que considera a idade avançada como um fator etiológico para este tipo tumoral.^(2,8) Em relação ao gênero, as mulheres apresentam maior suscetibilidade ao CCRE. Outros estudos observaram proporção semelhante dos gêneros entre pacientes com CCRE e controles.^(25,26,27) É possível observar um crescimento no número de casos entre as mulheres devido ao aumento do consumo de cigarro e álcool.^(28,29) É importante salientar que o grupo de mulheres com CCRE avaliado neste estudo apresentaram média de idade de 62 ± 13 anos, o que pode sugerir que o fator hormonal pode contribuir para a CCRE. Alguns trabalhos associaram a pós-menopausa com a incidência de câncer colorretal em mulheres.^(30,31,32) Além disso, a terapia de reposição hormonal mostrou-se um fator de proteção para o CCRE.^(33,34,35,36) E uma metanálise associou efeito protetor de estrogênio da soja em mulheres com CCRE e na pós-menopausa.⁽³⁷⁾

Os hábitos tabagista e etilista, no presente estudo, não foram associados com o CCRE. Por outro lado, Koh e colaboradores⁽³⁸⁾ observaram um risco três vezes maior para o CCRE entre os fumantes em comparação aos que nunca fumaram. Alguns dados sobre o risco de CCRE devido ao consumo de álcool são inconsistentes, o que pode ser explicado pela variação da quantidade de ingestão de doses do álcool analisada nos diferentes estudos.^(39,40)

A análise do Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) revelou que o polimorfismo *GSTP1* Ile105Val está em equilíbrio em ambos os grupos caso e controle. Esse resultado foi semelhante ao observado por outros estudos em CCRE^(26,41) Em relação aos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1*, o teste do EHW não foi possível, uma vez que a análise molecular não distinguiu indivíduos homocigotos selvagens e heterocigotos.⁽²⁵⁾

No presente estudo, o polimorfismo do gene *GSTP1* não mostrou associação com CCRE, corroborando com outros trabalhos em população búlgara e chinesa.^(5,25,27,42) Entretanto, um estudo com população da Tunísia

observou uma diferença significativa na frequência do polimorfismo entre os grupos caso e controle e este foi associado ao risco para o CCRE.⁽²⁶⁾ Por outro lado, um único estudo observou risco reduzido para o CCRE na presença do polimorfismo *GSTP1* Ile105Val, entretanto não existem dados consistentes para explicar a relevância biológica deste achado.⁽⁴³⁾

O polimorfismo do gene *GSTP1* resulta na alteração da sequência de aminoácidos da proteína e consequente redução da atividade enzimática e detoxificação ineficiente.⁽¹²⁾ Entretanto, embora o polimorfismo *GSTP1* Ile105Val não tenha sido associado ao CCRE neste estudo, o nível de expressão desse gene pode ser um fator importante e este não é dependente do polimorfismo. Estudo em carcinoma hepatocelular (CHC) observou que o aumento da expressão do gene *GSTP1* *in vivo* e *in vitro* resultou em redução da proliferação celular em células tumorais, inibição da fosforilação de Akt e interrupção do ciclo celular em G1 / S por meio do aumento dos inibidores do ciclo celular p21 e p27.⁽⁴⁴⁾ A expressão elevada de *GSTP1* também foi associada com melhor prognóstico dos pacientes com HCC.⁽⁴⁴⁾ Além disso, a hipermetilação de *GSTP1* foi observada em vários tipos de cânceres como câncer de próstata, mama, pulmão e fígado.⁽⁴⁵⁾

Em relação aos polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, o genótipo nulo de *GSTT1* foi associado à redução do risco para o desenvolvimento do CCRE, enquanto, que a presença do genótipo nulo *GSTM1* foi associada ao aumento do risco de CCRE. A ausência de algumas das isoenzimas de GST na mucosa colorretal normal resultante de genótipos nulos como a presença do polimorfismo *GSTM1* podem alterar a principal função de detoxificação das GSTs no metabolismo de xenobióticos.⁽⁶⁾ Em populações chinesa e iraniana foi evidenciado um risco aumentado para o CCRE na presença dos genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1*.^(25,46) Por outro lado, outros estudos não encontraram associação entre os genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* com o CCRE.^(5,26,43,46,47,48,49) O estudo caso-controle de Vlaykova e colaboradores⁽⁶⁾ não encontrou associação entre genótipo nulo *GSTM1* e o risco para CCRE; entretanto o genótipo nulo *GSTT1* foi associado com risco aumentado para o

CCRE. Esses diferentes resultados podem estar relacionados ao tempo de exposição aos fatores ambientais e a heterogeneidade populacional.

Foi observado que o efeito dos polimorfismos de GST, quando combinados, pode aumentar em duas ou três vezes o risco para o CCRE.⁽⁴¹⁾ O presente estudo demonstrou que as combinações de genótipos *GSTT1* não nulo/*GSTM1* nulo e *GSTT1* não nulo/*GSTM1* nulo/*GSTP1* Val*(presença de pelo menos um alelo polimórfico) estão associadas com o risco aumentado para o CCRE e com a progressão do tumor. Esses achados corroboram os resultados das análises individuais dos polimorfismos, que sugerem a influência do genótipo *GSTT1* não nulo no CCRE, uma vez que o genótipo nulo foi associado com risco reduzido para a doença.

Em população indiana foi encontrada associação entre os genótipos combinados de *GSTM1* nulo/*GSTT1* nulo e a combinação *GSTM1* nulo/*GSTT1* nulo/*GSTP1* Val* e o risco de CCRE.⁽⁴¹⁾ Este resultado também foi observado em trabalho de Vlaykova e colaboradores⁽⁶⁾ em população búlgara. Um estudo em população turca encontrou associação dos genótipos *GSTT1* nulo/*GSTM1* não nulo e *GSTT1* nulo/*GSTM1* não nulo/*GSTP1* Ile (homozigoto selvagem) e o CCRE.⁽⁵⁾ Cong e colaboradores⁽²⁵⁾ observaram risco aumentado na presença dos genótipos *GSTT1/GSTM1*, enquanto que a combinação de genótipos *GSTT1* não-nulo / *GSTM1* nulo resultaram em um risco significativamente reduzido para o CCRE diferindo dos achados deste e de outros estudos. Por outro lado, outros trabalhos que analisaram o efeito dos genótipos combinados *GSTT1/GSTM1* não encontraram associação com o risco para o CCRE.^(26,47,48) Vários estudos têm avaliado o potencial de associação entre o CCRE e os genótipos combinados destes polimorfismos. Os resultados observados são diferentes, evidenciando a importância do estudo dos efeitos da combinação genotípica no CCRE.

No presente estudo, foi evidenciada uma interação significativa entre presença do alelo selvagem do polimorfismo *GSTP1* Ile105Val e o hábito tabagista no risco para o CCRE. Diferindo do resultado do presente estudo, um estudo em população chinesa não observou interação entre o *GSTP1* Ile105Val e

o hábito tabagista e também etilista no risco de CCRE.⁽³⁸⁾ A literatura é escassa de estudos que avaliam a interação de fatores de risco com o polimorfismo *GSTP1* Ile105Val no desenvolvimento de CCRE. A relevância biológica deste achado não está clara, uma vez que a presença de pelo menos um alelo polimórfico do gene *GSTP1* combinada com a nulidade de *GSTM1* e a presença do alelo *GSTT1* foi associada ao aumento do risco para o CCRE. Ademais, o hábito tabagista não foi associado a este tipo tumoral no presente estudo.

Para os polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1*, este estudo não evidenciou interação com os hábitos tabagista ou etilista no risco para CCRE. Estes resultados corroboram com outros dois estudos em populações coreana e japonesa que também não encontraram em essa interação em relação ao hábito tabagista.^(46,48) Quando analisada interação do hábito etilista e os genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1* para o risco de CCRE, o estudo de Piao e colaboradores⁽⁴⁶⁾ não evidenciou essa relação. No entanto, um estudo realizado em Cingapura encontrou um risco aumentado para indivíduos tabagistas portadores de pelo menos dois genótipos nulos que causam a baixa atividade enzimática.⁽³⁸⁾

Os resultados controversos em relação aos polimorfismos podem sugerir que outros genes envolvidos no metabolismo dos xenobióticos podem apresentar maior relevância para o desenvolvimento do CCRE, como os polimorfismos em genes participantes da fase I do metabolismo xenobiótico.^(8,50) Apesar dos polimorfismos estudados alterarem de forma a reduzir ou eliminar a atividade enzimática, outros genes podem atuar compensando a detoxificação das substâncias presentes no tabaco e no álcool.

Em relação aos parâmetros clínico-histopatológicos do CCRE, é possível observar que houve uma associação entre o genótipo nulo do *GSTM1* e a presença de tumores avançados. Um estudo demonstrou uma associação entre tumores mais agressivos com a presença do genótipo nulo *GSTT1*.⁽⁴⁷⁾ Entretanto, outros estudos que avaliaram os mesmos polimorfismos não encontraram associação entre os genótipos polimórficos e os parâmetros clínico-histopatológicos do CCRE.^(5,27,42,49)

Quando investigada a associação entre polimorfismos e os sítios primários do CCRE, nenhuma associação foi evidenciada. Corroborando com estes achados, um estudo de Vlaykova e colaboradores⁽⁶⁾ não relacionou os polimorfismos de genótipos nulo *GSTT1* e *GSTM1* com o sítio primário. Entretanto, Wang e colaboradores⁽⁴¹⁾, observou aumento do risco para o câncer de reto na presença do genótipo nulo *GSTM1*, enquanto o genótipo nulo de *GSTT1* foi associado com o risco para o câncer de cólon.

Vale salientar que a predisposição para o CCRE é multifatorial e é resultante da interação entre variantes alélicas de genes de baixa penetrância e fatores ambientais como idade avançada, hábitos alimentares, tabagismo e etilismo.^(5,51,52) Portanto, os achados do presente estudo em relação à modulação da suscetibilidade para o CCRE na presença dos polimorfismos analisados, independente do hábito tabagista ou etilista, reforça a influência desses polimorfismos na etiologia do CCRE, mesmo que não tenham influência na sobrevida dos pacientes. Estes resultados poderão contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na carcinogênese colorretal.

Concluimos que indivíduos com idade avançada e do gênero feminino são mais suscetíveis ao CCRE. A presença do genótipo nulo *GSTM1* está associada com aumento do risco para o CCRE. A combinação dos genótipos *GSTT1/ GSTM1* e *GSTT1/ GSTM1/ GSTP1* estão associadas com o risco aumentado para o CCRE e progressão do tumor. O genótipo nulo de *GSTM1* é associado à presença de tumores mais avançados. Os polimorfismos não estão associados com o tempo de sobrevida dos pacientes com CCRE.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (bolsa 2011 / 23969-1 e 2012 / 02473-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (concessão 310582 / 2014-8) para apoio financeiro; A Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

(FAMERP) e a Fundação Escola de Medicina de São José do Rio Preto (FUNFARME), para apoio institucional; Glaucia Maria de Mendonça Fernandes pela análise estatística.

TABELAS

Tabela 1: Características sociodemográficas, fatores de risco e polimorfismos *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* A313G em pacientes com câncer colorretal e controles.

Variáveis		Caso	Controle	OR ⁺	IC 95%	p
		(n=232)	(n=738)			
		n (%)	n (%)			
Gênero						
Feminino		120 (52)	368 (50)	1,00		
Masculino		112 (48)	370 (50)	2,91⁺	1,94-4,37	<0,01⁺⁺
Idade (Mediana)						
<62		112 (49)	621 (84)	1,00		
≥62		120 (51)	117 (16)	8,79⁺	5,90-13,09	<0,01⁺⁺
Hábito Tabagista						
Não Tabagista		130 (56)	465 (63)	1,00		
Tabagista		102 (44)	273 (37)	1,45	0,98-2,14	0,061
Hábito Etilista						
Não Etilista		132 (57)	395 (54)	1,00		
Etilista		100 (43)	343 (46)	1,28	0,85-1,91	0,238
<i>GSTP1</i>						
Codominante	A/A	227 (43,7)	107 (46,1)	1,00		
	A/G	224 (43,2)	102 (44)	1,06	(0,73-1,54)	0,82
	G/G	68 (13,1)	23 (9,9)	0,88	(0,48-1,59)	
Dominante	A/A	227 (43,7)	107 (46,1)	1,00		
	A/G-G/G	292 (56,3)	125 (53,9)	1,02	(0,71-1,45)	0,92
Recessivo	A/A-A/G	451 (86,9)	209 (90,1)	1,00		
	G/G	68 (13,1)	23 (9,9)	0,85	(0,48-1,50)	0,58
Overdominante	A/A-G/G	295 (56,8)	130 (56)	1,00		
	A/G	224 (43,2)	102 (44)	1,09	(0,76-1,55)	0,65
Aditivo		---	---	0,97	(0,75-1,27)	0,85
<i>GSTT1</i>						
	+/+	573 (77,6)	192 (82,8)	1,00		
	0/0	165 (22,4)	40 (17,2)	0,65⁺	(0,43-0,98)	0,037⁺⁺
<i>GSTM1</i>						
	+/+	385 (52,2)	100 (43,1)	1,00		
	0/0	353 (47,8)	132 (56,9)	1,45⁺	(1,06-2,00)	0,022⁺⁺

+ Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos tabagista, etilista e polimorfismos.

++ valores significativos de p para p <0,05.

Tabela 2: Interação entre polimorfismos nos genes *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1* e hábitos tabagismo ou etilista no risco de CCRE.

	Hábito Tabagista						p ⁺⁺
	Não Tabagista			Tabagista			
	Caso	Controle	OR ⁺ (IC 95%)	Case	Controle	OR ⁺ (IC 95%)	
<i>GSTP1</i>							
A/A	50	136	1,00	57	91	2,33 (1,34-4,05)	0,049
A/G- G/G	80	177	1,40 (0,87-2,27)	45	115	1,59 (0,91-2,77)	
<i>GSTT1</i>							
+/+	110	362	1,00	82	211	1,42 (0,98-2,08)	0,64
0/0	20	103	0,60 (0,34-1,04)	20	62	1,03 (0,57-1,88)	
<i>GSTM1</i>							
+/+	52	231	1,00	48	154	1,40 (0,86-2,28)	0,7
0/0	78	234	1,38 (0,90-2,10)	54	119	2,19 (1,34-3,57)	
	Hábito Etilista						p ⁺⁺
	Não Etilista			Etilista			
	Caso	Controle	OR ⁺ (IC 95%)	Caso	Controle	OR ⁺ (IC 95%)	
<i>GSTP1</i>							
A/A	59	116	1,00	48	111	1,31 (0,74-2,31)	0,58
A/G- G/G	73	147	1,12 (0,69-1,81)	52	145	1,19 (0,70-2,04)	
<i>GSTT1</i>							
+/+	108	300	1,00	84	273	0,76 (0,52-1,12)	0,82
0/0	24	95	0,63 (0,37-1,07)	16	70	0,53 (0,28-1,01)	
<i>GSTM1</i>							
+/+	56	206	1,00	44	179	0,76 (0,46-1,26)	0,88
0/0	76	189	1,42 (0,93-2,18)	56	164	1,14 (0,72-1,82)	

+ Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos tabagista e etilista.

++ valores significativos de p para p <0,05.

Tabela 3: Distribuição dos parâmetros clínico-histopatológicos em relação aos polimorfismos nos genes *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes com câncer colorretal.

Modelos	Genótipos	Progressão Tumoral (TNM) (n=201)					Sítio Primário				
		Não Avançado n(%) 61 (31)	Avançado n(%) 140 (69)	OR ⁺	IC95%	p	Cólon	Reto	OR ⁺	IC95%	p
<i>GSTP1</i>											
Codominante	A/A	31 (51)	62 (44)	1,00			42 (46)	65 (46)	1,00		
	A/G	23 (38)	65 (47)	1,37	0,70-2,66	0,65	38 (41)	64 (45)	0,96	0,54-1,72	
	G/G	6 (10)	11 (8)	1,14	0,37-3,50		11 (12)	12 (8)	0,73	0,29-1,85	0,8
Dominante	A/A	31 (51)	62 (44)	1,00			42 (46)	65 (46)	1,00		
	A/G-G/G	29 (48)	76 (55)	1,32	0,71-2,48	0,38	49 (53)	76 (53)	0,91	0,53-1,57	0,74
Recessivo	A/A-A/G	54 (90)	127 (92)	1,00			80 (87)	129 (91)	1,00		
	G/G	6 (10)	11 (8)	1,00	0,34-2,95	1	11 (12)	12 (8)	0,74	0,31-1,81	0,52
Overdominant e	A/A-G/G	37 (61)	73 (52)	1,00			53 (58)	77 (54)	1,00		
	A/G	23 (38)	65 (47)	1,34	0,70-2,56	0,37	38 (41)	64 (45)	1,02	0,59-1,77	0,95
Aditivo <i>GSTT1</i>	---	---	---	1,18	0,73-1,92	0,5	---	---	0,89	0,59-1,34	0,59
	+/+ 0/0	47 (78) 13 (22)	47 (78) 20 (14)	1,00 0,57			78 (85) 13 (14)	114 (80) 27 (19)	1,00 1,47		0,3
<i>GSTM1</i>	+/+ 0/0	34 (56) 26 (43)	53 (38) 85 (61)	1,00 2,33		1,23-4,41	45 (49,5) 46 (50,5)	55 (39) 86 (61)	1,00 1,49		0,14

+ Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos tabagista e etilista.

++ valores significativos de p para p <0,05.

Tabela 4: Associação dos genótipos combinados *GSTT1* / *GSTM1* e *GSTT1* / *GSTM1* / *GSTP1* no risco de câncer colorretal, progressão tumoral e sítio primário, ajustado para sexo, idade, tabagismo e etilismo.

			Câncer Colorretal					Progressão Tumoral (TNM) (n=198)					Sítio Primário				
Combinação dupla de genótipos			Caso (n=19)	Controle (n=738)	OR	IC95%	p	Não avançado (n=60)	Avançado (n=138)	OR	IC95%	Valor de p	Cólon (n=81)	Reto (n=117)	OR	IC95%	p
<i>GSTT1</i>	<i>GTM1</i>																
(+)	(+)		68	303	1		26	42	1			34	34	1			
(+)	(-)		97	270	1,50	(1,03-2,19)	0,033	21	76	2,40	(1,19-4,85)	0,015	36	61	1,67	(0,88-3,18)	0,118
(-)	(+)		19	82	1,00	(0,55-1,84)	0,987	8	11	0,74	(0,26-2,15)	0,583	7	12	1,70	(0,59-4,94)	0,330
(-)	(-)		14	83	0,61	(0,32-1,19)	0,147	5	9	1,20	(0,35-4,10)	0,768	4	10	2,60	(0,72-9,46)	0,146
Combinação tripla de genótipos			Caso (n=19)	Controle (n=519)	OR	IC95%	P	Não Avançado (n=60)	Avançado (n=138)	OR	IC95%	Valor de p	Cólon (n=81)	Reto (n=117)	OR	IC95%	P
<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTP1</i>															
(+)	(+)	Ile/Ile	32	96	1		12	20	1			16	10	1			
(+)	(+)	Val*	36	126	1,13	(0,61-2,10)	0,689	14	22	0,93	(0,34-2,56)	0,883	12	17	1,81	(0,67-4,92)	0,242
(-)	(+)	Ile/Ile	10	22	1,45	(0,56-3,77)	0,446	5	5	0,50	(0,12-2,18)	0,359	18	22	1,41	(0,33-5,98)	0,645
(-)	(+)	Val*	9	34	0,90	(0,36-2,25)	0,822	3	6	1,07	(0,21-5,31)	0,936	2	7	4,57	(0,80-26,24)	0,088
(+)	(-)	Ile/Ile	42	86	1,52	(0,81-2,83)	0,191	8	22	1,78	(0,65-4,86)	0,263	11	19	2,58	(0,99-6,75)	0,053
(+)	(-)	Val*	55	98	1,85	(1,01-3,36)	0,045	10	42	2,92	(1,05-8,12)	0,040	19	33	2,06	(0,83-5,15)	0,120
(-)	(-)	Ile/Ile	9	23	1,27	(0,48-3,40)	0,632	3	5	1,25	(0,25-6,19)	0,783	1	7	5,47	(0,92-32,60)	0,062
(-)	(-)	Val*	5	34	1,27	(0,11-1,08)	0,068	1	3	1,01	(0,14-7,42)	0,989	2	2	1,88	(0,27-13,33)	0,525

*Ile/Val ou Val / Ile.

Tabela 5. Polimorfismos *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* em relação à sobrevida de pacientes com câncer colorretal.

Polimorfismos	Sobrevida (5 years)	Valor de p <i>Log Rank</i>
<i>GSTT1</i>		
Positivo	64	0,9935
Negativo	68	
<i>GSTM1</i>		
Positivo	67	0,442
Negativo	63	
<i>GSTP1 A313G</i>		
AA	61	0,7056
AG	70	
GG	63	

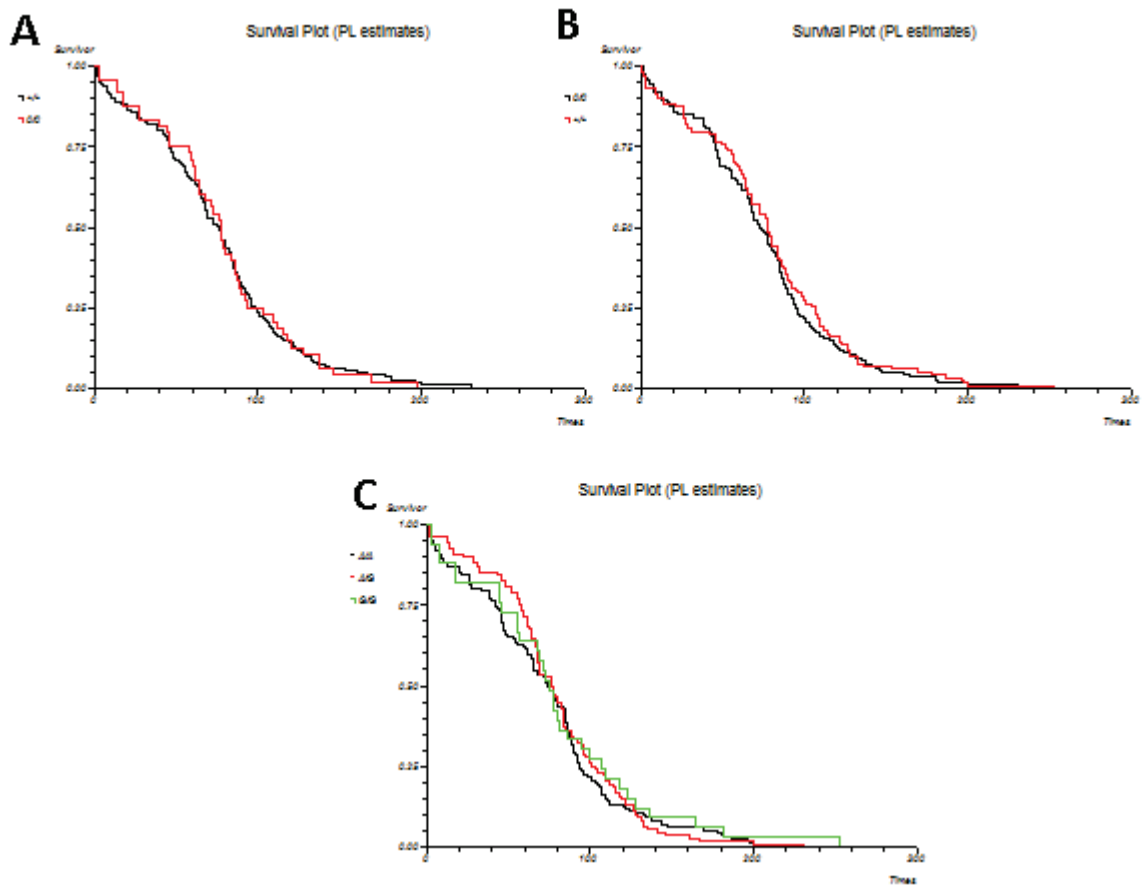


Figura 1. Curva de Kaplan-Meier para análise de sobrevida de pacientes com CCRE em relação aos polimorfismos *GSTT1* (A), *GSTM1* (B), *GSTP1* Ile105Val (C).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay JSI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray , F . *GLOBOCAN 2012 v1.0*, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. [accessed; 2016;International Agency for Research on Cancer (IARC), 2017. Accessed on 11/10/2017 Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde; 2016. [accessed 2018 February 20]. Available from: <http://www.inca.gov.br>.
3. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2016;7:105-14 [PMID: 27766137]
4. Silva M & Errante PG. Câncer colorretal: Fatores de risco, diagnóstico e tratamento. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa* 2016;13:133-40.
5. Gorukmez O, Yakut T, Gorukmez O, Topak A, Sahinturk S, Kanat O. Glutathione S-transferase T1, M1 and P1 Genetic Polymorphisms and Susceptibility to Colorectal Cancer in Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17:3855-9 [PMID: 27644629]
6. Vlaykova T, Gulubova M, Vlaykova D, Cirovski G, Yovchev Y, Dimov D, et al. Possible Influence of GSTM1 and GSTT1 Null Genotype on the Risk for Development of Sporadic Colorectal Cancer. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2009;23:1084-89 [DOI: 10.1080/13102818.2009.10817617]
7. Pelucchi C, Tramacere I, Boffetta P, Negri E, La Vecchia. Alcohol consumption and cancer risk. *Nutr Cancer* 2011;63:983-90 [PMID: 21864055 DOI: 10.1080/01635581.2011.596642]
8. Fernandes GMM, Russo A, Proença MA, Gazola NF, Rodrigues GH, Biselli-Chicote PM, et al. *CYP1A1*, *CYP2E1* and *EPHX1* polymorphisms in sporadic colorectal neoplasms. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 9974-83 [PMID: 28018104 DOI: 10.3748/wjg.v22.i45.9974]
9. Liang PS, Chen TY and Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2009;124:2406-15 [PMID: 19142968 DOI: 10.1002/ijc.24191]

10. Xue W, Warshawsk D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;206:73-93 [PMID: 15963346 DOI: 10.1016/j.taap.2004.11.006]
11. Kanés AB, Kumar V. Patologia Nutricional e Ambiental. In: Abbas AK, Kumar V, Fausto N. *Bases Patológicas das Doenças*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016; 433-90.
12. Gonzales FJ, Coughtrie M, Tukey RH. Metabolismo dos fármacos. In: *As bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12ª ed. Rio de Janeiro:AMGH; 2012; 135-136.
13. Strachan T & Read A. *Genética Molecular Humana*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
14. Ye Z, Song H, Higgins JP, Pharoah P, Donesh J. Five Glutathione transferase gene variant in 23, 452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *Plos Med* 2006;7:91 [DOI: 10.1371/journal.pmed.0030091]
15. Zheng T, Holford TR, Zhahm SH, Owens PH, Boyle P, Zhang Y, et al. Cigarette smoking glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Causes Control* 2002;13:637-45 [PMID: 12296511 DOI: 10.1038/sj.bjc.6600708]
16. Seigard J, Ekstrom G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1999;20:743-48 [PMID: 9255563]
17. Hatagima A, Costa ECB, Marques CFS, Koifman RJ, Boffetta P, Koifman S. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: A case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol* 2008; 44:200-7 [PMID: 17418613 DOI: 10.1016/j.oraloncology.2007.02.001]
18. Klusek J, Głuszek S, Klusek J. GST gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer development. *Contemp Oncol* 2014;18:219-21 [DOI: 10.5114/wo.2014.41388]

19. Andersen V, Holst R, Vogel U. Systematic review: diet–gene interactions and the risk of colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;37:383-91 [PMID: 23216531 DOI: 10.1111/apt.12180]
20. Ahrendt SA, Chow JT, Yang SC, Wu L, Zhang MJ, Jen J, et al. Alcohol Consumption and Cigarette Smoking Increase the Frequency of p53 Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 2000;60: 3155-59 [PMID: 10866304]
21. Kjaerhein K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10.900 Norwegian men. *Cancer Causes Control* 1998;9:99-108, 10.1023/A:1008809706062 [PMID: 9486469]
22. American Joint Committee on Cancer. In: Edge SB, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *Cancer Staging Manual*. New York: Springer; 2009.
23. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996;107:229-33 [PMID: 8947518]
24. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione-S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997;18:641–4 [PMID: 9111193]
25. Cong N, Liu L, Xie Y, Shao W, Song J. Association between Glutathione S-Transferase T1, M1, and P1 Genotypes and the Risk of Colorectal Cancer. *J Korean Med Sci* 2014;29:1488-192 [PMID: 25408579 DOI: 10.3346/jkms.2014.29.11.1488]
26. Kassab A, Msolly A, Lakhdar R, Gharbi O, Miled A. Polymorphisms of glutathione-S-transferases M1, T1, P1 and susceptibility to colorectal cancer in a sample of the Tunisian population. *Med Oncol* 2014;31: 760 [PMID: 24254297 DOI: 10.1007/s12032-013-0760-z]

27. Vlaykova, T, Miteva L, Gulubova M, Stanilova S. Ile105Val GSTP1 polymorphism and susceptibility to colorectal carcinoma in Bulgarian population. *Int J Colorectal Dis* 2007;22: 1209 [PMID: 17404745 DOI: 10.1007/s00384-007-0305-z]
28. Osazuwa-Peters N, Massa ST, Christopher KM, Walker RJ, Varvares, MA. Race and sex disparities in long-term survival of oral and oropharyngeal cancer in the United States. *J cancer Res Clin Oncol* 2016;142:521-28 [PMID: 26507889 DOI: 10.1007/s00432-015-2061-8]
29. Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *Br J Nutr* 2015;113:102-10 [PMID: 26148912 DOI: 10.1017/S0007114515000148]
30. Hendifar A, Yang D, Lenz F, Lurje G, Pohl A, Lenz C, et al. Gender disparities in metastatic colorectal cancer survival. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6391-97 [PMID: 19789331 DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-0877]
31. Iida Y, Kawai K, Tsuno NH, Ishihara S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T. Proximal shift of colorectal cancer along with aging. *Clin Colorectal Cancer* 2014;13:213-8 [PMID:25245544 DOI:10.1016/j.clcc.2014.06.005]
32. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 321-33 [PMID: 12117397]
33. Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW Jr. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 517-23 [PMID: 7707438]
34. Chan JA, Meyerhardt JA, Chan AT, Giovannucci EL, Colditz GA, Fuchs CS. Hormone replacement therapy and survival after colorectal cancer diagnosis. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5680-6 [PMID: 17179103]

35. Mandelson MT, Miglioretti D, Newcomb PA, Harrison R, Potter JD. Hormone replacement therapy in relation to survival in women diagnosed with colon cancer. *Cancer Causes Control* 2003;14: 979-84 [DOI:10.1023/B:CACO.0000007970.04094.76]
36. Slattery ML, Anderson K, Samowitz W, Edwards SL, Curtin K, Caan B, Potter JD. Hormone replacement therapy and improved survival among postmenopausal women diagnosed with colon cancer (USA). *Cancer Causes Control* 1999; 10: 467-73 [PMID: 10530618]
37. Yan L, Spitznagel EL, Bosland MC. Soy consumption and colorectal cancer risk in humans: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(1):148-58 [PMID: 20056634 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0856]
38. Koh WP, Nelson HH, Yuan J-M, Van den Berg D, Jin A, Wang R, et al. Glutathione S-transferase (GST) gene polymorphisms, cigarette smoking and colorectal cancer risk among Chinese in Singapore. *Carcinogenesis* 2011;32:1507-11 [PMID: 21803734 DOI: 10.1093/carcin/bgr175]
39. Rossi M, Jahanzaib Anwar M, Usman A, Keshavarzian A, Bishehsari F. Colorectal Cancer and Alcohol Consumption - Populations to Molecules. *Cancers* 2018;10:e38 [PMID: 29385712 DOI: 10.3390/cancers10020038]
40. Cai S, Li Y, Ding Y, Chen K, Jin M. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev* 2014 , 23:532-39 [PMID: 25170915 DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000076]
41. Wang J, Jiang J, Zhao Y, Gajalakshmi V, Kuriki K, Suzuki S, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to colorectal cancer: a case-control study in an Indian population. *Cancer Epidemiol* 2011;35: 66-72 [PMID: 20688591 DOI: 10.1016/j.canep.2010.07.003]
42. Khabaz MN. The GSTP1 Ile105Val polymorphism is not associated with susceptibility to colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13: 2949-53 [PMID: 22938488]

43. Hezova R, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Brezkova V, Vasku A, et al. Common polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and susceptibility to colorectal cancer in the Central European population. *Eur J Med Res* 2012; 17:17 [PMID: 22697302 DOI: 10.1186/2047-783X-17-17]
44. Liu X, Tan N, Liao H, Pan G, Xu Q, Zhu R, et al. High GSTP1 inhibits cell proliferation by reducing Akt phosphorylation and is associated with a better prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(10):8957-8971 [PMID: 29507666 DOI:10.18632/oncotarget.23420]
45. Gurioli G, Martignano F, Salvi S, Constantini M, Gunelli R, Casadio V. GSTP1 methylation in cancer: a liquid biopsy biomarker? *Clin Chem Lab Med*. 2018 [PMID: 29305565 DOI:10.1515/cclm-2017-0703]
46. Saadat I, Saadat M. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes and the risk of gastric and colorectal cancers. *Cancer Lett* 2001; 169:21-26 [PMID: 11410321 DOI: 10.1016/S0304-3835(01)00550-X]
47. Nissar S, Sameer A, Rasool R, Chowdri N, Rashid F. Evaluation of deletion polymorphisms of glutathione S-transferase genes and colorectal cancer risk in ethnic Kashmiri population: A case-control study. *Indian J Cancer* 2016;53:524-8 [PMID: 28485343 DOI: 10.4103/ijc.IJC_17_17]
48. Nisa H, Kono S, Yin G, Toyomura K, Nagano J, Mibu R, et al. Cigarette smoking, genetic polymorphisms and colorectal cancer risk: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *BMC Cancer* 2010;10:274 [PMID: 20534171 DOI: 10.1186/1471-2407-10-274]
49. Piao JM, Shin MH, Kweon SS, Kim HN, Choi JS, Bae WK, et al. Glutathione-S-transferase GSTM1, GSTT1 and the risk of gastrointestinal cancer in a Korean population. *World J Gastroenterol* 2009; 15:5716-21 [PMID: 19960570 DOI: 10.3748/wjg.15.5716]
50. Hunter DJ, Riboli E, Haiman CA, Albanes D, Altshuler D, Chanock SJ, et al. A candidate gene approach to searching for low-penetrance breast

and prostate cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2005;5:977-85 [PMID: 16341085 DOI: 10.1038/nrc1754]

51. De la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:769-80 [PMID: 15510158 DOI: 10.1038/nrc1453]