

**TESE DE DOUTORADO**

**Alessandra Duarte Clarizia**

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DA  
METILENOTETRAIDROFOLATO  
REDUTASE (MTHFR) EM  
AMOSTRAS DE CÂNCER  
COLORRETAL E CÂNCER DE MAMA**

**Orientador  
Sérgio D.J. Pena**

**Co-orientadora  
Helenice Gobbi**

**Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2006**

**Alessandra Duarte Clarizia**

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DA  
METILENOTETRAIDROFOLATO  
REDUTASE (MTHFR) EM  
AMOSTRAS DE CÂNCER  
COLORRETAL E CÂNCER DE MAMA**

Tese de doutorado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas:  
Farmacologia Bioquímica e  
Molecular, como requisito parcial  
para obtenção do grau de Doutor  
em Ciências.

Orientador: Sérgio D.J. Pena

Co-orientadora: Helenice Gobbi

Suporte financeiro: CNPq e  
FAPEMIG

Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2006

“Renda-se, como eu me rendi.  
Mergulhe no que você não  
conhece como eu mergulhei.  
Não se preocupe em entender,  
viver ultrapassa qualquer  
entendimento.”

Clarice Lispector

“A falsa ciência gera ateus; a verdadeira  
ciência leva os homens a se curvar  
diante de Deus.”

Voltaire

À Deus,

Aos meus pais, Angelo e Miriam, e minhas irmãs Viviane e Cristiana, pelo amor, carinho e compreensão, dispensados a mim durante essa trajetória. A união, a fé, e a perseverança da minha família trouxeram-me a paz e a força necessárias, para enfrentar um grande obstáculo, e poder finalizar mais uma etapa da minha formação.

A todos os pacientes que participaram deste estudo. Compreendo a dor ao receber o diagnóstico, o sofrimento e a trajetória complexa do tratamento, sustentados por uma grande força e esperança. Espero que esse trabalho traga, mesmo que indiretamente, uma contribuição para as pesquisas em câncer. E que ajude futuramente, a responder a pergunta mais freqüente que ouvi desses pacientes: "Essa pesquisa é para a cura do câncer?"

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos, que de maneiras diferentes, contribuíram para este trabalho:

Ao Orientador Dr. Sérgio Danilo Junho Pena. Por me ensinar a ter um pensamento crítico e como usufruí-lo e pelos cuidados prestados a mim, em momentos difíceis. Por comprovar a cada dia, que a ciência básica é o suporte de toda medicina clínica. Sinto-me privilegiada e muito honrada, por ter tido a preciosa oportunidade de estar sob sua orientação, pois a sua dedicação ao trabalho, sabedoria e amor pela ciência são admiráveis.

À minha co-orientadora Dra. Helenice Gobbi, pelo aprendizado valioso, amizade e paciência. Pelo exemplo de dedicação, competência e paixão pelo seu trabalho. Pela ética, honestidade e simplicidade, com as quais expõe suas idéias e ensinamentos. Agradeço a disponibilidade de seu laboratório na Faculdade de Medicina, sempre de portas abertas para mim.

À Dra. Cristina Guatimosim Fonseca, minha grande amiga, pelo apoio incomensurável durante essa trajetória. Pelo exemplo de profissional dedicada à ciência, e que faz aquilo que realmente gosta. Pela valiosa força que me impulsionou durante esses últimos anos. Pela imensa generosidade em me escutar, em dar opiniões, e permitir a utilização dos computadores de seu laboratório para redigir esse trabalho. Gratidão eterna.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e LGB, Glória Franco, Carlos Renato Machado, Andréia Macedo e Vânia Prado pelas sugestões, críticas e ensinamentos, e amizade.

Ao Prof. Marcus Vinícius Gomez e Prof. Luiz Armando de Marco pela confiança e amizade.

À Dra. Wolfanga Lentz Boson pela consideração, carinho e grande amizade.

Ao Prof. Marco Antônio Máximo Prado, Marcão, pela longa convivência, orientação e amizade que se iniciou desde o 2º período da graduação, passando pelo mestrado, até os dias de hoje. Obrigada pelo apoio e conselhos. Esses foram fundamentais para a minha trajetória.

Ao Prof. Washington Amorim e Dr. Leandro Ramirez, pelos ensinamentos durante meu estágio no Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas/UFMG. Ao Dr. Henrique Vítor Leite, coordenador do Ambulatório Carlos Chagas.

Ao Prof. Geraldo Brasileiro Filho pelo exemplo de profissionalismo e colaboração em nosso projeto "Oncogenômica e oncogenética do câncer de mama".

Ao Dr. Benedito Rossi e Dr. José Cláudio C. Rocha do Hospital A.C. Camargo (São Paulo); Dra. Anamaria A. Camargo, Dra. Otávia Caballero e Dr. Andrew Simpson do Instituto Ludwig de pesquisa sobre o câncer (São Paulo), pelas amostras de câncer colorretal utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Paulo Roberto Agrizzi Nacaratti pela imensa ajuda em estatística e disposição para rever, com paciência, todos os cálculos. Por me ensinar com linguagem fácil a bioestatística, que para mim era extremamente complicada.

À Prof. Maria Alice Duarte Matos pela inestimável ajuda na correção do português da minha tese.

À Prof. Renata Freitas (UFOP) pelo especial interesse em meu trabalho.

À Dra. Andréia Leopoldino pelos primeiros ensinamentos da prática de biologia molecular, pela paciência e amizade, que mesmo distante, está sempre presente.

Ao Dr. Charles Anacleto, pelo seu espirituoso jeito acolhedor e pela paciência peculiar de me ensinar desde dicas em biologia molecular, até lições de vida. Pelas conversas divertidas, amizade e sinceridade.

À Dra. Cláudia Benedetto pela agradável convivência e grande amizade, pelas sugestões e críticas. Exemplo de grande profissional de peculiar ética e senso de justiça.

À Dra. Patrícia Pellegrino, pelo exemplo de força em vários momentos difíceis que passamos juntas. Pela amizade e carinho de sempre. Pela exemplar inteligência e disponibilidade em ajudar.

Ao grupo de “Humanos” pela união em momentos difíceis e ajuda mútua. Vocês proporcionaram uma trajetória mais leve: Vanessa pela perseverança, Simone Santos pela tranquilidade e caráter, Luciana Bastos pela dedicação, Fernanda (Danda) pela técnica, Fernanda pela honestidade, Rodrigo pelo carinho e atenção, Lucas pela inteligência e Rogério pela seriedade.

Ao Helder e Carlos Gustavo pelas conversas cômicas e desabafos. Exemplos de pessoas leves e agradáveis. Pela imensa ajuda dentro e fora do laboratório.

Às doutoras Flávia Parra e Juliana Pimenta, pela grande consideração e carinho. Pelos momentos de desabafos. Pelas nossas divertidas conversas e conselhos.

Aos doutores Luiz Augusto Pinto e Analina Furtado pelos ensinamentos valiosos.

Ao Allyson Rivelli pela ajuda no LGB e Faculdade de Medicina para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Bioquímica: Alessandra Campos, Alice, Antônio Henriques, Bruno Chamber, Carlos Eduardo, Carol, Débora Lopes, Débora Naves, Francisco Lobo, Francisco Prodocimi, João Pedro, Jorge, Luciana Werneck, Marina Mourão, Marianne Antunes, Marcela, Michel, Mateus Rajão, Michelle, Pedro, Simone Pires.

À Neuza Antunes, minha querida Neuzinha, pelo grande profissionalismo, confiança, generosidade, amizade, carinho e por nossas conversas “papo cabeça”.

À Miriam Rodrigues e Kátia Barroso pela inestimável ajuda técnica e profissional. Além de todo carinho.

Ao Rafael Coelho pela preciosa ajuda técnica.

À direção e aos funcionários do laboratório GENE, Núcleo de Genética Médica/MG, por me receberem de portas e abraços abertos, sempre que precisei (em atenção à Gabrielle).

Ao Fernando Biava pelo apoio e compreensão durante esses anos.

Às amigas e colegas de profissão, Dra. Lavínia Borges, Dra. Simone Vieira, Dra. Patrícia Bittencourt e à amiga Dalva, pela grande força durante essa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina e alunos da Prof. Cristina Guatimosim.

À Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular e ao Departamento de Bioquímica do IBC/UFMG.

À secretária Sônia Mara, pelo auxílio prestativo durante todos esses anos.

À minha família.

Ao Criador.



1.4.2 Seleção de amostras controle	40
<b>2. Genotipagem do polimorfismo da MTHFR por PCR-RFLP</b>	<b>41</b>
2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	41
2.2 RFLP para Hinf I	42
<b>3. Análise do padrão de metilação e instabilidade de microssatélites nas amostras de câncer colorretal</b>	<b>43</b>
<b>4. Análise da ancestralidade genômica em amostras de câncer colorretal</b>	<b>40</b>
4.1 Segregação genômica	44
<b>5. Análise Estatística</b>	<b>44</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>46</b>
1. Estudo do câncer colorretal	47
2. Estudo do câncer de mama	61
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
<b>1. Estudo do câncer colorretal</b>	<b>71</b>
1.1 Polimorfismo C677T da MTHFR e CCR	71
1.2 MTHFR, CCR e características clínico-patológicas	76
1.3 MTHFR, CCR e mecanismos patogênicos	78
1.3.1 MTHFR, CCR e Hipermetilação da região promotora de genes	78
1.3.2 MTHFR, CCR e Instabilidade de Microssatélites	80
<b>2. Estudo do câncer de mama</b>	<b>86</b>
2.1 Polimorfismo da MTHFR e Câncer de Mama	86
2.2 Polimorfismo da MTHFR, Câncer de Mama e <i>Status</i> Hormonal	88
2.3 Polimorfismo da MTHFR, Câncer de Mama e Idade	88

2.4 Polimorfismo da MTHFR, CM e consumo de Álcool e Cigarro	90
<b>CONCLUSÃO</b>	96
<b>ANEXOS</b>	98
1.1 Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer/ São Paulo	99
1.2 Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFMG	100
1.3 Consentimento Informado e Esclarecido utilizado no estudo de câncer de mama	101
1.4 Estadiamento de Dukes para CCR	102
1.5 Estadiamento Clínico do Câncer de Mama baseado no sistema TNM	103
1.6 Gramas de álcool em algumas bebidas comuns	104
<b>ARTIGO</b>	105
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	114

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Nº</b>		<b>Pág.</b>
1	Esquema do metabolismo de um-carbono ou metabolismo do folato	17
4.1	Gel de poliacrilamida corado pela prata com os genótipos da MTIFH	48
4.2	Amostras de tumor colorretal microsatélite instáveis e o genótipo do polimorfismo da MTHFR	54
4.3	Análise dos tamanhos dos fragmentos de inserção-deleção (indels) em uma amostra de CCR, utilizando o programa Genetic Profiler (versão 2.2)	56-59
4.4	Proporções de indivíduos europeus, africanos, ameríndios e a presença ou ausência de Instabilidade de Microsatélites	60
4.4	Representação gráfica da idade (em anos) da ocorrência da menarca, da idade das mulheres no momento do diagnóstico de CM e da idade da ocorrência da menopausa	63
4.5	Histograma tridimensional mostrando a estratificação das pacientes com CM, de acordo com estadiamento da doença, e genótipos da MTIHF C677T	68
4.6	Distribuição das pacientes com CM de acordo com estadiamento da doença e a presença ou não de etilismo e/ou tabagismo	69
5.1	Distribuição das frequências genotípicas 677TT e 677CC+CT da MTHFR em alguns países do mundo	85

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>N°</b>		<b>Pág</b>
3.1	Dados clínicos (sexo, idade e estadiamento TNM) de 98 dos 106 pacientes portadores de CCR dos quais se obtiveram as amostras de DNA utilizadas neste trabalho	33
4.1	Frequência do genótipo do polimorfismo da MTIFH C677T em pacientes com e sem câncer colorretal	49
4.2	A relação entre o polimorfismo da MTIFH C677T e o sexo, a idade e o estadiamento por Dukes dos pacientes com câncer colorretal	51
4.3	Os polimorfismos da MTHFR C677T e metilação do DNA de cinco genes associados ao CCR ( <i>DAPK</i> , <i>MGMT</i> , <i>hMLH1</i> , <i>p16<sup>NK4a</sup></i> e <i>p14<sup>ARF</sup></i> )	53
4.4	Associação entre o polimorfismo da MTHFR C677T e instabilidade de microssatélite no CCR	55
4.5	Frequência do genótipo do polimorfismo da MTIFH C677T em pacientes com e sem câncer de mama	62
4.6	Relação entre mulheres com câncer de mama na pré- e pós-menopausa, idade superior e inferior a 70 anos e o polimorfismo C677T da MTIFH	65
4.7	Relação entre o consumo de álcool e tabagismo em mulheres com câncer de mama e o polimorfismo C677T	66

**LISTA DE ABREVIATURAS**

5-10 TIF – 5-10 metileno tetraidrofolato

5-TIF – 5- metiltetraidrofolato

CCR – câncer colorretal humano

CM – câncer de mama humano

CpG – citosina que precede guanossina

DNA – ácido desoxiribonucléico

DNMT - DNA metiltransferase

Hinf I – enzima de restrição Hinf I

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Indels - locos polimórficos bialélicos de inserção-deleção

MMR – sistema de reparo de DNA por erro de pareamento

MTHFR – metilenotetraidrofolato redutase

MSI – instabilidade de microssatélites

MSI-H – alto nível de instabilidade

MSI-L – baixo nível de instabilidade

MSS – estabilidade de microssatélites

PCR – reação em cadeia da polimerase

RFLP – polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

RNA – ácido ribonucléico

r.p.m. – rotações por minuto

SAH - adenosilhomocisteína sulfato

SAM – adenosilmetionina sulfato

TNM – tumor, nódulo linfático, metástase

## RESUMO

Estudos epidemiológicos sugerem que o polimorfismo da metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), C677T, pode modificar o risco de câncer colorretal (CCR) e câncer de mama (CM). O polimorfismo C677T está associado à expressão de uma enzima termolábil de baixa atividade, e afeta diretamente o nível de folato, crucial para evitar o estado de hipometilação genômica. Considerando que as anormalidades de metilação são importantes na patogênese do CCR e CM, este trabalho avaliou em amostras de CCR, a relação entre o polimorfismo C677T da MTHFR, hipermetilação da região promotora de cinco genes (*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16<sup>INK4a</sup>* and *p14<sup>ARF</sup>*) e instabilidade de microssatélites (MSI). Nos casos de CM, os genótipos do polimorfismo C677T foram analisados com relação aos parâmetros clínicos das pacientes, e o estadiamento da doença. A genotipagem do polimorfismo C677T foi realizada através da técnica PCR-RFLP. Não foi encontrada associação entre genótipo 677TT e CCR. Não houve diferença das frequências genotípicas da C677T, em relação à presença ou ausência de hipermetilação de um ou mais locos analisados. Por outro lado, houve uma forte associação entre o genótipo TT e a presença de MSI. Essa associação parece ser independente do *status* de metilação do promotor do gene *hMLH1*, ou da ancestralidade genômica dos pacientes (genotipados através da análise de indels). Em relação ao CM, não foi encontrada associação estatística entre genótipo TT e CM. Não houve diferença estatística das frequências genotípicas da C677T com relação ao tabagismo, à idade e *status* hormonal (pré ou pós-menopausa), no momento do diagnóstico. No entanto, foi encontrada uma forte associação estatística entre o genótipo TT e pacientes com CM etilistas e pacientes diagnosticadas no estadio IIIA. Nossos resultados sugerem que os efeitos deletérios advindos da baixa atividade da MTHFR, associados à potente ação antagonista do folato, induzida pelo álcool, podem aumentar o risco para CM. Apesar de encontrarmos associação entre estadio avançado da doença e genótipo TT, o estadiamento neste estudo pode estar ligado à temporalidade do diagnóstico, não refletindo a agressividade tumoral. Estudos adicionais focados na relação do álcool, estadiamento para CM e polimorfismo da MTHFR devem ser realizados. O uso preventivo de folato, para pacientes etilistas portadoras do genótipo TT, deve ser considerado, com o objetivo de reverter os efeitos do genótipo 677TT no CM.

## ABSTRACT

Epidemiologic studies suggest that the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism may modify the risk of both colorectal cancer (CRC) and breast cancer (BC). The C677T polymorphism is associated with the expression of a thermolabile enzyme with decreased activity that influences the levels of methyl-donor molecules. Considering that methylation abnormalities appear to be important in the pathogenesis of CRC, we have examined the relationship between the genotype at the MTHFR C677T polymorphism, hypermethylation of the promoter region of five genes (*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16<sup>INK4a</sup>* and *p14<sup>ARF</sup>*) and microsatellite instability (MSI) in 106 patients with CRC. In 195 BC cases, the genotype C677T was correlated with clinical parameters of the patients and stage of disease. The MTHFR C677T polymorphism was assessed by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The analysis of MTHFR 677 TT genotype between cases and controls did not reveal any statistically significant difference. We did not show statistically significant differences in the genotypic frequencies of the MTHFR C677T polymorphism with or without hypermethylation of one or multiple loci. However, our study found a significant excess of 677TT individuals among patients with CRC with MSI. This strong association appears to be independent of the methylation status of *hMLH1* or of the biogeographical genomic ancestry of the patients (typed utilizing indels). An explanation for this mechanism between MSI, 677TT genotype and CRC is not clear. We did not find statistical difference in the frequency of 677 TT genotype between controls and BC cases. In BC patients, no frequency differences of 677 TT genotype were observed among smoking habit, age, and menopausal status at the initial diagnosis. However, a strong statistical association was found between TT genotype and BC alcohol drinkers and BC stage IIIA. Our results suggest that the low activity of the MTHFR, and the powerful folate antagonistic action of alcohol, could increase the risk for BC. Besides the association between severity of disease and TT genotype, in this study, BC stage is linked to temporality of diagnosis and does not reflect tumor aggressiveness. Additional studies should be carried out to clarify the relationship among alcohol drinking, stage, and MTHFR C677T polymorphism. The preventive use of folate for BC drinkers, bearing 677 TT genotype, may be considered to reverse the effect of genotype 677TT.

# 1.INTRODUÇÃO

## **1. CÂNCER COLORRETAL E CÂNCER DE MAMA**

### **1.1 Incidência e Fatores de Risco**

O câncer colorretal humano (CCR) é um dos tumores mais freqüentes, e de alta incidência em todo o mundo. A cada ano são diagnosticados mais de 100.000 casos nos Estados Unidos (Jemal et a., 2004). As Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil para 2006, publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), apontam o câncer colorretal como o 5º tumor maligno mais freqüente entre homens (com 11.390 casos novos), e o 4º entre as mulheres (13.970 casos novos). A maior incidência de casos é de câncer esporádico e ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas as possibilidades de seu desenvolvimento aumentam a partir dos 40 anos. A maior concentração dos de CCR ocorre nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Brasil, 2006).

Os fatores ambientais e hereditários que contribuem para o aparecimento da doença são: presença de pólipos adenomatosos (incluindo polipose familiar adenomatosa), excesso de peso, tabagismo, alta ingestão de álcool e dieta pobre em vegetais e rica em alimentos de origem animal, particularmente a carne (Sharp & Little, 2004).

O câncer de mama (CM) é muito freqüente e constitui um grave problema de saúde pública. É, provavelmente, o câncer mais temido pelas mulheres, devido à possível mutilação pelo tratamento, afetando a sexualidade e a imagem pessoal. O CM esporádico é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas, acima desta faixa etária, sua incidência cresce rápida e progressivamente. Estima-se que a incidência mundial do câncer de mama é

de 1 milhão de casos por ano, sendo que mais da metade deles se concentra nos Estados Unidos e Europa (Dumitrescu & Cotarla, 2005). As estatísticas indicam aumento de sua freqüência nos países em desenvolvimento, sobretudo nos ocidentais. De acordo com a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para 2006, o câncer de mama será o segundo de maior incidência, com 48.930 casos, e a primeira causa de morte entre as mulheres (Brasil, 2006). Apesar de a incidência estar aumentando com o tempo, felizmente, nos últimos 10-15 anos, a mortalidade declinou em 2,3% por ano, devido a múltiplos fatores, incluindo avanços na triagem do câncer e novos regimes de tratamento (Stewart et al., 2004).

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento estão bem estabelecidos e incluem: idade (aumento em 100 vezes na incidência após 45 anos) (Hulka & Moorman, 2001), localização geográfica (o país com a maior incidência atualmente é a Holanda), *status* sócio econômico (maior número de casos em classe alta), eventos reprodutivos (menarca, menopausa, gravidez e amamentação), hormônios exógenos (terapia de reposição hormonal), estilo de vida (atividade física, consumo de álcool, tipo de alimentação, obesidade), densidade mamográfica; história pregressa de doença benigna da mama, fatores ambientais (exposição à irradiação ionizante) e história familiar positiva (Dumitrescu & Cotarla, 2005).

Apesar dos avanços tecnológicos e terapêuticos que visam a melhorar o prognóstico e a sobrevida dos pacientes com ambos os tumores, a detecção precoce ainda é falha. Estima-se que 50% dos casos são diagnosticados em estádios avançados (Ministério da Saúde. Estimativa 2005: Incidência de

Câncer no Brasil). Neste contexto, a busca pela melhoria de estratégias preventivas e/ou diagnósticas são necessárias para avaliar os pacientes. No CM a mastectomia é curativa para as pacientes com lesão *in situ* (carcinoma *in situ*), e no CCR, a detecção precoce diminui significativamente a taxa de mortalidade por essa doença. Por isso, torna-se urgente a busca de marcadores moleculares de valor diagnóstico e prognóstico, relacionados a tumorigênese. Recentemente, vários marcadores moleculares tumorais estão sendo descobertos e, futuramente, poderão ser ferramentas de detecção precoce ou que permitirão predizer o risco de desenvolvimento tumoral. Assim será viável diferenciar os pacientes com alto risco de metástases daqueles com lesão *in situ*, e determinar a conduta terapêutica mais adequada (Going & Gusterson, 1999).

## **2. O CÂNCER É UMA DOENÇA GENÔMICA**

Atualmente, sabe-se que o câncer é uma doença eminentemente genômica (e conseqüentemente genética) e emerge da expansão territorial de um clone que, através de mutações somáticas cumulativas (herdadas ou adquiridas ao longo da vida), adquire vantagens adaptativas crescentes e progressivas (Weinberg, 1996). Durante a tumorigênese, uma célula normal adquire a habilidade de esquivar-se dos mecanismos reguladores que controlam o crescimento celular, a morte celular programada ou apoptose, a angiogênese e a invasão do tecido adjacente e à distância, dando origem às metástases (Weinberg, 1996; Hanahan & Weinberg, 2000).

A perda precoce da capacidade de controle na replicação celular pode ser causada por alterações genéticas e epigenéticas, que são perpetuadas com a progressão do tumor. Essas alterações interferem no funcionamento do complexo e eficiente sistema de monitoramento (*caretaker*) do DNA que envolve genes e enzimas de reparo de DNA, genes supressores de tumor e oncogenes, gerando uma instabilidade genômica que modifica drasticamente a maquinaria celular (Klausner, 2002). Como consequência do mau funcionamento desse sistema de vigília genômico, as células adquirem a capacidade de apresentar insensibilidade aos sinais de anti-crescimento, auto-suficiência da produção dos sinais mitogênicos de crescimento, resistência à apoptose e indução da angiogênese (Hanahan & Weinberg, 2000). Assim, ocorre uma rápida e desordenada expansão clonal, originando tumores agressivos, invadindo o tecido primário local e adjacente, e que, através de metástases, são capazes de modificar a homeostasia de outros órgãos e tecidos (Lengauer, 1998; Keith & Loeb, 2000).

## **2.1 Fatores Genéticos e Epigenéticos**

Os estudos atuais sugerem que o desenvolvimento do tumor mamário de baixo grau segue etapas seqüenciais distintas, iniciando-se como proliferações ductais (hiperplasias com ou sem atipias), e gradualmente o tumor progride para carcinoma *in situ*, carcinoma invasor e carcinoma metastático. O surgimento do CCR segue a seqüência (“*multi-step*”) de adenoma para carcinoma. Ambos os modelos de desenvolvimento da carcinogênese mamária e colorretal estão diretamente relacionados ao

acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas (Szyf et al., 2004a). A progressão tumoral do CM para o tipo invasor e o tipo metastático provavelmente resulta do acúmulo no carcinoma *in situ* de vários eventos genéticos e epigenéticos (Lacroix et al., 2004).

Há anos atrás, o fator genético era considerado como o fator causal da carcinogênese, pois explica a característica irreversível dos tumores. É indiscutível que a presença de alterações genéticas (mutações em genes, rearranjos, deleções, duplicações, inserções, erro de pareamento de bases e recombinação) que acometem o DNA das células é evento marcante para o início, desenvolvimento e manutenção do câncer (Sugimura & Ushijima, 2000; Feinberg, 2004). O câncer colorretal hereditário (polipose adenomatosa familiar) é uma causa rara de CCR, ocorrendo em menos de 1% de todos os casos. É uma doença autossômica dominante, causada por mutações germinativas no gene *APC* (“*adenomatous polyposis coli*”). Aproximadamente de 5 a 10% de todos os casos de câncer de mama e ovário são hereditários (Offit, 2000), a herança é do tipo autossômica dominante e os portadores de mutação dos genes supressores de tumor *BRCA1* ou *BRCA2* apresentam penetrância, aos 70 anos, de 70-85% para carcinoma de mama e, de 20-60%, para carcinoma de ovário (Ford et al., 1994).

Porém, em decorrência das evidências de que algumas alterações são reversíveis, sendo estas características singulares dos fenômenos epigenéticos, os estudos voltados para o modelo epigenético ajudaram a compreender o quebra-cabeça do paradigma da biologia do câncer. O modelo epigenético de câncer não contradiz o modelo genético, ambos se

complementam. Na verdade, um pode predispor ao outro na indução da carcinogênese (Verma & Srivastava, 2002).

Alterações epigenéticas são modificações do genoma transmitidas durante a divisão celular, que não envolvem mudança na sequência de DNA (Esteller, 2003; Feinberg, 2004), apresentam um caráter hereditário e são capazes de modificar a expressão gênica (Jones & Laird, 1999). As características singulares das alterações epigenéticas que as diferenciam das alterações genéticas incluem: (1) sua potencial reversibilidade; (2) efeito de posição – isto é, promove efeitos nos genes à distância, porém, quanto maior a distância entre o ponto de alteração epigenética e o gene alvo, menor será o poder de alteração deste, podendo até mesmo inexistir; (3) alta frequência de alterações, infinitamente maior do que aquelas presentes em mutações e (4) pode ser modificada pelo ambiente (Feinberg, 2004). Geralmente as modificações epigenéticas não estão associadas ao câncer familiar em contraposição ao modelo genético.

Notadamente, um dos principais fenômenos epigenéticos, a metilação de DNA, tem sido reconhecida como uma das principais modificações presentes em neoplasias (Sugimura & Ushijima, 2000). A hipometilação do genoma e a hipermetilação (restrita às áreas localizadas dentro da região promotora de genes, as ilhas de CpG) são cruciais para a manutenção da integridade celular. Os eventos de hipometilação ou hipermetilação de genes podem ocorrer simultaneamente, sem necessariamente estabelecer uma relação de causa e efeito. Além disso, esses fenômenos podem promover o crescimento celular desordenado em determinado tecido e, em outro, diminuir o risco de câncer, não existindo uma regra rígida. O que exemplifica bem essa

informação foram experimentos em que se utilizaram ratos, nos quais evidenciou-se que a redução da atividade da DNA metiltransferase (DNMT) leva a hipometilação e instabilidade cromossômica, aumentando a incidência de linfomas e reduzindo tumores intestinais em ratos (Laird et al., 1995; Gaudet et al., 2003). Um equilíbrio entre esses eventos é relevante para garantir, pelo menos em parte, um *status* epigenético desfavorável para a formação e progressão tumoral.

### **2.1.1 Metilação aberrante de DNA em Câncer**

Em humanos, a metilação de DNA envolve, predominantemente, a adição covalente de um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) à posição 5' da citosina que precede uma guanosina na seqüência de DNA (dinucleotídeo CpG). A distribuição dos grupamentos CpG no genoma é assimétrica, e localizam-se principalmente reunidos (“ilhas CpG”) nas regiões de promotores de genes (Robertson & Wolffe, 2000). Pelo menos metade dos genes, em nosso genoma, possui regiões ricas de ilhas CpG nos promotores. Na imensidão do genoma humano, cerca de 80% dos nucleotídeos CpG, que não pertencem às ilhas CpG, encontram-se fortemente metilados (Herman & Baylin, 2003). Em contraste, os dinucleotídeos presentes nas ilhas CpG, especialmente aqueles associados aos promotores, geralmente se encontram não-metilados (Robertson & Wolffe, 2000). A metilação que ocorre nas ilhas CpG localizadas em promotores silencia a expressão gênica e é considerado um evento celular normal que regula a expressão gênica.

A hipermetilação é parte de um processo que afeta vários genes simultaneamente, alguns dos quais podem ser cruciais para a formação de uma neoplasia e/ou progressão tumoral. Essa alteração é evento freqüentemente observado em casos de câncer esporádicos (Esteller et al., 2001).

A inativação gênica por metilação pode produzir seletivamente a perda da função de um gene supressor tumoral (De Bustros et al., 1988). Na verdade, já foi identificada a presença de hipermetilação da região promotora de 66 diferentes genes, todos eles envolvidos com o desenvolvimento tumoral (Issa et al., 1994). Dentre esses, destacam-se o gene supressor de tumor *BRCA1*, os genes envolvidos no ciclo celular *p16<sup>INK4a</sup>*, *p 14<sup>ARF</sup>* (Baylin et al., 1998; Issa et al., 1994), os genes com provável função supressora tumoral *CDH1* (caderina-E), *ESR1* e *ESR2* (receptor de estrógeno) (Issa et al., 1994; Parrela et al., 2004), os genes envolvidos no reparo de DNA, *hMLH1* (homólogo humano do *MutL* bacteriano) e *MGMT* (O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase) e o gene associado a apoptose ligado a proteína quinase, *DAPK*. A metilação aberrante - em conjunto ou isoladamente - desses genes está freqüentemente associada à patogênese do CCR e também do CM. Por exemplo, 58% dos CCR apresentaram hipermetilação em pelo menos uma região promotora dos genes *DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16<sup>INK4a</sup>* e *p14<sup>ARF</sup>* (Anacleto et al., 2005 a e b). Já foram descritos mais de 35 genes com hipermetilação da região promotora associados ao CM. No CM a hipermetilação de alguns genes acontece precocemente, antes do desenvolvimento de metástases (Lacroix et al., 2004)

### 2.1.2 Hipometilação e Câncer

Várias linhas de evidência indicam que, quando ilhas CpG são metiladas, o genoma das células cancerosas torna-se hipometilado. Uma célula maligna contém entre 20 a 60% a menos de 5-metilcitosina do que uma célula normal. As regiões no genoma que freqüentemente se encontram hipometiladas incluem os exons, os introns e as seqüências de DNA repetitivas. A hipometilação genômica contribui para a carcinogênese por meio de três possíveis mecanismos: (1) instabilidade cromossômica, (2) reativação de elementos *transponíveis*, (3) perda do *imprinting* (Liu et al., 2003; Szyf et al., 2004; Esteller 2005). O DNA não-metilado favorece recombinação mitótica levando à perda da heterozigose à promoção de rearranjos, detectáveis em cariótipos. Além disso, a demetilação em seqüências centroméricas é comum no câncer humano e deve ter um papel importante na aneuploidia (Esteller, 2003). A perda da metilação poderia ativar a expressão de protooncogenes quiescentes, ativando uma cascata de eventos que culminaria com a transformação maligna (Goelz et al., 1985).

As principais fontes alimentares doadoras de grupamentos metila são os folatos, a metionina e a vitamina B12. Uma dieta pobre nestes nutrientes induz a ocorrência de hipometilação genômica em humanos e em ratos. Esses animais, quando submetidos a dieta pobre nestes nutrientes, desenvolveram câncer hepático, câncer de pulmão e CCR (Pogribny, 1997). Em humanos, a hipometilação está associada a vários cânceres, incluindo CCR (Pufulete et al., 2003), mama (Szyf et al., 2004) e ovário (Cheng et al., 1997), e tumor de Wilms (Ehrlich et al., 2002). Não se sabe precisamente qual é o nível de deficiência de

folato que é capaz de promover hipometilação ou instabilidade genômica. Experimentos *in vitro*, em que se utilizaram cultura de células humanas, mostraram que níveis de ácido fólico superiores a 180 nmol/L e 120 nmol/L minimizam quebra de DNA e incorporação errônea de uracila, respectivamente (Fenech, 2003). Em humanos, indivíduos com nível de folato sérico entre 8 a 35 nmol/L estão relacionados à instabilidade genômica (Kimura et al., 2004). Em conjunto, níveis de vitamina B12 maiores que 300 pmol/L, folato plasmático maiores que 34 nmol/L e homocisteína plasmática menores que 7,5  $\mu$ mol/L podem reduzir a hipometilação de DNA em humanos. Essas concentrações são alcançadas quando há ingestão diária de pelo menos 400 $\mu$ g/dia de ácido fólico e 2 $\mu$ g/dia de vitamina B12 (Fenech, 2003).

É amplamente aceito que a hipometilação no câncer não é um evento restrito apenas ao tecido tumoral. A presença de hipometilação foi observada tanto nas células do tumor colorretal, quanto na mucosa colônica não-afetada do mesmo paciente (Feinberg et al., 1983, Goelz et al., 1985, Cravo et al., 1994). Isso reforça a teoria de que a hipometilação é um evento precoce e consistente na carcinogênese.

Uma metilação eficiente do genoma depende da adequada disponibilidade dos substratos doadores do grupamento metila. Bioquimicamente, a manutenção desses substratos é realizada através do funcionamento eficaz do metabolismo de um-carbono ou metabolismo do folato. Teoricamente, se esse metabolismo for ineficiente, a hipometilação poderá ocorrer, contribuindo para a progressão da carcinogênese. Devido a isso, é crescente o número de trabalhos que estudam a fundo a relação entre

as enzimas pertencentes ao metabolismo do folato, a hipometilação e o CCR e CM.

## **2.2 Instabilidade de Microssatélites**

A instabilidade de microssatélites (MSI) representa um dos mecanismos moleculares de instabilidade genômica. Os microssatélites são repetições em tandem de seqüências de DNA (mono, di, tri, tetra e pentanucleotídeos) que estão espalhados em todo genoma. Por causa da sua natureza repetitiva, essas seqüências estão sempre sujeitas a alterações freqüentes no número de repetições, originando a instabilidade de microssatélites (MSI). A MSI é definida como uma alteração no tamanho do microssatélite causado por deleção ou inserção de nucleotídeos no DNA do tumor quando comparado com o tecido normal (Boland et al., 1998). Esse fenômeno é causado por falha do sistema de reparo por erro de pareamento (MMR, do inglês *mismatch repair*) que ocorre durante a replicação de DNA. Mutações germinativas nos genes que estão envolvidos no reparo de DNA, como *MLH1*, *MSH2* ou *MSH6*, diminuem a eficiência do MMR, e culminam em taxas de mutações em microssatélites 100 vezes maiores do que aquelas observadas em células normais (Thomas et al., 1996).

Um critério mínimo para determinação da MSI no CCR foi desenvolvido pelo *National Cancer Institute (NCI, Bethesda Consensus Panel)*, o qual determina a inclusão da avaliação de dois microssatélites com repetições mononucleotídeos (BAT-25 e BAT-26) e três microssatélites com repetições dinucleotídeos (D2S123, D5S346 e D17S250). Os cânceres são subdivididos

em 3 grupos: microssatélites estáveis (MSS), baixa MSI (MSI-L; menos de 30-40% de MSI nos locos investigados) e alta MSI (MSI-H; mais de 30-40% de MSI nos locos investigados) (Boland et al., 1998). Parece que a incidência de tumores com MSI varia de acordo com o grupo étnico estudado. A proporção de casos de CCR com MSI em indivíduos com descendência africana (45%) é superior à proporção observada em indivíduos de origem europeia (20%) (Ashktorab et al., 2003).

Dois mecanismos patogênicos foram propostos para o desenvolvimento dos CCRs (Lengauer et al., 1997). O primeiro, denominado “clássico”, representa 85% dos casos, apresenta estabilidade de microssatélites e depende de eventos mutacionais cumulativos (germinativos ou somáticos) em genes supressores de tumor e oncogenes, e freqüentemente envolve deleções cromossômicas, aneuploidias, perda alélica, ampliações e translocações (Cottrell et al., 1992).

O segundo mecanismo, chamado “mutador”, representa os 15 % dos CCRs remanescentes. Esses tumores apresentam alta freqüência de MSI e, portanto, estão relacionados a mutações (germinativas ou somáticas) dos genes relacionados à maquinaria do sistema de reparo de DNA. Notadamente, os tumores “mutadores” apresentam um fenótipo específico (fenótipo mutador), que inclui a localização preferencial na região proximal do cólon direito, do tipo mucinoso, histologicamente pouco diferenciados e com infiltração linfocitária marcante. Esses tumores apresentam melhor prognóstico e são resistentes à quimioterapia adjuvante com 5-fluorouracil (Thibodeau et al., 1993; Ribic et al., 2003; Lynch et al., 2003). Além disso, a instabilidade de microssatélites neste mecanismo, freqüentemente resulta da inativação do gene *hMLH1* causado por

hipermetilação de sua região promotora (Herman & Baylin, 2000). Estudos recentes têm mostrado que no câncer colorretal esporádico, a perda da função de outros diferentes genes envolvidos no reparo de DNA ocorre devido à metilação aberrante de seus promotores. Isso reforça a estreita relação entre MSI e hipermetilação na patogênese do CCR.

A informação sobre MSI e CM é confusa e inconsistente. As incidências variam entre 0 a 30%. Entretanto, provavelmente menos de 10% dos tumores são MSI-H. O papel exato da mutação dos genes de reparo (MMR) no desenvolvimento e prognóstico do CM requer melhores investigações (Schmitt et al., 1999; Lawes et al., 2002)

### **3. METILENOTETRAIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)**

Um dos possíveis fatores de risco recentemente proposto para o CCR e CM é o polimorfismo C677T da MTHFR (revisto por Sharp & Little, 2004, Gershoni-Baruch et al., 2000). Essa ligação é bastante interessante, pois fenômenos epigenéticos, como hipermetilação da região promotora de genes e hipometilação genômica, são comuns em ambos os tipos de câncer. A MTHFR apresenta um papel central no complexo metabolismo de um-carbono - ou metabolismo do folato - e determina o equilíbrio entre as várias formas de folato, essenciais para metilação e síntese de DNA.

O gene autossômico humano da MTHFR está localizado no cromossomo 1p36.3 e codifica uma flavoproteína de 656 aminoácidos. A MTHFR catalisa a conversão de 5-10-metilenotetraidrofolato (5-10 TIF) em 5-

metiltetraidrofolato (5-TIF, principal forma de folato plasmático circulante) que é um doador de grupamentos de carbono para a síntese *de novo* de metionina (Yamada et al., 2001; Kawakami et al., 2003). A metionina é a precursora para síntese de adenosilmetionina sulfato (SAM), um importante doador de grupamentos metila para metilação do DNA (Yamada et al., 2001, Kawakami et al., 2003). A enzima MTHFR tem um papel crucial no metabolismo do folato, importante para a manutenção da biossíntese de DNA e/ou RNA e metilação de DNA genômico (figura 1). É amplamente aceito que na ausência desses eventos, instala-se uma instabilidade genômica, que pode ser crítica para transformação oncogênica de células humanas, favorecendo uma possível ligação entre a enzima MTHFR e a carcinogênese. Atualmente, tem sido investigada a contribuição de outras enzimas (timidilato sintetase e metionina sintetase) que pertencem ao ciclo do folato, isoladamente ou em associação ao polimorfismo da MTHFR, na gênese do câncer (Ulvik et al., 2004; Etienne et al., 2003; Ricciardiello et al., 2005).

O polimorfismo mais importante do gene da MTHFR encontra-se na posição 677 (exon 4, códon 222) e altera um aminoácido altamente conservado no domínio catalítico N-terminal (C677T/Ala222Val). O camundongo com inativação do gene da MTHFR (*MTHFR-knockout*) apresenta morte com apenas alguns dias de vida (Chen et al., 2001). O polimorfismo C677T se localiza na base do sítio de ligação do co-fator flavina adenina dinucleotídeo (FAD), e assim diminui a afinidade de ligação do FAD à MTHFR e aumenta a taxa de dissociação do FAD à enzima (Guenther et al., 1999). Devido a isso, os indivíduos portadores do genótipo 677TT e 677CT estão associados à expressão de uma aloenzima termolábil com 30% e 60% de atividade

enzimática, quando comparados com genótipo 677CC (Frosst et al., 1995). Um outro polimorfismo, A1298C (glutamina para alanina, exon 7, codon 1298), é menos importante do ponto de vista bioquímico, pois altera menos a atividade enzimática da MTHFR (Weisberg et al., 1998). Os dois polimorfismos se encontram em desequilíbrio de ligação (C677T e A1298C) na população geral (Stegmann et al., 1999). Outros polimorfismos no gene da MTHFR têm sido reportados nas posições 1059, 1289, 1317 e 1793, entretanto são bem menos comuns do que o C677T e o A1298C, e a importância funcional de todos eles ainda não foi esclarecida. A homozigose do alelo 677 T está associada com níveis plasmáticos elevados de homocisteína, baixos níveis de folato sérico (Kluijtmans et al., 1998) e hipometilação genômica (Stern et al., 2000). Esses eventos em conjunto aumentam o risco para uma série de manifestações clínicas, como doenças cardiovasculares, retardo de desenvolvimento e defeitos de formação do tubo neural em fetos, complicações gestacionais, desordens psiquiátricas e câncer (para revisão Sharp & Little, 2004). Os tipos de câncer mais estudados incluem o câncer gástrico (Shen et al., 2001), o câncer esofágico (Song et al., 2001), o CCR (van Rijnsoever et al., 2002; Heijmans et al., 2003) e adenoma colorretal (Pufulete et al., 2003), o CM (Gershoni-Barush et al., 2000; Semenza et al., 2003), o câncer de colo de útero (Piyathilake et al., 2000; Goodman et al., 2001 Gerhard et al. 2003; Kang et al., 2005) e as leucemias (Skibola et al., 1999).



### 3.1 Freqüências dos genótipos da MTHFR nas populações

Existe uma variação étnica e geográfica na distribuição da freqüência do alelo 677T no mundo todo. Um estudo recente (Wilcken et al., 2006) avaliou a freqüência do alelo T em 7.000 recém-nascidos, em 16 áreas em todo mundo. Na Europa, a prevalência do genótipo 677TT aumenta nitidamente quando se caminha em direção ao sul do continente, partindo de valores menores no norte (4-7% na Finlândia, Helsink, Nordeste da Holanda e Rússia), para valores intermediários na França e Hungria (8-10%) até valores altos no sudeste (12-15% na Espanha e norte da Itália) com o pico no sudeste da Itália (20-26% na região da Campanha e Sicília). O mesmo se observa na América do Norte, onde a freqüência de homozigotos TT aumenta do oeste do Canadá para a região sul dos Estados Unidos, com um pico no México (32% - 677TT). A variação étnica do genótipo 677TT é aparente entre os grupos, sendo maior nos indivíduos de origem hispânica (17%), intermediária entre os indivíduos de origem européia (10-15%) e extremamente baixa nos indivíduos afrodescendentes americanos (2,7%). O trabalho de Wilcken et al. (2006) não avaliou nenhuma população de origem africana, porém essa baixa porcentagem do genótipo 677TT também foi reportada em três estudos realizados com indivíduos da região do sub-Sahara africano, África do Sul e Zimbábue e cinco estudos que avaliaram negros norte-americanos. Em 234 indivíduos provenientes da África Central, Gâmbia, Kênia e Madagascar, nenhum apresentou o genótipo 677TT (Schneider et al., 1998). Baseando-se nesses estudos, a freqüência do alelo T parece ser diferente entre os grupos étnicos de origem européia e africana.

Trabalho recente não demonstrou nenhuma diferença na frequência do polimorfismo 677TT com relação à estratificação por sexo (Anderson et al., 2005). No entanto, esse genótipo foi associado à alta mortalidade em populações idosas (Shannon et al., 2002).

A população brasileira é muito heterogênea devido ao tipo de colonização. O Brasil acolheu imigrantes oriundos de três continentes principais: europeus (representados pelos portugueses - colonizadores), africanos (na figura dos escravos) e ameríndios. Após cinco séculos de mistura étnica entre esses três grupos, torna-se inviável correlacionar cor da pele à ancestralidade em nosso país (Parra et al., 2003).

No Brasil, apenas um estudo mostrou a distribuição genotípica 677TT da MTHFR, maior entre os caucasianos (10,3%) e extremamente menor em negros (1,45%) e ameríndios (tribo Parakanã) (1,2%) (Arruda et al., 1998). Apesar de a porcentagem dos genótipos TT ser equivalente à dos valores encontrados em outro estudo (Wilcken et al., 2006), os indivíduos dos grupos “caucasiano” e “negros” foram selecionados através da aparência, cor da pele e entrevista sobre a origem ancestral, o que pode invalidar o estudo.

A busca por ferramentas moleculares com o objetivo de estratificar etnicamente os indivíduos de acordo com sua ancestralidade genômica, e não através da cor da pele, é de extrema importância. O controle genômico deve ser realizado em todos os estudos (principalmente os do tipo caso-controle), que utilizam populações que apresentam elevado grau de mistura gênica, como a do Brasil. Recentemente, Bastos-Rodrigues et al. (2006) desenvolveram uma seleção de 40 locos polimórficos bialélicos de inserção-deleção (indels), os quais são altamente informativos para sugerir a

ancestralidade de um indivíduo. Os indels apresentam características ideais para serem marcadores de controle genômico: estão espalhados em praticamente todos os cromossomos, possuem baixíssima taxa de mutação, possuem neutralidade seletiva e apresentam frequência alélica entre 0,4-0,5. A utilização desta ferramenta pode ser útil para esclarecer se determinada associação entre dois fatores ocorreu devido à mera estratificação étnica ou não, validando os resultados dos estudos do tipo caso-controle.

### **3.2 MTHFR e Câncer Colorretal**

A hipótese de uma associação direta entre o genótipo 677TT e o CCR é ainda controversa, pois se sabe que fatores ambientais são igualmente significantes para o risco de CCR. É notável que a concentração de folato sérico - e também da cobalamina -, é uma condição importante, e várias linhas de evidência reforçam a relevância da interação gene-nutriente para o risco do CCR (Friso et al., 2002). O álcool tem sido considerado também um importante fator de risco para o CCR, porque age como um antagonista do folato (revisto por Le Marchand, 2005).

Indivíduos carreadores do genótipo 677TT têm baixos níveis de folato sérico e de vitamina B12 (diretamente relacionados com hipometilação genômica), e hiperhomocisteinemia, ambos fatores de risco para o desenvolvimento de CCR (Pufulete et al., 2003, Ma et al., 1997 e 1999). Paradoxalmente, os trabalhos mais recentes indicam uma associação inversa entre o genótipo TT e o risco de CCR (Chen et al., 1999; Ma et al., 1997; Toffoli et al., 2003). No entanto, esse “efeito protetor” desaparece, especialmente se

os níveis de folato plasmático forem inadequados (Kono et al., 2005; Eaton et al., 2005) ou mesmo se a ingestão de álcool for baixa (Le Marchand et al., 2005). Uma provável explicação para a relação inversa entre o genótipo TT e o CCR seria que a baixa atividade da MTHFR aumenta a disponibilidade do substrato 5-10 TIF, favorecendo a síntese e o reparo de DNA, resultando em diminuição da incorporação errônea de uracila. Por outro lado, a baixa atividade enzimática leva à depleção dos níveis de 5-TIF, a forma de folato essencial para metilação de DNA, favorecendo outro caminho para a gênese do câncer: a hipometilação genômica. Porém, a hipometilação não ocorrerá se os níveis plasmáticos de folato (fonte exógena) forem adequados, pois ocorrerá um aumento dos grupamentos metila para a manutenção da estabilidade genômica. Esse efeito é tão forte que mesmo altos níveis de homocisteína plasmática parecem não influenciar no risco de CCR. Indivíduos portadores do genótipo 677TT com hiperhomocisteinemia e níveis de folato sérico adequados apresentam uma menor prevalência de CCR (Rosenberg et al., 2002).

### **3.3 MTHFR e Câncer de Mama**

Poucos estudos investigaram a influência do polimorfismo da MTHFR em câncer de mama. A prevalência do alelo T foi significativamente maior em mulheres judias com câncer de mama bilateral ou cânceres de mama e ovário simultâneos (Gershoni-Baruch et al., 2000). Semenza et al. (2003), Ergul et al. (2003) e Campbell et al. (2002) relataram que a homozigose do alelo T aumenta o risco de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa, mas não na pós-menopausa, provenientes da população americana, turca e inglesa,

respectivamente. Em contraste, alguns estudos não encontraram associação entre o genótipo TT e o câncer de mama (Kalemi et al., 2005; Beilby et al., 2004; Langsenlehner et al., 2003).

Um único trabalho propõe que o genótipo 677 TT está associado com a baixa sobrevida em mulheres com câncer de mama em estágio avançado, que realizaram quimioterapia adjuvante (Shrubsole et al., 2005). Trabalhos mostraram que pacientes portadoras do polimorfismo 677 TT apresentam grande toxicidade ao metotrexato e resposta clínica aumentada à quimioterapia com 5-fluorouracil. Estas drogas exercem sua atividade antineoplásica através da inibição do metabolismo do folato. O 5-fluorouracil apresenta vários mecanismos citotóxicos. Dois metabólitos do 5-fluorouracil, 5-fluoro-2-deoxiurina-5-trifosfato e 5-fluoridina-5-trifosfato podem incorporar no DNA e RNA, respectivamente, causando uma instabilidade do DNA e interferindo no processamento do RNA. Outro metabólito, 5-fluoro-2-deoxiuridina-5-monofosfato, pode formar um complexo terciário com a timidilato sintetase e com a 5-10 TIF. A formação desse complexo inibe a atividade da timidilato sintetase e, conseqüentemente, diminui os níveis intracelulares de timidilato, suprimindo a síntese de DNA (Kim et al., 2005). O metotrexato inibe a diidrofolato redutase (DIFH), e o acúmulo de diidrofolato pode inibir a timidilato sintetase e enzimas envolvidas na biossíntese de purinas. Ambos os fármacos participam do clássico esquema de quimioterapia para a doença metastática (Ciclofosfamida, Metotrexato e 5-fluorouracil) (Toffoli et al., 2003).

### 3.3.1 Álcool, folato, tabagismo e Câncer de Mama

A maioria dos estudos tem demonstrado que o risco de câncer conferido pelo polimorfismo C677T é alterado pelo consumo de álcool, tabagismo e dieta pobre em folato, notáveis fatores ambientais modificáveis.

Estudos epidemiológicos mostraram que o álcool é considerado um fator de risco relevante para o desenvolvimento de CM. Estima-se que 4% de todos os novos casos de CM são primariamente devidos ao uso de álcool (Pöschl & Seitz, 2004). O risco para a doença aumenta proporcionalmente à quantidade de álcool ingerida: o consumo crônico de 10-12g de álcool por dia (uma dose/dia) aumenta o risco em 9%, e pode-se chegar a um risco de até 41%, se forem consumidos entre 2-5 doses diárias (Dumitrescu & Shields, 2005). O risco aumentado para o CM independe do tipo de bebida alcoólica consumida (Singletary & Gapstur, 2001).

De acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), os indivíduos que consomem três ou mais doses por dia, ou mais de cinco doses em uma ocasião pelo menos uma vez na semana, são considerados alcoolistas pesados. Uma dose padrão (do inglês *drink*) corresponde a uma lata de cerveja, ou a um cálice de vinho, ou uma dose de uísque ou cachaça (OMS, 2004). A maioria dos estudos prefere calcular a quantidade consumida de álcool em gramas por dia (g/dia). Apesar de não haver um consenso bem definido, nota-se que a maioria dos trabalhos padronizou a ingestão de álcool em leve (menos que 10 g/dia), moderada (10 a 30g/dia) e pesada (maior que 30g/dia).

O consumo de álcool estimula a carcinogênese mamária através de diferentes mecanismos, como estresse oxidativo, mutagênese através do acetaldeído (metabólito do etanol), alteração da resposta e do metabolismo do estrógeno, e redução do ácido fólico (Dumitrescu & Shields, 2005).

O álcool é considerado um antagonista do folato. Ele diminui a biodisponibilidade do folato plasmático por dificultar sua absorção intestinal e por aumentar sua excreção urinária. O álcool é capaz de clivar a molécula de folato, como demonstrado *in vitro* e em animais, mas não em humanos (Mason & Choi, 2005). Praticamente todos os folatos encontrados na dieta possuem uma cauda de ácido glutâmico. A desconjugação do folato poliglutâmico para a forma monoglutâmica, pela poliglutamil hidroxilase (enzima presente nas criptas dos enterócitos), é fundamental para essa forma ser transportada através da membrana luminal do enterócito. O álcool inibe a atividade enzimática de desconjugação e também inibe a atividade de proteínas responsáveis pelo transporte transmembrana do folato, prejudicando a absorção deste. Tanto o consumo de álcool agudo (4 horas), quanto o crônico (12 semanas), são capazes de diminuir os níveis de folato plasmático por inibirem a sua reabsorção tubular renal (Mason & Choi, 2005). Não existe até o momento na literatura indexada, uma correlação linear de qual seria a quantidade de álcool ingerida que interfere com o nível de folato sérico. Especula-se que o consumo moderado de álcool (maior que 15g/dia) é suficiente para reduzir os níveis de folato plasmático, principalmente quando a ingestão exógena de ácido fólico for deficiente (Chiuve et al., 2005). Porém, esses etilistas moderados podem ter os níveis de folato plasmáticos normalizados com uma suplementação adequada de ácido fólico (Cravo,

2005). Essa reversibilidade não foi observada em indivíduos etilistas pesados, que consomem mais que 50g/dia de álcool (Chiuve et al., 2005).

O álcool pode causar efeitos adversos no metabolismo de um-carbono. O acetoaldeído é um potente inibidor da metionina sintetase (MS). A inibição desta enzima eleva a homocisteína plasmática em 40% e também aumenta os níveis de adenosilhomocisteína sulfato (SAH). Particularmente, o SAH é um potente inibidor das DNMTs e já foi demonstrada a sua relação com hipometilação em alguns tecidos (Mason & Choi, 2005). O uso moderado de álcool diminui os níveis séricos de vitamina B12, que é co-fator da MS para remetilação da homocisteína em metionina, o que contribui para manter os níveis de homocisteína altos (de la Vega et al., 2001; Giovannucci, 2004).

A investigação entre o genótipo 677TT da MTHFR e o uso de álcool é interessante, porque as variações no ciclo do folato induzidas pelo álcool e pela baixa atividade da MTHFR podem ter efeitos cumulativos para o risco de câncer de mama. No entanto, Le Marchand (2004) mostrou que o consumo de álcool está associado ao aumento do risco de CM em portadoras do genótipo 677CC, usuárias de terapia de reposição hormonal (TRH). Mulheres saudáveis portadoras do genótipo TT, que consomem quantidades moderadas de álcool e baixo consumo de ácido fólico, apresentam hiperhomocisteinemia (Chiuve et al., 2005, Cravo, 2005).

O consumo adequado de folato deve ter um papel preventivo para o CM em mulheres que consomem álcool (Zintaras, 2006), à semelhança do que foi observado para o CCR. O efeito do genótipo 677TT no risco de CM é mais pronunciado quando essas mulheres apresentam níveis de folato inadequados (Chen et al., 2003).

Diferentemente do álcool, o tabagismo tem um importante papel na carcinogênese mamária, mas não é considerado fator de risco primário. Além dos agentes carcinogênicos na fumaça do cigarro, tem sido demonstrado que o tabagismo eleva os níveis de homocisteína plasmática e diminui os níveis de vitaminas do grupo B, como B6, B12 e folatos, quando comparados aos níveis encontrados nos não-fumantes (Piyathilake et al., 1994, O'Callaghan et al., 2002). Até o momento, não encontramos nenhum trabalho na literatura indexada que explorou o polimorfismo C677T e sua relação com tabagismo e CM.

## **2. OBJETIVOS**

Considerando que o polimorfismo da MTHFR C677T poderia contribuir para o risco de câncer colorretal e de mama, somando-se aos resultados controversos da literatura em demonstrar esta associação, à relevância do assunto e à originalidade do nosso projeto, definimos os seguintes objetivos:

(1) **Geral:** Avaliação do polimorfismo da MTHFR C677T em amostras de câncer colorretal e de mama.

(2) **Específicos:**

### (2.1) Câncer Colorretal

- Estudar a frequência deste polimorfismo nas amostras de tumor primário colorretal esporádico e em pacientes sem câncer (estudo caso-controle);
- Avaliar nas amostras de CCR se há associação entre o polimorfismo C677T e (1) parâmetros clínicos: sexo, idade e estadiamento por Dukes; (2) parâmetros moleculares: instabilidade de microssatélites e hipermetilação da região promotora de genes relacionados ao CCR;
- Excluir a estratificação étnica dos pacientes com CCR através da análise da ancestralidade genômica.

### (2.2) Câncer de Mama

- Estudar a frequência do polimorfismo C677T nas amostras de pacientes com CM esporádico e em pacientes sem câncer (estudo caso-controle);

- Avaliar nas amostras de pacientes com CM se há associação entre o polimorfismo C677T e (1) parâmetros clínicos: idade e *status* hormonal no momento do diagnóstico, estadiamento da doença; (2) hábitos de vida modificáveis: tabagismo e etilismo.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

## **1. AMOSTRAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO**

### **1.1 Amostras de Câncer Colorretal**

Foram utilizados DNAs provenientes de amostras de tumor primário de cólon e tecidos normais (sem processo neoplásico detectado) obtidos de pacientes submetidos a cirurgia (radical ou paliativa) no Hospital do Câncer A.C. Camargo, de São Paulo, gentilmente cedidas pelos doutores Anamaria A. Camargo, José Cláudio C. Rocha, Otávia Caballero, Benedito Mauro Rossi e Ademar Lopes. Este projeto obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da mesma Instituição (ver termo de aprovação em Anexos, 1.1). Foram utilizadas 106 amostras de tumor colorretal. Em alguns casos, foram utilizadas também amostras de tecido normal (n=32), retiradas próximo ao tumor, no órgão afetado do mesmo paciente. Enviou-se esse material para pesquisa no Instituto Ludwig de Pesquisas para o Câncer (São Paulo), onde permaneceu em nitrogênio líquido até o isolamento das amostras de DNA.

Na Tabela 3.1, estão descritos alguns dados clínicos de 98 pacientes dos quais se obtiveram as amostras de tumores colorretais utilizados neste trabalho. Em dezesseis casos (oito deles mostrados na Tab. 3.1), os dados clínicos não estavam disponíveis. Foram coletados, ainda, dados referentes à localização do tumor (proximal ou distal), características histopatológicas, estadiamento por Dukes (ver Anexos, 1.4) e recorrência de 91 pacientes.

## **1.2 Amostras controle para estudo do CCR**

Amostras de DNA de cento e cinquenta indivíduos saudáveis, provenientes da região Sudeste do Brasil, foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética e Bioquímica da UFMG. Foi utilizado um protocolo de extração de DNA proveniente de sangue periférico já padronizado naquele laboratório (Freitas et al., 2002).

## **1.3 Extração de DNA das amostras de CCR**

Os fragmentos (10-30 mg) de tumor foram microdissecados pelo Dr. Fernando A. Soares, para se obter um percentual estimado de aproximadamente 80% de tecido tumoral, e estocados em nitrogênio líquido. Amostras de tecido normal adjacente também foram coletadas e estocadas nas mesmas condições.

Para a extração do DNA, foi utilizado o protocolo modificado de extração de DNA por fenol-clorofórmio (Freitas et al., 2002). Os tecidos foram macerados em nitrogênio líquido até a pulverização. A este pó foram adicionados 4 ml de tampão TE 2:1 (Tris-HCl 2 mM, pH 8.0 e EDTA 1 mM, pH 8.0) contendo RNase A (10 mg/ml). A suspensão foi incubada a 37°C por 1 hora. Foram adicionados 100 ug/ml de proteinase K e SDS a 0,5%. Seguiu-se nova incubação a 37°C por 12 a 16 horas. Foram adicionados 3ml de fenol saturado (Tris-HCl 0.1M, pH7.0), e a solução foi homogeneizada, suavemente, por inversão, durante 10 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 14.000 r.p.m., por 10 minutos, à temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida, e o

**Tabela 3.1 – Dados clínicos (sexo, idade e estadiamento TNM) de 98 dos 106 pacientes portadores de CCR dos quais se obtiveram as amostras de DNA utilizadas neste trabalho.** Estão listados: os códigos das amostras, a presença ou não de tecido normal (sim = preto ou não = branco), sexo (M = Masculino ou F = Feminino) e a classificação do tumor pelo sistema TNM (Tumor, Nódulo e Metástase). Os dados, quando não-disponíveis, estão indicados por (?). (Adaptação da tese de doutorado do Dr. Charles Anacleto)

N	AMOSTRA	Normal	Sexo	Idade	T	N	M
1	COT118	X	F	67	4	1	1
2	COT131	X	?	?	?	?	?
3	COT139		M	33	4	2	0
4	COT141	X	F	53	2	1	0
5	COT148	X	M	64	3	1	0
6	COT150		F	56	3	1	1
7	COT153		M	74	3	0	0
8	COT154	X	M	56	3	0	0
9	COT158	X	F	46	4	0	0
10	COT161		M	50	2	0	0
11	COT162	X	M	81	3	1	0
12	COT163		M	79	3	0	0
13	COT164		F	63	1	0	0
14	COT165		M	74	3	0	0
15	COT166		M	71	3	0	0
16	COT168		M	76	4	0	0
17	COT169	X	F	57	4	0	1
18	COT170		M	60	3	0	1
19	COT174	X	F	48	4	0	0
20	COT175	X	F	75	2	0	0
21	COT176	X	F	70	4	1	0
22	COT177	X	F	76	4	0	0
23	COT178		M	74	3	0	0
24	COT179		F	36	3	0	0
25	COT180	X	F	70	2	0	0
26	COT181		M	69	4	1	0
27	COT182		M	79	3	0	0
28	COT183		M	64	4	0	0
29	COT184		M	62	2	0	0
30	COT185		M	56	2	0	0
31	COT186		F	36	4	2	1
32	COT187		M	61	4	1	0
33	COT188		F	75	3	0	0
34	COT189		M	46	4	0	0
35	COT190		F	71	3	0	0
36	COT191		F	51	3	0	1
37	COT192		M	57	3	1	0
38	COT193		F	47	3	1	0
39	COT194		F	61	4	2	1
40	COT195		F	56	4	2	1
41	COT197		?	?	?	?	?
42	COT201		F	70	?	?	?
43	COT203		M	49	3	0	0
44	COT204		F	69	3	0	0
45	COT206		F	38	2	0	0
46	COT207		F	73	2	0	0
47	COT208		F	51	3	0	1
48	COT210		F	73	3	0	0
49	COT213		F	49	3	0	0
50	COT216		M	54	3	0	1
51	COT217		?	?	?	?	?
52	COT218		M	68	3	2	0
53	COT219		?	?	?	?	?
54	COT54	X	F	66	4	0	0
55	COT66	X	M	56	4	1	1
56	COT68		M	70	4	0	0
57	COT89	X	M	92	2	0	0
58	COT97	X	F	55	3	2	0
59	CT1057		F	74	3	1	0
60	CT1069		F	51	3	0	0
61	CT1077		?	?	?	?	?
62	CT1097		F	61	3	1	1
63	CT1136		M	48	1	0	0
64	CT1141	X	M	59	3	0	1
65	CT1142	X	?	?	?	?	?
66	CT1158		M	74	4	2	1
67	CT1159	X	M	51	3	1	1
68	CT1169	X	F	76	3	0	0
69	CT1179	X	F	85	4	0	0
70	CT1268		?	?	?	?	?
71	CT1271		M	51	4	0	0
72	CT1288		?	?	?	?	?
73	CT1318		F	74	3	0	0
74	CT1368		F	64	3	1	0
75	CT1383		?	?	?	?	?
76	CT1405		F	64	3	0	0
77	CT1406	X	F	84	2	0	0
78	CT1435		F	66	3	1	1
79	CT150	X	?	?	?	?	?
80	CT1515		M	74	3	0	0
81	CT1545		M	70	3	2	0
82	CT1561		M	86	2	0	0
83	CT371	X	M	32	2	0	0
84	CT421	X	F	51	2	0	0
85	CT427	X	M	52	3	0	0
86	CT460		F	34	3	1	0
87	CT479	X	M	81	4	0	0
88	CT524		F	83	2	1	0
89	CT545		F	66	4	2	1
90	CT591	X	?	?	?	?	?
91	CT639	X	?	?	?	?	?
92	CT833		M	64	4	2	1
93	CT843		F	63	4	1	0
94	CT852		F	85	2	0	0
95	CT860		F	66	4	1	0
96	CT862		F	68	3	2	1
97	CT872		F	48	4	1	0
98	CT908		F	68	3	0	0

tratamento com fenol, repetido por duas vezes. Após esse tratamento, foram adicionados à fase aquosa 3 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), seguindo-se 10 minutos de homogeneização, por suave inversão. O DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto, seguindo-se de agitação leve e incubação por 12 a 16 horas a -20°C, e, em seguida, uma centrifugação a 14.000 r.p.m., por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento, lavado duas vezes com etanol 70% e deixado à temperatura ambiente até secar. O DNA foi solubilizado em TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM, pH7.0, EDTA 1mM, pH7.0) e estocado a 4°C para uso posterior. A concentração média de DNA utilizada para a realização da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi de, aproximadamente, 10 a 20 ng/mL.

## **1.4 Amostras de Câncer de Mama**

### **1.4.1 Seleção de casos**

Foi realizada uma revisão nos arquivos do Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG, selecionando-se os casos de pacientes com diagnóstico de câncer de mama, operados no Hospital das Clínicas da UFMG, e com seguimento clínico no Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas/UFMG, entre 2002 e 2004. As pacientes que se enquadraram dentre os critérios de inclusão, e não apresentaram nenhum parâmetro de exclusão, foram selecionadas. Os critérios de inclusão foram: diagnóstico de câncer de mama confirmado por exame anatomo-patológico, apresentar material proveniente do espécime cirúrgico de mama (tumor

primário/tecido normal), fixado em formol e conservado em parafina e ter seguimento clínico no Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas/UFMG.

Cento e oitenta e nove casos foram selecionados, e os prontuários médicos dessas pacientes, arquivados no Setor de Arquivos Médicos do Hospital das Clínicas da UFMG, foram analisados, em busca de informações clínicas.

Os dados clínicos analisados foram: idade no momento do diagnóstico, paridade, tempo de lactação, *status* hormonal (pré-menopausa ou menopausa), índice de massa corporal (IMC), tabagismo, etilismo, estadiamento TNM para CM (tumor/nódulo/metástase, ver Anexos, 1.5), história de recidiva de CM, história familiar e história pregressa para outras doenças. Os dados do tumor incluindo o tipo histológico e pesquisa imuno-histoquímica de receptores de estrógeno e progesterona e a pesquisa para proteína HER-2/neu e p53 foram obtidos dos laudos do exame anátomo-patológico arquivados no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG. Nem todos os prontuários eram informativos para a totalidade dos dados clínicos. Todos os dados foram compilados em uma planilha, para arquivo e análise estatística. Somente alguns dados, como idade no momento do diagnóstico, *status* hormonal, etilismo, tabagismo, e estadiamento da doença, foram estatisticamente analisados. Foi utilizada a fórmula [idade da menopausa ou idade atual – (idade da menarca+número de gestações completas)] para a estimativa média dos anos de exposição ao estrógeno durante a vida reprodutiva. As condições que definiram as pacientes como tabagistas ou etilistas são as seguintes:

- “tabagistas” eram pacientes que fumavam pelo menos um cigarro ao dia (cigarro de tabaco comercial), independentemente do tempo de uso, e as “não-tabagistas” incluíram as mulheres que nunca fumaram até o momento do diagnóstico do CM. No grupo da tabagistas, foi obtido o número de cigarros fumados por dia e o tempo de uso do cigarro em meses.
- “etilistas” eram pacientes que consumiam pelo menos 1 dose (10 gramas de álcool) de qualquer bebida alcoólica com frequência diária ou superior a 3 dias da semana (World Health Organization, Organização Mundial de Saúde, OMS, 2004), as “não-etilistas” incluíram aquelas que nunca consumiram álcool ou consumiam eventualmente (“socialmente”) geralmente no fim de semana, sem apresentar repercursões sistêmicas da bebida. Para as pacientes do grupo “etilistas”, foi calculada a quantidade de álcool consumido por dia, em gramas (para a fórmula, ver Anexos 1.6).

Quarenta e quatro amostras foram excluídas do estudo pela não-obtenção de DNA suficiente para a realização do PCR, resultando 145 casos.

A casuística incluiu ainda 50 pacientes diagnosticadas com câncer de mama em acompanhamento clínico no Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas/UFMG, durante período compreendido entre janeiro e abril/2005. Após concordância espontânea e assinatura do consentimento informado e esclarecido (ver em Anexos, 1.3), as pacientes foram entrevistadas, e seus prontuários foram revisados, para coleta dos dados supracitados. Em seguida, foi coletada amostra de *swab* bucal para extração de DNA e estudo molecular.

Esse estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG como parte do projeto “Oncogenômica e Oncogenética do câncer de mama” (ver em Anexos, 1.2).

#### **1.4.1.1 Extração de DNA das amostras fixadas em formol e incluídas em parafina**

As amostras de tecido para a extração de DNA foram obtidas a partir de blocos de parafina arquivados no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG. A área da amostra foi selecionada, após a revisão por microscopia ótica dos cortes histológicos (corados pelo método hematoxilina-eosina) correspondentes aos blocos, para se evitar a coleta de área de gordura ou necrose. Tanto áreas de tumor primário quanto de tecido normal foram selecionadas para extração de DNA.

Para a extração de DNA de tecidos fixados em formol e emblocados em parafina, foi utilizado o método descrito por Coombs et al. (1999), com algumas modificações, as quais se descrevem a seguir. Inicialmente, alguns testes foram realizados utilizando esse protocolo, visando observar se haveria diferença na obtenção do DNA das amostras obtidas por microtomia (cortes de 20  $\mu$ M), e acondicionadas em lâminas, e as amostras retiradas em pequena quantidade (aproximadamente uma fatia de 0,5 x 0,5 cm) de forma manual, diretamente dos blocos de parafina com lâmina de bisturi estéril. Como não houve diferença entre as duas estratégias, optou-se pela retirada do tecido emblocado utilizando-se a lâmina bisturi estéril e individual para cada amostra.

Cuidadosamente, o excesso de parafina foi retirado de forma a preservar somente o tumor primário e/ou tecido normal.

Cada amostra foi acondicionada em tubos estéreis de 1,5 ml e em que se adicionaram 100  $\mu$ L de *Tween-20* a 0,5%, os quais foram agitados levemente, e deixados por 10 minutos, a 90°C, no termociclador (PTC-100, MJ Research Inc., Watertown, MS, EUA). Em seguida, foram resfriados a 55°C, retirados do termociclador e mantidos na mesma temperatura, em banho-maria, por 20 minutos. Durante esse período, as amostras eram maceradas de 5 em 5 minutos, com o auxílio de uma ponteira estéril, e posteriormente, homogeneizadas. A seguir, foram adicionados a essa solução 2  $\mu$ l de proteinase K (10mg/ml – concentração final 200 $\mu$ g/ml), e a digestão foi mantida por um período de tempo total de 3 horas, a 55°C, com agitação das amostras de hora em hora. Após 2 horas de digestão, foi adicionado mais 1  $\mu$ l de proteinase K (10mg/ml). As amostras foram retiradas do banho-maria e, imediatamente, adicionou-se 100  $\mu$ l de Chelex 100 (Biorad) a 5% TRIS EDTA pH 9,0. Essa solução era mantida em agitação constante, para homogeneizar os grânulos da resina na solução antes desta ser pipetada. Os tubos foram agitados levemente e transferidos para o termociclador, onde se mantiveram a 99°C, por 10 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas em temperatura ambiente a 14.000 r.p.m., por 15 minutos, e imediatamente colocadas no gelo, por 20 minutos. A parafina solidificada era afastada, e a amostra era transferida para tubos novos e centrifugada a 14.000 r.p.m., por 5 minutos. Posteriormente, foi aquecida em banho-maria a 45°C, por 10 minutos, e adicionados 100  $\mu$ l de clorofórmio. Após leve agitação e centrifugação sob as mesmas condições, o sobrenadante foi removido e estocado a 4°C. A

quantidade de DNA das amostras foi estimada utilizando-se gel de agarose a 1% comparando-se com o padrão de dosagem de DNA gênomico de esperma de salmão. A média da quantidade de DNA obtida por esse método foi entre 80 a 100ng/ $\mu$ l por amostra. Dentre 189 amostras extraídas, obtivemos quantidade suficiente para realização da PCR em 145 amostras (77%), sendo que as 44 amostras remanescentes foram excluídas do estudo. Todas as amostras foram diluídas em água bidestilada estéril para a concentração média de 10ng/ $\mu$ L, para a realização da PCR.

#### **1.4.1.2 Extração de DNA das amostras provenientes de células da mucosa bucal (*swab* bucal)**

As células da mucosa bucal foram colhidas com o auxílio de uma pequenina escova do tipo *cytobrush*, rodando-se a escova de encontro com a mucosa bucal da bochecha, por 30 segundos. Posteriormente, a escova era levemente agitada em uma solução de etanol 90%, com o objetivo de desprender as células. A seguir, os tubos eram identificados e mantidos a 4°C. A extração de DNA era realizada em até três dias após a coleta, utilizando-se o protocolo descrito por Miller et al (1988), com as modificações expressas a seguir:

Os tubos com as amostras eram centrifugados em temperatura ambiente por 5 minutos, a 14.000 r.p.m.. Após desprezar o sobrenadante, foram adicionados 200  $\mu$ l de solução High TE (Tris-HCl 100mM pH 8, EDTA 40mM), agitados com auxílio de um agitador tipo *vortex*, e em seguida adicionados 270  $\mu$ l de solução de Madisen (Tris-HCl 100mM pH 8, EDTA 40mM, NaCl 1M, SDS

0,2%) pré-aquecida a 55°C e 10 µl de proteinase K (20mg/ml). Após incubação em banho-maria a 55°C, por 1 hora, foram adicionados às amostras 120 µl de NaCl 6M, as quais foram acondicionadas no gelo, por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados sob refrigeração (4°C) a 14.000 r.p.m., por 20 minutos. O sobrenadante era aspirado com auxílio de uma pipeta e colocado em novos tubos. Em seguida, adicionou-se, ao sobrenadante, 600 µl de isopropanol 90% gelado e 5 µl de LPA a 0,25%, para precipitação do DNA. Essa solução era delicadamente invertida, e centrifugada sob as mesmas condições anteriores, por 10 minutos. O *pellet* (precipitado) era lavado com 250 µl de etanol 80%, e novamente centrifugado por 5 minutos. Após desprezar o sobrenadante, o *pellet* remanescente foi ressuspendido em 100 µl de água deionizada estéril e armazenado em refrigeração a 4°C. O DNA foi dosado sob as mesmas condições descritas anteriormente (ver item 1.4.1.1), com obtenção média da concentração de DNA de 100ng/µl. Em todas as 50 amostras (100%), obtivemos DNA suficiente para o estudo molecular. As amostras foram diluídas com água deionizada estéril, para a concentração aproximada de 10ng/µL para realização do estudo molecular.

#### **1.4.2 Seleção de amostras controle**

Amostras de DNA de sangue periférico de 150 mulheres e homens adultos e sem história pregressa ou atual de neoplasias, foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética e Bioquímica (ICB/UFMG). Foi utilizado um protocolo de extração já padronizado naquele laboratório (Freitas et al., 2002).

## **2. GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO DA MTHFR POR PCR-RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição – Reação em Cadeia da Polimerase)**

O DNA eluído das amostras de CCR e CM, foi amplificado pela PCR com iniciadores específicos e submetidos à digestão pela enzima de restrição Hinf I, conforme protocolo descrito previamente (Frosst et al.1995), com as modificações descritas a seguir:

### **2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Em uma reação com o total de 12 µl contendo aproximadamente 10 a 30ng de DNA, 1,3µl de tampão 10X PCR (10mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>), 200 µM dNTP, 2µl (10 µM) de cada iniciador (*Foward*: 5' – TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA – 3'; *Reverse*: 5' – AGG ACG CTG CGG TGA GAG TG -3') e 0,13 unidades de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen) foram amplificados em termociclador (PTC-100, MJ Research Inc., Watertown, MS, EUA), sob as seguintes condições: desnaturação a 95°C, por 4 minutos, seguidos de 40 ciclos, sendo: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C. Imediatamente ao fim dos ciclos, seguiu-se uma extensão final a 72°C, por 5 minutos. O fragmento de DNA amplificado (198 pb) foi analisado por meio de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 6%, em tampão TBE 1X, 8V/cm, e corado pela prata (Santos et al., 1993).

## **2.2 Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) para Hinf I**

Oito microlitros do produto de PCR foram digeridos com 0,6 unidades de Hinf I (Promega Corporation Madison, WI), em 15 $\mu$ l volume final de reação (1,3  $\mu$ l de tampão Promega e 5,1 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O) a 37°C, por 24 horas, seguido de inativação enzimática a 65°C, por 20 minutos. Aproximadamente, 4 $\mu$ l de cada produto de digestão foram utilizados na eletroforese em gel de poliacrilamida 6% visualizado pela prata, sob as mesmas condições anteriormente descritas. Essa técnica utiliza-se da estratégia de que a presença do alelo T cria um sítio de restrição para a enzima Hinf I. O homocigoto para o alelo C, heterocigoto e homocigoto para o alelo T produzem, respectivamente, fragmentos de 198 pb; 198, 175 e 23 pb; e 175 e 23 pb.

Em todos os experimentos, foram adicionadas três amostras de DNA controle para cada genótipo (genótipo previamente conhecido para homocigoto para alelo C, heterocigoto, e homocigoto para o alelo T) para comparação dos resultados. Em uma amostra foi utilizada água deionizada estéril ao invés do DNA, para verificar se houve contaminação do experimento (controle branco). A leitura dos resultados de genotipagem foi realizada também por outro pesquisador, para garantir a qualidade dos genótipos.

### **3. ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO E INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES NAS AMOSTRAS DE CÂNCER COLORRETAL**

O estudo do polimorfismo da MTHFR nas amostras de câncer colorretal compreende a continuação de uma linha de pesquisa do Laboratório de Genética e Bioquímica do ICB/UFMG, conduzida anteriormente pelos alunos de Doutorado Andréia Machado Leopoldino e Charles Anacleto, os quais foram responsáveis pela análise da instabilidade de microssatélites (BAT-26 e Sistema de Bethesda – A.L.F. 10) e pela análise do padrão de metilação do promotor dos genes  $p16^{INK4a}$ ,  $p14^{ARF}$ , hMLH-1, MGMT, e DAPK, respectivamente. Para maiores detalhes sobre os microssatélites, os iniciadores e as técnicas que foram utilizados, ver Anacleto et al. (2005 a).

### **4. ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE GENÔMICA EM AMOSTRAS DE CÂNCER COLORRETAL**

As 106 amostras de CCR foram submetidas à análise de ancestralidade genômica biogeográfica. Individualmente, cada amostra foi genotipada utilizando-se 40 locos polimórficos bialélicos de inserção-deleção (indels). Para amplificação do fragmento por PCR, foram utilizados quatro sistemas de reações em multiplex, cada um contendo de 10 a 12 pares de iniciadores, conforme descrito por Bastos-Rodrigues et al (2006). Os fragmentos (*amplicons*) foram mensurados utilizando-se o seqüenciador de DNA *Megabace 1000* (Amersham), e analisados, utilizando-se os programas *Genetic*

*Profiler*<sup>®</sup> (versão 2.2) (ver Figura 4.3 em Resultados) e *Fragment Profiler*<sup>®</sup> (versão 1.2, Amersham).

#### 4.1 Segregação genômica

Foi utilizado o programa *Structure*<sup>®</sup> (versão 2.1) com o objetivo de alocar cada paciente nas populações com ancestralidade ameríndia, européia ou africana. Esse programa utiliza como base a frequência alélica de cada loco analisado em cada paciente, e os agrupa comparando com a frequência alélica dos indivíduos que pertencem aos grupos ancestrais (ameríndios, europeus e africanos). Os indivíduos representantes dos grupos ancestrais (n=225) tinham informações *a priori* de sua população de origem e da frequência alélica para cada loco. O programa CLUMP<sup>®</sup> foi utilizado para investigar as diferenças na frequência alélica dos indels entre as amostras de CCR com instabilidade de microssatélites e sem instabilidade de microssatélites.

### 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados conforme se explica a seguir:

- O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi testado por meio do método exato de Guo e Thompson (1992).
- Para a comparação entre as frequências dos polimorfismos da MTHFR C677T do grupo controle e as variáveis clínicas e

moleculares das amostras CCR e CM, foi utilizado o programa Epi Info<sup>®</sup> (versão 6.0). Os testes utilizados foram o teste exato de Fisher ou o teste qui quadrado ( $\chi^2$ ).

- O programa CLUMP<sup>®</sup>, utilizado em estudos genéticos do tipo caso-controle, foi empregado para investigar: (1) as diferenças na frequência alélica dos indels entre as amostras de CCR com instabilidade de microsatélites e sem instabilidade de microsatélites; (2) a associação entre o estadiamento das pacientes com CM e o genótipo 677TT.
- A análise por regressão logística, nas amostras de CM, foi realizada utilizando-se a página de análises estatísticas *online* da Universidade de Vassar, acesso em:  
<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>.
- O nível de significância adotado inicialmente para todas as análises foi de  $p < 0,05$ . A correção por Bonferroni foi realizada para ajustamento de múltiplas comparações.

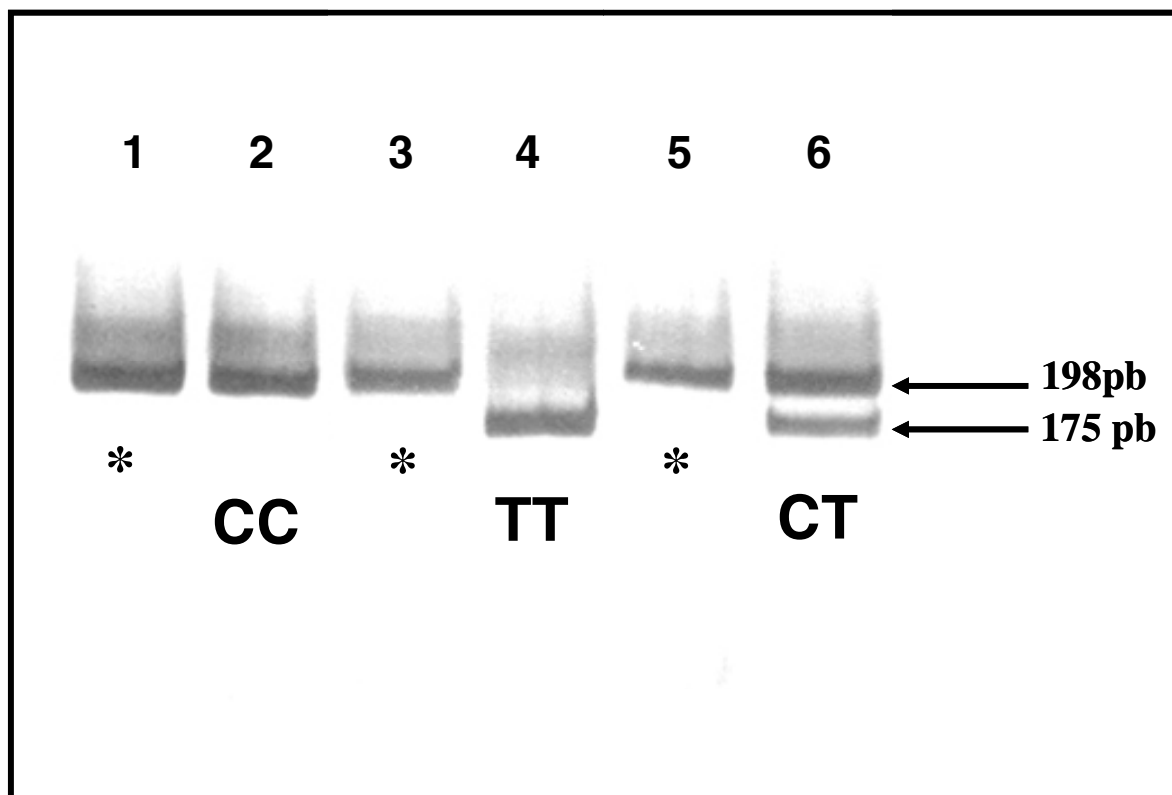
## **4. RESULTADOS**

## 1. ESTUDO DO CÂNCER COLORRETAL

A genotipagem do polimorfismo C677T foi realizada para cada uma das 106 amostras de CCR (casos), em 32 amostras de tecido normal retirado do cólon adjacente à lesão e em 150 pacientes sem câncer (controle), utilizando-se a técnica PCR-RFLP (Frosst et al., 1995). Os genótipos da MTHFR C677T foram idênticos entre as amostras de tecido tumoral e não-tumoral provenientes do mesmo paciente. A Figura 4.1 mostra um gel de poliacrilamida 6% corado pela prata, mostrando o fragmento de DNA (198 pb) antes e após RFLP, para cada genótipo da MTHFR.

Os resultados da genotipagem para o estudo dos CCR e CM foram segregados em dois grupos 677CC+CT e 677TT, pelos seguintes motivos: (1) O genótipo CC+CT está associado a uma atividade enzimática eficiente da MTHFR, contrastando com a atividade dos portadores do genótipo TT; (2) Diminuir o grau de liberdade e aumentar o poder do teste estatístico.

A Tabela 4.1 mostra pequena diferença entre a frequência do genótipo TT no grupo de pacientes com câncer (14%) e de pacientes sem câncer (9%), mas não revelou nenhuma diferença estatística ( $p=0,17$ ). Em todas as amostras, a distribuição do polimorfismo C677T encontrou-se sob equilíbrio de Hardy-Weinberg.



**Figura 4.1:** Gel de poliacrilamida corado pela prata com os genótipos da MTHFR. As canaletas do gel estão numeradas em ordem crescente. As bandas marcadas em asterisco (\*) representam as amostras amplificadas pela técnica de PCR antes do RFLP. As bandas ao lado direito de cada banda asterisco (\*) representam as mesmas amostras após digestão pela enzima *HinfI*. CC= homocigoto para o alelo C; CT= heterocigoto; TT= homocigoto para o alelo T. As setas indicam o peso molecular, em pares de base, de cada banda. A banda correspondendo a 23 pb não está representada neste gel.

**Tabela 4.1:** Freqüência do genótipo do polimorfismo da MTHFR C677T em pacientes com e sem câncer colorretal.

	CC+CT(%)	TT(%)	OR	CI	valor p
Controles	137 (91)	13 (9)			
Casos	91 (86)	15 (14)	1.74	0,47-4,1	0,17 <sup>#</sup>

OR = *Odds Ratio*; CI = 95% de intervalo de confiança para *Odds Ratio*.  
*Odds Ratio*= razão da probabilidade de ocorrência.

<sup>#</sup> valor de  $p$  para qui quadrado ( $\chi^2$ )

Estatisticamente significativo se  $p < 0,05$

As características clínico-patológicas de 91 pacientes com CCR foram obtidas, incluindo idade e sexo do paciente, localização do tumor (proximal ou distal) e características histopatológicas (ambos não avaliados neste estudo), estadiamento por Dukes (ver Anexos, 1.4) e recorrência.

Algumas informações clínico-patológicas e os dados dos grupos 677CC+CT e 677TT estão mostrados na Tabela 4.2. Não foi observada diferença entre os sexos e a frequência do genótipo TT ( $p=0,82$ ). Com relação à idade, observa-se uma tendência do aumento da frequência do genótipo TT (19%) em pacientes com idade superior ou igual a 70 anos em comparação ao outro grupo (9%). Nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre idade e genótipo 677TT ( $p=0,2$ ).

A frequência dos genótipos 677CC+CT e TT foi semelhante entre os estadiamentos de Dukes A, B ou C ( $p=0,1$ ), não havendo correlação linear entre os genótipos da MTHFR (CC, CT e TT) e o maior estadiamento da doença (Tabela 4.2). Além disso, não encontramos nenhuma associação entre os grupos 677CC+CT/677TT e os pacientes que apresentaram recorrência até 3 anos do diagnóstico (dado não-mostrado).

**Tabela 4.2:** A relação entre o polimorfismo da MTHFR C677T e o sexo, a idade e o estadiamento por Dukes dos pacientes com câncer colorretal.

	CC+CT(%)	TT(%)	OR	CI	valor p
Homens (n=41)	36 (88)	5 (12)	1,17	0,30-4,72	0,8 <sup>#</sup>
Mulheres (n=50)	43 (86)	7 (14)			
Idade >70 (n=36)	29 (81)	7 (19)	2,41	0,61-9,82	0,2*
Idade < 70 (n=55)	50 (91)	5 (9)			
Dukes A (n=15)	13 (87)	2 (13)	1,00	0,18-10,10	0,99*
Dukes B (n=38)	32 (84)	6 (16)	1,22		
Dukes C (n=37)	32 (86)	5 (14)	1,02		

OR = *Odds Ratio*; CI = 95% de intervalo de confiança para *Odds Ratio*.  
*Odds Ratio*= razão da probabilidade de ocorrência.

<sup>#</sup> valor de *p* para qui quadrado ( $\chi^2$ )

\* valor de *p* para Teste Exato de Fisher

Estatisticamente significativo se  $p < 0,05$

Investigou-se a associação entre o polimorfismo da MTHFR e hipermetilação da região promotora de 5 genes associados ao CCR (*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16<sup>INK4a</sup>* e *p14<sup>ARF</sup>*) nas 106 amostras. A frequência dos polimorfismos 677CC+CT e 677TT para cada loco hipermetilado individual ou com presença de locos de hipermetilação simultâneos está sumarizada na Tabela 4.3. Nenhuma diferença estatística foi encontrada nessas análises.

Quatorze de 106 tumores CCR (13,3%) exibiram instabilidade de microsatélite (MSI+), sendo que 11 amostras exibiram MSI de alto grau (mais de três marcadores instáveis) (ver Figura 4.2). Cinquenta por cento dos pacientes com MSI+ apresentaram o genótipo TT (7/14), em contraste com apenas 9% do grupo sem instabilidade de microsatélites (MSI-; Tabela 4.4). Esta diferença foi altamente significativa ( $p=0,00057$ ), indicando uma forte associação entre os tumores MSI+ e o genótipo TT (*odds ratio*: 10,4; intervalo de confiança: 2,5-45,4).

Com o objetivo de esclarecer se essa associação ocorreu por mera estratificação étnica dos indivíduos com CCR, esses foram individualmente genotipados utilizando-se 40 locos polimórficos bialélicos de inserção-deleção (indels) (Figuras 4.3 A, B, C e D). Para o grupo MSI+, as proporções de indivíduos europeus, africanos e ameríndios foram, respectivamente, 0,851, 0,0935 e 0,055 e para o grupo MSI- foram 0,868, 0,115 e 0,017, respectivamente. As diferenças entre as proporções de ancestralidade genômica entre esses dois grupos não foram significativas (Figura 4.4).

**Tabela 4.3:** Os polimorfismos da MTHFR C677T e metilação do DNA de cinco genes associados ao CCR (*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16<sup>INK4a</sup>* e *p14<sup>ARF</sup>*).

	CC+CT	TT	OR	CI	valor p
Sem metil.	41	8	1		
<i>HMLH</i> metil.	15	4	1,37	0,29-6,12	0,72*
<i>DAPK</i> metil.	20	1	0,26	0,01-2,30	0,26*
<i>p16<sup>INK4a</sup></i> metil.	14	3	1,10	0,20-5,57	1*
<i>p14<sup>ARF</sup></i> metil.	10	4	2,05	0,41-9,87	0,43*
<i>MGMT</i> metil.	25	5	1,02	0,26-4,00	1*
>3 locos metil. (10)	7	3	2,20	0,36-12,84	0,37*
>2 locos metil. (26)	21	5	1,22	0,30-4,85	0,75*
>1 loco metil. (57)	50	7	0,72	0,72-2,42	0,55 <sup>#</sup>

metil.= metilado; OR = *Odds Ratio*; CI = 95% de intervalo de confiança para *Odds Ratio*.

*Odds Ratio*= razão da probabilidade de ocorrência.

<sup>#</sup> valor de  $p$  para qui quadrado ( $\chi^2$ )

\* valor de  $p$  para Teste Exato de Fisher

Estatisticamente significativo se  $p < 0,05$ .

EI	M.S./G.N.T.	TC852	COT187	COT131	COT174	COT176	COT162	TC524	TC1057	COT190	COT177	TC1318	TC843	COT161	TC860
poli A	BAT26														
(TAGA) <sup>8</sup>	D16S2622														
(AAGG) <sup>10</sup>	D1S1612														
(AAT) <sup>12</sup>	D2S1353														
(GATA) <sup>11</sup>	D22S685														
(GATA) <sup>13</sup>	D11S1392														
(GATA) <sup>12</sup>	D3S2398														
(GRTA) <sup>10</sup>	D5S2501														
(GATA) <sup>10</sup>	D15S657														
	677 TT														
	677 CT														
	677 CC														

**Figura 4.2:** Amostras de tumor colorretal microsatélite instáveis e o genótipo do polimorfismo da MTIFH. E.I. = estrutura interna (número de repetições dos microsatélites); M.S. = nome do loco. G.N.T.= genótipo da MTIHR C677T. Os positivos e negativos estão marcados em preto e branco, respectivamente. Os genótipos do polimorfismo 677 da MTIFH estão marcados em cinza.

**Tabela 4.4:** Associação entre o polimorfismo da MTHFR C677T e instabilidade de microssatélite nas amostras de CCR.

	CC + CT(%)	TT (%)	OR	CI	valor p
MSI- (91)	83 (91)	8 (9)			
MSI+ (14)	7 (50)	7 (50)	10,4	2,5-45,4	0,00057*

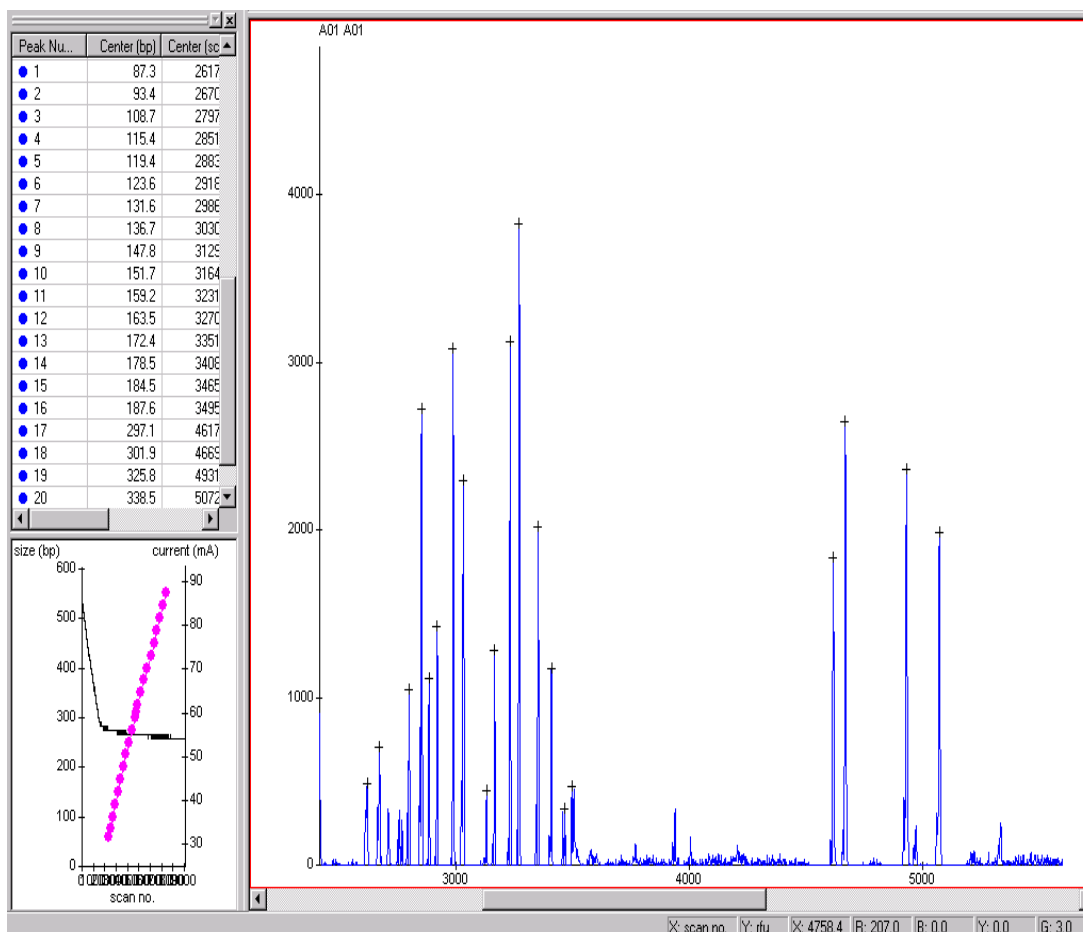
OR = *Odds Ratio*; CI = 95% de intervalo de confiança para *Odds Ratio*.  
*Odds Ratio*= razão da probabilidade de ocorrência.

MSI-= ausência de instabilidade de microssatélites  
 MSI+= presença de instabilidade de microssatélites

\* valor de  $p$  para Teste Exato de Fisher

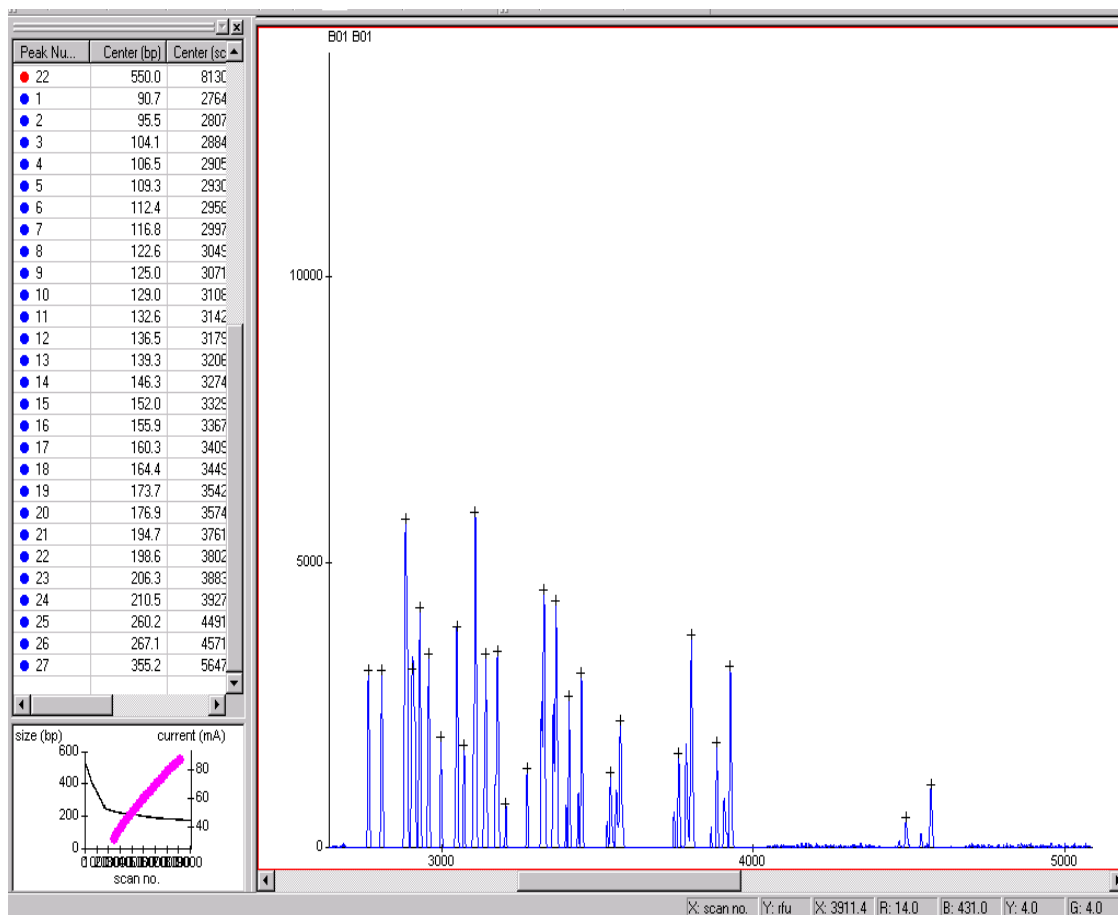
Estatisticamente significativo se  $p < 0,05$ .

A



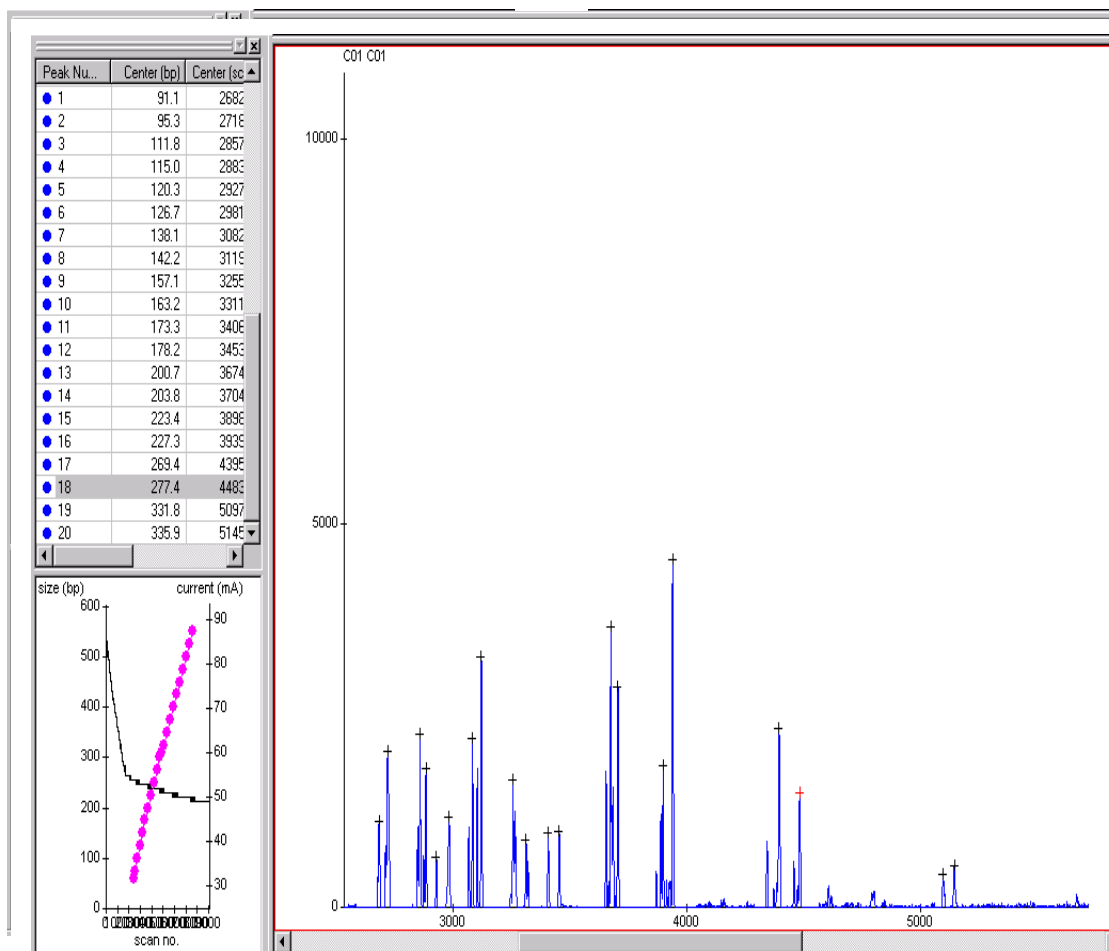
**Figura 4.3 A:** Análise dos tamanhos dos fragmentos dos locos de inserção-deleção (indels) em uma amostra de CCR, utilizando o programa Fragment Profiler (versão 2.2). A= análise de 10 locos.

B



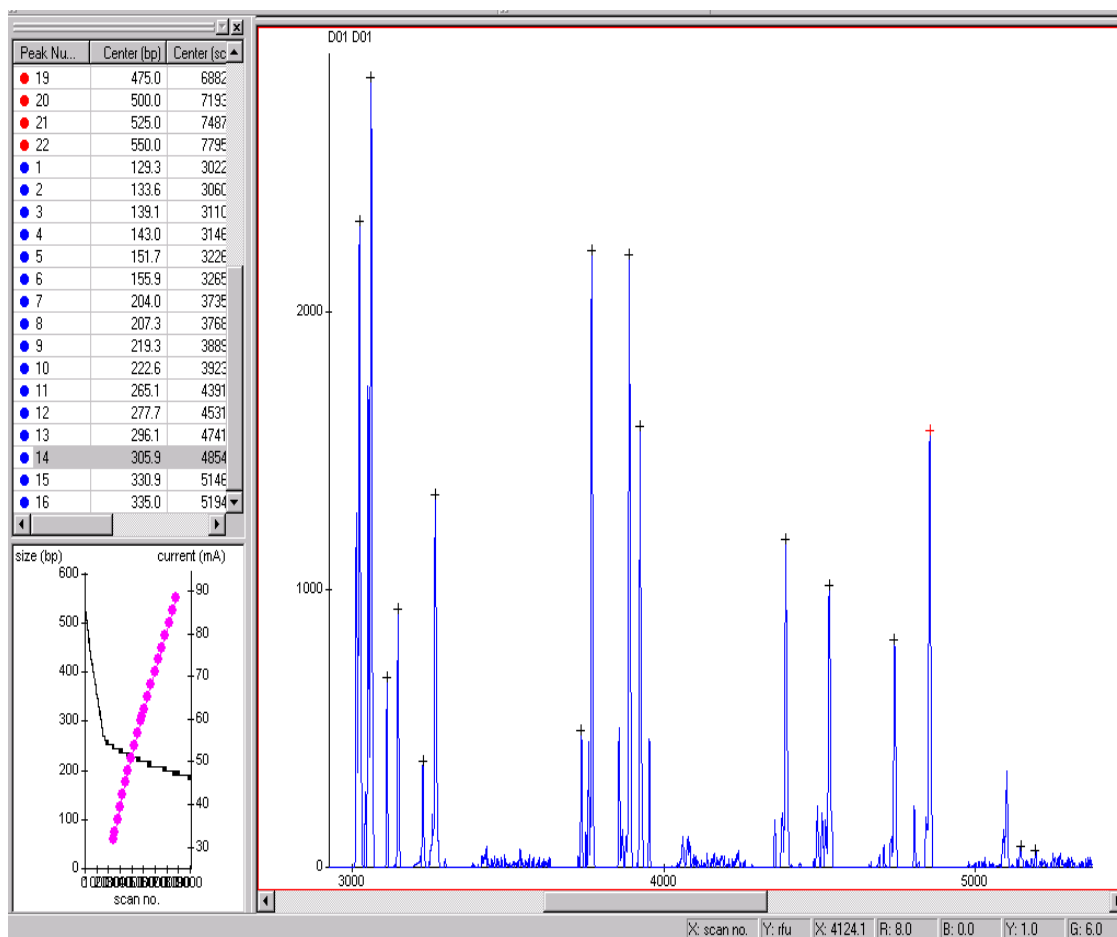
**Figura 4.3 B:** Análise dos tamanhos dos fragmentos dos locos de inserção-deleção (indels) em uma amostra de CCR, utilizando o programa Fragment Profiler (versão2.2). B= análise de 12 locos.

C

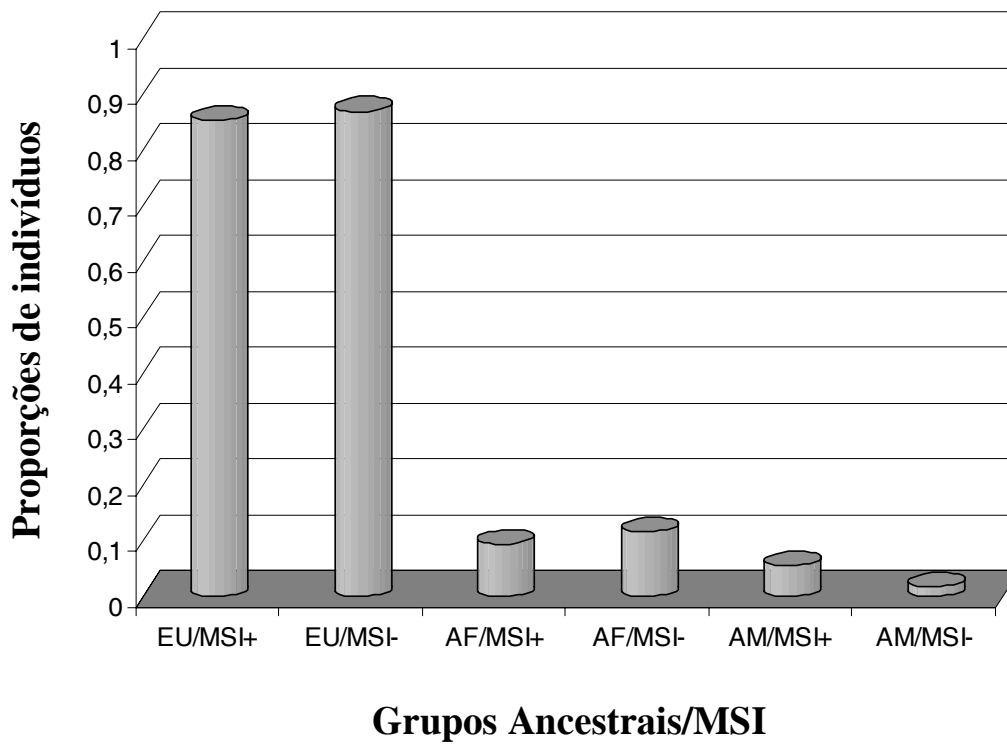


**Figura 4.3 C:** Análise dos tamanhos dos fragmentos dos locos de inserção-deleção (indels) em uma amostra de CCR, utilizando o programa Fragment Profiler (versão 2.2). C= análise de 10 locos.

D



**Figura 4.3 D:** Análise dos tamanhos dos fragmentos dos locos de inserção-deleção (indels) em uma amostra de CCR, utilizando o programa Fragment Profiler (versão 2.2). D= análise de 8 locos.



**Figura 4.4:** Proporções de indivíduos europeus (EU), africanos (AF), ameríndios (AM) e a presença (MSI+) ou ausência (MSI-) de Instabilidade de Microsatélites (MSI).

## 2. ESTUDO DO CÂNCER DE MAMA

A genotipagem da MTHFR C677T foi obtida com sucesso em todas 145 amostras de tecido conservado em parafina e nas 50 amostras de *swab* bucal.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos 677 CC+CT e TT entre os grupos caso e controle ( $p=0,61$ ), demonstrando ausência de associação entre o polimorfismo C677T e o risco de câncer de mama (Tabela 4.5). A distribuição do polimorfismo C677T encontrou-se sob equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as amostras.

A idade das pacientes com CM no momento do diagnóstico variou de 29 a 94 anos (mediana=53 anos; ver Figura 4.4). A mediana para a idade da ocorrência da menarca e menopausa foi 12,9 e 48,7 anos, respectivamente. Para cada paciente, foi estimada a exposição aos hormônios sexuais femininos durante a vida reprodutiva. A estimativa média de anos de exposição ao estrogênio, durante a vida reprodutiva, das mulheres com CM foi de 22 anos (dado ausente na Tabela). Com relação à paridade, 20% das pacientes eram nulíparas, e as demais tiveram, pelo menos, um filho. Aproximadamente um terço (33%) de todas as pacientes tiveram, pelo menos, um episódio de aborto.

Com relação aos tipos histológicos das amostras de CM deste estudo, a maioria era do tipo histológico ductal invasor (77%). O restante das amostras era do tipo ductal *in situ*, lobular invasor e *in situ* (considerado hoje “neoplasia”) e medular.

As pacientes com CM foram separadas em dois grupos: pré- e pós-menopausa para o estudo da associação entre o *status* hormonal e o polimorfismo

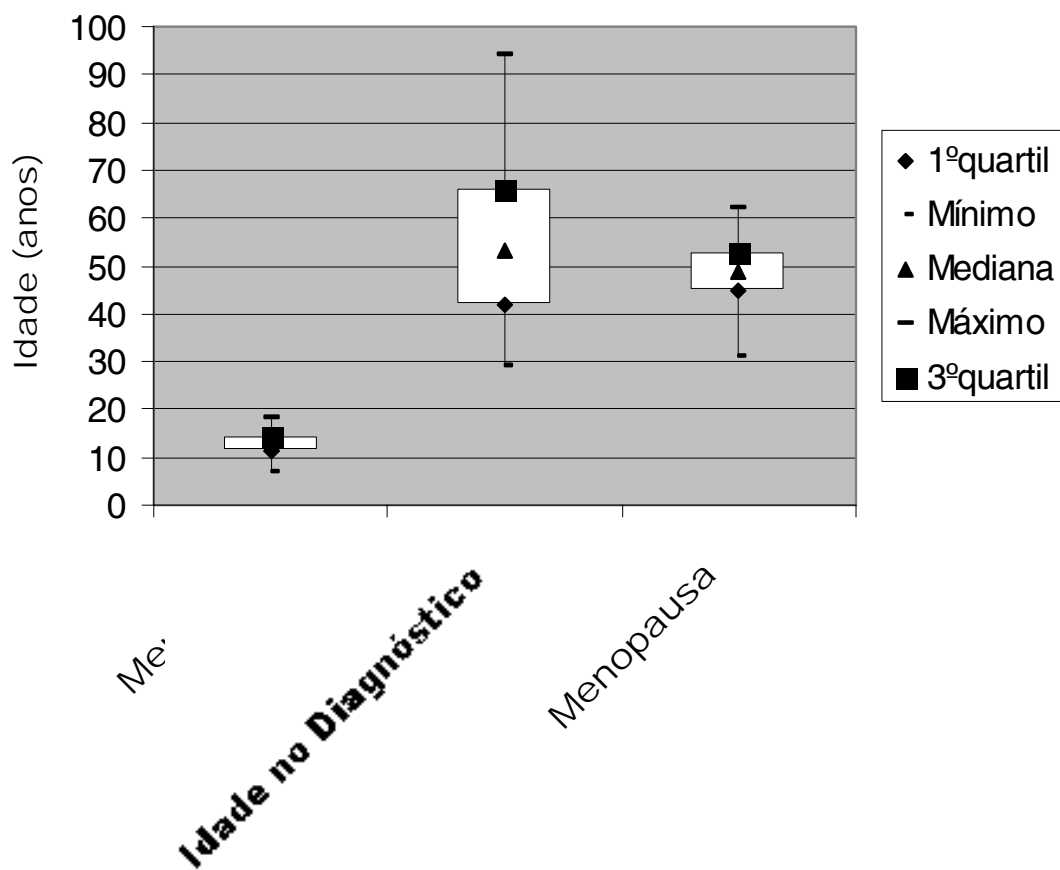
**Tabela 4.5:** Frequência do genótipo do polimorfismo da MTHFR C677T em pacientes com e sem câncer de mama.

	CC+CT(%)	TT(%)	OR	CI	valor p
Controles	137 (91)	13 (9)			
Casos	181 (93)	14 (7)	1,26	0,35-1,91	0,61 <sup>#</sup>

OR = *Odds Ratio*; CI = 95% de intervalo de confiança para *Odds Ratio*.  
*Odds Ratio*= razão da probabilidade de ocorrência.

<sup>#</sup> valor de  $p$  para qui quadrado ( $\chi^2$ ).

Estatisticamente significativo se  $p \leq 0,0125$  (correção de Bonferroni para múltiplas comparações)



**Figura 4.4:** Representação gráfica da idade (em anos) da ocorrência da menarca, da idade das mulheres no momento do diagnóstico de CM e da idade da ocorrência da menopausa. O gráfico mostra a mediana da idade para a ocorrência desses eventos.

da MTHFR C677T. As mulheres que apresentavam ciclos menstruais, e aquelas que não menstruavam há mais de um ano, foram alocadas no grupo “pré-menopausa” e “pós-menopausa”, respectivamente. Nenhuma paciente do grupo pós-menopausa estava recebendo terapia de reposição hormonal. Houve um equilíbrio entre o número de mulheres com CM na pré- ou pós-menopausa (Tabela 4.6). Observa-se, ainda, uma distribuição homogênea entre as pacientes destes grupos e os genótipos CC+CT e TT. Não foi observada nenhuma associação estatística entre o polimorfismo 677 TT e o *status* hormonal ( $p=0,94$ ).

As pacientes foram segregadas arbitrariamente em dois subgrupos etários, maior de 70 anos ( $> 70$  anos) e menor que 70 anos ( $< 70$  anos), uma vez que o polimorfismo 677 TT e a idade avançada são condições que podem estar associados ao CM (Tabela 4.6). A distribuição da frequência dos polimorfismos CC+CT e TT foi semelhante entre os dois grupos. Não houve diferença estatística significativa entre o polimorfismo 677 TT e a idade avançada ( $p=0,72$ ).

O consumo de cigarro e álcool foi investigado, dentre os hábitos de vida das mulheres com CM. A média de cigarros fumados, por dia, pelas pacientes tabagistas foi de  $16 \pm 10$ , e a média dos anos de tabagismo foi de  $21 \pm 14$ . Com relação ao consumo de álcool, a média de consumo de álcool em gramas, por dia, foi de  $26,5 \pm 14,5$ . A maioria das pacientes etilistas (21/26; 81%) consumia bebidas alcoólicas com frequência diária. O consumo médio de álcool pelas pacientes portadoras do genótipo 677TT foi de 24g/dia. A Tabela 4.7 mostra a frequência das pacientes com CM nos grupos 677 CC+CT e TT, de acordo com o consumo, ou não, de cigarro ou álcool.

**Tabela 4.6:** Relação entre mulheres com câncer de mama na pré- e pós-menopausa, idade superior e inferior a 70 anos e o polimorfismo C677T da MTHFR.

	CC+CT(%)	TT(%)	OR	CI	valor p
Pré-Menopausa	81 (49)	7 (50)			
Pós-Menopausa	84 (51)	7 (50)	0,96	0,29-3,23	0,94 <sup>#</sup>
<70 anos	145 (93)	11 (7)			
>70 anos	31 (91)	3 (9)	1,28	0,26-5,37	0,72 <sup>#</sup>

OR = *Odds Ratio*; CI = 95% de intervalo de confiança para *Odds Ratio*.  
*Odds Ratio*= razão da probabilidade de ocorrência.

<sup>#</sup> valor de  $p$  para Teste Exato de Fisher

Estatisticamente significativo se  $p \leq 0,0125$  (correção de Bonferroni para múltiplas comparações).

**Tabela 4.7:** Relação entre o consumo de álcool e o tabagismo em mulheres com câncer de mama e o polimorfismo C677T.

	CC+CT(%)	TT(%)	OR	CI	valor p
Tabagismo					
Sim	35 (85)	6 (15)			
Não	136 (95)	7 (5)	0,3	0,08-1,09	0,043 <sup>#</sup>
Etilismo					
Sim	20 (77)	6 (23)			
Não	132 (95)	7 (5)	0,18	0,05-0,67	0,007 <sup>#*</sup>

OR = *Odds Ratio*; CI = 95% de intervalo de confiança para *Odds Ratio*.  
*Odds Ratio*= razão da probabilidade de ocorrência.

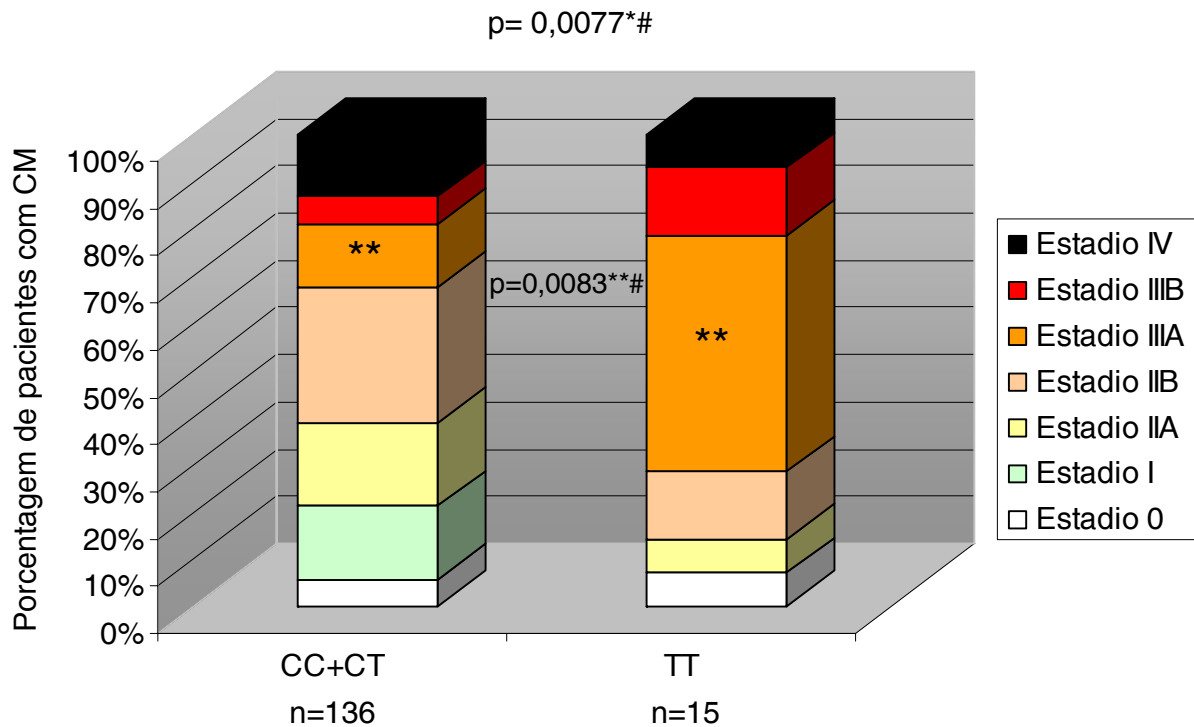
<sup>#</sup> valor de *p* para Teste Exato de Fisher

\* estatisticamente significativo se  $p \leq 0,0125$  (correção de Bonferroni para análise de múltiplas variáveis)

Apesar de os dados mostrarem um número três vezes maior na frequência do genótipo TT nas tabagistas (15%) em comparação às não-tabagistas (5%), essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0.043$ ; valor de  $p$  após correção de Bonferroni para múltiplas comparações,  $p>0,0125$ ). As pacientes etilistas portadoras de CM apresentaram um expressivo aumento da frequência do genótipo TT, 4,6 vezes maior do que a frequência encontrada nas pacientes etilistas do grupo CC+CT. Esses resultados indicam uma forte associação entre pacientes com CM que consomem álcool e o polimorfismo 677 TT ( $p=0,007$ ).

A análise da associação entre estadiamento do câncer de mama (ver em Anexos, 1.5) e os grupos 677 CC+CT e TT foi estatisticamente significativa (qui quadrado= 17,8;  $p=0,0077$ ; Figura 4.5). Metade das pacientes do grupo CC+CT encontravam-se no estadiamento II, no momento do diagnóstico (Figura 4.5). A maioria das pacientes (65%) portadoras do genótipo TT encontrava-se no estadiamento III, com maior proporção de pacientes no estadiamento IIIA em relação ao estadiamento IIIB. Observou-se uma diferença importante entre as frequências observadas no estadiamento IIIA para os genótipos CC+CT (12%) e TT (47%) (Figura 4.5). Essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,0083$ ), sugerindo associação entre estadiamento IIIA e genótipo 677TT (Tabela 4.8). Dentre as pacientes diagnosticadas no estadiamento IIIA e portadoras de genótipo TT, apenas duas eram alcoolistas.

Investigou-se se haveria associação entre o uso de cigarro e álcool, pelas pacientes com CM, e o estadiamento da doença. Através da análise dos dados por regressão logística, não se observou correlação entre etilismo ou tabagismo com a severidade da doença (Figura 4.6).

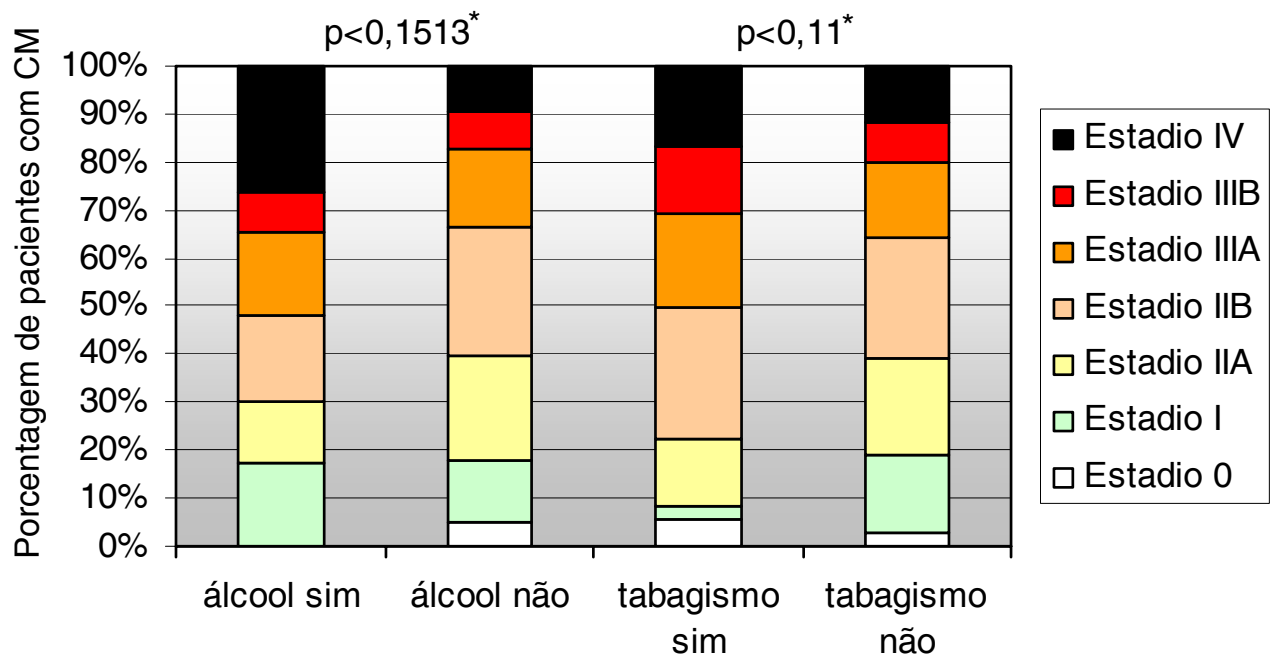


\*valor de  $p$  para qui quadrado,

\*\* valor de  $p$  para Teste Exato de Fisher

#estatisticamente significativo se  $p > 0,0083$  (correção de Bonferroni para análise de múltiplas variáveis)

**Figura 4.5:** Histograma tridimensional mostrando a estratificação das pacientes com CM, de acordo com estadiamento da doença, e genótipos da MT1HF C677T. A legenda indica os estadiamentos para CM, de acordo com as cores. Foi utilizado o programa CLUMP<sup>®</sup> (10.000 simulações) e Epi Info<sup>®</sup> para os cálculos estatísticos para qui quadrado e teste de Fisher, respectivamente.



**Figura 4.6:** Distribuição das pacientes com CM de acordo com estadiamento da doença e a presença, ou não, de etilismo e/ou tabagismo. A legenda indica os estadiamentos para CM, de acordo com as cores. \*valor de p para qui quadrado calculado por regressão logística.

## **5. DISCUSSÃO**

## 1. ESTUDO DO CÂNCER COLORRETAL

### 1.1 POLIMORFISMO C677T DA MTHFR E CCR

Em nosso estudo, não foi observada associação entre o polimorfismo C677T da MTHFR e CCR. A literatura é controversa sobre a correlação entre os genótipos da MTHFR e câncer. O polimorfismo da MTHFR modula o risco de vários tipos de câncer, de uma maneira sítio-específica. O polimorfismo C677T parece aumentar o risco de câncer de endométrio, colo de útero, esôfago, estômago, bexiga e CM. Em contraste, o polimorfismo parece diminuir o risco para CCR, adenoma colorretal, carcinoma hepatocelular, leucemia linfocítica aguda em adultos e crianças, leucemias, linfomas, displasia e câncer de colo de útero (Sharp & Little, 2004). Essa discrepância pode ser explicada pela diferença no nível de expressão da *MTHFR*, específico para cada tecido. Além disso, a necessidade de folato e a suscetibilidade à deficiência de folato são diferentes para cada tecido. A maioria dos estudos tem demonstrado que o risco de câncer, associado ao polimorfismo C677T, pode ser modificado por consumo de álcool, tabagismo e níveis de folato inadequados (Kim, 2005). Uma associação direta entre CCR e genótipo TT foi relatada em indivíduos com CCR, tabagistas, portadores de baixos níveis de folato plasmático (Ryan et al., 2001) e também em pacientes com alto consumo de álcool (Chen et al., 1996). Por outro lado, outros estudos observaram um efeito protetor do genótipo 677TT em CCR (Chen et al., 1999; Ma et al., 1997; Toffoli et al., 2003), quando os indivíduos apresentavam níveis adequados de folato (Eaton

et al., 2005) e baixos níveis de ingestão de bebidas alcóolicas (Le Marchand et al., 2005).

Os resultados conflitantes da literatura sobre a correlação do polimorfismo da MTHFR com o câncer podem ser devidos à importância da interação gene-ambiente na tumorigênese do CCR. Há evidências de que os fatores dietéticos (particularmente dietas pobres em folato e cobalamina, e alto consumo de álcool), associados ao polimorfismo 677 TT, aumentam o risco para CCR. Estudos mais recentes especulam que os indivíduos que apresentam níveis de folato séricos adequados adquirem uma insensibilidade aos efeitos promovidos pelo genótipo TT (tais como hiperhomocisteinemia e hipometilação genômica), o que diminui o risco para o CCR (Chen et al., 1996, Ma et al, 1997; Rosenberg et al, 2002). No presente trabalho, os níveis de folato sérico, de cobalamina ou de homocisteína dos pacientes portadores de CCR não foram dosados, o que impediu a análise dessas variáveis.

Uma vez que a interação gene-ambiente é relevante, e os níveis de folato adequados parecem compensar os efeitos oriundos da menor atividade da MTHFR, em indivíduos portadores do genótipo TT, tem sido amplamente questionada a necessidade de suplementação de ácido fólico para esses indivíduos, e para a população geral.

O folato foi isolado do espinafre, pela primeira vez, em 1941 e, nesta época, os primeiros estudos eram focados para a “cura da anemia”. À medida que os estudos sobre o metabolismo do folato avançavam, foi notado que a administração de folato aumentava o crescimento de tumores já existentes e, por isso, as drogas anti-folato (por exemplo, o metotrexato) tornaram-se potenciais ferramentas quimoterápicas para o câncer (Ulrich & Potter, 2006).

Atualmente, parece existir uma linha tênue entre o efeito benéfico e o efeito prejudicial da suplementação com ácido fólico, ainda bastante inconsistente com relação ao câncer. Alguns estudos relatam que a dose e o tempo de suplementação são críticos para a ocorrência desses efeitos. O folato tem um papel duplo na carcinogênese, tanto em animais quanto em humanos: está envolvido na prevenção do aparecimento de lesões neoplásicas e na progressão de lesões pré-malignas já existentes (Ulrich & Potter, 2006). Os estudos epidemiológicos sugerem que altas doses de suplementação (>1000  $\mu\text{g}/\text{dia}$ , recomendação diária de ácido fólico = 400  $\mu\text{g}/\text{dia}$ ), por tempo prolongado, reduzem o risco para CCR, CM, e outros cânceres, como o de pâncreas, esôfago e colo de útero (Ulrich & Potter, 2006). Em contrapartida, os ensaios clínicos randomizados relatam que doses baixas de ácido fólico (400  $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) também promovem um efeito protetor, mas ressaltam que, se houver um pequeno foco pré-maligno, pode ocorrer rápida progressão das células neoplásicas. Especula-se que a discrepância entre os resultados dos estudos observacionais e clínicos resulta das diferenças moleculares entre os indivíduos e as populações estudadas. A ocorrência de fenômenos epigenéticos e genéticos, assim como os polimorfismos das enzimas relacionadas ao metabolismo do folato, podem levar a diferenças entre indivíduos, inclusive com relação ao comportamento biológico do tumor, em resposta ao ácido fólico. É bem aceito que, dentre vários fenômenos, a hipometilação genômica é considerada um evento importante na tumorigênese (Goelz et al., 1985). Já foi demonstrado que o genótipo 677TT da MTHFR leva a hipometilação genômica de leucócitos (Stern et al., 2000) e de tecidos normais (Paz et al., 2002). A suplementação diária com ácido fólico (400 $\mu\text{g}$ )

pode reverter o estado de hipometilação (Pufulete et al., 2005). Estes autores observaram um aumento de 31% ( $p < 0,001$ ) e 25% ( $p = 0,09$ ) na metilação genômica de leucócitos e na mucosa de cólon normal, respectivamente, após suplementação por 10 semanas.

Mais pesquisas serão necessárias para avaliar a indicação e a segurança do uso do ácido fólico *per se*, diante das variações genéticas, condições dietéticas e marcadores tumorais, de cada indivíduo.

Especificamente com relação aos pacientes portadores do genótipo 677TT, é bem aceito que a suplementação ou dieta rica em ácido fólico deve ser estimulada em casos de hiperhomocisteinemia. Ainda não é conhecida a quantidade de folato necessária para compensar o defeito genético. Estima-se que deve ser necessário um nível de folato plasmático acima de 13,6 nmol/L para diminuir os níveis de homocisteína (Somekawa et al., 2002). No entanto, esses indivíduos devem ter acompanhamento clínico e laboratorial para se evitar excesso de suplementação, pois, hoje em dia, existem alimentos de grande consumo, tais como farinha e cereais, fortificados com ácido fólico. Os níveis séricos elevados de ácido fólico podem levar a outros efeitos deletérios, como declínio da cognição em idosos e da função imune (Ulrich & Potter, 2006).

Em nosso estudo, os resultados de genotipagem da MTHFR foram semelhantes quando analisamos 32 pares de tecido colorretal normal e tumoral do mesmo paciente. Sabe-se que a genotipagem do tecido tumoral pode ser problemática, por causa da perda da heterogossidade (LOH), que é uma característica comum dos tumores, especialmente no CCR. Isso pode levar a uma classificação errônea dos genótipos, por isso alguns estudos preferem a

utilização do tecido normal ou de sangue periférico. A perda das regiões cromossômicas 8p, 17p, 18q e 22q são freqüentes em CCR. Em nosso estudo, não tivemos dificuldade com relação à amplificação do loco da MTHFR por PCR, ou à genotipagem por RFLP de nossas amostras, realizada em triplicatas e em dias diferentes. Por mais cuidadosa que seja a microdissecção das amostras de CCR, existe a chance de contaminação com tecido normal (como células endoteliais dos vasos, células do estroma e inflamatórias) de aproximadamente 18%. Isso pôde ter contribuído para as taxas de sucesso de nossos experimentos. Na ausência de LOH para o loco estudado no tecido tumoral, o mesmo genótipo era esperado para esses tecidos, uma vez que o polimorfismo da MTHFR é uma alteração genômica, não-específica das células tumorais. Por isso, o polimorfismo C677T não deve ser considerado como marcador tumoral, mas possível marcador preditivo.

Parece ser interessante a genotipagem do polimorfismo da MTHFR e de outras enzimas cruciais do ciclo do folato (particularmente timidilato sintetase) anteriormente à quimioterapia adjuvante para tratamento do CCR e CM. É importante chamar a atenção para a toxicidade e o aumento da resposta terapêutica por maior quimiosensibilidade, que os pacientes portadores do genótipo TT apresentam, quando realizam quimioterapia com metotrexato e 5-fluorouracil, respectivamente, em comparação aos genótipos 677CC/CT (Shrubsole et al., 2005). Trabalhos recentes demonstraram maior quimiosensibilidade das células portadoras do genótipo 677TT (Sohn et al., 2004) e maior resposta terapêutica ao 5-fluorouracil em pacientes com polimorfismo 677TT com CCR metastático (Cohen et al., 2003). Vários estudos indicam que o genótipo 677 TT está associado ao risco aumentado de

aparecimento de mucosite oral, e principalmente com maior toxicidade hepática e hematopoiética quando da utilização do metotrexato, o que culmina em interrupção do tratamento. Uma toxicidade severa de medula óssea foi observada em mulheres com CM, portadoras do genótipo TT, quando o esquema quimioterápico utilizava simultaneamente metotrexato e 5-fluorouracil (Robien et al., 2005; Kim, 2005; Efferth & Volm, 2005). A homozigose do alelo T parece estar associado à baixa sobrevida em mulheres com CM avançado, e não modifica a sobrevida de mulheres diagnosticadas em estágio inicial, quando comparado a pacientes portadores dos outros genótipos com os mesmos estádios (Efferth & Volm, 2005).

## **1.2 MTHFR, CCR E CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS**

A literatura tem mostrado que o CCR pode progredir através de dois mecanismos distintos que envolvem diferenças clínicas, fenotípicas e moleculares.

Um estudo conduzido por Rosen & Shaw (1999) avaliou 915 recém-nascidos hígidos, e sugeriu que o genótipo TT foi mais freqüente em recém-nascidos do sexo masculino do que no sexo feminino. Em nosso estudo, não foi observada diferença na freqüência do genótipo TT com relação à estratificação por sexo, assim como demonstrado no estudo de Anderson et al. (2005). Neste estudo, os autores analisaram os resultados de 20 trabalhos publicados na literatura, referentes a um total de 8.400 indivíduos pesquisados,

e não encontraram variação entre a frequência dos genótipos da MTHFR e o sexo desses indivíduos.

Shannon e colaboradores (2002) sugerem que o genótipo 677 TT está associado à alta mortalidade em populações idosas. Esses autores justificam esse resultado pelo fato de que, tanto o genótipo TT quanto o processo natural de envelhecimento, favorecem um aumento do nível de homocisteína plasmática, notável fator de risco para hipometilação genômica. Assim, teoricamente, à medida que a idade progride, aqueles indivíduos portadores do genótipo TT devem apresentar maior risco para o aparecimento do CCR, quando alcançarem uma idade mais avançada. De fato, ao separarmos os pacientes com CCR em dois grupos, o primeiro constituído de indivíduos com idade superior a 70 anos, e o segundo com indivíduos com menos de 70 anos, observamos uma maior frequência do genótipo TT no primeiro grupo (19%) em comparação ao segundo (9%), mas essa diferença não apresentou significância estatística. Além disso, parece não haver relação linear entre o genótipo TT e a severidade (avaliado através do estadiamento por Dukes) e a recorrência até 3 anos após remissão da doença, em concordância com o trabalho de Shannon e colaboradores (2002). Consideramos que o estadiamento da doença está ligado à temporalidade do diagnóstico, não refletindo a agressividade tumoral.

### 1.3 MTHFR, CCR E MECANISMOS PATOGENÉTICOS

#### 1.3.1 MTHFR, CCR e Hipermetilação da região promotora de genes

Dois mecanismos patogênicos distintos foram propostos para o CCR. O mais freqüente (85%), denominado “clássico”, está relacionado à ocorrência de eventos mutacionais (germinativos e/ou somáticos) aditivos que culminam em LOH, e, portanto, em instabilidade cromossômica, de importantes regiões genômicas. O outro, denominado “mutador”, está relacionado à ineficiência do sistema de reparo (MMR) que ocorre em decorrência de mutações somáticas e/ou germinativas em genes relacionados ao MMR. A distinção entre os dois mecanismos é relevante, uma vez que os tumores ditos “mutadores” exibem características biológicas e clínicas específicas que, em conjunto, são denominadas fenótipo mutador. Este fenótipo inclui localização preferencial no cólon direito, histologia indiferenciada, infiltração linfocitária, melhor prognóstico e maior resistência à quimioterapia com 5-fluorouracil.

Atualmente, sabe-se que a perda da atividade dos genes relacionados na gênese de ambos os mecanismos (clássico ou mutador) ocorre preferencialmente por eventos epigenéticos (hipermetilação e hipometilação). Dentre esses, a hipermetilação da região promotora de genes é evento marcante das células neoplásicas, especialmente para o CCR. Particularmente, a hipermetilação da região promotora do gene *hMLH1* é o único evento que reconhecidamente origina MSI e, portanto, está relacionado ao fenótipo mutador. Em nosso estudo, avaliamos se haveria associação entre a hipermetilação da região promotora de 5 genes relacionados ao CCR (*DAPK*,

*MGMT*, *hMLH1*, *p16<sup>INK4a</sup>* e *p14<sup>ARF</sup>*), MSI (dados publicados por Anacleto et al., 2005) e os genótipos da MTHFR. Poucos trabalhos estudaram esses parâmetros moleculares com relação aos polimorfismos da MTHFR.

A investigação entre hipermetilação e o genótipo TT da MTHFR é interessante devido a três pontos principais: (i) o polimorfismo da MTHFR C677T leva ao desequilíbrio do metabolismo dos grupos metila e, teoricamente, pode afetar o padrão de metilação; (ii) o genótipo 677TT está associado à hipometilação de tecidos normais e em tecidos de CCR, CM e câncer de pulmão (Paz et al., 2002); (iii) os tumores que exibem hipermetilação da região promotora de genes, freqüentemente, exibem hipometilação genômica por excesso de consumo de grupamentos metila, o qual ocorre no primeiro evento (Esteller, 2005). No entanto, nós não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre o genótipo TT e hipermetilação de um ou mais locos analisados nas amostras de CCR, em concordância com estudo anterior (Paz et al., 2002). No entanto uma pergunta poderia ser feita: será que o genótipo TT poderia levar a menor quantidade de locos hipermetilados em nossas amostras, em comparação aos genótipos CT e CC? Esta pergunta se sustenta pela hipótese de que o genótipo TT leva à diminuição da formação de SAM, principal doador de grupamentos metila, fundamental para metilação aberrante dos promotores dos genes. Das amostras com genótipo 677TT (n=15) e 677 CT+CC (n=91), 47% (n=7) e 55% (n=50) delas apresentaram hipermetilação em pelo menos um dos locos analisados, sem diferença estatística entre os grupos (p=0,59; dado não-mostrado). Dois motivos podem contribuir para o resultado negativo, em resposta à pergunta feita anteriormente: o número pequeno de indivíduos com genótipo 677TT (n=15), e a inacessibilidade dos

níveis de folato plasmático dos pacientes, pois níveis adequados de folato podem reverter os efeitos da homozigotidade do alelo T. Seria interessante a realização de estudos com maior casuística em que se investigasse a associação entre as variantes germinativas que envolvem as enzimas relacionadas no metabolismo do folato, a metilação aberrante dos promotores de genes envolvidos na gênese do câncer e os níveis de folato plasmático. Esses parâmetros, em conjunto, podem afetar o paradigma de metilação de DNA.

### **1.3.2 MTHFR, CCR e Instabilidade de Microssatélites**

A presença de MSI é característica marcante dos CCR que pertencem ao fenótipo mutador. Tumores MSI+ são tipicamente diplóides, apresentam tamanhos maiores, raramente dão origem a metástases, apresentam estadiamento menos avançado e, por isso, apresentam melhor prognóstico e sobrevida do que os tumores com instabilidade cromossômica e com estabilidade de microssatélites (MSS) (Chang et al., 2006). Dois eventos falam contra a “benignidade” dos tumores CCR/MSI+. O primeiro é a resistência à quimioterapia e a menor sobrevida dos pacientes MSI+ em tratamento com 5-fluorouracil (Carethers et al., 1999). O segundo evento é que a MSI em CCR pode ser um marcador de suscetibilidade herdada ou adquirida para outras doenças, como câncer gástrico, de útero e ovário, conforme relatado por recente estudo (Chang et al., 2006). As nossas amostras 677TT/MSI+ totalizaram 7 indivíduos que apresentaram as seguintes características: 6 mulheres, todos os pacientes apresentavam idade superior a 70 anos, 2 casos

de invasão linfocitária, estadiamento a partir de T2N0M0 e nenhuma recorrência da doença. Não tivemos acesso ao tipo de quimioterapia empregada nesses pacientes. Seria interessante analisar a resposta à quimioterapia com 5-fluorouracil nos pacientes CCR do grupo 677TT/MSI+. De forma paradoxal, o genótipo 677TT pode “anular” o efeito conferido pelo CCR/MSI+, e vice-versa. Os pacientes portadores de tumores MSI+ são quimioresistentes e, em contraponto, o genótipo TT confere maior quimiosensibilidade e resposta terapêutica ao 5-fluorouracil.

Em nosso estudo, encontramos uma forte associação estatística entre o genótipo 677TT e a instabilidade de microssatélites. Esta associação já foi observada em estudo prévio (Shannon et al., 2002), mas não em outros (Toffoli et al., 2003; Eaton et al., 2005). Shannon et al. (2002) observaram que os tumores MSI eram mais comuns entre pacientes com CCR mais idosos (>70 anos), quando comparados com tumores MSS, à semelhança dos nossos resultados. Em contraponto, Plaschke et al. (2003) não identificaram nenhuma associação entre os genótipos dos polimorfismos C677T/A1298C e os casos de CCR com MSI. Dois estudos em CCR são favoráveis a uma associação inversa entre o genótipo 677TT e MSI (Toffoli et al., 2003 e Eaton et al., 2005) influenciado por adequados níveis de folato, e preconizam que essa situação favorece tumores MSS.

Investigamos duas possibilidades que poderiam originar a associação entre polimorfismo 677TT e MSI+: o excesso do genótipo 677TT nas amostras MSI+ estaria relacionado à hipermetilação da região promotora do gene *hMLH1*? Ou estaria associado à mera estratificação étnica?

Para responder à primeira pergunta, separamos as amostras 677TT/MSI+ em dois subgrupos com relação à presença ou ausência de hipermetilação para o loco *hMLH1*. Houve um equilíbrio entre as frequências das amostras 677TT/MSI+ para ambos subgrupos ( $p=0,1$ ). Observamos, ainda, que nem todas as amostras MSI+ apresentavam hipermetilação da região promotora para o loco analisado. A metilação neste loco, reconhecidamente, leva à instabilidade de microssatélites, mas nem sempre toda instabilidade de microssatélites está associada a hipermetilação do gene de reparo *hMLH1*, conforme já visto em alguns estudos (Yamashita et al., 2003; Anacleto et al., 2005b). Nas amostras 677TT/MSI-, não foi observada hipermetilação para o loco *hMLH1*.

No Brasil, temos uma população bastante heterogênea, que resulta de cinco séculos de mistura étnica entre indivíduos. Estes eram oriundos de três continentes: Europa, na figura dos colonizadores portugueses, África (através da vinda dos escravos) e América (nativos habitantes do Brasil). Desde a colonização, esses três grupos se misturaram a tal ponto que, no Brasil, a cor de pele não reflete a origem ancestral do indivíduo (Parra et al., 2003). As proporções relativas das três ancestralidades variam consideravelmente em diferentes regiões brasileiras (Alves-Silva et al., 2000; Carvalho-Silva et al., 2001). Poucos estudos relatam a frequência alélica ou genotípica da MTHFR C677T encontrada no Brasil, segundo dados publicados na literatura indexada (Franco et al., 1998; Arruda et al., 2002; Couto et al., 2004). No mundo, a distribuição da frequência do alelo 677T parece variar de acordo com o grupo étnico e área geográfica. As frequências alélicas e genotípicas mais baixas são encontradas em populações pretas de descendência africana, como do Quênia

(4.9% / 0%), Gâmbia (6.25% / 0%) e Madagascar (6,7% / 0%) (Schneider et al., 1998). Nesses grupos africanos, não foi detectado nenhum indivíduo portador de homozigose do alelo T (Schneider et al., 1998, Rosenberg et al., 2002). As maiores frequências são encontradas em hispânicos, variando entre 41 até 57% para frequência do alelo T (maior pico observado em mexicanos) e 15,3 a 32% para frequência genotípica (Schneider et al., 1998; Wilcken et al., 2003). Na população europeia observa-se um aumento progressivo da frequência do genótipo TT à medida que se desloca do extremo norte europeu para os países mediterrâneos. Este fenômeno também é observado na América do Norte, onde no Canadá encontram-se frequências do genótipo TT menores do que aquelas encontradas no sul dos Estados Unidos (Wilcken et al., 2003). O consumo adequado de ácido fólico parece influenciar na distribuição dos genótipos da MTHFR, o que justifica a variabilidade na prevalência do genótipo 677TT em diferentes populações. Os indivíduos portadores de homozigose da MTHFR apresentam uma sobrevivência maior, se o consumo de ácido fólico for adequado (Rosenberg et al., 2002). Isso explicaria o fenômeno observado na distribuição crescente da frequência do genótipo 677TT do norte para o sul da Europa: há um consumo maior de ácido fólico nos países mediterrâneos, em comparação aos nórdicos. Concebivelmente, a baixa frequência da MTHFR 677T observada em africanos está relacionada à deficiência de folato, por desnutrição e má absorção do ácido fólico, condições ainda comuns na África (Rosenberg et al., 2002). No entanto, a frequência do genótipo TT em afrodescendentes moradores nas Américas é superior em relação aos africanos, mas ainda são frequências menores do que aquelas encontradas nos outros grupos étnicos (Botto & Yang, 2000). Uma dieta mais rica em ácido

fólico e a mistura étnica poderiam contribuir para o aumento da frequência do genótipo 677TT entre afro-descendentes. A figura 5.1 mostra a distribuição da frequência dos genótipos 677CC+CT e 677TT em alguns países do mundo.

Considerando que a frequência do alelo 677T (Botto et al., 2001) e a incidência da MSI (Ashktorab et al., 2003) em CCR parecem ser diferentes entre africanos e europeus, investigamos se a associação entre MSI+ e genótipo 677TT poderia ter acontecido devido à estratificação étnica das amostras de CCR. Utilizamos como ferramenta a análise de 40 locos bialélicos polimórficos (indels) que, em conjunto, formam uma poderosa ferramenta para informar a ancestralidade genômica de cada indivíduo (Bastos-Rodrigues et al., 2006). Escolhemos os indels como marcadores de ancestralidade genômica porque apresentam algumas vantagens em comparação a outros marcadores, como, por exemplo, os microssatélites. Os indels formam uma ferramenta simples, com baixa taxa de mutação e, por isso, reproduzem um histórico evolutivo mais antigo do que os microssatélites.

A distribuição dos indivíduos com CCR MSI+ e MSI- nas três principais populações étnicas fundadoras da população brasileira (Ameríndia, Africana e Européia) foi semelhante entre os grupos MSI+ e MSI-. Esse resultado é importante porque exclui a estratificação étnica de nossas amostras. Assim, descartam-se duas possibilidades que poderiam causar um viés em nosso resultado. A primeira, de encontramos um maior número de indivíduos de ancestralidade européia no grupo MSI+ do que o número observado no grupo MSI- e, a segunda, de existir um número de indivíduos de ancestralidade africana no grupo MSI-, superior ao número encontrado no grupo MSI+.

A maioria dos pacientes do grupo CCR e do grupo controle apresentaram ancestralidade européia (85%). Os indivíduos pesquisados em nosso estudo são representativos da distribuição dos grupos ancestrais, na Região Sudeste do Brasil. Um estudo populacional, utilizando os mesmos marcadores, revelou que 88% dos indivíduos da região sudeste brasileira pertencem à ancestralidade européia (Bastos-Rodrigues et al. - manuscrito em preparação). Assim, exclui-se a possibilidade de não-aleatoriedade ou de seletividade de nossas amostras.



**Figura 5.1 :** Distribuição das frequências genotípicas 677TT e 677CC+CT da MTIFR em alguns países do mundo. Adaptado de: Arruda et al., 1998; Schneider et al., 1998; Botto & Yang, 2000; Adjalila et al., 2003; Rajkovic et al., 2003; Wilcken et al., 2003

## **2. ESTUDO DO CÂNCER DE MAMA**

### **2.1 POLIMORFISMO DA MTHFR E CÂNCER DE MAMA**

Os poucos estudos que investigaram a associação entre CM e o polimorfismo da MTHFR C677T forneceram resultados controversos ou inconclusivos, até o momento. Vários fatores contribuíram para a variabilidade dos resultados: pequeno número de casos e controles, diferentes populações e agrupamento diferente de genótipos da MTHFR 677 para análise estatística (por exemplo, CC x CT/TT ou CC/CT x TT).

Em nosso estudo, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo C677T e o risco para CM. Recente meta-análise sobre o tema (Zintaras, 2006) agrupou e analisou os dados de 33 artigos indexados e não encontrou relação entre o polimorfismo C677T e CM. Dentre esses, apenas três trabalhos (Ergul et al., 2003; Deligezer et al., 2005; Chen et al., 2005) mostraram associação entre o genótipo 677TT e CM. Zintaras (2006) estratificou os dados de acordo com três categorias principais: (i) grupo étnico (descendência europeia, africana, leste asiático e “outros” que incluíram as etnias turcas, havaianas, judias e árabes), (ii) época do diagnóstico do CM na pré- e (iii) pós menopausa. Não foi encontrada diferença estatística entre o polimorfismo C677T e mulheres com CM de diferentes grupos étnicos ou mulheres diagnosticadas com CM na pós-menopausa. No entanto, essa meta-análise (Zintaras, 2006) e outro estudo (Semenza et al., 2003) relataram que o polimorfismo C677T é um fator de risco para CM em mulheres na pré-menopausa, contrariamente aos resultados encontrados em nosso trabalho, no qual não encontramos associação entre mulheres na pré-

menopausa com diagnóstico de CM e o genótipo 677TT. Os efeitos decorrentes da inadequada atividade da MTHFR podem-se somar aos efeitos do estrogênio no epitélio mamário. Casos de CM diagnosticados em mulheres com ciclos ovulatórios (ou seja, na pré-menopausa) apresentam mecanismo patogênico diferente dos casos com diagnóstico na pós-menopausa. Os hormônios ovarianos (notadamente o estrogênio) afetam a cinética das células tronco do epitélio mamário, induzindo sua diferenciação e replicação. A longa ou superexposição aos hormônios pode ser um ponto de partida para a carcinogênese mamária (Henderson et al., 1988). Células com alta atividade mitótica são susceptíveis a alterações na síntese, reparo e metilação de DNA. Uma vez que a MTHFR tem um papel relevante na manutenção destas etapas moleculares, sua inadequada atividade pode ter um sinergismo juntamente com os hormônios ovarianos na patogênese do câncer de mama. No entanto, a avaliação dietética do consumo de folato é importante para validar esse tipo de associação. Devido a isso, as conclusões dos trabalhos que avaliam a relação entre a expansão estrogênica e a atividade da MTHFR no parênquima mamário devem ser interpretadas com cautela (Semenza et al., 2003; Zintaras, 2006), pela falta de dados referentes a fatores modificadores do ciclo do folato, como a dieta.

## **2.2 POLIMORFISMO DA MTHFR, CÂNCER DE MAMA E STATUS HORMONAL**

Estudos sugerem que as pacientes portadoras do genótipo TT na pós-menopausa são boas candidatas a utilizarem terapia de reposição hormonal (TRH) (Somekawa et al., 2002). Recente trabalho (Le Marchand et al., 2004) mostrou uma associação inversa entre o genótipo 677TT e CM em mulheres na pós-menopausa em TRH. De maneira similar, também não encontramos associação entre genótipo TT e *status* hormonal, porém, nossas pacientes não estavam em TRH. Na pós-menopausa, o epitélio mamário apresenta uma diminuição notória das taxas de divisão celular, no entanto ocorre um aumento significativo dos níveis de homocisteína plasmática (Hak et al., 2000). Teoricamente, os estrógenos exógenos aumentam a proliferação epitelial na mama e, ao mesmo tempo, diminuem os níveis de homocisteína plasmática, mas por um mecanismo que parece ser independente dos níveis de folato ou do genótipo da MTHFR (Somekawa et al., 2002, Madsen et al., 2002). Ainda permanece sem resposta o mecanismo pelo qual o genótipo TT favoreceria um efeito protetor para o risco de CM, nas mulheres pós-menopausa em TRH.

## **2.3 POLIMORFISMO DA MTHFR, CÂNCER DE MAMA E IDADE**

O aumento da idade, a pós-menopausa e o genótipo 677TT elevam os níveis de homocisteína plasmática, e, além disso, já foi demonstrado que a homoziguidade do alelo T da MTHFR 677 está relacionada à maior mortalidade em idosos com CCR (Shannon et al., 2002). Devido a isso, estratificamos as pacientes com CM em dois grupos, o primeiro constituído de pacientes com idade maior que 70 anos e o segundo, constituído de pacientes

com idade menor que 70 anos. Não houve diferença na frequência do genótipo 677TT em relação à idade. O que pode ter influenciado os resultados de nosso trabalho é o número reduzido de mulheres acima de 70 anos com CM, aproximadamente 18% da casuística, diferentemente do número de pacientes com idade acima de 70 anos no estudo CCR (Shannon et al., 2002), que representaram 52%. Em nosso trabalho, não pudemos avaliar o impacto do genótipo TT sobre a mortalidade, pois todas as pacientes estavam vivas e em acompanhamento clínico no ambulatório de mastologia do Hospital das Clínicas (UFMG), por ocasião do estudo. A homoziguidade do alelo T parece estar associada à baixa sobrevida em mulheres com CM avançado, e não modifica a sobrevida de mulheres diagnosticadas em estágio inicial, quando comparada a pacientes portadores dos outros genótipos da MTHFR com os mesmos estágios (Shrubsole et al., 2005). Não tivemos acesso ao tipo de quimioterapia que as pacientes utilizaram para o tratamento do CM. Parece que as pacientes com CM e genótipo 677TT podem apresentar baixa sobrevida por apresentarem exacerbação dos efeitos tóxicos da quimioterapia adjuvante. Uma toxicidade severa de medula óssea foi observada em mulheres com CM portadoras do genótipo TT, quando no esquema quimioterápico, utilizava-se simultaneamente metotrexato e 5-fluoracil (Robien et al., 2005; Kim, 2005; Efferth & Volm, 2005). Dentre seis pacientes que apresentaram toxicidade severa ao primeiro ciclo com CMF (ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluoracil), cinco eram portadoras do genótipo 677TT. Tratamentos com drogas antimetabólicas, como o metotrexato, podem elevar os níveis de homocisteinemia plasmática, o que contribui para a toxicidade (Toffoli et al., 2000). Neste sentido, o genótipo da MTHFR C677T e os níveis de

homocisteína são fatores preditores de toxicidade quando se utilizam drogas antifolato, como metotrexato e 5-fluoracil. A administração de folato, vitamina B6 e B12 é barata, não-tóxica e pode proteger as pacientes portadoras do genótipo TT de efeitos colaterais severos e até mesmo letais da quimioterapia com CMF.

#### **2.4 POLIMORFISMO DA MTHFR, CÂNCER DE MAMA E CONSUMO DE ÁLCOOL E CIGARRO**

Atualmente, as pesquisas têm dado muita atenção para os fatores de risco modificáveis associados ao câncer. O efeito cumulativo de nove fatores de risco modificáveis é responsável por mais de um terço das mortes por câncer (Danaei et al., 2005). A busca por medidas de saúde pública e intervenções clínicas têm sido o foco de vários estudos porque vários tipos de câncer, incluindo CM e CCR, podem ser prevenidos por mudanças nos hábitos de vida. Dentre os fatores de risco modificáveis, destacam-se o tabagismo e o consumo de álcool, além do baixo consumo de frutas e vegetais.

Um dos exemplos mais ilustrativos da interação gene-ambiente na carcinogênese constitui-se da relação do polimorfismo da MTHFR 677 e dos fatores de risco modificáveis. A associação do polimorfismo 677 e CM tem sido inconsistente, porque os fatores ambientais apresentam um potente efeito modificador no risco para CM. Isoladamente, o tabagismo deve ter um importante papel na carcinogênese mamária, mas não é considerado fator de risco primário. Cui et al. (2006) mostraram que o risco para CM está associado com a duração, a intensidade e a exposição cumulativa ao consumo de cigarro. Os fumantes estão expostos a vários agentes carcinogênicos bem conhecidos,

presentes na fumaça do cigarro, como, por exemplo, o benzopireno, um hidrocarbono aromático policíclico. A forma ativa do benzopireno, benzopireno-diol-epóxido, está relacionada a maior dano ao DNA de pacientes com CM, por alterações no sistema de reparo, podendo contribuir para o risco de CM (Shi et al., 2004). Além disso, estudos epidemiológicos têm demonstrado que os fumantes apresentam um nível maior de homocisteína plasmática e baixos níveis séricos de vitaminas do grupo B, como B6, B12 e folatos, quando comparados aos não-fumantes (Piyathilake et al., 1994, O'Callaghan et al., 2002). Portanto, os efeitos deletérios do cigarro podem se somar aos efeitos promovidos pela baixa atividade da MTHFR. Por isso, investigamos se as pacientes com CM, tabagistas, apresentariam maior frequência do genótipo 677TT, em comparação às não-tabagistas. Encontramos um valor marginal ( $p=0,043$ ), estatisticamente não significativo, entre pacientes portadoras do genótipo 677TT tabagistas, e não-tabagistas. Até o momento, na literatura indexada, nenhum trabalho exibiu uma casuística adequada para a avaliação entre CM, tabagismo e polimorfismo da MTHFR C677T. Dois trabalhos relataram associação significativa entre tabagismo e o polimorfismo C677T da MTHFR em câncer de bexiga (Lin et al., 2004) e em mulheres com câncer de pulmão (Shi et al., 2005). O tabagismo é um fator de risco primário para o risco de câncer de pulmão e bexiga, e é considerado um fator secundário em outros tipos de câncer, como o colorretal e o de mama. Esta observação pode contribuir para um viés na análise dos resultados relatados pelos estudos anteriormente citados.

Com relação ao consumo de álcool, observamos frequência maior do genótipo 677TT em mulheres com CM, etilistas, que foi estatisticamente

diferente das não-etilistas ( $p=0,007$ ;  $CI=0,05-0,67$ ). Esse resultado indica uma forte associação entre pacientes com CM que consomem álcool e o polimorfismo 677TT. Esse resultado é interessante, porque o álcool interfere em variáveis importantes para o metabolismo do folato. O álcool é um “antagonista do folato”, e seu uso moderado (2-3 doses/dia) diminui os níveis séricos de vitamina B12 e folatos, e aumenta os níveis de homocisteína (de la Vega et al., 2001; Giovannucci, 2004; Chiuve et al., 2005). Além disso, os indivíduos portadores do genótipo 677TT são especialmente sensíveis aos efeitos carcinogênicos do álcool (Bailey et al., 2003), e podem ser intolerantes ao uso de bebidas alcoólicas (Semenza et al., 2003). Nossos resultados são diferentes dos relatados por Le Marchand (2004), que relatou que o consumo de álcool está associado ao aumento do risco de CM em portadoras do genótipo 677CC, usuárias de TRH. Trabalho anterior relatou que as pacientes com CM portadoras dos genótipos 677CC e CT estão associadas a um risco menor para a doença quando os níveis de folato são adequados (Beilby et al., 2004). De fato, o consumo adequado de folato deve ter um papel preventivo para o CM, em mulheres que consomem álcool (Zintaras, 2006). A maioria dos trabalhos observou que há um risco elevado de CM em mulheres com genótipo 677TT que apresentam um baixo consumo de folato (Chen et al., 2003), semelhante ao relatado para o CCR. Indivíduos etilistas portadores do genótipo 677TT apresentam um risco maior para CCR, que pode ser revertido através de alto consumo de folato (Weisberg et al., 2003). Há poucos trabalhos que relataram o álcool como modificador do risco para CM em portadores do genótipo 677TT. Na maioria dos trabalhos, observou-se que há um risco elevado de CM em mulheres com genótipo 677TT que apresentam um baixo

consumo de folato (Chen et al., 2003). Estima-se que o consumo moderado de álcool (>15g/dia) é suficiente para aumentar os níveis de homocisteína em mulheres saudáveis (Chiuve et al., 2005), e que os níveis de folato plasmático acompanham inversamente aos níveis de homocisteína. Neste estudo, as pacientes etilistas consomem de 12 a 41g/dia de álcool. A média de álcool consumida pelas pacientes portadoras do genótipo TT foi de 24g/dia. Teoricamente, a ingestão dessa quantidade de álcool poderia modificar os níveis de homocisteína e folato plasmático, sendo intensificados pelos efeitos deletérios advindos da baixa atividade da MTHFR. Isso justificaria a maior proporção de pacientes com CM alocadas no grupo das etilistas portadoras do genótipo TT. No entanto, não podemos afirmar tal mecanismo, porque não temos acesso aos níveis de homocisteína ou folato plasmáticos e nem informações sobre a dieta dessas pacientes. O uso preventivo de folato para pacientes etilistas portadoras do genótipo TT, deve ser considerado, com o objetivo de reverter os efeitos do genótipo 677TT no CM.

Com o intuito de determinar se a gravidade do CM e o genótipo 677TT da MTHFR estariam relacionados, separamos as pacientes de acordo com o estadiamento TNM e os genótipos 677CC+CT e TT. Foi encontrada uma forte associação estatística, entre estadiamento para CM e genótipo TT ( $p=0,0077$ ). Observamos um significativo acúmulo de pacientes portadoras do genótipo 677TT encontradas no estadiamento IIIA ( $p=0,0083$ ). Esse resultado foi diferente do reportado pelo estudo de Srubsole et al., (2005), no qual não encontrou diferença significativa entre estadiamento para CM e genótipos da MTHFR. Outro estudo conduzido por Langsenlehner et al., (2003), o qual analisou variáveis como, tamanho do tumor maior que 2 cm, grau histológico

superior a 2, e metástases em linfonodos, também não encontrou associação estatística entre essas características e os genótipos da MTHFR. Ambos os trabalhos utilizaram um número maior de pacientes, e a proporção de pacientes portadoras do genótipo TT foi superior à nossa casuística.

Não podemos afirmar que existe uma relação de causalidade entre genótipo TT e estadiamento IIIA para CM. O estadiamento, neste estudo, está ligado apenas à temporalidade do diagnóstico, não refletindo o nível de agressividade tumoral. Temos que considerar que as pacientes do nosso estudo são pertencentes às classes sociais média e baixa. Sabe-se que o acesso dessas pacientes ao setor primário de saúde (posto de saúde) e ao secundário (ambulatórios de especialidade) é difícil, o que pode postergar o diagnóstico da doença. Ao mesmo tempo, não podemos deixar de discorrer que o tumor de mama classificado em estágio III, apresenta maior atividade celular em relação aos estádios I e II. A diferença marcante entre estadiamento IIIA e os demais estádios se refere à invasão de células cancerosas em linfonodos axilares (N2, linfonodos axilares fixos). Não sabemos qual é o processo que poderia contribuir para a metástase das células do CM que expressam a MTHFR com baixa atividade. No entanto, os efeitos da inatividade da MTHFR podem se somar às inúmeras alterações celulares que controlam o crescimento celular e a invasão do tecido adjacente e à distância. No entanto, uma pergunta poderia ser feita: será que essa associação ocorreu por maior quantidade de pacientes etilistas encontradas no estadiamento IIIA? Somente duas pacientes, com estágio IIIA e portadoras do genótipo TT, eram etilistas. Com o intuito de averiguar se o consumo de álcool e de cigarro poderia estar correlacionado ao estadiamento mais avançado, essas variáveis foram

analisadas através de regressão logística. Nesta análise não foi encontrada nenhuma associação, sugerindo que, em nosso estudo, esses fatores de risco modificáveis não se correlacionam com a estadiamento avançado. Estudos adicionais focados na relação do álcool, estadiamento para CM e polimorfismo da MTHFR devem ser realizados.

## **6. CONCLUSÃO**

Este trabalho avaliou o polimorfismo da MTHFR C677T em dois tipos de câncer, CCR e CM. Nas amostras de CCR avaliou-se a relação entre o genótipo 677TT, e parâmetros clínicos e moleculares. Nas amostras de CM, avaliou-se a relação entre o genótipo 677TT e parâmetros clínico-patológicos. A partir da análise e discussão dos resultados encontrados neste trabalho, podemos concluir:

- ✓ Não encontramos associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo C677T e o risco para CCR e CM.
- ✓ Nas amostras de CCR, não encontramos associação estatisticamente significativa entre o genótipo 677TT e parâmetros clínicos e/ou hipermetilação da região promotora de 5 genes associados ao CCR (*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16<sup>INK4a</sup>* e *p14<sup>ARF</sup>*). No entanto, foi observada uma forte associação estatística entre os tumores MSI+, e o genótipo 677TT.
- ✓ Nas amostras de CM, foi encontrada associação estatisticamente significativa, entre o genótipo 677TT e pacientes etilistas, e entre pacientes diagnosticadas em estágio IIIA.

## **7. ANEXOS**

## 1.1 Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer/ São Paulo



São Paulo, 29 de novembro de 2000

À

Dra. Otávia Luisa Silva Damas de Caballero

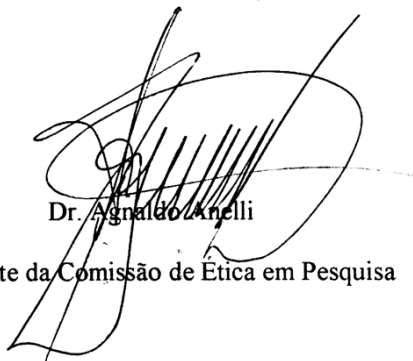
Ref. Comunicação da Comissão de Ética em Pesquisa

Projeto: “Desenvolvimento e otimização de testes moleculares para detecção de alterações em genes relacionados à tumorigênese de cânceres hereditários e esporádicos.” (nº 287/00)

Prezada Dra. Otávia,

Seu projeto de pesquisa, acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer em sua última reunião de 28/11/2000. Os membros desta comissão **aprovaram** a realização deste estudo. Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhados à secretaria do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,



Dr. Agnaldo Anelli  
Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa

C/c Dr. Andrew J. G. Simpson  
Dr. Sérgio D. J. Pena

---

**Comissão de Ética em Pesquisa - CEP**  
Rua Prof. Antonio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo – SP  
CEP – 01509-900 – Tel. (0\*\*11) 3272-5000 ramal 1117

## 1.2 Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas  
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE

UFMG

Belo Horizonte, 10 de abril de 2003.

PROCESSO Nº 031/03.

**TÍTULO: "Medicina Genômica: oncogenômica e oncogenética do Câncer de Mama."**

Sr(a) Pesquisador(a):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico Financeira sobre o mesmo e sua aprovação pelo COEP/UFMG em 03/04/02, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE relatório parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

Prof. Urquiza Helena Meira Paulino  
Diretora da DEPE/HC-UFMG

Ao  
Prof. Sérgio Danilo Pena  
Depto. Bioquímica do ICB/UFMG

### 1.3 Consentimento Informado e esclarecido utilizado no estudo de câncer de mama

#### CONSENTIMENTO INFORMADO E ESCLARECIDO

**Estudo Epigenético do Câncer de Mama/UFMG**  
**Faculdade de Medicina UFMG/Instituto de Ciências Biológicas UFMG**



Nome: \_\_\_\_\_ Nº pront: \_\_\_\_\_  
 End: \_\_\_\_\_ Biópsia HC: ( ) sim ( ) não Nº \_\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Est Civil: \_\_\_\_\_ G P A  
 Idade: \_\_\_\_\_ Idade no diagnóstico: \_\_\_\_\_ Pré menop: ( ) sim ( ) não  
 Químio: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_ Radio: ( ) sim ( ) não \_\_\_\_\_  
 Dieta: \_\_\_\_\_  
 A.P: \_\_\_\_\_ E P cerb-2 p53 Tipo histológico \_\_\_\_\_  
 Tabagismo: \_\_\_\_\_ Álcool: \_\_\_\_\_ HP: \_\_\_\_\_  
 IMC: \_\_\_\_\_ HF: \_\_\_\_\_  
 Metástase: ( ) sim ( ) não Esvaziamento axilar: ( ) sim ( ) não Recidiva: ( ) sim ( ) não  
 Médico responsável: \_\_\_\_\_ SUS / Convênio T N M

Você está sendo convidada a participar de um estudo que irá enriquecer a pesquisa sobre câncer de mama. A sua participação é VOLUNTÁRIA. Não há interesse financeiro neste estudo. Este estudo tem autorização do comitê de Ética do Hospital das Clínicas/UFMG.

Iremos estudar se existe ou não alguma alteração em seu DNA que predispõe ao câncer de mama, e ainda associar aos seus fatores pessoais que estão listados acima com os resultados encontrados. Como qualquer estudo de laboratório, os resultados podem demorar alguns anos para serem analisados.

Será coletado uma amostra da sua mucosa bucal (chamamos swab bucal) através da raspagem da parte interna da boca com uma escovinha. Em casos especiais será coletado uma pequena amostra de sangue. O material utilizado é totalmente descartável e individual. Todos os dados coletados serão SIGILOSOS, somente os médicos e as pessoas que estarão envolvidos saberão dos seus dados, e não serão fornecidos em nenhuma hipótese a outras pessoas. Esses dados utilizados para publicação em revistas científicas/médicas. Em caso de necessidade ou dúvida, retorne ao Ambulatório de Mastologia ou ligue para 3499-2628 e procure pela Dra. Alessandra Clarizia.

Declaro que li e entendi e ainda foi-me explicado claramente sobre a pesquisa que estarei participando para contribuir com o estudo sobre câncer de mama. Declaro que entendi que essa pesquisa não apresenta fins lucrativos e que minha participação é voluntária.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 Paciente

\_\_\_\_\_  
 Médico (a)

\_\_\_\_\_  
 Testemunha

#### 1.4 Estadiamento de Dukes.

O estadiamento de Dukes utiliza como critério de base o sistema TNM (Tumor, Nódulo, Metástase). T= tamanho do tumor; Tis= acometimento da mucosa; T1= acometimento da mucosa e submucosa; T2= acometimento da muscular própria; T3= acometimento da serosa; T4= acometimento de toda a espessura da parede incluindo tecidos ou órgãos adjacentes. N= linfonodos com células tumorais; N0= nenhum linfonodo acometido; N1= acometimento de 1 a 3 linfonodos; N2/N3= acometimento de mais de 4 linfonodos. M= metástase a distância; M0= ausência de metástase a distância, M1= presença de metástase a distância.

AJCC= *American Joint Committee on Cancer*.

Adaptado de: *AJCC/Câncer Staging Manual*, 6ª edição, 2002.

ESTADIO AJCC	TUMOR PRIMÁRIO	LINFONODOS REGIONAIS	METÁSTASE A DISTÂNCIA	DUKES
Estadio 0	Tis	N0	M0	
Estadio I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	A
Estadio II	T3	N0	M0	B
	T4	N0	M0	B
Estadio III	T1-T2	N1	M0	C
	T3-T4	N2	M0	C
	Qual quer T	N3	M0	C
Estadio IV	Qual quer T	Qual quer N	M1	C

### 1.5 Estadiamento Clínico do Câncer de Mama baseado no sistema TNM.

T= tamanho do tumor; TX= tumor primário não pode ser avaliado; Tis= carcinoma *in situ*; T0= não há evidência de tumor primário T1= tumor igual ou maior que 2 cm em seu maior diâmetro; T2= tumor maior que 2 cm ou igual a 5 cm em seu maior diâmetro; T3= tumor maior que 5 cm; T4= tumor de qualquer tamanho com extensão direta para parede torácica ou pele. N= linfonodos com células tumorais; NX= linfonodos regionais não podem ser avaliados; N0= ausência de metástases em linfonodos axilares; N1= metástases em linfonodos axilares homolaterais móveis; N2= metástases em linfonodos axilares fixos; N3= metástases em linfonodos da cadeia mamária interna, e/ou infraclavicular, e/ou supraclavicular. M= metástase à distância; MX= metástase à distância não pode ser avaliada; M0= ausência de metástase à distância, M1= presença de metástase à distância.

AJCC= *American Joint Committee on Cancer*.

Adaptado de: *AJCC/Câncer Staging Manual*, 6<sup>o</sup> edição, 2002

ESTADIO AJCC	TUMOR PRIMÁRIO	LINFONODOS REGIONAIS	METÁSTASE A DISTÂNCIA	
Estadio 0	Tis	N0	M0	
Estadio I	T1	N0	M0	
Estadio II	A	T0	N1	M0
		T1	N1	M0
		T2	N0	M0
	B	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
Estadio III	A	T0	N2	M0
		T1	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1	M0
		T3	N2	M0
	B	T4	N0	M0
		T4	N1	M0
		T4	N2	M0
	C	Qual quer T	N3	M0
Estadio IV	Qual quer T	Qual quer N	M1	

**1.6 GRAMAS DE ÁLCOOL EM ALGUMAS BEBIDAS COMUNS**

Nome	Quantidade (mL)	% álcool v/v	média de gramas de álcool
Cerveja	350	4 a 6	13
Vinho branco/tinto	100	13 a 15	10
Gim, Rum, Vodka	45	35-45	16
Aguardente	45	30 a 38	12
Uísque	45	40 a 45	16
Licores	30	20 a 40	7

Fórmula para cálculo de gramas de álcool:

$\text{volume (mL)} \times \text{concentração v/v} \times 0,789$

**Fonte:** <http://www.alcohol.org.nz/WhatsInAStandardDrink.aspx>  
[http://www.fcf.usp.br/LAT/i\\_alcool.php](http://www.fcf.usp.br/LAT/i_alcool.php)

## **8. ARTIGO**

## **9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AJCC cancer staging manual.- 6th ed. Greene Frederick, Page David, Fleming Irving, Fritz April, Balch Charles, Haller Daniel, Morrow Monica. Springer-Verlag, New York, 2002.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.*, 67(2):444-61, 2000.
- Anacleto C, Rossi B, Lopes A, Soares FA, Rocha JCC, Caballero O, Camargo AA, Simpson AJG, Pena SDJ. Development and application of a multiplex PCR procedure for the detection of DNA methylation in colorectal cancer. *Oncology Reports*, 13:325-328, 2005a.
- Anacleto C, Leopoldino AM, Rossi B, Soares FA, Lopes A, Rocha JC, Caballero O, Camargo AA, Simpson AJ, Pena SD. Colorectal cancer "methylator phenotype": fact or artifact? *Neoplasia*,. 7(4): 331-5, 2005b.
- Anderson CA, Jorgensen AL, Deeb S, McLerran D, Beresford SA, Motulsky AG. Equal proportion of adult male and female homozygous for the 677C --> T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism. *Am J Med Genet* ; 134(1): 97-9, 2005.
- Arruda VR, Siqueira LH, Goncalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. Prevalence of the mutation C677 --> T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet.*, 78(4):332-5, 1998.
- Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SDJ The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Annals of Human Genetics*, 70:1-8, 2006.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, 72:141-96, 1998.
- Beilby J, Ingram D, Hahnel R, Rossi E. Reduced breast cancer risk with increasing serum folate in a case-control study of the C677T genotype of the metilenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur.J. Câncer*, 40: 1250-54, 2004.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, p94, 2004.
- Brasil. Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil para 2006. INCA, 2006: [www.inca.gov.br/estimativas/2006](http://www.inca.gov.br/estimativas/2006).
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for

- the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58, 5248-57, 1998.
- Campbell IG, Baxter SW, Eccles DM, Choong DY. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 4: R 4, 2002.
- Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, et al. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluoracil. *Gastroenterology*, 117: 123-131, 1999.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am. J. Hum. Genet.*, 68(1):281-6, 2001.
- Chang EY, Dorsey PB, Johnson N, Lee R, Walts D, Johnson W, Anadiotis G, Kiser K, Frankhouse J. A prospective analysis of microsatellite instability as a molecular marker in colorectal cancer. *The American Journal of Surgery*, 191: 646-651, 2006.
- Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol. Genet.*, 10(5): 433-43, 2001.
- Cheng P, Schmutte C, Cofer KF, Felix JC, Yu MC, Dubeau L. Alterations in DNA methylation are early, but not initial, events in ovarian tumorigenesis. *Br. J. Cancer*, 75(3):396-402, 1997.
- Chiuve SE, Giovannucci EL, Hankinson SE et al. Alcohol intake and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism modify the relation of folate intake to plasma homocysteine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 82: 155-62, 2005.
- Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res.*, 15;27(16): e12, 1999.
- Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet*, 340(8820):626-30, 1992.
- Couto FD, Adorno EV, Menezes JF, Neto JPM, Rêgo MAV, Reis MG, Gonçalves MS. C677T polymorphism of the MTHFR gene and variant hemoglobin: a study in newborns from Salvador, Bahia, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 20(2):529-33, 2004.
- Cravo M, Fidalgo P, Pereira AD, Gouveia-Oliveira A, Chaves P, Selhub J, Mason JB, Mira FC, Leitao CN. DNA methylation as an intermediate biomarker in colorectal cancer: modulation by folic acid supplementation. *Eur. J. Cancer Prev.*, 3(6): 473-9, 1994.

- Cravo M. Alcohol, methylenetetrahydrofolate 677C->T genotype, and low folate intake: concurrent causes for hyperhomocysteinemia. *Am. J. Clin. Nutr.*, 82(1):3-4, 2005.
- Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, 366(9499):1784-93, 2005.
- De Bustros A, Nelkin BD, Silverman A, Ehrlich G, Poiesz B, Baylin SB. The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 85(15):5693-7, 1988.
- de la Vega MJ, Santolaria F, Gonzalez-Reimers E, Alemán MR, Milena A, Martinez-Riera A, Gonzalez-Garcia C. High prevalence of hiperhomocisteinemia in chronic alcoholism: the importance of the thermolabile form of the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Alcohol*, 25: 59-67, 2001.
- Dumitrescu RG, Shields PG. The etiology of alcohol-induced breast cancer. *Alcohol*, 35:213-25, 2005.
- Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J. Cell Mol. Med.*, 9(1):208-21, 2005.
- Eaton AM, Sandler R, Carethers JM, Millikan RC, Galanko J, Keku TO. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677 and 1298 polymorphisms, folate intake, and microsatellite instability in colon cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, (8):2023-9, 2005.
- Efferth T, Volm M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol. Ther.*, 107(2):155-76, 2005
- Ehrlich M, Jiang G, Fiala E, Dome JS, Yu MC, Long TI, Youn B, Sohn OS, Widschwendter M, Tomlinson GE, Chintagumpala M, Champagne M, Parham D, Liang G, Malik K, Laird PW. Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. *Oncogene*, 21(43):6694-702, 2002.
- Ergul E, Sazci A, Canturk NZ. Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer. *Tum. Biol.*, 24: 286-90, 2003.
- Esteller. M; Corn, PG, Baylin, SB; Herman, JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.*, 61: 3225-3229, 2001.
- Esteller M. Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 532:39-49, 2003.
- Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*;45: 629-56, 2005.

- Feinberg, A. P., Volgestein, B. Hipomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111:47-54, 1983.
- Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin. Cancer Biol.*, 14(6):427-32, 2004.
- Fenech M. Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances. *Nutr. Res. Reviews*, 16:109-122, 2003.
- Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet*, 343(8899):692-5, 1994.
- Freitas RN, Brasileiro-Filho G, Silva ME, Pena SD. Bracken fern-induced malignant tumors in rats: absence of mutations in p53, H-ras and K-ras and no microsatellite instability. *Mutat. Res.*, 499: 189-196, 2002.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.*, 10(1): 111-3, 1995.
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, 300(5618):489-92, 2003.
- Gerhard DS, Nguyen LT, Zhang ZY, Borecki IB, Coleman BI, Rader JS. A relationship between methylenetetrahydrofolate reductase variants and the development of invasive cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 90(3): 560-5, 2003.
- Gershoni-Baruch R, Dagan E, Israeli D, Kasinetz L, Kadouri E, Friedman E. Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women. *Eur. J. Cancer*, 6(18): 2313-6, 2000.
- Giovannucci E. Alcohol, one –carbon metabolism, and colorectal cancer: recent insights from molecular studies. *J. Nutr.*, 134:2475S-81S, 2004.
- Goelz, SE; Vogestein, B; Hamilton, SR, Feinberg, AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*, 228; 187-90, 1985.
- Going, JJ; Gusterson, BA. Molecular Pathology and future developments. *Eur. J. Cancer*, 35: 1895-1904, 1999.
- Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Wilkens LR, Bertram CC, Killeen J, Le Marchand L, Selhub J, Murphy S, Donlon TA. Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and dietary

- folate with the risk of cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10(12): 1275-80, 2001.
- Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat. Struct. Biol.*, 4:359-65, 1999.
- Guo SW, EA Thompson. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372, 1992.
- Hak EA, Polderman KH, Westendorp ICD, Jackobs C, Hofman A, Witteman JCM, Stehouwer CDA. Increased plasma homocysteine after menopause. *Atherosclerosis*, 149: 163-68, 2000.
- Heijmans BT, Boer JM, Suchiman HE, Cornelisse CJ, Westendorp RG, Kromhout D, Feskens EJ, Slagboom PE. A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Res.*, 63(6):1249-53, 2003.
- Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res.*, 48: 246-53, 1988.
- Herman JG, Baylin SB. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 249:35-54, 2000.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 2042-2054, 2003.
- Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*, 38(1):103-13, 2001.
- Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat. Genet.*, 4:536-40, 1994.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ, and American Cancer Society. Cancer statistics 2004. *CA Cancer J. Clin.*, 54: 8-29, 2004.
- Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.*, 2:163-7, 1999.
- Kalemi TG, Lambropoulos AF, Gueorguiev M, Chrisafi, Papazisis KT, Kotsis A. The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. *Cancer Lett.*, 222: 57-65, 2005.

- Kang S, Kim JW, Kang GH, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP. Polymorphism in folate- and methionine-metabolizing enzyme and aberrant CpG island hypermethylation in uterine cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 96(1): 173-80, 2005.
- Kawakami K, Ruskiewicz A, Bennett G, Moore J, Watanabe G, Iacopetta B. The folate pool in colorectal cancers is associated with DNA hypermethylation and with a polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin. Cancer Res.*, 9(16 Pt 1): 5860-5, 2003.
- Kim, YI. 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and pharmacogenetics: a new role of single nucleotide polymorphisms in folate metabolic pathway in human health and disease. *Nutr. Rev.*, 63(11): 398-407, 2005.
- Kimura M, Umegaki K, Higuchi M, Thomas P, Fenech M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J Nutr.*, 134(1):48-56, 2004.
- Kluijtmans LA, den Heijer M, Reitsma PH, Heil SG, Blom HJ, Rosendaal FR. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase and factor V Leiden in the risk of deep-vein thrombosis. *Thromb. Haemost.*, 79(2):254-8, 1998.
- Kono S, Chen K. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma. *Cancer Sci.*, 96(9):535-42, 2005.
- Lacroix M, Toillon RA, Leclercq. Stable "portrait" of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. *Endocrine-related cancer*, 11: 497-522, 2004.
- Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jaenisch R. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell*, 81(2):197-205, 1995.
- Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nature Rev. Cancer*, 3: 601-14, 2003.
- Langsenlehner U, Kripp P, Renner W, Yasdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, Paulweber B, Weitzer W, Samonigg H. The common 677C>T gene polymorphism of ethylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.*, 81: 169-72, 2003.
- Lawes DA, SenGupta S, Boulos PB. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 3:201-12, 2003.

- Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Henderson BE. The MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14(5): 1198-203, 2005.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 94:2545-50, 1997.
- Lin J, Spitz M, Wang Y, Schabath MB, Gorlov IP, Hernandez LM, Pillow P, Grossman HB, Wu X. Polymorphisms of folate metabolic genes and susceptibility to bladder cancer: a case-control study. *Carcinogenesis*, 25 (9): 1639-47, 2004.
- Liu L, Wylie RC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection. *Mech. Ageing Dev.*, 124(10-12): 989-98, 2003.
- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 348(10):919-32, 2003.
- Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.*, 57(6):1098-102, 1997.
- Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Gravel R, Rozen R. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 8(9): 825-9, 1999.
- Madsen JS, Kristensen SR, Klitgaard NA, Bladbjerg EM, Abrahamsen B, Stilgren L, Jespersen J. Effect of long-term hormone replacement therapy on plasma homocysteine in post menopausal women: A randomized controlled study. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 187(1): 33-39, 2002.
- Mason JB, Choi SW. Effects of alcohol on folate metabolism: implications for carcinogenesis. *Alcohol*, 35(3):235-41, 2005.
- Miller SA, Dykes DD, Poleski HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. *Nucleic Acids Res.*, 16: 1215, 1988.
- O'Callaghan P, Meleady R, Fitzgerald T, Graham I. Smoking and plasma homocysteine. *Eur. Heart J.*, 23(20):1580-6, 2002.
- Offit K. Are BRCA1- and BRCA2-associated breast cancers different? *J. Clin. Oncol.*, 18(21 Suppl):104S-6S, 2000.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 100(1): 177-82, 2003.

- Parrela P, Poeta ML, Gallo AP, Prencipe M, Scintu M, Apicella A, Rossiello R, Liguoro G, Seripa D, Gravina C, Rabiti C, Rinaldi M, Nicol T, Tommasi S, Paradiso A, Schitulli F, Altomare V, Fazio VM. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. *Clin. Cancer Res.*, 10:5349-54, 2004.
- Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, Sanchez-Cespedes M, Herman J G, Esteller M. Germ-line variants in methyl group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res.*, 62: 4519-24, 2002.
- Plaschke J, Schwanebeck U, Pistorius S, Saeger HD, Schackert HK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of sporadic and hereditary colorectal cancer with or without microsatellite instability. *Cancer Lett.*, 191(2): 179-85, 2003.
- Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Richards, EW, Krumdieck CL. Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B12. *Am. J. Clin. Nutr.*, 60: 559-66, 1994.
- Piyathilake CJ, Macaluso M, Johanning GL, Whiteside M, Heimbürger DC, Giuliano A. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res.*, 20(3A): 1751-7, 2000.
- Pogribny, I. P., Miller, B. J., and James, S. J. Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat. *Cancer Lett.*, 115:31-8, 1997.
- Poschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol.*, 39(3):155-65, 2004.
- Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Leather AJ, Appleby P, Gout S, Terry C, Emery PW, Sanders TA. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology*, 124(5): 1240-8, 2003.
- Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N. Engl. J. Med.*, 348:919-32, 2003.
- Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat. Rev. Genet.*, 1(1): 11-9, 2000.
- Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*, 20: 3139-55, 2001.

- Robien K, Ulrich CM. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *Am. J. Epidemiol.*, 157(7):571-82, 2003.
- Robien K, Boynton A, Ulrich CM. Pharmacogenetics of folate-related drug targets in cancer treatment. *Pharmacogenomics*. 2005 Oct;6(7):673-89.
- Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, Seligsohn U. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *Am. J. Hum. Genet.*, 70(3): 758-62, 2002.
- Rozen R, Shaw G. Decreased proportion of female newborn infants homozygous for the 677 C→T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase. *Am. J. Hum. Genet.*, 83: 142-43, 2002.
- Santos FR, Pena SD, Epplen JT. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genet.*, 90(6): 655-56, 1993.
- Schmitt FC, Soares R, Gobbi H, Milanezzi F, Santos-Silva F, Cirnes L, Costa C, Seruca R. Microsatellite instability in medullary breast carcinomas. *Int. J. Cancer*, 82 (5): 644-47, 1999.
- Shannon B, Gnanasampanthan S, Beilby J, Iacopetta B. A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut*, 50(4): 520-4, 2002.
- Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am. J. Hum. Genet.*, 62(5):1258-60, 1998.
- Semenza JC, Delfino RJ, Ziogas A, Anton-Culver H. Breast cancer risk and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism. *Breast Cancer Res. Treat.*, 77(3): 217-23, 2003.
- Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*;159(5): 423-43, 2004.
- Shen H, Xu Y, Zheng Y, Qian Y, Yu R, Qin Y, Wang X, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. *Int. J. Cancer.*, 95(5): 332-6, 2001.
- Shi Q, Wang LE, Bondy ML, Brewster A, Singletary SE, Wei Q. Reduced DNA repair of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced adducts and common XPD

- polymorphisms in breast cancer patients. *Carcinogenesis*, 25(9):1695-700, 2004.
- Shi Q, Zhang Z, Li G, Pillow P, Hernandez LM, Spitz M, Wei Q. Sex differences in risk of lung cancer associated with methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14(6): 1477-84, 2005.
- Shrubsole MJ, Shu XO, Ruan ZX, Cai Q, Cai H, Niu Q Gao YT, Zheng W. MTHFR genotypes and breast cancer survival after surgery and chemotherapy: a report from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res. Treat.*, 91: 73-79, 2005.
- Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA*, 286(17):2143-51, 2001.
- Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 96(22): 12810-5, 1999.
- Somekawa Y, Kobayashi K, Tomura S, Aso T, Hamagushi H. Effects of hormone replacement therapy and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism on plasma folate and homocysteine levels in postmenopausal Japanese women. *Fertil Steril.*, 77:481-85, 2002.
- Song C, Xing D, Tan W, Wei Q, Lin D. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res.*, 61(8):3272-5, 2001.
- Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 9(8):849-53, 2000.
- Stewart SL, King JB, Thompson TD, Friedman C, Wingo PA. Cancer mortality surveillance--United States, 1990-2000. *MMWR Surveill. Summ.*, 53(3):1-108, 2004.
- Sugimura T, Ushijima T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 462(2-3):235-46, 2000.
- Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA demethylation and cancer: therapeutic implications. *Cancer Lett.*, 211(2): 133-43, 2004.

- Tavassoli F.A., Devilee P (Eds.). World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumor of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon, 2003.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 260: 816-9, 1993.
- Thomas DC, Umar A, Kunkel TA. Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer. *Mutat. Res.*, 350(1):201-5, 1996.
- Toffoli G, Veronesi A, Boiocchi M, Crivellari D. MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with ciclofosphamide, methotrexate, and fluorouracil. *Ann. Oncol.*, 11:373-75, 2000.
- Toffoli G, Gafa R, Russo A, Lanza G, Dolcetti R, Sartor F, Libra M, Viel A, Boiocchi M. Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-->T polymorphism and risk of proximal colon cancer in north Italy. *Clin. Cancer Res.*, 9(2): 743-8, 2003.
- van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut*, 51(6):797-802, 2002.
- Verma M, Srivastava S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol.*, 3(12): 755-63, 2002.
- Weinberg RA. The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol. Ther.*, 2(2):105-10, 1996.
- Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol. Genet. Metab.*, 64(3): 169-72, 1998.
- Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, Lopez MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martinez-Frias ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J. Med. Genet.*, 40(8):619-25, 2003.
- World Health Organization. Global Status Report on alcohol 2004. Geneva: Department of Mental Health and Substance Abuse, 2004.
- Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 98(26): 14853-8, 2001.