

**Helvia Nascimento**

Influência dos Polimorfismos dos Alelos do Sistema da Glutathione  
S-Transferase Mu 1 (GSTM1) e Theta 1 (GSTT1) e do Polimorfismo D104N  
do Gene COL18A1 na Susceptibilidade  
ao Adenocarcinoma Colorretal Esporádico

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas, da aluna HELVIA NASCIMENTO.*

30/07/02



*Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima  
Orientadora*

Campinas

2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

---

**Helvia Nascimento**

**Influência dos Polimorfismos dos Alelos do Sistema da Glutathione S-Transferase  
Mu 1 (*GSTM1*) e Theta 1 (*GSTT1*) e do Polimorfismo D104N do Gene *COL18A1* na  
Susceptibilidade ao Adenocarcinoma Colorretal Esporádico**

Tese apresentada à Coordenadoria do Curso de  
Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção  
do **Título de Mestre** em Clínica Médica

**Orientadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**

Campinas

2002

ii

UNIDADE Be  
Nº CHAMADA UNICAMP  
N171  
V EX  
TOMBO BCI 51494  
PROC 16.837102  
C DX  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 13/11/02  
Nº CPD

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

CM00176449-5

BIB ID 267018

N171

Nascimento, Helvia

Influência dos polimorfismos dos alelos do sistema da glutathione S-transferase Mu 1 (*GSTM1*) e Theta 1 (*GSTT1*) e do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* na susceptibilidade ao adenocarcinoma colorretal esporádico / Helvia Nascimento. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientadores : Carmen Silvia Passos Lima, Fernando Ferreira Costa  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. \* Susceptibilidade à doença. 2. \* Glutathione Transferase – efeitos de drogas. 3. \* Glutathione Transferase. 4. Polimorfismo (Genética). I. Carmen Silvia Passos Lima. II. Fernando Ferreira Costa. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

**Aluno(a):** *HELVIA NASCIMENTO*

---

**Orientador(a):** *Profa.Dra. CARMEN SILVIA PASSOS LIMA*

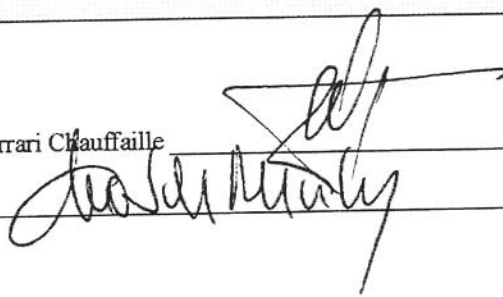


---

**Membros:**

Professora Doutora Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chaffaille

Professor Doutor Cláudio Sady Rodrigues Coy



---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data:** 30/07/2002

---

200264480



"Não há sorte, destino ou fado que possa subjugar, embaraçar ou controlar a firme resolução de uma alma determinada"

Ella Wheeler Wilcox

À **Prof.<sup>a</sup> Dra. Carmen Silvia Passos Lima**, pela orientação, apoio e amizade, sem os quais eu não teria terminado minha dissertação.

Ao **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa** pelo apoio através da cessão de materiais e do laboratório, essenciais para o desenvolvimento desse projeto.

Ao **Dr. Cláudio Coy, Dr. Ricardo Góes, Dr. Fagundes** e residentes do departamento de Proctologia, pela enorme ajuda na obtenção das amostras dos pacientes e na compreensão de tudo o que fosse relacionado à doença.

À **Dra. Ilka Boin**, do departamento de Gastrocirurgia, pela ajuda no projeto inicial e na obtenção de amostras.

À **Ana Lúcia**, enfermeira do Gastrocentro, pelo esforço em conseguir amostras de controles.

Ao **Dr. Paulo Pizão**, do departamento de Oncologia Clínica, e às enfermeiras, pela ajuda fundamental na obtenção das amostras necessárias ao fechamento da casuística.

Aos estatísticos **Cleide, Andréa e Roberto**, pela paciência e dedicação nas análises dos dados referentes aos nossos resultados.

À **Lena**, à **Manoela** e ao **Anderson** e à **Flávia**, do Laboratório de Biologia Molecular, pela ajuda e amizade inestimáveis, fundamentais no desenvolvimento da parte prática do meu trabalho.

Ao **Márcio**, à **Teca**, à **Silvana** e à **Marlene**, pela triagem, identificação e coleta de sangue dos controles.

À **Sandrinha** e ao **Ricardo** pelo apoio computacional.

Aos meus **pais e irmãos**, pelo apoio incondicional sem o qual eu não teria chegado até aqui.

Ao **Julio**, pela paciência e companheirismo que me deram força para ir até o final.

Aos meus **amigos**, pela compreensão, pela amizade e pela torcida.

Ao meu **Anjo**, por cuidar de mim e me estimular sempre.

E, principalmente, a **Deus**, por me proteger e estar constantemente ao meu lado.

**Muito obrigada a todos vocês!**

**A realização deste estudo contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**

	PÁG
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xiii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xiv</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1. Considerações gerais.....	16
2. Aspectos clínicos.....	16
3. Aspectos genéticos e ambientais .....	18
3.1. Aspectos genéticos.....	18
3.1.1. Sistema da glutathione S-transferase.....	19
3.1.2. Endostatina.....	21
3.2. Aspectos ambientais.....	23
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
1. Avaliação clínica .....	28
2. Análise molecular dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> e <i>COL18A1</i> .....	33
2.1. Extração do DNA a partir dos leucócitos .....	33
2.2. Identificação dos polimorfismos dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....	33
2.3. Identificação do polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i> .....	34
3. Aspectos éticos.....	35
4. Análise estatística .....	36

	PÁG
<b>RESULTADOS</b> .....	37
1. Aspectos clínicos.....	38
2. Análise molecular dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....	40
2.1. Polimorfismos gênicos em pacientes e controles .....	40
2.2. Polimorfismos gênicos em pacientes estratificados por aspectos clínicos .....	43
2.3. Polimorfismos gênicos em pacientes estratificados por aspectos anátomo-patológicos do tumor .....	44
3. Análise molecular do gene <i>COL18A1</i> .....	46
3.1. Polimorfismo D104N em pacientes e controles .....	46
3.2. Polimorfismo D104N em pacientes estratificados por aspectos clínicos.....	49
3.3. Polimorfismo D104N em pacientes estratificados por aspectos anátomo-patológicos do tumor.....	50
<b>DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	65
<b>ANEXOS</b> .....	80

<b>CC</b>	Câncer colorretal
<b>CCE</b>	Câncer colorretal esporádico
<b>GST</b>	Glutathione S-transferase
<b>GSTM1</b>	Gene mu 1 do sistema da glutathione S-transferase
<b>GSTT1</b>	Gene theta 1 do sistema da glutathione S-transferase
<b>kD</b>	Kilodaltons
<b>kb</b>	Kilobases
<b>D104N</b>	Polimorfismo do gene <i>COL18A1</i>
<b>COL18A1</b>	Gene codificador do colágeno XVIII
<b>ACE</b>	Adenocarcinoma colorretal esporádico
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>μL</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>ng</b>	Nanograma
<b>mM</b>	Milimolar
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>OR</b>	Razão das chances
<b>IC</b>	Intervalo de confiança

<b>Figura 1.</b>	Possibilidades da extensão de acometimento do câncer colorretal em parede do cólon e órgãos ou tecidos adjacentes .....	28
<b>Figura 2.</b>	Polimorfismos dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico.....	40
<b>Figura 3.</b>	Polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i> em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico.....	46

	PÁG
<b>Tabela 1.</b> Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer colorretal .....	29
<b>Tabela 2.</b> Grupos de estadiamento e características TNM do câncer colorretal.....	30
<b>Tabela 3.</b> Critérios de classificação do sistema de estadiamento de Astler-Coller do câncer colorretal .....	30
<b>Tabela 4.</b> Distribuições dos 102 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico de acordo com a idade, o sexo, a raça e o hábito de fumar.....	36
<b>Tabela 5.</b> Distribuições dos 102 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico de acordo com a localização, o estadio e a diferenciação do tumor .....	37
<b>Tabela 6.</b> Frequências das deleções homozigóticas dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico e controles.....	39
<b>Tabela 7.</b> Frequências das deleções homozigóticas dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por aspectos clínicos.....	41
<b>Tabela 8.</b> Frequências das deleções homozigóticas dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por aspectos anátomo-patológicos do tumor.....	43
<b>Tabela 9.</b> Frequências do polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i> em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico e controles.....	44
<b>Tabela 10.</b> Frequências do polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i> em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por aspectos clínicos .....	47
<b>Tabela 11.</b> Frequências do polimorfismo D104N do gene <i>COL18A1</i> em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por aspectos anátomo-patológicos do tumor.....	49



As enzimas do sistema da glutathione S-transferase (GST) mediam a exposição a agentes citotóxicos e genotóxicos e parecem compromissadas com a susceptibilidade ao câncer. Os genes *GSTM1* e *GSTT1* apresentam um genótipo variante, a deleção homozigótica, no qual o gene inteiro está ausente. A associação dos genótipos do GST com o risco de ocorrência do câncer colorretal (CC) não está completamente esclarecida. Por outro lado, uma maior frequência do polimorfismo D104N do gene *COL18A1*, um inibidor da angiogênese, foi observada em pacientes com adenocarcinoma prostático, quando comparados a indivíduos normais, sugerindo que sua presença possa influenciar o desenvolvimento de tumores sólidos dependentes da angiogênese, como o CC. Neste estudo, nós testamos se a deleção homozigótica dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e o polimorfismo D104N alteram o risco de adenocarcinoma colorretal esporádico (ACE). Para cumprir tais objetivos, o DNA genômico de 102 pacientes com ACE e 300 controles foi analisado por meio da reação em cadeia da polimerase e digestão enzimática. As frequências da deleção dos genes *GSTM1* (49,9%) e *GSTT1* (16,6%) em pacientes foram similares às aquelas observadas em controles (44,6 e 17,3%, respectivamente). Não foram também observadas diferenças significativas entre as frequências da deleção combinada dos genes em pacientes e controles (8,8% vs 8,0%). A observação de riscos de 1,03 (IC 95%: 0,96-1,10) e 1,08 (IC 95%: 0,99-1,18) associados com as deleções isoladas dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, respectivamente ( $P=0,45$  e  $P=0,08$ ), e de 1,18 (IC 95%: 0,47-2,90) associado com a deleção combinada dos genes ( $P=0,74$ ), sugere que a ausência hereditária desta via de detoxificação de carcinógenos não teve importância na determinação do ACE em nossos casos. Ainda, as frequências do polimorfismo D104N foram similares em pacientes e controles (15,7% e 14,0%, respectivamente;  $P=0,80$ ). O risco de 0,98 (IC 95%: 0,89-1,08), associado com este polimorfismo do gene *COL18A1*, sugere que ele também não influenciou a susceptibilidade ao ACE em nossos casos. Entretanto, a deleção do gene *GSTT1* foi mais comum em pacientes com idade menor do que 60 anos, quando comparados àqueles com idade maior do que 60 anos (28,8% vs 4,0%, respectivamente;  $P=0,001$ ), sugerindo que este genótipo possa ter influenciado a idade de manifestação da doença em nossa amostra.

It has been postulated that the glutathione S-transferase (GST) enzymes mediate the exposure to cytotoxic and genotoxic agents and may be involved in susceptibility to cancer. Both GST mu 1 (*GSTM1*) and GST theta 1 (*GSTT1*) genes have a null variant allele, in which the entire gene is absent. The association of the GST null genotype and the risk of developing colorectal cancer (CC) is not yet fully clarified. On the other hand, higher frequency of the polymorphism D104N of the gene *COL18A1*, an inhibitor of angiogenesis, was seen in prostatic adenocarcinoma in comparison with controls, suggesting that the gene abnormality may influence the developing of solid tumours dependent of angiogenesis, such as CC. In this study, we tested whether the null genotypes for *GSTM1* and *GSTT1* genes and D104N mutation altered the risk for the sporadic colorectal adenocarcinoma (SCA). For this purpose, genomic DNA from 102 SCA patients and 300 controls were analysed by polymerase chain reaction and restriction digestion. The frequencies of *GSTM1* (49.9%) and *GSTT1* (16.6%) null genotypes in patients were similar to those observed in controls (44.6 and 17.3%, respectively). No significant differences in the null combined genotype frequencies were also found between patients and controls (8.8% vs 8.0%). The observation of a 1.03 (95%CI: 0.96-1.10) and 1.08-fold (95%CI: 0.99-1.18) risk associated with the *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes, respectively ( $P=0.45$  and  $P=0.08$ ) and a 1.18-fold (95%CI: 0.47-2.90) risk associated with the combined null genotype ( $P=0.74$ ), suggests that the inherited absence of this carcinogen detoxification pathway was an unimportant determinant of the SCA in our cases. In addition, the frequencies of D104N polymorphism were also similar in patients and controls (15.7% and 14.0%, respectively;  $P=0.80$ ). A 0.98-fold (95%CI: 0.89-1.08) risk associated with this *COL18A1* gene polymorphism suggests that it did not influence the susceptibility for SCA in our cases. However, *GSTT1* null genotype was more common in patients who were diagnosed before the age of 60 years than in those who were diagnosed at an older age (28.8% vs 4.0%, respectively;  $P=0.001$ ), suggesting that this genotype could have influenced the age of onset of the disease in our cases.

## ***INTRODUÇÃO***

## **1. Considerações gerais**

Acredita-se que o câncer humano ocorra devido a anormalidades que conferem, a algumas células, vantagens que são transmitidas às células filhas, dando origem a um clone celular que escapa aos controles de crescimento e diferenciação (NAMBA et al., 1990). Embora cerca de 350 bilhões de células se dividam no organismo adulto normal todos os dias, o aparecimento de um tumor é relativamente raro, devido aos mecanismos fisiológicos de reparo do ácido desoxirribonucléico dos núcleos celulares (WARD, 1997).

O câncer colorretal (CC) é um dos principais problemas de saúde do mundo ocidental. Constitui a maior causa de óbito atribuída a neoplasia, após os cânceres de pulmão e de mama (WINAWER & SHERLOCK, 1983; HOULSTON & TOMLINSON, 2001).

A incidência do CC nos Estados Unidos da América (EUA) foi de cerca de 50 casos/100.000 habitantes/ano (SCHOTTENFELD, 1995). As incidências do CC para populações negróides e caucasóides da África do Sul foram de 2,2 casos/100.000 habitantes por ano e 18,7 casos/100.000 habitantes/ano, respectivamente (SEGAL et al., 2000). Já a incidência do CC na cidade de Campinas, segundo dados fornecidos pelo Registro de Câncer de Base Populacional de Campinas, para o período de 1991 a 1995, foi de 25,2 casos/100.000 habitantes/ano.

Em nosso conhecimento, não há dados atualizados sobre as incidências da doença nos referidos países.

## **2. Aspectos clínicos**

O CC usualmente se apresenta como um conjunto de sinais e sintomas que incluem a anemia, a dor abdominal, a perda de peso, o sangramento retal e as modificações do hábito intestinal, como a diarreia e a constipação (WAYE, 1980).

Acomete predominantemente indivíduos após os 40 anos de idade, sendo que 90% dos casos ocorre naqueles com idade maior ou igual a 50 anos (PETERS et al.,

1989; SCHOTTENFELD, 1995). O risco para o desenvolvimento do CC aumenta bruscamente a partir dos 50 anos, duplicando a cada década e atingindo o seu máximo entre os 75 e os 80 anos (WINAWER et al., 1985). A idade média de ocorrência da doença, observada em pacientes do hemisfério norte, foi de 60 anos (KATOH et al., 1996; GERTIG et al., 1998).

O câncer de cólon acomete de forma similar indivíduos do sexo masculino e do feminino. Já no câncer de reto, os indivíduos do sexo masculino são mais acometidos do que os do sexo feminino, guardando entre si uma relação de 1,5:1,0 (WINAWER et al., 1985).

Dois principais sistemas de estadiamento do tumor são utilizados para a determinação do prognóstico e da terapêutica adequada a ser administrada a cada paciente, o TNM e o Astler-Coller (FIELDING, 1995).

O sistema TNM considera a extensão do acometimento do tumor na parede do cólon e em tecidos e órgãos adjacentes (T), a identificação da presença ou da ausência de metástases para linfonodos (N) e a identificação da presença ou da ausência de metástases em órgãos à distância (M). Cinco grupos de pacientes podem ser identificados por este sistema (estádios 0, I, II, III e IV) (ZINKIN, 1983; FIELDING, 1995), sendo que as maiores probabilidades de sobrevivência são observadas naqueles com os estádios 0 e I e a menor probabilidade de sobrevivência naqueles com o estádio IV da doença (ZINKIN, 1983; FIELDING, 1995). O sistema de Astler-Coller considera os mesmos parâmetros do sistema TNM (ASTLER & COLLER, 1954; ZINKIN, 1981; FIELDING, 1995).

A despeito dos avanços terapêuticos, apenas cerca de 50% dos pacientes com CC sobrevive por período de cinco anos (BEGG, 1995; COHEN, 1995; HERRERO-JIMENEZ et al., 2000). Como as sobrevivências mais longas são observadas, em geral, em pacientes com doença localizada, o interesse atual está direcionado para os protocolos de detecção precoce do câncer. Entretanto, a baixa aderência dos pacientes aos exames solicitados e os custos elevados dos mesmos impõem a identificação de grupos de alto risco para o desenvolvimento do tumor. Para

estes pacientes, é recomendada a realização rotineira dos exames de identificação precoce da doença, como a colonoscopia e o enema opaco.

### 3. Aspectos genéticos e ambientais

O CC pode ser determinado por fatores genéticos e ambientais (CUNHA, 1980; HARNDEN, 1995; SHIKE, 1995; KINZLER & VOGELSTEIN, 1996; HOULSTON & TOMLINSON, 2001).

#### 3.1. Aspectos genéticos

Anormalidades em oncogenes ou genes supressores tumorais (FEARON et al., 1987; FINLEY et al., 1989; VOGELSTEIN et al., 1989; MELHAM et al., 1992; SIDRANSKY et al., 1992; GUILLEM et al., 1995), a instabilidade de microsátélites (IONOV et al., 1993; GUILLEM et al., 1995) e a desregulação de sinais das vias de transdução (GUILLEM et al., 1995) parecem estar definitivamente associadas à doença.

Anormalidades gênicas de alta penetrância, particularmente as mutações nos genes *adenomatosis polyposis coli* (APC), *mut L homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2* (MLH1) e *mut S homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 2* (MSH2), foram descritas em pacientes com CC familiar (BURT et al., 1990; BURT & GRODEN, 1993; PELTOMAK et al., 1993; BURT, 1995; HOULSTON & TOMLINSON, 2001). Mutações em oncogenes, como o *Harvey ras* (H-ras) e no gene supressor tumoral *P53* e polimorfismos de genes associados com o metabolismo de carcinógenos, como o N-acetil transferase 1 (NAT1), N-acetil transferase 2 (NAT2), glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) e glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1), foram também descritos neste tipo de câncer, mas de forma menos consistente (HOULSTON & TOMLINSON, 2001).

Entretanto, não foi ainda identificado um marcador gênico específico em pacientes com o CC esporádico (CCE).



### 3.1.1. Sistema da glutathione S-transferase

As glutathione S-transferases (GSTs) constituem uma família de enzimas detoxificantes, que fazem parte do mecanismo de proteção contra a carcinogênese química (KETTERER, 1988; HAYES & PULFORD, 1995; CHEN et al., 1996; SLATTERY et al., 2000; COTTON et al., 2000).

Estas enzimas catalisam a conjugação de moléculas eletrofílicas de carcinógenos à glutathione reduzindo-os, quase sempre, a produtos menos tóxicos (CLAPPER et al., 1991; MOORGHEN et al., 1991; HAYES & PULFORD, 1995; CHEN et al., 1996; ZHANG et al., 1999).

As concentrações das GSTs são reguladas por elementos da dieta, pelo hábito de fumar e por variantes hereditárias dos genes que as codificam (SLATTERY et al., 2000).

Alguns vegetais crucíferos, como o brócolis e a couve de bruxelas (LIN et al., 1998), e o café (SLATTERY et al., 2000) foram descritos como indutores da produção das GSTs ou ativadores destas enzimas. Os isotiocianatos e indóis de vegetais crucíferos, hipoteticamente reduzem o risco de ocorrência do câncer atribuído à exposição a carcinógenos por meio da ativação das GSTs. Entretanto, a associação entre o padrão de ingestão de vegetais crucíferos e o risco de ocorrência do CC é inconsistente (COTTON, et al., 2000; SLATTERY et al., 2000). Dois palmitatos encontrados nos grãos de café foram descritos como responsáveis pela associação inversa observada entre o alto consumo de café e a baixa incidência do CC, embora os mecanismos desta associação ainda não tenham sido esclarecidos (SLATTERY et al., 2000).

O tabagismo também foi descrito como um indutor da produção das GSTs (SLATTERY et al., 2000). Este poderia constituir o seu efeito benéfico, pois altos níveis de GSTs parecem necessários para fumantes, para a detoxificação dos carcinógenos provenientes do cigarro (SLATTERY et al., 2000).

Cinco classes de genes codificadores destas proteínas foram identificados em humanos: alpha, mu, pi, sigma e theta (HAYES & PULFORD, 1995).

O gene *GSTM1*, da classe mu, compreende 5,9 kb de DNA genômico, contém 8 éxons e está localizado no braço curto do cromossomo 1, na região 1p13. Já o gene *GSTT1*, da classe theta, compreende 7,6 kb de DNA genômico, contém cinco éxons e está localizado no braço longo do cromossomo 22, na região 22q11.

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são polimórficos em humanos (SMITH et al., 1995) e estão ausentes ou deletados de forma homozigótica em 40-50% e 16-24% das diferentes populações étnicas, respectivamente (SEIDGARD et al., 1988; PEMBLE et al., 1994; WARWICK et al., 1994; HAYES & PULFORD, 1995; NELSON et al., 1995; ARRUDA et al., 1998).

Assim, hipoteticamente, indivíduos com a deleção homozigótica destes genes parecem mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças atribuídas à exposição a carcinógenos.

Os resultados de estudos epidemiológicos prévios indicaram a associação da deleção homozigótica do gene *GSTM1* ao aumento do risco de CC (ZHONG et al., 1993; KATOH et al., 1996) mas, não houve associação significativa deste genótipo com a doença em outros estudos (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; BUTLER et al., 1997; GERTIG et al., 1998; LEE et al., 1998; SLATTERY et al., 1998; ZHANG et al., 1999; SLATTERY et al., 2000; BUTLER et al., 2001; LOKTIONOV et al., 2001; SAADAT & SAADAT, 2001).

A deleção homozigótica do gene *GSTT1* foi associada ao aumento significativo do risco de CC em três estudos (DEAKIN et al., 1996; BUTLER et al., 1997; ZHANG et al., 1999) mas, nenhuma associação significativa deste genótipo com a doença foi obtida em outros estudos (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; KATOH et al., 1996; GERTIG et al., 1998; LEE et al., 1998; BUTLER et al., 2001; LOKTIONOV et al., 2001; SAADAT & SAADAT, 2001).

Ainda, resultados discordantes foram observados na avaliação das associações das deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* com variáveis clínico-patológicas em pacientes com CCE, como a idade de manifestação da doença (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; GUO et al., 1996; GERTIG et al., 1998; SLATTERY et al., 1998; ZHANG et al., 1999; LOKTIONOV et al., 2001), o



sexo (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; SLATTERY et al., 1998; ZHANG et al., 1999; SLATTERY et al., 2000; LOKTIONOV et al., 2001), o tabagismo (KATOH et al., 1996; GERTIG et al., 1998; SLATTERY et al., 1998; LOKTIONOV et al., 2001), a localização do tumor (ZHONG et al., 1993; KATOH et al., 1996; CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; GUO et al., 1996; GERTIG et al., 1998; LEE et al., 1998; SLATTERY et al., 1998; ZHANG et al., 1999; LOKTIONOV et al., 2001), a extensão de acometimento do tumor (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; ZHANG et al., 1999; LOKTIONOV et al., 2001) e o grau de diferenciação do tumor (KATOH et al., 1996; CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; LEE et al., 1998; ZHANG et al., 1999).

Em resumo, os papéis desempenhados pelas deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* no risco de ocorrência do CC e suas associações com aspectos clínicos dos pacientes e anátomo-patológicos do tumor não estão suficientemente estabelecidos (HENGSTLER et al., 1998; COTTON et al., 2000).

### **3.1.2. Endostatina**

A angiogênese, definida como a formação de novos vasos sangüíneos a partir de um endotélio pré-existente, é considerada um passo fundamental para a progressão e o desenvolvimento de metástases de tumores sólidos (FOLKMAN, 1990; HANABAN & FOLKMAN, 1996; SASAKI et al., 1998; FELDMAN et al., 2001b), incluindo o CC (PAPAMICHAEL, 2001; SOKMEN et al., 2001).

O fenômeno é mediado por uma ampla gama de moléculas estimulatórias e inibitórias.

O fator tissular e o fator de crescimento do endotélio vascular foram descritos como importantes estimuladores da angiogênese em CC (FURUDOI et al., 2002; NAKASAKI et al., 2002).

Já a interleucina 2 (BRIVIO et al., 2002), a trombospondina 2 (TOMII et al., 2002), os inibidores da enzima ciclo-oxigenase (MASFERRER, 2001; STACK & DUBOIS, 2001), o TNP-470 (ODA et al., 2001), o interferon alfa (OZAWA et al., 2001) e

a endostatina (YOON et al., 1999; FELDMAN et al., 2001a) foram descritos como inibidores da angiogênese na doença.

Duas evidências indicaram que a endostatina parece agir como um inibidor do desenvolvimento de tumores sólidos. Inicialmente, foi observada a regressão de tumores de mama, de rim e de próstata em camundongos, quando o aumento das concentrações séricas da endostatina foi induzido de forma experimental (YOON et al., 1999; YOKOYAMA et al., 2000; PERLETTI et al. 2000; SCAPPATICCI et al., 2000; IUGHETTI et al., 2001). Uma outra evidência resultou da avaliação de pacientes com a síndrome de Down, os quais apresentaram uma incidência expressivamente menor de tumores sólidos e concentrações séricas de endostatina significativamente maiores do que as observadas em indivíduos normais da população geral (HASLE et al., 2000). Estes resultados indicaram que as concentrações aumentadas da endostatina parecem determinar menor susceptibilidade a tumores sólidos e ainda, a regressão dos mesmos.

Entretanto, concentrações séricas maiores da endostatina foram descritas por FELDMAN et al. (2001a) em pacientes com CC e metástases hepáticas, quando comparados a controles. Os autores observaram que as concentrações séricas da proteína diminuíram após a ressecção dos tumores e aumentaram durante as recidivas da doença, sugerindo que ela fosse induzida pelo próprio tumor. Entretanto, a casuística considerada neste estudo isolado e a amplitude das variações das concentrações séricas da proteína observadas em controles indicaram que este resultado necessita confirmação por estudos adicionais.

Assim, o papel da endostatina na susceptibilidade e na progressão de tumores sólidos em humanos é desconhecido. Não está claro se ela representa parte de um mecanismo de proteção do hospedeiro contra o crescimento do tumor ou se resulta simplesmente da ação de proteases comprometidas com sua produção, por ele secretadas.

A endostatina é constituída por um fragmento de 20 kD, produto da clivagem do domínio carboxi-terminal do colágeno XVIII (NC1) (O'REILLY et al., 1997; SASAKI et al., 1998; DHANABAL et al., 1999; DIXELIUS et al., 2000). O colágeno XVIII, por sua vez, é produzido principalmente por hepatócitos, por ação do gene *COL18A1*. Este

gene compreende aproximadamente 58,6 kb de DNA genômico, contém 43 éxons e está localizado no braço longo do cromossomo 21, na região 21q22.3.

Recentemente, como resultado de uma análise sistemática do gene *COL18A1*, foi identificado um polimorfismo, o D104N, localizado no éxon 42 do gene, a região codificadora da endostatina (VISA KORPI, 1999). IUGHETTI et al. (2001) descreveram a associação deste polimorfismo com um risco expressivamente maior de ocorrência do adenocarcinoma de próstata. Observaram ainda, que as concentrações séricas da endostatina em pacientes com o câncer e controles foram similares e postularam que anormalidades funcionais da proteína poderiam estar presentes.

Em nosso conhecimento, não há estudos sobre a influência do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* na susceptibilidade ao CC, ou avaliações sobre as associações deste genótipo com aspectos clínicos e anátomo-patológicos do tumor em pacientes com a doença.

### **3.2. Aspectos ambientais**

Alguns fatores ambientais parecem agir como carcinógenos diretamente ou aumentar as frequências de mutações somáticas, predispondo ou determinando o aparecimento da neoplasia (HARN DEN, 1995; HILL, 1995; SCHOTTENFELD, 1995; SHIKE, 1995). Embora, o CC não seja visto como uma doença ocupacional, o aumento de sua ocorrência foi observado em trabalhadores expostos a metais, plásticos, fibras de vidro e solventes (SCHOTTENFELD et al., 1980; SWANSON et al., 1985), sugerindo que a exposição a estes agentes possa influenciar a origem da doença.

Por outro lado, existe uma associação óbvia entre o padrão da dieta e o CC, ainda que não tenha sido identificado um carcinógeno específico que justifique completamente esta relação (TROCK et al., 1990; WILLETT et al., 1990; SHIKE, 1995). É possível que os próprios alimentos constituam uma fonte de substratos que possa ser metabolizada por bactérias do cólon, a substâncias carcinogênicas ou mutagênicas (ARIES et al., 1969; HILL et al., 1975; HILL, 1989; HILL, 1995) ou ainda, que possa ser ativada a substâncias carcinogênicas ou mutagênicas, por enzimas presentes na

mucosa colônica (DE WAZIERS et al., 1991). Dentre estes substratos estão os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como o benzopireno, produzidos, entre outras formas, pela exposição de carnes a temperaturas de pirólise durante o cozimento (SCHIFFMAN, 1990; GERHARDSSON, 1991). Estes podem causar danos ao DNA de células do cólon humano (ALEXANDROV et al., 1996) e são metabolizados pelas GSTs (HAYES & PULFORD, 1995).

Outro importante responsável pela exposição ambiental aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos é o cigarro (ALEXANDROV et al., 1996; COTTON, et al., 2000), que parece estar associado ao aumento do risco de CC, após um período de indução relativamente longo (KNEKT et al., 1998) ou de número considerável de cigarros consumidos por dia (SLATTERY et al., 1998).

Até o momento, não foram observadas associações consistentes entre o padrão da dieta e o tabagismo e as deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* na susceptibilidade ao CC (SLATTERY et al., 1998; COTTON, et al., 2000).

Vale comentar que a origem étnica da população brasileira é altamente heterogênea, composta por indígenas e imigrantes da Europa, África e Ásia (ARRUDA et al., 1998; ALVES-SILVA et al., 2000; CARVALHO-SILVA et al., 2001), e que os estudos sobre a influência dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* no risco de ocorrência do CC foram realizados apenas em populações caucasóides e asiáticas.

Vale ainda comentar que as neoplasias constituem a segunda causa de óbito na região sudeste do Brasil (DUNCAN et al., 1992) e que doenças relacionadas à exposição ocupacional a agentes químicos foram descritas em pacientes desta área, de forma aparentemente mais freqüente do que em outras áreas brasileiras (LORAND et al., 1984; AUGUSTO et al., 1987; RUIZ et al., 1994; QUEIROZ et al., 1997).

Frente ao exposto, nos pareceu interessante a avaliação da influência dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* do sistema da glutathione S-transferase e do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* no risco de ocorrência do CC, em uma população mista, aparentemente mais exposta a carcinógenos e com incidência elevada de neoplasias.

## ***OBJETIVOS***

---

Foram avaliados um grupo de pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal esporádico (ACE) e um grupo de indivíduos normais, que serviram como controles, tendo como objetivos:

- Determinar as frequências de ocorrência das deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* do sistema da glutathione S-transferase em cada grupo de indivíduos,
- Verificar se as deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* influenciaram o risco de ocorrência do ACE,
- Verificar se as deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* estiveram associadas à idade, ao sexo, à raça, ao hábito de fumar e à localização, ao estadio e ao grau de diferenciação do tumor de pacientes com ACE,
- Determinar as frequências de ocorrência do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* em cada grupo de indivíduos,
- Verificar se o polimorfismo D104N influenciou o risco de ocorrência do ACE e,
- Verificar se o polimorfismo D104N esteve associado à idade, ao sexo, à raça, ao hábito de fumar e à localização, ao estadio e ao grau de diferenciação do tumor de pacientes com ACE.

## ***CASUÍSTICA E MÉTODOS***

---

Foram estudados todos os pacientes com ACE atendidos, por ocasião do diagnóstico ou durante o seguimento clínico, no ambulatório de Proctologia, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, no período de 18 de agosto de 1999 a 10 de agosto de 2001. Foram excluídos da casuística os pacientes que apresentaram polipose familiar, síndrome de Lynch, doenças inflamatórias intestinais, antecedente familiar de CC e aqueles que não aceitaram participar do estudo proposto.

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

## **1. Avaliação clínica**

Os dados relativos à identificação, à idade, ao sexo, à raça e os exames laboratoriais necessários ao diagnóstico, à determinação do tipo histológico, do grau de diferenciação e do estadio do tumor, foram obtidos dos prontuários de cada paciente.

Foram considerados tabagistas os pacientes que mantiveram o hábito de fumar até o momento do diagnóstico do ACE ou que pararam de fumar menos de cinco anos antes. Foram considerados não tabagistas aqueles que nunca fumaram e ex-tabagistas aqueles que mantiveram o hábito de fumar até, no máximo, cinco anos antes do diagnóstico do ACE, de acordo com o proposto por FREEDMAN et al. (1996).

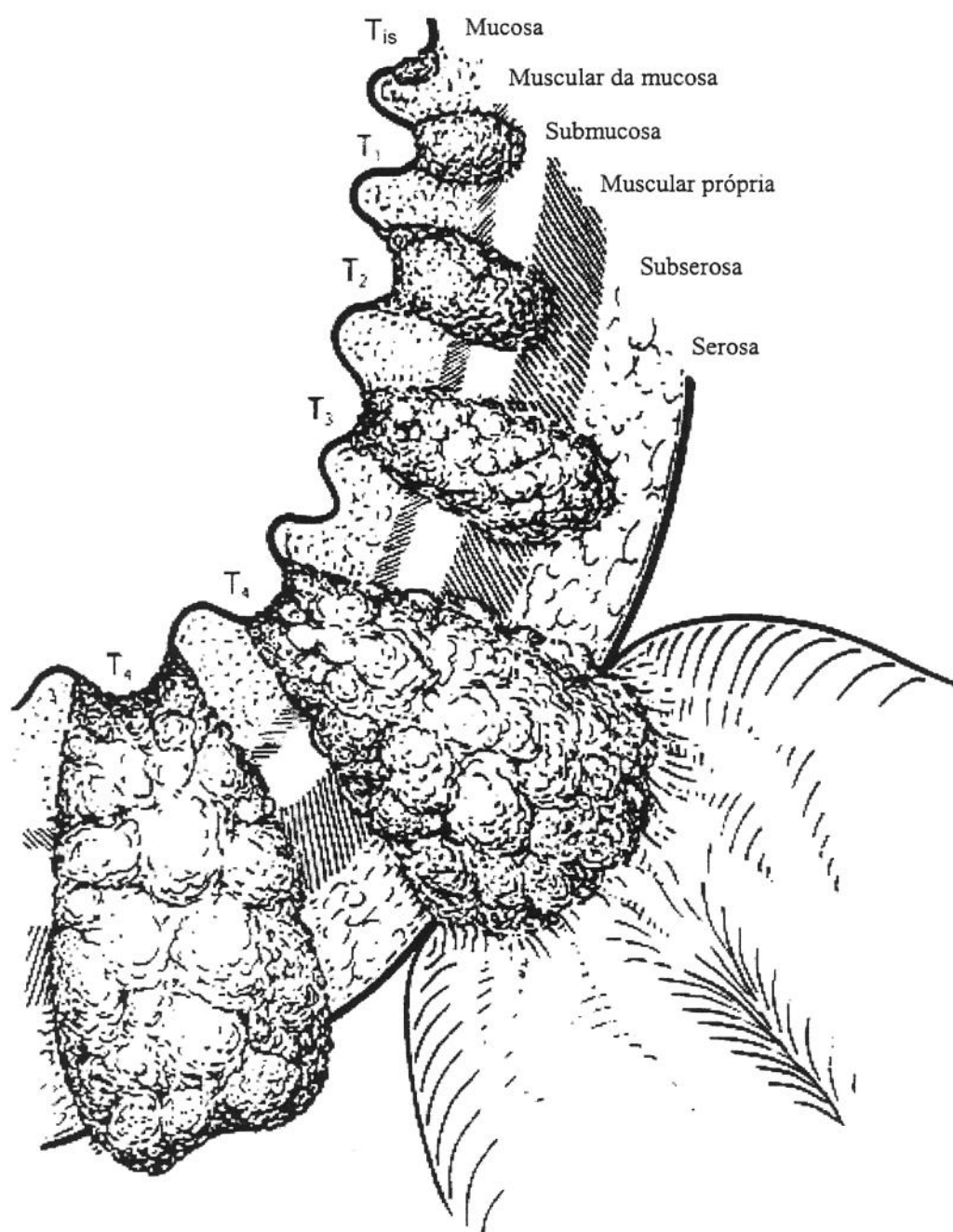
O diagnóstico do ACE foi realizado em cortes histológicos de fragmentos do tumor incluídos em parafina e corados por hematoxilina e eosina e a classificação do grau de diferenciação do tumor foi realizada de acordo com os critérios propostos por BRODERS (1925).

Foi considerada a localização do tumor descrita no exame anátomo-patológico da peça cirúrgica. Foram considerados como proximais os tumores localizados em



cólon ascendente, transversal ou descendente, e como distais os localizados em sigmóide ou reto.

O estadiamento do tumor foi realizado com base nos resultados obtidos do exame histológico da peça cirúrgica, da ultra-sonografia e da tomografia computadorizada do abdome e pelve, do raio X de tórax e dos achados intra-operatórios, de acordo com o proposto por ZINKIN (1983) e ASTLER & COLLER (1954) para os sistemas TNM (Figura 1, Tabela 1, Tabela 2) e Astler-Coller (Tabela 3), respectivamente.



**Figura 1.** Possibilidades da extensão de acometimento do câncer colorretal em parede do cólon e órgãos ou tecidos adjacentes

**Tabela 1.** Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer colorretal

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

**Tabela 2.** Grupos de estadiamento e características TNM do câncer colorretal

Estadio	Código
Estadio 0	$pT_{is}, pN_0, M_0$
Estadio I	$pT_1, pN_0, M_0$
	$pT_2, pN_0, M_0$
Estadio II	$pT_3, pN_0, M_0$
	$pT_4, pN_0, M_0$
Estadio III	qualquer $pT, pN_1, M_0$
	qualquer $pT, pN_2, M_0$
	qualquer $pT, pN_3, M_0$
Estadio IV	qualquer $pT$ , qualquer $pN$ , $M_1$

**Tabela 3.** Critérios de classificação do sistema de estadiamento de Astler-Coller do câncer colorretal

Estadio	Invasão
A	Tumor confinado à mucosa
B1	Não ultrapassa a muscular própria; sem metástases em linfonodos
B2	Ultrapassa a muscular própria; sem metástases em linfonodos
C1	Não ultrapassa a muscular própria; presença de metástases em linfonodos
C2	Ultrapassa a muscular própria; presença de metástases em linfonodos

Os pacientes foram distribuídos de acordo com a idade, o sexo, a raça, o hábito de fumar, a localização do tumor, os estadios TNM e Astler Coller e o grau de diferenciação do tumor.

Os dados relativos à identificação, à idade, ao sexo, à raça e à história clínica e familiar foram obtidos por interrogatório específico em controles. Estes, foram distribuídos de acordo com a idade, o sexo e a raça.

## **2. Análise molecular dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *COL18A1***

### **2.1. Extração do DNA a partir dos leucócitos**

O DNA genômico foi obtido de amostras de sangue periférico dos pacientes com ACE e dos indivíduos controle, por extração com o reagente DNAzol™ (Life Technologies) até outubro de 2000 e com o *kit* para purificação GFX Genomic Blood DNA™ (Amersham Pharmacia Biotech) a partir desta data, seguindo as especificações técnicas dos referidos laboratórios.

### **2.2. Identificação dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* do GST**

Os éxons 4 e 5 do gene *GSTM1* e o éxon 4 e o íntron 4 e do gene *GSTT1* foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Um fragmento do gene da globina beta, incluindo o éxon 3 e a sequência dos íntrons 2 e 3, foi amplificado na mesma reação e serviu como controle da amostra de DNA (SAIKI *et al.*, 1988). O multiplex-PCR foi realizado com a utilização de uma mistura de 10 mM de Tris-HCL, pH 8,4, 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 0,4 mM de cada nucleosídeo trifosfato, 2,0 µL de DNA genômico de cada indivíduo e 400 ng de cada iniciador (COMSTOCK *et al.*, 1990; PEMBLE *et al.*, 1994). A reação compreendeu 35 ciclos de incubação a 95°C (1 minuto), a 62°C (1 minuto) e a 72°C (1 minuto). Fragmentos de 273 pb, 480 pb e 630 pb foram obtidos com a amplificação das regiões especificadas para os genes *GSTM1*, *GSTT1* e globina beta, respectivamente. A presença ou a deleção

homozigótica dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2,0%. Os genótipos foram avaliados apenas quando foi identificada uma banda correspondente à amplificação do fragmento do gene da globina beta.

Os pacientes e controles foram distribuídos de acordo com os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. Os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram avaliados em pacientes estratificados de acordo com a idade (menor do que 60 anos, maior ou igual a 60 anos), o sexo (masculino, feminino), a raça (caucasóide, negróide), o hábito de fumar (tabagista, não tabagista, ex-tabagista), a localização (proximal e distal), a extensão de acometimento (estádios TNM e Astler Coller) e o grau de diferenciação do tumor (bem e moderadamente diferenciado, pouco diferenciado). Os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram também avaliados em controles estratificados por sexo (masculino, feminino) e raça (caucasóide, negróide).

### 2.3. Identificação do polimorfismo D104N do gene *COL18A1*

O éxon 42 do gene *COL18A1* foi amplificado por meio da PCR. A PCR foi realizada com a utilização de uma mistura de 10 mM de Tris-HCL, pH 8,4, 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 0,2 mM de cada nucleosídeo trifosfato e 400 ng de cada iniciador (IUGHETTI et al., 2001). A reação compreendeu 32 ciclos de incubação a 94°C (40 segundos), a 61°C (40 segundos) e a 72°C (1,5 minuto).

A presença ou a ausência do polimorfismo D104N foi avaliada por meio da digestão enzimática dos fragmentos amplificados. Esta foi realizada com a utilização de uma mistura de 10 µL do produto da PCR, 3,0 µL de H<sub>2</sub>O estéril, 1,5 µL de tampão e 0,5 µL da enzima *Mse I* (Life Technologies). Em seguida, a mistura foi colocada em banho-maria, a 37°C, por 5 horas. A presença ou a ausência do polimorfismo foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 3,0%.

Fragmentos de 169 pb foram obtidos dos alelos sem o polimorfismo. Já os alelos com o polimorfismo D104N foram caracterizados por fragmentos de 101 e 68 pb.

As frequências do polimorfismo D104N foram avaliadas em pacientes e controles. Foram também avaliadas em pacientes estratificados de acordo com a idade

(menor do que 60 anos, maior ou igual a 60 anos), o sexo (masculino, feminino), a raça (caucasóide, negróide), o hábito de fumar (tabagista, não tabagista, ex tabagista), a localização (proximal, distal), a extensão de acometimento (estádios TNM e Astler-Coller) e o grau de diferenciação do tumor (bem e moderadamente diferenciado, pouco diferenciado). As frequências do polimorfismo D104N foram também avaliadas em controles estratificados por sexo (masculino, feminino) e raça (caucasóide, negróide).

Foi considerado como polimorfismo gênico a anormalidade identificada com frequência maior do que 1,0% nas amostras avaliadas (COTTON & SCRIVER, 1998).

### **3. Aspectos éticos**

O estudo molecular foi realizado em amostras de sangue periférico obtidas por ocasião da punção venosa realizada para a coleta de exames necessários ao diagnóstico ou acompanhamento clínico dos pacientes, e de uma única punção venosa em controles.

O raio X de tórax, a ultra-sonografia e a tomografia computadorizada do abdome e pelve foram exames realizados de rotina para o estadiamento da doença e para as determinações do prognóstico e da terapêutica a ser administrada. Nenhum material adicional foi coletado dos pacientes ou controles.

Os procedimentos foram realizados após a obtenção das cartas de consentimento pós informação, assinadas por pacientes e controles que aceitaram participar do estudo (Anexos 1 e 2), e após a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Processo nº 116/99).

#### 4. Análise estatística

O significado estatístico das diferenças entre grupos foi calculado por meio do teste da probabilidade exata de Fisher ou do teste do Qui-quadrado.

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

Os valores das ORs foram corrigidos por meio de modelos de regressão logística multivariada, tendo como variável dependente o grupo (pacientes e controles) e como variáveis independentes a idade, o sexo e os genótipos GST e *COL18A1*.

O teste de verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado com o intuito de verificar se houve distribuição preferencial de algum dos genótipos avaliados do gene *COL18A1* no grupo de pacientes e controles utilizado no estudo (BEIGUELMAN, 1995).

Todas as análises foram realizadas com a utilização do programa estatístico SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 8.1 (FLEISS, 1981; AGRESTI & FINLAY, 1986).



## ***RESULTADOS***

---

## 1. Aspectos clínicos

As distribuições individualizadas dos pacientes incluídos no estudo, de acordo com os aspectos clínicos e anátomo-patológicos do tumor, estão apresentadas nos Anexos 3 e 4, respectivamente.

As características clínicas dos 102 pacientes com ACE incluídos no estudo estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Distribuições dos 102 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico de acordo com a idade, o sexo, a raça e o hábito de fumar

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

Os pacientes apresentaram a idade entre 24 e 83 anos (média±DP: 58,9±13,6 anos; mediana: 59,0 anos). Cerca de metade da casuística foi constituída por pacientes com idade menor do que 60 anos. Ainda, 25,5% da casuística foi constituída por pacientes com idade menor do que 50 anos.

A distribuição dos pacientes por sexo mostrou um discreto predomínio da doença em pacientes do sexo masculino em relação aos do feminino, guardando uma relação entre si de 1,2:1.

Já as distribuições dos pacientes por raça e hábito de fumar mostrou que a doença ocorreu predominantemente em caucasóides e em tabagistas e ex-tabagistas.

As distribuições dos 102 pacientes com ACE incluídos no estudo, de acordo com os aspectos anátomo-patológicos do tumor, estão apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Distribuições dos 102 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico de acordo com a localização, o estadio e a diferenciação do tumor

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

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

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

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

As distribuições individualizadas dos 300 controles, de acordo com os aspectos clínicos, estão apresentadas no Anexo 6.

A idade destes indivíduos variou entre 50 e 60 anos (média $\pm$ DP: 53,9 $\pm$ 2,9 anos; mediana: 53,0 anos). Cento e noventa e sete foram do sexo masculino e 103 do sexo feminino (relação: 1,9:1,0). Duzentos e cinquenta e nove foram caucasóides (86,4%), 40 negróides (13,3%) e um asiático (0,3%).

## **2. Análise molecular dos genes *GSTM1* e *GSTT1***

### **2.1. Polimorfismos gênicos em pacientes e controles**

As distribuições individualizadas dos 102 pacientes e dos 300 controles, de acordo com os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, estão apresentadas nos Anexos 5 e 6, respectivamente.

As frequências dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes e controles estão apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6.** Frequência dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico e em controles

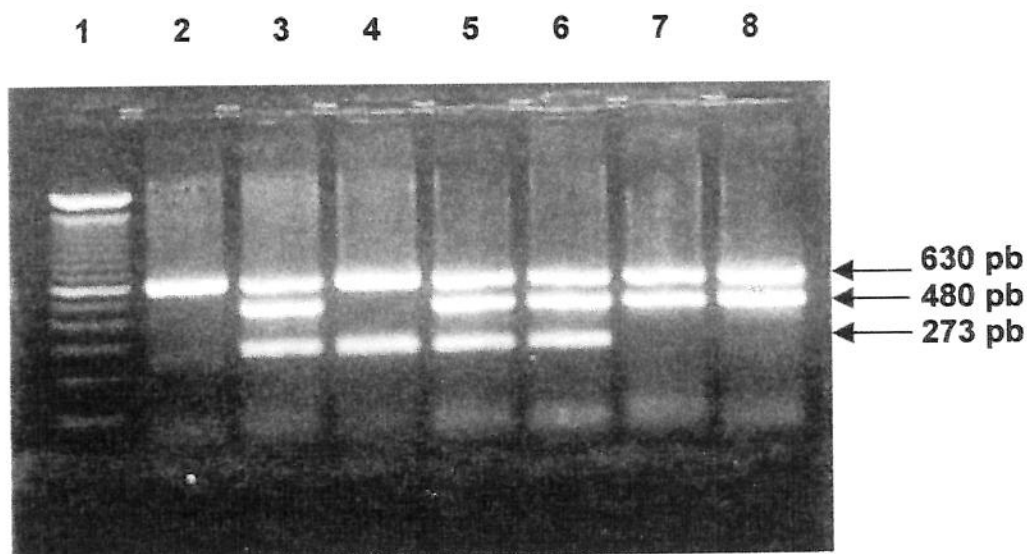
	<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1</i>		<i>GSTM1/T1</i>		
	Presente n (%)	Deletado n (%)	Presente n (%)	Deletado n (%)	Ambos presentes n (%)	Um deletado n (%)	Ambos deletados n (%)
Casos	52 (50,1)	50 (49,9)	85 (83,4)	17 (16,6)	44 (43,2)	49 (48,0)	9 (8,8)
Controles	166 (55,4)	134 (44,6)	248 (82,7)	52 (17,3)	138 (46,0)	138 (46,0)	24 (8,0)
OR (IC 95%)	1,00 (ref)	1,19 (0,74-1,91)	1,00 (ref)	0,95 (0,50-1,80)	1,00 (ref)	1,11 (0,69-1,78)	1,18 (0,51-2,72)
OR* (IC 95%)	1,00 (ref)	1,03 (0,96-1,10)	1,00 (ref)	1,08 (0,99-1,18)	1,00 (ref)	1,11 (0,68-1,83)	1,18 (0,47-2,90)
<i>P</i>		0,45		0,88		0,74	0,87

n: número de casos; OR: razão das chances; \*: OR ajustada por idade e sexo

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências das deleções homozigóticas isoladas ou combinada dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes com ACE e controles.

Os riscos de ocorrência do ACE associados às deleções isoladas ou combinadas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* variaram entre 1,03 e 1,18.

Os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* de alguns pacientes com ACE incluídos no estudo estão apresentados na Figura 2.



**Figura 2.** Multiplex-PCR para a identificação dos haplótipos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* do sistema da glutathione S-transferase, em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico, em gel de agarose a 2,0%. O fragmento de 630 pb representa um fragmento do gene da globina beta, utilizado para o controle da amostra de DNA. Fragmentos de 480 pb e 273 pb correspondem à presença dos alelos *GSTT1* e *GSTM1*, respectivamente. O marcador do tamanho do DNA, ladder 100pb, está apresentado na coluna 1. O resultado obtido em 1 indivíduo com deleção combinada dos genes *GSTM1* e *GSTT1* está apresentado na coluna 2. Os resultados obtidos em indivíduos com a presença dos alelos *GSTM1* e *GSTT1* estão apresentados nas colunas 3, 5 e 6 e o obtido em 1 indivíduo com deleção homozigótica do gene *GSTT1* está apresentado na coluna 4. Os resultados obtidos de indivíduos com deleção homozigótica do gene *GSTM1* estão apresentados nas colunas 7 e 8

## 2.2. Polimorfismos gênicos em pacientes estratificados por aspectos clínicos

As frequências das deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes estratificados por aspectos clínicos estão apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7.** Frequências das deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por aspectos clínicos

	n	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1/T1</i>	
		Deletado n (%)	Deletado n (%)	Um deletado n (%)	Ambos deletados n (%)
Idade	102				
< 60	52	25 (48,0)	15 (28,8) <sup>b</sup>	24 (46,1)	8 (15,4)
≥ 60	50	25 (50,0)	2 (4,0)	25 (50,0)	1 (2,0)
Sexo	102				
Masculino	55	30 (54,5)	9 (16,3)	27 (49,0)	6 (10,9)
Feminino	47	20 (42,5)	8 (17,0)	22 (46,8)	3 (6,4)
Raça	100 <sup>a</sup>				
Caucasóide	90	43 (47,8)	17 (18,9)	42 (46,7)	9 (10,0)
Negróide	10	6 (60,0)	0 (0,0)	6 (60,0)	0 (0,0)
Tabagismo	102				
Tabagista	32	13 (40,6)	7 (21,9)	14 (43,7)	3 (9,4)
Não	60	30 (50,0)	9 (15,0)	29 (48,3)	5 (8,3)
Ex	10	7 (70,0)	1 (10,0)	6 (60,0)	1 (10,0)

<sup>a</sup>: O número total difere do total (102) incluído no estudo porque foram excluídos da análise dois pacientes asiáticos, <sup>b</sup>: deleção homozigótica do gene *GSTT1* em pacientes com idade menor e maior ou igual a 60 anos,  $P=0,001$ .

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências das deleções homozigóticas isoladas ou combinada dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes com ACE, em relação ao sexo ( $P>0,22$ ), à raça ( $P>0,52$ ) e ao hábito de fumar ( $P>0,26$ ).

Frequência maior da deleção do gene *GSTT1* foi observada em pacientes com idade menor do que 60 anos quando comparados àqueles com idade maior ou igual a 60 anos (28,8% vs 4,0%).

A frequência da deleção do gene *GSTT1* em pacientes com idade menor do que 60 anos tendeu a ser maior do que a observada em controles (28,8% vs 17,3%, respectivamente;  $P=0,07$ ; OR=1,97 IC95%: 0,95-4,05). Já a frequência da deleção do gene *GSTT1* em pacientes com idade maior do que 60 anos foi menor do que a observada em controles (4,0% vs 17,3%, respectivamente;  $P=0,03$ ; OR=0,20 IC95%: 0,02-0,80).

### **2.3. Polimorfismos gênicos em pacientes estratificados por aspectos anátomo-patológicos do tumor**

As frequências das deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes com ACE, estratificados por aspectos anátomo-patológicos do tumor, estão apresentadas na Tabela 8.



**Tabela 8.** Freqüências das deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por aspectos anátomo-patológicos do tumor

	n	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1/T1</i>	
		Deletado n (%)	Deletado n (%)	Um deletado n (%)	Ambos deletados n (%)
Localização	99 <sup>a</sup>				
Proximal	31	13 (41,9)	4 (12,9)	11 (35,5)	3 (9,7)
Distal	68	36 (52,9)	13 (19,1)	37 (54,4)	6 (8,8)
TNM	94 <sup>a</sup>				
I+II	47	23 (48,9)	12 (25,5)	23 (48,9)	6 (12,8)
III+IV	48	21 (43,7)	5 (10,4)	20 (41,7)	3 (6,2)
Astler-Coller	90 <sup>a</sup>				
B1+B2	54	26 (48,1)	12 (22,2)	26 (48,1)	6 (11,1)
C1+C2	37	17 (45,9)	5 (13,5)	16 (43,2)	3 (8,1)
Diferenciação	101 <sup>a</sup>				
Bem+moderada	89	45 (50,5)	15 (16,8)	42 (47,2)	9 (10,1)
Pouco	12	5 (41,7)	2 (16,7)	7 (58,3)	0 (0,0)

<sup>a</sup>: O número difere do total (102) incluído no estudo porque não nos foi possível definir a localização, o estadio ou a diferenciação do tumor em alguns pacientes

Não foram observadas diferenças significativas entre as freqüências da deleção homozigótica isolada ou combinada dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes com ACE estratificados pela localização ( $P>0,19$ ), estadios TNM ( $P>0,05$ ) e Astler-Coller ( $P>0,29$ ), ou o grau de diferenciação do tumor ( $P>0,47$ ).

### 3. Análise molecular do gene *COL18A1*

#### 3.1. Polimorfismo D104N em pacientes e controles

As distribuições individualizadas dos 102 pacientes e dos 300 controles, de acordo com o polimorfismo D104N, do gene *COL18A1*, estão apresentadas nos Anexos 5 e 6, respectivamente.

As amostras de pacientes e controles avaliadas para o polimorfismo D104N estiveram no Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $X^2 = 0,064$ ,  $P = 0,80$ ;  $X^2 = 0,221$ ,  $0,50 < P < 0,70$ ; para heterozigotos).

As frequências do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* em pacientes e controles estão apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Frequências do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico e em controles

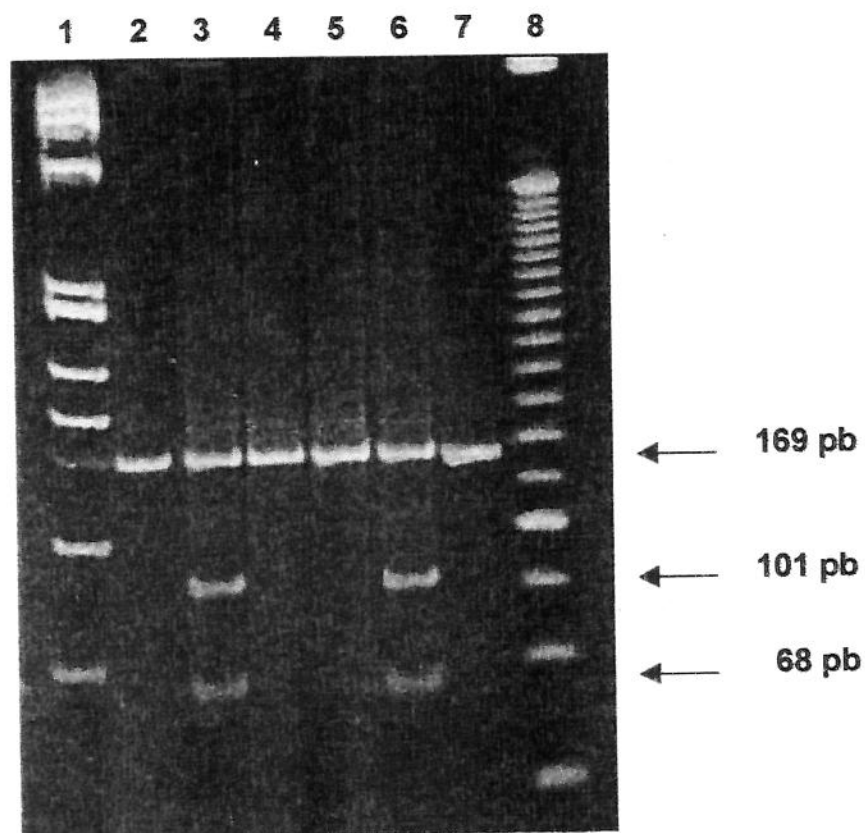
	D104N	
	Presente em heterozigose n (%)	Ausente n (%)
Casos	16 (15,7)	86 (84,3)
Controles	42 (14,0)	258 (86,0)
OR (IC 95%)	1,00 (ref)	1,14 (0,58-2,22)
OR* (IC 95%)	1,00 (ref)	0,98 (0,89-1,08)
Valor de <i>P</i>	0,80	

n: número de casos; OR: razão das chances; \*: ORs ajustadas por idade e sexo

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências do polimorfismo D104N em pacientes com ACE e controles.

O risco de ocorrência do ACE associado ao polimorfismo gênico foi de 0,98.

Os polimorfismos do gene *COL18A1* em pacientes com ACE incluídos no estudo estão apresentados na Figura 2.



**Figura 3.** Digestão enzimática para a identificação do polimorfismo D104N, do gene *COL18A1*, em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico, em gel de poliacrilamida a 12%. O fragmento de 169 pb corresponde à ausência do polimorfismo D104N e os fragmentos de 101pb e 68 pb correspondem ao alelo polimórfico D104N. Marcadores do tamanho do DNA,  $\Phi$ X e ladder 25 pb, estão apresentados nas colunas 1 e 8, respectivamente. Os resultados obtidos em indivíduos sem o polimorfismo D104N estão apresentados nas colunas 2, 4, 5 e 7. Os resultados obtidos em indivíduos com a presença do polimorfismo D104N em heterozigose estão apresentados nas colunas 3 e 6

### 3.2. Polimorfismo D104N em pacientes estratificados por aspectos clínicos

As freqüências do polimorfismo D104N em pacientes estratificados por aspectos clínicos estão apresentadas na Tabela 10.

**Tabela 10.** Freqüências do polimorfismo D104N, do gene *COL18A1*, em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por aspectos clínicos

	n	D104N	
		Presente n (%)	Ausente n (%)
Idade	102		
< 60	52	7 (6,8)	45 (44,2)
≥ 60	50	9 (8,8)	41 (40,2)
Sexo	102		
Masculino	55	7 (12,7)	48 (87,3)
Feminino	47	9 (19,2)	38 (80,8)
Raça	100 <sup>a</sup>		
Caucasóide	90	15 (16,7)	75 (83,3)
Negróide	10	1 (10,0)	9 (90,0)
Tabagismo	102		
Tabagista	32	3 (9,4)	29 (90,6)
Não	60	11 (18,3)	49 (81,7)
Ex	10	2 (20,0)	8 (80,0)

<sup>a</sup>: O número difere do total (102) incluído no estudo porque foram excluídos da análise dois pacientes asiáticos

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências do polimorfismo D104N em pacientes com ACE estratificados por idade ( $P=0,94$ ), sexo ( $P=0,53$ ), raça ( $P=1,00$ ) e hábito de fumar ( $P=0,54$ ).

### **3.3. Polimorfismo D104N em pacientes estratificados por aspectos anátomo-patológicos do tumor**

As frequências do polimorfismo D104N em pacientes estratificados por aspectos anátomo-patológicos do tumor estão apresentadas na Tabela 11.

**Tabela 11.** Frequências do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* em pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico estratificados por aspectos anátomo-patológicos do tumor

	n	D104N	
		Presente n (%)	Ausente n (%)
Localização	99 <sup>a</sup>		
Proximal	31	5 (16,1)	26 (83,9)
Distal	68	10 (14,7)	58 (85,3)
TNM	94 <sup>a</sup>		
I+II	47	9 (19,6)	37 (80,4)
III+IV	48	7 (14,6)	41 (85,4)
Astler-Coller	90 <sup>a</sup>		
B1+B2	54	9 (17,0)	44 (83,0)
C1+C2	37	7 (18,9)	30 (81,1)
Diferenciação	101 <sup>a</sup>		
Bem+moderada	89	14 (15,7)	75 (84,3)
Pouco	12	1 (8,3)	11 (91,7)

<sup>a</sup>: O número difere do total (102) incluído no estudo porque não nos foi possível definir a localização, o estadio ou a diferenciação do tumor em alguns indivíduos

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências do polimorfismo D104N em pacientes com ACE estratificados pela localização ( $P=1,0$ ), estadios TNM ( $P=0,71$ ) e Astler-Coller ( $P=0,96$ ) ou o grau de diferenciação do tumor ( $P=0,68$ ).

## ***DISCUSSÃO***

---



O CC é uma das neoplasias malignas mais estudadas nas últimas décadas, devido à sua ocorrência e à alta mortalidade a ele atribuída. Sendo assim, seu comportamento biológico está entre os melhor estabelecidos dentre as neoplasias malignas, em países do hemisfério norte. Entretanto, vários de seus aspectos, como a etiologia e a fisiopatologia, ainda estão por ser determinados com exatidão, o que justificou a realização deste estudo.

A incidência da doença na cidade de Campinas foi de 25,2 casos/100.000 habitantes/ano, no período de 1991 a 1995. Incidência expressivamente maior da doença, 50 casos/100.000 habitantes/ano, foi descrita por SCHOTTENFELD (1995), considerando os EUA. Já a incidência da doença na África do Sul foi expressivamente menor do que a descrita em Campinas, para a população negróide, 2,2 casos/100.000 habitantes/ano, mas, não para a população caucasóide, 18,7 casos/100.000 habitantes/ano (SEGAL et al., 2000). Embora a incidência do CC pareça menor na cidade de Campinas, é possível que seja semelhante à dos demais países ocidentais e que a falta de dados reais e atualizados resulte da falta de notificação dos casos diagnosticados.

Quando os nossos pacientes com ACE foram distribuídos por idade, notamos que a idade média, 59 anos, foi semelhante à observada em pacientes do hemisfério norte, 60 anos (KATOH et al., 1996; GERTIG et al., 1998). Entretanto, vale comentar que cerca de 25% dos pacientes da nossa amostra apresentou idade menor do que 50 anos, sendo que 90% dos casos da doença, em países desenvolvidos, ocorre em indivíduos com idade maior ou igual a 50 anos (SCHOTTENFELD, 1995).

O controle da exposição ambiental de indivíduos a agentes químicos é insatisfatório no Brasil. Assim, a população brasileira parece ser mais exposta a pesticidas, herbicidas e ao benzeno do que as populações de países desenvolvidos (LORAND et al., 1984; SHIELDS et al., 1993; RUIZ et al., 1994; QUEIRÓZ et al., 1997). Como estes fatores podem estar associados com a origem do CC (SCHOTTENFELD et al., 1980; SWANSON et al., 1985), a ocorrência da doença em um contingente significativo de pacientes mais jovens, em nosso meio, pode ter resultado de uma maior incidência do CC atribuído à exposição ocupacional, em indivíduos desta faixa etária.

Ainda, considerando a distribuição etária da população de Campinas no ano de 1995, de acordo com os dados fornecidos pelo Registro de Câncer de Base Populacional de Campinas, cerca de 74.000 indivíduos apresentaram idade até cinco anos enquanto que apenas 15.000 indivíduos apresentaram idade maior que 75 anos. Assim, as diferentes composições etárias das populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento podem também constituir uma explicação plausível para as diferenças etárias observadas em pacientes dos diversos estudos.

Quando os nossos casos foram distribuídos por sexo, observamos um discreto predomínio da doença em pacientes do sexo masculino, semelhante a outros relatos (DEAKIN et al., 1996; GERTIG et al., 1998; COTTON et al., 2000).

A distribuição dos nossos casos por raça, mostrou que a doença ocorreu predominantemente em caucasóides, de forma semelhante às descrições obtidas em países desenvolvidos (GERTIG et al., 1998; SLATTERY et al., 1998; SLATTERY et al., 2002; LIN et al., 1995). Também na África do Sul a incidência da doença foi maior para a população caucasóide do que para a negróide (SEGAL et al., 2000), sugerindo uma influência da raça na incidência da doença. Entretanto, a incidência do câncer de cólon em americanos de origem africana foi de 32,8 casos/100.000 habitantes/ano, uma das maiores do mundo (SEGAL et al., 2000), sugerindo que o padrão da dieta parece mais importante que o fator racial na origem da doença. Ainda, os nossos resultados podem ter refletido apenas a distribuição étnica da população que procura assistência médica no Hospital das Clínicas da UNICAMP (18,3% de negróides e 81,7% de não negróides, em 212.226 pacientes atendidos no período de 1995 a 2000). Vale ainda comentar que a população brasileira é altamente heterogênea e composta predominantemente por indivíduos miscigenados (ALVES-SILVA et al., 2001; CARVALHO-SILVA et al., 2001), o que indica que os estudos que avaliam a raça, apenas por meio da observação do biótipo, como o nosso estudo, não são confiáveis.

Também observamos que a maioria dos nossos pacientes com ACE eram tabagistas ou foram tabagistas no passado. A associação entre tabagismo e o risco de ocorrência do CC foi observada, de forma consistente, em estudos controlados conduzidos por HEINEMAN et al. (1995), ALEXANDROV et al. (1996), FREEDMAN et

al. (1996) e TERRY et al. (2001). Também SLATTERY et al. (1998) observaram que aqueles que fumaram mais que um maço por dia tiveram um risco do CC aumentado em aproximadamente 40%, independentemente do "status" atual, número de cigarros fumados por dia, número de maços fumados por ano e número de anos desde que parou de fumar. Entretanto, nenhuma associação entre o tabagismo e o CC pôde ser obtida em outros estudos (KNEKT et al., 1998; LOKTIONOV et al., 2001), o que indica que esta associação não se encontra definitivamente estabelecida. Como não obtivemos informações relativas ao hábito de fumar na população brasileira ou em controles do nosso estudo, podemos apenas sugerir que o cigarro possa ter contribuído para a origem da doença de nossos casos.

Observamos que cerca de 70% dos nossos pacientes apresentou tumores distais. Tumores proximais, em cólon ascendente, transverso e descendente, e combinações de tumores proximais e distais foram identificados nos 30% restantes. Frequências similares de tumores proximais e distais, 38% e 62%, respectivamente, foram descritas para a doença em outros países (ZHONG et al., 1993; CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; KATOH et al., 1996; GERTIG et al., 1998; ZHANG et al., 1999; COTTON et al., 2000; LOKTIONOV et al., 2001).

Quando os nossos pacientes foram distribuídos de acordo com o estadio da doença, cerca de metade do número deles a apresentou em suas formas mais avançadas, de acordo com descrições prévias (DEAKIN et al., 1996; FREEDMAN et al., 1996; ZHANG et al., 1999).

Também observamos que 88% dos tumores dos nossos pacientes foram classificados como bem ou moderadamente diferenciados e apenas 12% como pouco diferenciados. Frequências similares de tumores bem ou moderadamente diferenciados, 65 a 88%, e pouco diferenciados, 12 a 17%, foram descritas por ZHANG et al. (1999) e LOKTIONOV et al. (2001), respectivamente.

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

Quando os nossos controles foram distribuídos de acordo com os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, observamos que as frequências das deleções isoladas ou combinada dos genes foram similares às obtidas de indivíduos normais, de vários estados brasileiros ou apenas da região de Campinas, avaliados anteriormente por nosso grupo (ARRUDA et al., 1998; ARRUDA et al., 2000). Estes resultados indicam que os nossos controles foram representativos da população geral e particularmente daquela que procura assistência médica em nossa região. Observamos ainda, que as frequências das deleções isoladas ou combinada dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, obtidas em nosso estudo foram também similares às descritas para populações americanas e européias (HAYES & PULFORD, 1995; COTTON et al., 2000) e para americanos de origem mexicana ou africana (NELSON et al., 1995). Entretanto, estas frequências foram menores do que as descritas em países asiáticos (NELSON et al., 1995; KATOH et al., 1996), o que pode ser explicado pelo pequeno número de pacientes asiáticos incluídos em nosso estudo. Assim, a heterogeneidade racial encontrada no Brasil parece não ter influenciado, de forma significativa, as frequências destes genes em nossa população.

Nós encontramos frequências similares da deleção homozigótica do gene *GSTM1* em pacientes com ACE e controles, de acordo com os estudos conduzidos na Austrália (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; BUTLER et al., 1997; BUTLER et al., 2001), Europa (DEAKIN et al., 1996; ZHANG et al., 1999; LOKTIONOV et al., 2001), China (LEE et al., 1998), América do Norte (GERTIG et al., 1998; SLATTERY et al., 1998; SLATTERY et al., 2000) e Irã (SAADAT & SAADAT, 2001). Apenas ZHONG et al. (1993) e KATOH et al. (1996) encontraram um significativo excesso da deleção homozigótica do gene *GSTM1* em pacientes com CC, quando comparados a controles, em populações inglesa e japonesa, respectivamente. Ambos observaram que os pacientes com CC e a deleção homozigótica do gene, incluídos em suas casuísticas, estiveram sob risco duas vezes maior de apresentar a doença do que aqueles sem a deleção gênica.

Em relação ao gene *GSTT1*, nenhuma associação com o CC foi aparente em nosso estudo ou em outros realizados na Austrália (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995;

BUTLER et al., 2001), Europa (LOKTIONOV et al., 2001), Japão (KATOH et al., 1996), China (LEE et al., 1998), América do Norte (GERTIG et al., 1998) e Irã (SAADAT & SAADAT, 2001). Entretanto, as freqüências da deleção homozigótica do gene foram expressivamente maiores em pacientes do que em controles, nos estudos conduzidos por DEAKIN et al. (1996), BUTLER et al. (1997) e ZHANG et al. (1999), em pacientes ingleses, australianos e suecos, respectivamente.

Nós também observamos freqüências similares das deleções combinada dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em nossos pacientes e controles, de acordo com descrições prévias (DEAKIN et al., 1996; GERTIG et al., 1998; ZHANG et al., 1999).

Nós examinamos as associações dos polimorfismos do gene *GSTM1* com algumas variáveis clínicas, em pacientes com CC. Não encontramos diferenças nas freqüências de deleção homozigótica deste gene em pacientes estratificados por idade (menor do que 60 anos, maior ou igual a 60 anos), sexo (masculino, feminino), origem étnica (caucasóides, negróides) e hábito de fumar (tabagistas, não tabagistas, ex-tabagistas).

Esses resultados foram sustentados por outros estudos, nos quais foram obtidas freqüências similares da deleção homozigótica do gene *GSTM1*, em pacientes com CC estratificados por idade (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; GERTIG et al., 1998; SLATTERY et al., 1998; ZHANG et al., 1999; LOKTIONOV et al., 2001) e sexo (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; GERTIG et al., 1998; LEE et al., 1998; SLATTERY et al., 1998; LOKTIONOV et al., 2001). Ainda, pouca ou nenhuma evidência da interação entre o genótipo *GSTM1*, exposição ao cigarro e CC foi encontrada por KATOH et al. (1996), GERTIG et al. (1998), SLATTERY et al. (1998) e LOKTIONOV et al. (2001).

Nós também examinamos as associações dos polimorfismos do gene *GSTM1* com algumas variáveis anátomo-patológicas do tumor, em pacientes com CC e também não encontramos diferenças nas freqüências de deleção homozigótica do gene em pacientes estratificados pela localização do tumor (proximal, distal), estadio (TNM: I+II, III+IV; Astler-Coller: B1+B2, C1+C2) e o grau de diferenciação do tumor (bem+moderado, pouco diferenciado).



Resultados similares foram previamente observados em pacientes com CC, estratificados pela localização do tumor (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; GERTIG et al., 1998; LEE et al., 1998; SLATTERY et al., 1998; LOKTIONOV et al., 2001), estadió do tumor (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; ZHANG et al., 1999; LOKTIONOV et al., 2001) e o grau de diferenciação do tumor (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; KATOH et al., 1996; ZHANG et al., 1999). Em contraste, ZHONG et al. (1993) observaram que mais de 70% dos pacientes com CC, com tumor no cólon proximal, avaliados em seu estudo apresentou a deleção homozigótica do gene *GSTM1*, enquanto que KATOH et al. (1996) e ZHANG et al. (1999) descreveram frequência aumentada da deleção homozigótica do gene em pacientes com tumores distais. Além disso, a deleção homozigótica do gene *GSTM1* foi mais comum em tumores pouco diferenciados, no estudo conduzido por LEE et al. (1998), mas nenhuma associação do genótipo do gene com o grau de diferenciação do tumor foi encontrada em outros estudos (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; KATOH et al., 1996; ZHANG et al., 1999).

Nós também examinamos as associações dos polimorfismos do gene *GSTT1* com algumas variáveis clínicas, em pacientes com CC e não encontramos diferenças entre as frequências da deleção homozigótica do gene em pacientes estratificados por sexo (masculino, feminino), origem étnica (caucasóides, negróides) e hábito de fumar (tabagista, não tabagistas, ex-tabagistas).

Entretanto, frequência significativamente maior da deleção homozigótica do gene *GSTT1*, foi observada em pacientes com ACE e idade menor do que 60 anos, quando comparados àqueles com idade maior ou igual a 60 anos (28,8% vs 4,0%, respectivamente).

A frequência da deleção homozigótica do gene *GSTT1*, em pacientes com ACE e idade menor do que 60 anos (28,8%), foi também maior do que a observada para os controles (17,3%). Os primeiros estiveram expostos a um risco duas vezes maior de ocorrência da doença do aqueles com a presença do gene. Entretanto, como a análise estatística destes resultados indicou apenas uma tendência à significância ( $P=0,07$ ),

podemos apenas sugerir que este genótipo possa ter influenciado a idade de manifestação da doença em nossos casos.

Por outro lado, a frequência da deleção homozigótica do gene *GSTT1*, em pacientes com ACE e idade maior ou igual a 60 anos (4,0%), foi expressivamente menor do que a observada para os controles (17,3%). A ocorrência de óbito por outras doenças associadas a este sistema de metabolização de carcinógenos, em indivíduos com a deleção homozigótica do gene desta faixa etária, parece constituir uma explicação plausível para este resultado.

Resultados semelhantes foram obtidos por CHENEVIX-TRENCH et al. (1995), na avaliação de pacientes com CC e idade menor e maior ou igual a 70 anos. Entretanto, nenhuma associação significativa pôde ser observada entre o genótipo *GSTT1* e a idade dos pacientes com CC, nos estudos conduzidos por DEAKIN et al. (1996), GERTIG et al. (1998) e LOKTIONOV et al. (2001). Além disso, ZHANG et al. (1999) descreveram maior frequência da deleção homozigótica do gene em pacientes com CC e idade maior do que 70 anos, quando comparados a pacientes mais jovens. Em nosso conhecimento, não há estudos apontando diferenças nas frequências da deleção do gene *GSTT1* em pacientes com CC estratificados por sexo (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; ZHANG et al., 1999, LOKTIONOV et al., 2001). Ainda, KATOH et al. (1996), GERTIG et al. (1998), e LOKTIONOV et al. (2001) descreveram que o hábito de fumar não teve efeito sobre o risco associado de CC em pacientes com a deleção homozigótica do gene *GSTT1*.

Nós também examinamos as associações dos polimorfismos do gene *GSTT1* com algumas variáveis anátomo-patológicas do tumor, em pacientes com CC e não observamos diferenças significativas nas frequências da deleção homozigótica do gene em pacientes estratificados pela localização, estadió e o grau de diferenciação do tumor.

Nenhuma associação significativa entre o genótipo do gene *GSTT1* e a localização do tumor (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; GERTIG et al., 1998; LEE et al., 1998; ZHANG et al., 1999, LOKTIONOV et al., 2001), o estadió do tumor (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995; DEAKIN et al., 1996; ZHANG et al., 1999,

LOKTIONOV et al., 2001) e o grau de diferenciação do tumor (CHENEVIX-TRENCH et al., 1995, DEAKIN et al., 1996; LEE et al., 1998) foi também observada em outros estudos. Entretanto, DEAKIN et al. (1996) descreveram riscos relativos aumentados para tumores de cólon direito (OR=1,5), cólon esquerdo (OR=2,3) e reto (OR=1,9), em pacientes com CC e a deleção homozigótica do gene. Também ZHANG et al. (1999), descreveram frequência maior da deleção homozigótica do gene em pacientes com tumores pouco diferenciados quando comparados àqueles com tumores bem ou moderadamente diferenciados.

Considerando a disparidade dos resultados obtidos nos diferentes estudos, não nos é possível afirmar ou afastar a hipótese de que as deleções homozigóticas isoladas ou combinada dos genes *GSTM1* e *GSTT1* possam ser usadas como um marcador da susceptibilidade ao CC ou ainda, que possam influenciar as características clínicas dos pacientes e anátomo-patológicas do tumor.

As razões para as diferenças observadas entre os resultados dos vários estudos, que avaliaram o papel destes polimorfismos gênicos na susceptibilidade ao CC e em suas associações com variáveis clínicas e anátomo-patológicas do tumor na doença, não são claras. A seleção de amostras, o tamanho das casuísticas, a origem étnica das diferentes populações, a ocorrência de fatores que podem ter contribuído para a origem do CC, como o padrão da dieta, o hábito de fumar, o estilo de vida e as anormalidades concomitantes de outros genes, podem ter determinado a inconsistência dos resultados obtidos nos estudos em geral.

Assim, só nos é possível afirmar que os nossos resultados não sustentam a hipótese de que as deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* são independentemente associadas com um substancial aumento no risco do ACE, em pacientes brasileiros.

Entretanto, a observação de uma maior frequência da deleção homozigótica do gene *GSTT1*, em nossos pacientes diagnosticados antes dos 60 anos de idade, sugere que este genótipo possa influenciar a idade de manifestação da doença. Se este resultado reflete uma menor frequência deste genótipo entre indivíduos de maior idade devido a efeitos da seleção de uma predisposição generalizada a outras doenças a ele



associadas ou, se constitui uma característica clínica real em pacientes brasileiros com ACE, requer investigações adicionais com estudos incluindo maiores casuísticas, com populações de diferentes origens étnicas.

Se a deleção homozigótica do gene *GSTT1*, realmente predispor ao aparecimento do ACE em idade mais precoce do que a usual em nossa população, a identificação de indivíduos com este genótipo poderia constituir um método útil para a identificação de indivíduos, que devam ser submetidos à colonoscopia periódica, para a detecção precoce da doença.

As amostras de pacientes e controles avaliados para o polimorfismo D104N do gene *COL18A1* estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Assim, os controles foram adequados para a avaliação da frequência do polimorfismo gênico na população geral e, conseqüentemente, para a comparação com a frequência obtida em pacientes com ACE.

Quando os nossos pacientes e controles foram distribuídos de acordo com a presença ou a ausência do polimorfismo gênico, observamos frequências similares do genótipo D104N em ambos os grupos (15,8% vs 14,0%, respectivamente).

Já é conhecido que a angiogênese é considerada um passo importante para a ocorrência e a progressão do CC (PAPAMICHAEL, 2001; SOKMEN et al., 2001) e que as anormalidades quantitativa ou funcional da endostatina, um inibidor do fenômeno, podem determinar a progressão e o desenvolvimento de metástases de tumores sólidos (FOLKMAN, 1990; HANABAN & FOLKMAN, 1996; SASAKI et al., 1998; IUGHETTI et al., 2001).

A capacidade da endostatina humana endógena em inibir a angiogênese é desconhecida. Não está claro se ela representa parte de um mecanismo de proteção do hospedeiro contra o crescimento do tumor ou se resulta simplesmente da ação de proteases por ele secretadas. Em ambos os casos, a produção da proteína poderia estar aumentada, particularmente em pacientes com formas agressivas da doença (FELDMAN et al., 2001a).

Em nosso conhecimento, há apenas dois estudos sobre a endostatina em CC. FELDMAN et al. (2001) avaliaram a quantificação sérica da proteína em pacientes com

a doença e em controles. Observaram que a concentração sérica da endostatina esteve diretamente relacionada ao número e ao tamanho das metástases hepáticas e, ainda, que o aumento da concentração sérica da proteína, avaliada durante o seguimento clínico dos pacientes, esteve associado com a progressão da doença. Entretanto, o número relativamente pequeno de pacientes avaliado neste estudo isolado e a amplitude das variações das concentrações séricas da endostatina observada em controles indicaram que estes resultados necessitam confirmação por estudos adicionais. Já GUENTHER et al. (2001) observaram que o aumento da expressão do colágeno XVIII/endostatina também foi identificado em células endoteliais de tumores de cólon.

Freqüência expressivamente maior do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* foi observada em pacientes com adenocarcinoma de próstata em comparação a controles, em um único estudo conduzido por IUGHETTI et al., (2001). Indivíduos com o polimorfismo estiveram expostos a risco de ocorrência da doença duas vezes e meia maior do que aqueles que não apresentaram o polimorfismo gênico. Os autores observaram ainda, que as concentrações séricas da endostatina em pacientes foram semelhantes às observadas em controles e atribuíram o maior risco de ocorrência da doença naqueles com o polimorfismo, a anormalidades funcionais da endostatina, determinadas pela substituição, na molécula, do ácido aspártico pela asparagina (IUGHETTI et al., 2001).

Também não observamos diferenças entre as freqüências do polimorfismo D104N, quando nossos pacientes foram estratificados por aspectos clínicos e anátomo-patológicos do tumor.

Em nosso conhecimento, não há descrições sobre outras avaliações do polimorfismo D104N do gene *COL18A1* na susceptibilidade ao CC ou sobre sua associação com aspectos clínicos e anátomo-patológicos do tumor em pacientes com a doença. Assim, só podemos dizer que este genótipo não influenciou o risco de ocorrência do ACE, e não esteve associado a qualquer das características clínicas e anátomo-patológicas do tumor avaliadas em nossos casos.

## ***CONCLUSÕES***

---

A similaridade entre as frequências das deleções homozigóticas isoladas e combinada dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, em pacientes e controles, indica que os polimorfismos destes genes não alteraram o risco de ocorrência do ACE em nossos casos e não estiveram associados a características clínicas dos pacientes, como o sexo, a raça e o hábito de fumar, e anátomo-patológicas do tumor, como a localização, o estadio e o grau de diferenciação.

A frequência aumentada da deleção homozigótica do gene *GSTT1*, em pacientes com idade menor do que 60 anos, sugere que este genótipo possa ter influenciado o aparecimento do tumor em idade mais precoce do que a habitualmente observada para a doença.

A similaridade entre as frequências do polimorfismo D104N do gene *COL18A1*, em pacientes e controles, indica que a anormalidade gênica não influenciou o risco do ACE em nossos casos e não esteve associada a características clínicas dos pacientes, como a idade, o sexo, a raça e o hábito de fumar, e anátomo-patológicas do tumor, como a localização, o estadio e o grau de diferenciação.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

- AGRESTI, A. & FINLAY, B. – **Statistical Methods for the Social Sciences**. San Francisco, Dellen Publishing Company, 1986.
- ALEXANDROV, K.; ROJAS, M.; KADLUBAR, F.F.; LANG, N.P.; BARTSCH, H. – Evidence of *anti-benzo(a)pyrene* dilepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa. **Carcinogenesis**, **17**(9): 2081-2083, 1996.
- ALVES-SILVA, J.; DA SILVA-SANTOS, M.; GUIMARAES, P.E.; FERREIRA, A.C.; BANDELT, H.J.; PENA, S.D. – The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, **67**: 444-461, 2000.
- ARIES, V.; CROWTHER, J.S.; DRASAR, B.S.; HILL, M.J. – Degradation of bile salts by human intestinal bacteria. **GUT**, **10**(7): 575-576, 1969.
- ARRUDA, V.R.; GRIGNOLLI, C.E.; GONÇALVES, M.S.; SOARES, M.C.; MENEZES, R.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. – Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to enviromental carcinogenesis ? **Clin. Genet.**, **54**: 210-214, 1998.
- ARRUDA, V.R.; LIMA, C.S.P.; GRIGNOLLI, C.E.; MELO, M.B.; SOARES, M.C.; LORAND-METZE, I.; ALBERTO, F.L.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. – Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) gene deffects. **Eur. J. Haematol.**, **66**: 383-388, 2000.
- ASTLER, V.B. & COLLER, F.A. – The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. **Ann. Surg.**, **139**: 846-851, 1954.
- AUGUSTO, L.G.S.; LIEBER, S.R.; RUIZ, M.A.; SOUZA, C.A. – Micronucleus monitoring to assess human occupational exposure to organoclorides. **Environ. Mol. Mutagen.**, **29**: 46-52, 1987.
- BARRETT, J.C. – Mechanism of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. **Environ. Health Perspect.**, **100**: 9-12, 1993.

- BEGG, C.B. – Statistical considerations in the interpretation of clinical trials. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 415-421.
- BEIGUELMAN, B – Dinâmica dos genes nas famílias e populações. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 2.ed. p. 1-472.
- BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; GAREWAL, H.; DINNING, P.; JABI, R.; SAMPLINER, R.E.; McCUSKEY, M.K.; PANDA, M.; ROE, D.J.; L'HEUREUX, L.; PAYNE, C. – A bile acid-induced apoptosis assay for colon cancer risk and associated quality control studies. **Cancer Res.**, **59**: 2353-2357, 1999.
- BRIVIO, F.; LISSONI, P.; ROVELLI, F.; NESPOLI, A.; UGGERI F.; FUMAGALLI, L.; GARDANI G. Effects of IL-2 preoperative immunotherapy on surgery-induced changes in angiogenic regulation and its prevention of VEGF increase and IL-2 decline. **Hepatogastroenterology**, **49**(44): 385-7, 2002.
- BRODERS, A.C. – The grading of carcinoma. **Minn. Med.**, **8**: 726-730, 1925.
- BRUCE, W.R. – Recent hypotheses for the origin of colon cancer. **Cancer Res.**, **47**: 4237-4242, 1987.
- BURT, R.W.; BISHOP, D.T.; LYNCH, H.T.; ROZEN, P.; WINAWER, S.J. – Risk and surveillance of individuals with heritable factors for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. **Bull World Health Organ**, **68**(5): 655-665, 1990.
- BURT, R.W. & GRODEN, J. – The genetic and molecular diagnosis of adenomatous polyposis coli. **Gastroenterology**, **104**: 1211-1214, 1993.
- BURT, R.W. – Inheritance – General Issues. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 51-59.
- BUTLER, W.J.; RYAN, P.; ROBERTS-THOMPSON, I.C. – Metabolic genotypes and risk for colorectal cancer increased risk in individuals with glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) gene defect (Abstract). **Gastroenterology**, **112**: A542, 1997.

- BUTLER, W.J.; RYAN, P.; ROBERTS-THOMPSON, I.C. – Metabolic genotypes and risk for colorectal cancer. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, **16**: 631-635, 2001.
- CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; ROCHA, J.; PENA, S.D.J. – The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, **68**: 281-286, 2001.
- CHEN, H.; SANDLER, D.P.; TAYLOR, J.A.; SHORE, D.L.; LIU, E.; BLOOMFIELD, C.D.; BELL, D.A. – Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. **Lancet**, **347**(8997): 295-297, 1996.
- CHENEVIX-TRENCH, G.; YOUNG, J.; COGGAN, M.; BOARD, P. – Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms: susceptibility to colon cancer and age of onset. **Carcinogenesis**, **16**(7): 1655-1657, 1995.
- CLAPPER, M.L.; HOFFMAN, S.J.; CARP, N.; WATTS, P.; SEESTALLER, L.M.; WEESE, J.L.; TEW, K.D. – Contribution of patient history to the glutathione S-transferase activity of human lung, breast and colon tissue. **Carcinogenesis**, **12**(10): 1957-1961, 1991.
- COHEN, A.M. – Overview of Colorectal Cancer Treatment. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 413-414.
- COMSTOCK, K.E.; SANDERSON, B.J.S.; CLAFIN, G.; HENER, W.D. – GST1 gene deletion determined by polymerase chain reaction. **Nucleic Acid Res.**, **18**: 3670, 1990.
- COTTON, R.G.H. & SCRIVER, C.R. – Proof of "Disease Causing" mutation. **Hum. Mutation**, **12**: 1-3, 1998.
- COTTON, S.C.; SHARP, L.; LITTLE, J.; BROCKTON, N. – Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. **Am. J. Epidemiol.**, **151**(1): 7-32, 2000.



- CUNHA, A.J.U. – Aspectos genéticos relacionados ao câncer do estômago e do intestino grosso. In: Habr-Gama, A; Gama-Rodrigues, J.J.; Betarello, A. – **Câncer do Estômago e do Intestino Grosso: Prevenção e Detecção**. São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária Ltda. 1980. p. 43-57.
- DE WAZIERS, I.; CUGNENC, P.H.; BERGER, A.; LEROUX, J.P.; BEAUNE, P.H. – Drug metabolizing enzyme expression in human normal, peritumoral and tumoral colorectal tissue samples. **Carcinogenesis**, **12**(5): 905-909, 1991.
- DEAKIN, M.; ELDER, J.; HENDRICKSE, C.; PECKHAN, D.; BALDWIN, D.; PANTIN, C.; WILD, N.; LEOPARD, P.; BELL, D.A.; JONES, P.; DUNCAN, H.; BRANNIGAN, K.; ALLDERSEA, J.; FRYER, A.A.; STRANGE, R.C. – Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. **Carcinogenesis**, **17**(4): 881-884, 1996.
- DHANABAL, M.; RAMCHANDRAN, R.; WATERMAN, M.J.F.; LU, H.; KNEBELMANN, B.; SEGAL, M.; SUKHATME, V.P. – Endostatin induces endothelial cell apoptosis. **J. Biol. Chem.**, **274**(17): 11721-11726, 1999.
- DIXELIUS, J.; LARSSON, H.; TAKAKO, SASAKI, T.; HOLMQVIST, K.; LU, L.; ENGSTRÖM, A.; TIMPL, R.; WELSH, M.; CLAEISSON-WELSH, L. – Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. **Blood**, **95**(11): 3403-34011, 2000.
- DUNCAN, B.B.; SCHMIDT, M.I.; POLANCZYK, C.A.; MENGUE, S.S. – Altos coeficientes de mortalidade em populações adultas brasileiras: uma comparação internacional. **Rev. Ass. Med. Brazil**, **38**: 138-144, 1992.
- FEARON, E.R.; HAMILTON, S.R.; VOGELSTEIN, B. – Clonal analysis of human colorectal tumors. **Science**, **238**: 193-197, 1987.
- FELDMAN, A.L.; ALEXANDER JR., H.R.; BARTLETT, D.L.; KRANDA, K.C.; MILLER, M.S.; COSTOUROS, N.G.; CHOYKE, P.L.; LIBUTTI, S.K. – A prospective analysis of plasma endostatin levels in colorectal cancer patients with liver metastases. **Ann. Surg. Oncol.**, **8**(9): 741-745, 2001a.

- FELDMAN, A.L.; PAK, H.; YANG, J.C.; ALEXANDER JR., H.R.; LIBUTTI, S.K. – Serum endostatin levels are elevated in patients with soft tissue sarcoma. **Cancer**, **91**(8): 1525-1529, 2001b.
- FIELDING, L.P. – Staging Systems. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 207-215.
- FINLEY, G.G.; SCHULZ, N.T.; HILL, S.A.; GEISER, J.R.; PIPAS, J.M.; MEISLER, A.I. – Expression of the myc gene family in different stages of human colorectal cancer. **Oncogene**, **4**(8): 963-971, 1989.
- FLEISS, J.L. – **Statistical Methods for Rates and Proportions**. 2. ed. New York, John Wiley & Sons Inc., 1981.
- FOLKMAN, J. – What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J. Natl. Cancer Inst.**, **82**: 4-6, 1990.
- FREEDMAN, A.N.; MICHALEK, A.M.; MARSHALL, J.R.; METTLIN, C.J.; PETRELLI, N.J.; ZHANG, Z-F.; BLACK, J.D.; SATCHIDANAND, S.; ASIRWATHAM, J.E. – The relationship between smoking exposure and p53 overexpression in colorectal cancer. **Br. J. Cancer**, **73**: 902-908, 1996.
- FURUDOI, A.; TANAKA, S.; HARUMA, K.; KITADAI, Y.; YOSHIHARA, M.; CHAYAMA, K.; SHIMAMOTO, F. – Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. **Oncology**, **62**(2): 157-66, 2002.
- GERHARDSSON DE VERDIER, M.; HAGMAN, U.; PETERS, R.K.; STEINECK, G.; OVERVIK, E. Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm. **Int. J. Cancer**, **49**: 520-525, 1991.
- GERTIG, D.M.; STAMPFER, M.; HAIMAN, C.; HENNEKENS, C.H.; KELSEY, K.; HUNTER, D.J. – Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **7**(11): 1001- 1005, 1998.

- GOLD, P. & FREEDMAN, S.O. – Demonstration of tumor-specific antigen in human colonic carcino-mata. **J. Exp. Med.**, **121**(3): 439, 1965.
- GUENTER, U.; HERBST, H.; BAUER, M.; ISBERT, C.; BUHR, H-J.; RIECKEN, E.O.; SCHUPPAN, D. – Collagen type XVIII/endostatin is differentially expressed in primary and metastatic colorectal cancers and ovarian carcinomas. **Br. J. Cancer**, **85**(10): 1540-1545, 2001.
- GUILLEM, J.G.; PATY, P.B.; ROSEN, N. – Molecular biology of colorectal cancer. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 149-156.
- GUO, J.Y.; WAN, D.S.; ZENG, R.P.; ZHANG, Q. – The polymorphism of GSTM1, mutagen sensitivity in colon cancer and healthy control. **Mutat. Res.**, **372**(1): 17-22, 1996.
- HANABAN, D. & FOLKMAN, J. – Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, **8**: 353-364, 1996.
- HARNDEN, D.G. – Inherited susceptibility to mutation. In: Phillips, D.H. – **Environmental Mutagenesis**. Oxford, Bios. Scientific., 1995. p. 61-81.
- HARRISON, J.C.; CARVAJAL, M.; GARNER, R.C. – Does aflatoxin exposure in the United Kingdom constitute a cancer risk ? **Environ. Health Perspect.**, **99**: 99-105, 1993.
- HASLE, H.; CLEMMENSEN, I.H.; MIKKELSEN, M. – Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. **The Lancet**, **355**: 165-169, 2000.
- HAYES, J. & PULFORD, D. – The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, **30**(6): 445-600, 1995.
- HENGSTLER, J.G.; ARAND, M.; HERRERO, M.E.; OESCH, F. – Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. **Recent Results Cancer Res.**, **154**: 47-85, 1998.

- HERRERO-JIMENEZ, P.; TOMITA-MITCHEL, A.; FURTH, E.E.; MORGENTHALER, S.; THILLY, W.G. – Population risk and physiological rate parameters for colon cancer. The union of an explicit model for carcinogenesis with the public health records of the United States. **Mutat. Res.**, **447**: 73-116, 2000.
- HILL, M.J. – Colorectal bacteria in colorectal carcinogenesis. In: Seitz, H.K.; Simanovsky, U.A.; Wright, N.A. – **Colorectal Cancer**. Heidelberg, Springer-Verlag, 1989. p. 160-176.
- HILL, M.J. – Dietary factors – The intestinal milieu. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 27-34.
- HILL, M.J.; DRASAR, B.S.; WILLIAMS, R.E.D. – Faecal bile-acid and clostridia in patients with cancer of the large bowel. **Lancet**, **1**: 535-539, 1975.
- HOULSTON, R.S. & TOMLINSON, P.M. – Polymorphisms and colorectal risk. **Gastroenterology**, **121**: 282-301, 2001.
- IONOV, Y.; PEINADO, M.A.; MALKHOSYAN, S.; SHIBATA, D.; PERUCHO, M. – Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. **Nature**, **363**(6429): 558-561, 1993.
- IUGHETTI, P.; SUZUKI, O.; GODOI, P.H.C.; ALVES, V.A.F.; SERTIÉ, A.L.; ZORICK, T.; SOARES, F.; CAMARGO, A.; MOREIRA, E.S.; DI LORETO, C.; MOREIRA-FILHO, C.A.; SIMPSON, A.; OLIVA, G.; PASSOS-BUENO, M.R. – A polymorphism in endostatin, an angiogenesis inhibitor, predisposes for the development of prostatic adenocarcinoma. **Cancer Res.**, **61**: 7375-7378, 2001.
- KATOH, T.; NAGATA, N.; KURODA, Y.; ITOH, H.; KAWAHARA, A.; KUROKI, N.; OOKUMA, R.; BELL, D.A. – Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphisms and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. **Carcinogenesis**, **17**(9): 1855-1859, 1996.
- KETTERER, B. – Protective role of glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. **Mutat. Res.**, **202**: 343-361, 1988.

- KNEKT, P.; HAKAMA, M.; JÄRVINEN, R.; PUKKALA, E.; HELIÖVAARA, M. – Smoking and risk of colorectal cancer. **Br. J. Cancer**, **78**(1): 136-139, 1998.
- KINZLER, K.W. & VOGELSTEIN, B. – Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**, **87**: 159-170, 1996.
- KNUDSON, A.G. – Antioncogenes and human cancer. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **90**: 10914-10921, 1993.
- KRAJINOVIC, M.; LABUDA, D.; RICHER, C.; KARIMI, S. SINNETT, D. – Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms. **Blood**, **93**(5): 1496-1501, 1999.
- LEE, E.; HUANG, Y.; ZHAO, B.; SEOW-CHOEN, F.; BALAKRISHNAN, A.; CHAN, S.H. – Genetic polymorphism of conjugating enzymes and cancer risk: GSTM1, GSTT1, NAT1 and NAT2. **J. Toxicol. Sci.**, **23**: 140-142, 1998.
- LIN, H.J.; PROBST-HENSCH, N.M.; INGLES, S.A.; HAN, C.Y.; LIN, B.K.; LEE, D.B.; FRANKL, H.D.; LEE, E.R.; LONGNECKER, M.P.; HAILE, R.W. – Glutathione S-transferase mu (GSTM1) null genotype, smoking, and prevalence of colorectal adenomas. **Cancer Res.**, **55**: 1224-1226, 1995.
- LIN, H.J.; PROBST-HENSCH, N.M.; LOUIE, A.D.; KAU, I.H.; WITTE, J.S.; INGLES, S.A.; FRANKL, H.D.; LEE, E.R.; HAILE, R.W. – Glutathione transferase null genotype, broccoli, and lower prevalence of colorectal adenomas. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **7**: 647-652, 1998.
- LOKTIONOV, A.; WATSON, M.A.; GUNTER, M.; STEBBINGS, W.S.L.; SPEAKMAN, C.T.M.; BINGHAM, S.A. – Glutathione S-transferase gene polymorphisms in colorectal cancer patients: interaction between GSTM1 and GSTM3 allele variants as a risk-modulating factor. **Carcinogenesis**, **22**: 1053-1060, 2001.
- LORAND, I.G.H.; SOUZA, C.A.; COSTA, F.F. – Haematological toxicity associated with agricultural chemicals in Brazil. **Lancet**, **1**: 404, 1984.

- MACH, J.P.; JAEGER, P.; BERTHOLET, M.M.; RUEGSEGG, C.H.; LOOSLI, R.M.; PETTAVEL, J. – Detection of recurrence of large-bowel carcinoma by radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen (C.E.A.). **Lancet**, **2**(7880): 535-540, 1974.
- MASFERRER, J. – Approach to angiogenesis inhibition based on cyclooxygenase-2. **Cancer J.**, **7 Suppl. 3**: S144-50, 2001.
- MELHAM, M.F.; NEISLER, A.I.; FINLEY, G.G. – Distribution of cells expressing myc proteins in human colorectal epithelium, polyps, and malignant tumors. **Cancer Res.**, **52**: 5853-5864, 1992.
- MOORGEN, M.; CAIRNS, J.; FORRESTER, L.M.; HAYES, J.D.; HALL, A.; CATTAN, A.R.; WOLF, C.R.; HARRIS, A.L. – Enhanced expression of glutathione S-transferases in colorectal carcinoma compared to non-neoplastic mucosa. **Carcinogenesis**, **12**(1): 13-17, 1991.
- NAKASAKI, T.; WADA, H.; SHIGEMORI, C.; MIKI, C.; GABAZZA, E.C.; NOBORI, T.; NAKAMURA, S.; SHIKU, H. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. **Am. J. Hematol.**, **69**(4): 247-54, 2002.
- NAMBA, H.; MATSUO, K.; FAGIN, J.A. – Clonal composition of benign and malignant thyroid tumors. **J. Clin. Invest.**, **86**(1): 120-125, 1990.
- NELSON, H.H.; WIENCKE, J.K.; CHRISTIANI, D.C.; CHENG, T.J.; ZUO, Z.F.; SCHWARTZ, B.S.; LEE, B.K.; SPITZ, M.R.; WANG, M.; XU, X.; KELSEY, K.T. – Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. **Carcinogenesis**, **16**: 1243-1245, 1995.
- ODA, H.; OGATA, Y.; SHIROUZU, K. The effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 against postoperative lung metastasis following removal of orthotopic transplanted human colon cancer: an experimental study. **Kurume Med.**, **48**(4): 285-93, 2001.
- O'REILLY, M.S.; BOEHM, T.; SHING, Y.; FUKAI, N.; VASIOS, G.; LANE, W.S.; FLYNN, E.; BIRKHEAD, J.R.; OLSEN, B.R.; FOLKMAN, J. – Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, **88**: 277-285, 1997.

- OZAWA, S.; SHINOHARA, H.; KANAYAMA, H.O.; BRUNS, C.J.; BUCANA, C.D.; ELLIS, L.M.; DAVIS, D.W.; FIDLER, I.J. Supression of angiogenesis and therapy of human colon cancer liver metastasis by systemic administration of interferon-alpha. **Neoplasia**, 3(2): 154-64, 2001.
- PAPAMICHAEL, D. – Prognostic role of angiogenesis in colorectal cancer. **Anticancer Res.**, 21(6B): 4349-53, 2001.
- PELTOMAKI, P.; AALTONEN, L.A.; SISTONEN, P.; PYLKKANEN, L.; MECKLIN, J.P.; JARVINEN, H.; GREEN, J.S.; JASS, J.R.; WEBER, J.L.; LEACH, F.S. – Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science**, 260: 810-812, 1993.
- PEMBLE, S.; SCHROEDER, K.R.; SPENCER, S.R.; MEYER, D.J.; HALLIER, E.; BOLT, H.M.; KETTERER, B.; TAYLOR, J.B. – Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. **Biochem. J.**, 300: 271-276, 1994.
- PERLETTI, G.; CONCARI, P.; GIARDINI, R.; MARRAS, E; PICCININI, F.; FOLKMAN, J.; CHEN, L. – Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. **Cancer Res.**, 60: 1793-1796, 2000.
- PETERS, R.K.; GARABRANT, D.H.; YU, M.C.; MACK, T.M. – A case-control study of occupational and dietary factors in colorectal cancer in young men by subsite. **Cancer Res.**, 49: 5459-5468, 1989.
- QUEIROZ, M.L.S.; BINCOLETO, C.; PERLINGEIRO, R.C.R.; SOUZA, C.A.; TOLEDO, H. – Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to hexachlorobenzene. **Human Exp. Toxicol.**, 16: 322-326, 1997.
- RABBITS, T.H. – Chromosomal translocation in human cancer. **Nature**, 372: 143-149, 1994.
- RUIZ, M.A.; AUGUSTO, L.G.S.; VASSALLO, J.; VIGORITO, A.C.; LORAND-METZE, I. – Bone marrow morphology in patients with neutropenia due to chronic exposure to organic solvents (benzene): early lesions. **Path. Res. Pract.**, 190: 151-154, 1994.



- SAADAT, I. & SAADAT, M. – Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes and the risk of gastric and colorectal cancers. **Cancer Letters**, **169**: 21-26, 2001.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.F.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. – Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**: 487-491, 1988.
- SASAKI, T.; FUKAI, N.; MANN, K.; GÖHRING, W.; OLSEN, B.R.; TIMPL, R. – Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. **EMBO J.**, **17**(15): 4249-4256, 1998.
- SCAPPATICCI, F.A.; SMITH, R.; PATHAK, A.; SCHLOSS, D.; LUM, B.; CAO, Y.; JOHNSON, F.; ENGLEMAN, E.G.; NOLAN, G.P. – Combination angiostatin and endostatin gene transfer induces synergistic antiangiogenic activity *in vitro* and antitumor efficacy in leukemia and solid tumors in mice. **Mol. Ther.**, **3**(2): 186-196, 2001.
- SCHIFFMAN, M.H. & FELTON, J.S. – RE: "Fried foods and the risk of colon cancer". **Am. J. Epidemiol.**, **131**: 376-378, 1990.
- SCHOTTENFELD, D. - Epidemiology. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 11-24.
- SCHOTTENFELD, D.; WARSHAUER, M.E.; ZAUBER, A.G. – Study of cancer mortality and incidence in wood shop workers of the General Motors Corporation: report prepared for the Occupational Health Advisory Board of United Auto Workers, 1980.
- SEGAL, I.; EDWARDS, C.A.; WALKER, A.R.P. – Continuing low colon cancer incidence in African populations. **Am. J. Gastroenterol.**, **95**(4): 859-860, 2000.
- SEIDGARD, J.; VORACHEK, W.R.; PERO, R.W.; REARSON, W.R. – Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. **Proc. Acad. Sci. USA**, **85**: 7293-7297, 1988.



- SHIKE, M. – Dietary Factors. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 5-40.
- SIDRANSKY, D.; TOKINO, T.; HAMILTON, S.R.; KINZLER, K.W.; LEVIN, B.; FROST, P.; VOGELSTEIN, B.- Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. **Science**, **256**: 102-105, 1992.
- SLATTERY, M.L.; POTTER, J.D.; SAMOWITZ, W.; BIGLER, J.; CAAN, B.; LEPPERT, M. – NAT2, GSTM1, cigarette smoking, and risk of colon cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **7**: 1079-1084, 1998.
- SLATTERY, M.L.; KAMPMAN, E.; SAMOWITZ, W.; CAAN, B.J.; POTTER, J.D. – Interplay between dietary inducers of GST and the GSTM-1 genotype in colon cancer. **Int. J. Cancer**, **87**: 728-733, 2000.
- SMITH, G.; DALE-SMITH, C.A.; WOLF, C.R. – Pharmacogenetic polymorphisms. In: Phillips, D.H. & Venit, S. – **Mutagenesis**. Oxford, Bios. Scientific., 1995. p. 83-106.
- SOKMEN, S.; SARIOGLU, S.; FUZUN, M.; TERZI, C.; KUPELIOGLU, A.; ASLAN, B. Prognostic significance of angiogenesis in rectal cancer: a morphometric investigation. **Anticancer Res.**, **21**(6B): 4341-4348, 2001.
- STACK, E. & DUBOIS, R.N. – Role of cyclooxygenase inhibitors for the prevention of colorectal cancer. **Gastroenterol. Clin. North. Am.**, **30**(4): 1001-1010, 2001.
- SWANSON, G.M.; BELLE, S.H.; BURROWS, R.W. – Colon cancer incidence among model markers and pattern markers in the automobile manufacturing industry; a continuing dilemma. **J. Occup. Med.**, **27**: 567-569, 1985.
- TOMII, Y.; KAMOCHI, J.; YAMAZAKI, H.; SAWA, N.; TOKUNAGA, T.; OHNISHI, Y.; KIJIMA, H.; UYAMA, Y.; TAMAOKI, N.; NAKAMURA, M. Human trombospondin 2 inhibits proliferation of microvascular endothelial cells. **Int. J. Oncol.**, **20**(2): 339-42, 2002.
- TROCK, B.; UNZA, E.; GREENWALD, P. – Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analysis of the epidemiologic evidence. **J. Natl. Cancer Inst.**, **82**: 650-661, 1990.

- TUDEK, B.; BIRD, R.P.; BRUCE, W.R. – Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. **Cancer Res.**, **49**(5): 1236-1240, 1989.
- VISAKORPI, T. – Molecular genetics of prostate cancer. **Ann. Chirurg. Gynaecol.**, **88**: 11-16, 1999.
- VOGELSTEIN, B.; FEARON, E.R.; KERN, S.E.; HAMILTON, S.R.; PREISINGER, A.C.; NAKAMURA, Y.; WHITE, R. – Allelotype of colorectal carcinomas. **Science**, **244**(4901): 207-211, 1989.
- WARD, L.S. – Genética molecular do câncer: implicações no câncer de tiróide. **Rev. Bras. Cl. Terap.**, **23**(6): 212-218, 1997.
- WARWICK, A.; SARHANIS, P.; REDMAN, C.W.E.; PEMBLE, S.; TAYLOR, J.B.; KETTERER, B.; JONES, P.; ALLDERSEA, J.; GILFORD, J.; YENG, L.; FRYER, A.; STRANGE, R.C. – Theta class glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cervical neoplasia: interactions with GSTM1, CYP2 and smoking. **Carcinogenesis**, **15**: 2841-2845, 1994.
- WAYE, J. – Evolução do câncer do cólon. In: Habr-Gama, A; Gama-Rodrigues, J.J.; Betarello, A. – **Câncer do Estômago e do Intestino Grosso: Prevenção e Detecção**. São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária Ltda. 1980. p. 73-76.
- WEINBERG, R. – Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis. **Cancer Res.**, **49**: 3713-3721, 1989.
- WILLETT, W.C.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A. - Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. **Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.**, **323**: 1664-1672, 1990.
- WINAWER, S.J. & SHERLOCK, P. – Malignant neoplasms of the small and large intestine. In: Sleisenger, M.H. & Fordtran, J.S. – **Gastrointestinal Disease**. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1983, p. 1220-1249.

- WINAWER, S.J.; ENKER, W.E.; LIGHTDALE, C.J. – Malignant tumors of the colon and rectum. In: Berk, J.E. – **Gastroenterology**. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1985, p. 2531-2574.
- YOKOYAMA, Y.; GREEN, J.E.; SUKHATME, V.P.; RAMAKRISHNAN, S. – Effect of endostatin on spontaneous tumorigenesis of mammary adenocarcinomas in a transgenic mouse model. **Cancer Res.**, **60**: 4362-4365, 2000.
- YOON, S.S.; ETO, H.; LIN, C.; NAKAMURA, H.; PAWLIK, T.M.; SONG, S.U.; TANABE, K.K. – Mouse endostatin Inhibits the formation of lung and liver metastases. **Cancer Res.**, **59**: 6251-6256, 1999.
- ZHANG, H.; AHMADI, A.; ARBMAN, G.; ZDOLSEK, J.; CARSTENSEN, J.; NORDENSKJOLD, B.; SODERKVIST, P.; SUN, X.F. - Glutathione S-transferase T1 and M1 genotypes in normal mucosa, transitional mucosa and colorectal adenocarcinoma. **Int. J. Cancer**, **84**(2): 135-138, 1999.
- ZHONG, S.; WYLLIE, A.H.; BARNES, D.; WOLF, C.R.; SPURR, N.K. – Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and, colon cancer. **Carcinogenesis**, **14**(9): 1821-1824, 1993.
- ZINKIN, L.D. – A critical review of the classification and staging of colorectal cancer. **Dis. Colum Rectum.**, **26**: 37-43, 1983.

***ANEXOS***

**Carta de consentimento pós – informação a ser obtida dos pacientes, para participação no estudo intitulado “Influência dos Polimorfismos dos Alelos do Sistema da Glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1) e Theta 1 (GSTT1) e do Polimorfismo D104N do Gene COL18A1 na Susceptibilidade ao Adenocarcinoma Colorretal Esporádico”**

**Nome do paciente:** .....

**Idade:** .....anos    **RG:** .....    **HC:**.....

**Endereço:** .....

.....

**Nome do responsável legal (se paciente incapacitado):**

.....

**RG:**.....    **Grau de parentesco:**.....

**Endereço:**.....

.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue (volume: 10 ml) a ser colhida em veia de um dos braços. Estou ciente de que este sangue será utilizado para a avaliação de uma predisposição familiar para o desenvolvimento de câncer do intestino e reto. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização deste exame. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e

**Carta de consentimento pós – informação a ser obtida dos indivíduos controle, para participação no estudo intitulado “Influência dos Polimorfismos dos Alelos do Sistema da Glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1) e Theta 1 (GSTT1) e do Polimorfismo D104N do Gene COL18A1 na Susceptibilidade ao Adenocarcinoma Colorretal Esporádico”**

**Nome:** .....

**RG:** .....

**Idade:** ..... anos

**Endereço residencial:** .....

.....

**Endereço comercial:** .....

.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei informações sobre o funcionamento do meu intestino e sobre a ocorrência de câncer do intestino ou do reto em meus familiares e uma amostra de sangue a ser colhida em veia de um dos braços (volume: 10 ml). Estou ciente que este material será utilizado para a avaliação de uma predisposição familiar para o desenvolvimento de câncer do intestino e do reto. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização deste exame. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu atendimento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Dra. Carmen

Distribuições dos 102 pacientes com adenocarcinoma colorretal de acordo com a idade, o sexo, a raça e o hábito de fumar

N.º do caso	Paciente	Idade (anos)	Sexo	Raça	Tabagismo
1	T.G.L.	61	F	N	NT
2	O.A.V.	72	M	C	NT
3	F.X.F.	74	M	C	NT
4	A.A.S.	41	F	C	NT
5	A.D.	81	M	C	T
6	E.F.D.A.	46	F	C	NT
7	M.C.G.H.	47	F	C	T
8	M.A.T.S.	76	F	C	NT
9	E.M.F.	67	F	C	T
10	F.P.	82	M	C	T
11	G.R.T.	51	F	N	NT
12	P.B.T.	80	M	C	NT
13	I.A.C.	68	F	C	T
14	M.L.Q.R.	46	F	C	NT
15	H.P.B.	66	F	C	NT
16	M.J.D.Q.	53	F	C	NT
17	C.O.	51	M	C	NT
18	R.J.C.G.	47	M	C	T
19	R.A.M.	33	M	C	NT
20	H.M.	64	M	C	T
21	J.Q.C.	82	M	N	NT
22	M.I.Z.M.	51	F	C	NT
23	G.A.S.A.	40	F	C	NT
24	H.S.	59	M	C	NT
25	A.M.O.	80	M	C	NT
26	M.A.I.M.	54	F	A	NT
27	S.M.J.	73	M	C	NT
28	D.S.	64	M	C	NT
29	A.O.S.F.	70	F	C	NT
30	J.J.S.	83	M	N	NT
31	J.T.	73	M	C	NT
32	V.E.	59	M	C	T
33	M.A.I.P.	55	F	C	T
34	J.S.M.	57	M	C	NT
35	M.V.	51	M	A	T
36	L.A.R.S.	24	F	C	NT
37	A.G.S.	55	F	C	NT
38	A.C.S.	62	F	C	NT
39	A.C.F.	68	M	C	NT
40	A.V.F.	46	M	C	T
41	L.F.S.	70	M	C	ET
42	O.P.	48	M	C	ET
43	M.V.	70	F	C	NT
44	A.P.	45	M	C	T

Continuação

45	O.F.	68	F	C	NT
46	V.S.C.	59	F	N	ET
47	M.P.	49	M	C	NT
48	R.S.S.	35	M	C	NT
49	J.O.E.	74	M	C	T
50	G.P.A.	56	F	C	T
51	D.F.A.	50	M	C	ET
52	D.J.S.	55	F	C	NT
53	P.A.B.	75	M	C	NT
54	L.B.O.	55	M	C	NT
55	L.S.	58	M	C	NT
56	J.A.P.C.	54	F	C	T
57	E.M.S.	69	F	C	NT
58	R.F.R.	27	F	C	NT
59	G.M.	68	M	C	T
60	I.T.L.	75	F	C	NT
61	M.I.F.M.	67	F	C	NT
62	M.F.C.	57	F	C	T
63	J.M.A.	71	F	N	NT
64	M.M.S.S.	40	F	C	T
65	E.S.	51	F	C	T
66	A.C.S.	51	M	C	T
67	G.B.M.N.	36	M	C	NT
68	R.N.M.C.	29	F	C	NT
69	B.A.	48	M	C	T
70	L.B.L.	41	F	C	NT
71	E.S.F.	52	F	C	NT
72	A.M.S.	60	F	N	NT
73	C.G.S.	74	F	C	NT
74	O.C.	56	M	C	NT
75	M.B.F.	65	F	C	T
76	J.J.L.	59	M	C	ET
77	M.F.S.	50	F	C	NT
78	J.B.C.S.	61	F	C	NT
79	N.M.C.P.	47	F	C	NT
80	A.M.	69	M	C	ET
81	A.C.G.	60	M	C	ET
82	J.M.A.	66	M	C	NT
83	A.B.	71	M	C	ET
84	A.R.G.	42	F	C	T
85	J.M.F.	60	M	C	ET
86	M.A.G.	49	M	N	NT
87	J.C.	72	M	C	T
88	A.D.A.	83	F	N	NT
89	M.C.T.S.	61	F	C	NT
90	A.B.	44	M	C	NT
91	D.G.	67	M	N	T



Continuação

92	I.A.P.S.	41	F	C	NT
93	J.E.G.	63	M	C	T
94	J.P.R.	74	M	C	NT
95	M.G.	79	M	C	T
96	N.A.F.	56	M	C	T
97	J.B.G.G.	48	M	C	T
98	J.G.S.	68	M	C	T
99	L.R.R.	39	M	C	T
100	O.L.	64	M	C	NT
101	S.T.	74	M	C	T
102	H.S.S.J.	66	F	C	ET

Sendo: N.º, número; F, feminino; M, masculino; N, negróide; C, caucasóide; A, asiática; NT, não tabagista; T, tabagista; ET, ex-tabagista

**Anexo 3**

Distribuições dos 102 pacientes com adenocarcinoma colorretal de acordo com a localização, o estadio e o grau de diferenciação do tumor

N.º do caso	Paciente	Localização do tumor	Estadiamento		Grau de diferenciação do Adenocarcinoma
			TNM	Astler-Coller	
1	T.G.L.	P+D	IV	B1	moderado
2	O.A.V.	D	IV	C2	bem
3	F.X.F.	D	III	C2	pouco
4	A.A.S.	P	IV	C2	moderado
5	A.D.	D	II	B2	bem
6	E.F.D.A.	P	III	C2	moderado
7	M.C.G.H.	D	II	B2	moderado
8	M.A.T.S.	D	IV	B2	moderado
9	E.M.F.	D	II	B2	moderado
10	F.P.	P	III	C2	bem
11	G.R.T.	D	II	B2	moderado
12	P.B.T.	D	III	B2	pouco
13	I.A.C.	P	II	B2	bem
14	M.L.Q.R.	D	III	C2	moderado
15	H.P.B.	P+D	III	C1	moderado
16	M.J.D.Q.	D	I	B2	moderado
17	C.O.	D	II	B2	bem
18	R.J.C.G.	D	II	B2	bem
19	R.A.M.	P	III	C2	moderado
20	H.M.	D	I	B1	moderado
21	J.Q.C.	D	II	B2	moderado
22	M.I.Z.M.	D	II	B2	moderado
23	G.A.S.A.	D	III	C1	moderado
24	H.S.	D	II	B2	moderado
25	A.M.O.	D	I	B1	bem
26	M.A.I.M.	P	IV	B2	bem
27	S.M.J.	D	IV	NR	bem
28	D.S.	P	IV	C1	pouco
29	A.O.S.F.	P	II	B2	moderado
30	J.J.S.	D	IV	NR	pouco
31	J.T.	D	I	B1	bem
32	V.E.	P	IV	C2	bem
33	M.A.I.P.	D	I	B1	bem
34	J.S.M.	D	III	C2	moderado
35	M.V.	P	0	A	bem
36	L.A.R.S.	D	III	C2	moderado
37	A.G.S.	D	I	B1	moderado
38	A.C.S.	P	III	C2	NA
39	A.C.F.	D	II	B2	moderado
40	A.V.F.	P	II	B2	moderado
41	L.F.S.	D	II	B2	bem
42	O.P.	D	NR	NR	bem

Continuação

43	M.V.	D	II	B2	bem
44	A.P.	D	III	C2	bem
45	O.F.	D	III	C2	moderado
46	V.S.C.	D	I	B1	moderado
47	M.P.	D	III	C1	bem
48	R.S.S.	D	IV	C2	moderado
49	J.O.E.	D	II	B2	moderado
50	G.P.A.	D	I	B1	moderado
51	D.F.A.	P	I	B1	pouco
52	D.J.S.	D	II	B2	pouco
53	P.A.B.	D	I	B1	moderado
54	L.B.O.	D	II	B2	moderado
55	L.S.	D	I	B1	moderado
56	J.A.P.C.	D	I	B1	moderadao
57	E.M.S.	D	III	C2	moderado
58	R.F.R.	P	II	B2	bem
59	G.M.	P	II	B2	moderado
60	I.T.L.	D	I	B1	moderado
61	M.I.F.M.	P	IV	C2	moderado
62	M.F.C.	P	III	C2	moderado
63	J.M.A.	D	IV	B2	moderado
64	M.M.S.S.	D	II	B2	moderado
65	E.S.	D	NR	NR	moderado
66	A.C.S.	P	II	B2	moderado
67	G.B.M.N.	D	III	C2	pouco
68	R.N.M.C.	D	III	C1	moderado
69	B.A.	D	II	B2	moderado
70	L.B.L.	P	III	C2	moderado
71	E.S.F.	D	II	B2	pouco
72	A.M.S.	D	I	B1	bem
73	C.G.S	D	III	C2	moderado
74	O.C.	P	IV	C2	moderado
75	M.B.F.	D	IV	C2	moderado
76	J.J.L.	D	II	B2	moderado
77	M.F.S.	D	II	B2	bem
78	J.B.C.S.	D	III	C2	pouco
79	N.M.C.P.	P	III	C1	moderado
80	A.M.	D	IV	B2	moderado
81	A.C.G.	P	III	C2	moderado
82	J.M.A.	D	IV	B1	bem
83	A.B.	D	IV	NR	moderado
84	A.R.G.	P	III	C2	pouco
85	J.M.F.	D	IV	C2	moderado
86	M.A.G.	P + D	NR	NR	pouco
87	J.C.	P	IV	C2	moderado
88	A.D.A.	D	IV	NR	moderado
89	M.C.T.S.	D	NR	NR	moderado

Continuação

90	A.B.	P	III	C2	moderado
91	D.G.	D	II	B2	moderado
92	I.A.P.S.	D	NR	NR	bem
93	J.E.G.	P	II	B2	pouco
94	J.P.R.	D	NR	NR	moderado
95	M.G.	P	I	B1	moderado
96	N.A.F.	D	II	B2	moderado
97	J.B.G.G.	P	II	B2	bem
98	J.G.S.	D	IV	NR	bem
99	L.R.R.	P	II	B2	moderado
100	O.L.	P	IV	C2	moderado
101	S.T.	D	III	C1	bem
102	H.S.S.J.	P	IV	C2	moderado

Sendo: N.º, número; P, proximal; D, distal; P+D, proximal e distal; NR, não realizado

**Anexo 4**

Distribuições dos 102 pacientes com adenocarcinoma colorretal de acordo com os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* do sistema da glutatona S-transferase e da presença ou ausência do polimorfismo D104N do gene *COL18A1*

Nº do caso	Paciente	GST		D104N
		M1	T1	
1	T.G.L.	-	+	N
2	O.A.V.	+	+	P
3	F.X.F.	-	+	P
4	A.A.S.	+	+	N
5	A.D.	+	+	N
6	E.F.D.A.	+	+	N
7	M.C.G.H.	+	+	N
8	M.A.T.S.	+	+	N
9	E.M.F.	-	+	P
10	F.P.	+	+	N
11	G.R.T.	-	+	P
12	P.B.T.	-	+	N
13	I.A.C.	+	+	N
14	M.L.Q.R.	-	-	P
15	H.P.B.	+	+	P
16	M.J.D.Q.	-	+	N
17	C.O.	-	-	N
18	R.J.C.G.	+	+	N
19	R.A.M.	-	+	N
20	H.M.	-	+	N
21	J.Q.C.	+	+	N
22	M.I.Z.M.	-	+	N
23	G.A.S.A.	-	-	N
24	H.S.	-	-	N
25	A.M.O.	+	+	N
26	M.A.I.M.	+	+	N
27	S.M.J.	+	+	N
28	D.S.	-	+	N
29	A.O.S.F.	+	+	P
30	J.J.S.	+	+	N
31	J.T.	+	+	P
32	V.E.	+	+	N
33	M.A.I.P.	+	-	P
34	J.S.M.	-	+	N
35	M.V.	-	+	N
36	L.A.R.S.	+	+	N
37	A.G.S.	-	+	N
38	A.C.S.	+	+	P
39	A.C.F.	-	+	N
40	A.V.F.	-	-	N
41	L.F.S.	-	+	N

Continuação

42	O.P.	-	+	N
43	M.V.	+	+	N
44	A.P.	-	+	N
45	O.F.	-	+	N
46	V.S.C.	-	+	N
47	M.P.	+	+	N
48	R.S.S.	+	-	N
49	J.O.E.	-	+	N
50	G.P.A.	+	+	N
51	D.F.A.	+	+	N
52	D.J.S.	-	+	N
53	P.A.B.	-	+	N
54	L.B.O.	+	-	N
55	L.S.	+	+	P
56	J.A.P.C.	+	-	N
57	E.M.S.	+	+	N
58	R.F.R.	-	-	N
59	G.M.	-	+	P
60	I.T.L.	+	-	N
61	M.I.F.M.	-	+	N
62	M.F.C.	+	+	N
63	J.M.A.	+	+	N
64	M.M.S.S.	+	+	N
65	E.S.	-	+	N
66	A.C.S.	+	+	N
67	G.B.M.N.	-	+	N
68	R.N.M.C.	-	+	N
69	B.A.	+	+	N
70	L.B.L.	+	+	N
71	E.S.F.	+	-	N
72	A.M.S.	-	+	N
73	C.G.S.	+	+	N
74	O.C.	-	+	N
75	M.B.F.	+	+	N
76	J.J.L.	-	-	P
77	M.F.S.	+	+	P
78	J.B.C.S.	+	+	N
79	N.M.C.P.	+	+	P
80	A.M.	+	+	N
81	A.C.G.	-	+	P
82	J.M.A.	-	+	N
83	A.B.	+	+	N
84	A.R.G.	+	-	N
85	J.M.F.	-	+	N
86	M.A.G.	+	+	N
87	J.C.	+	+	N
88	A.D.A.	-	+	N

Continuação

89	M.C.T.S.	-	+	N
90	A.B.	+	+	N
91	D.G.	-	+	N
92	I.A.P.S.	-	+	N
93	J.E.G.	+	+	N
94	J.P.R.	-	+	N
95	M.G.	+	+	N
96	N.A.F.	+	-	N
97	J.B.G.G.	-	-	N
98	J.G.S.	-	+	N
99	L.R.R.	-	+	N
100	O.L.	-	+	N
101	S.T.	-	-	N
102	H.S.S.J.	-	+	N

Sendo : N.º, número; ( - ) deleção homozigótica do gene *GSTM1* ou *GSTT1*; ( + ) presença do gene *GSTM1* ou *GSTT1*, P, presença do polimorfismo D104N; N: polimorfismo *D104N* não identificado

**Anexo 5**

Distribuição dos 300 controles, de acordo com a idade, o sexo, a raça, os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* do sistema da glutathione S-transferase e a presença ou a ausência do polimorfismo D104N do gene *COL18A1*

N.º do Caso	Doador	Idade	Sexo	Raça	GST		D104N
					M1	T1	
1	M.A.R.C.	57	F	C	-	+	N
2	P.B.S.	51	M	C	-	+	N
3	S.M.S.	54	M	N	+	+	N
4	M.L.V.S.	57	F	C	+	+	N
5	M.H.P.S.	51	F	C	+	+	P
6	E.P.T.	59	M	N	-	+	N
7	N.P.S.	55	M	C	+	+	N
8	N.G.A.B.	50	F	C	-	+	N
9	M.V.G.	57	M	C	-	+	P
10	A.A.G.	54	M	C	+	+	N
11	F.B.	54	M	C	+	+	P
12	W.M.C	52	M	C	-	+	N
13	J.F.N.	59	M	C	+	+	N
14	N.M.J.G.	53	F	C	-	+	N
15	J.C.	52	M	C	-	+	P
16	C.D.	54	M	C	-	+	N
17	B.E.	53	M	C	+	+	N
18	J.A.S.	51	M	N	-	+	N
19	C.S.F.	52	F	C	-	+	N
20	J.A.N.	52	M	N	+	-	N
21	M.P.S.L.	57	F	C	-	+	N
22	J.F.S.	57	M	C	-	-	N
23	A.R.T.	53	M	C	-	-	N
24	N.S.	56	M	N	-	+	N
25	E.T.	55	M	C	-	+	N
26	J.C.A.N.	53	M	N	+	+	N
27	J.R.C.	50	M		+	+	N
28	D.I.S.D.	51	F	C	-	+	N
29	A.N.P.	56	M	C	+	+	N
30	J.C.S.	50	M	C	+	-	N
31	M.S.S.	57	F	N	+	+	N
32	O.J.	58	M	C	-	+	N
33	V.O.	50	M	C	-	+	N
34	M.J.S.	53	M	C	+	+	N
35	E.G.O.	57	M	C	-	-	N
36	L.T.G.	51	F	C	+	+	N
37	J.M.L.	50	M	C	-	+	N
38	H.J.M.	50	M	C	-	+	N
39	E.P.A.	50	F	C	-	-	N
40	M.C.	55	M	C	+	+	N
41	M.N.	53	M	C	-	+	N
42	A.D.C.	52	M	C	-	+	N



Continuação

43	B.F.P.C.	58	M	N	+	+	N
44	V.P.T.	50	M	N	-	+	N
45	A.P.M.	56	M	C	-	+	N
46	S.R.	56	M	C	+	-	N
47	J.B.B.M.	51	M	C	-	+	N
48	M.L.S.	56	F	C	-	+	N
49	M.G.B.	59	M	C	-	+	N
50	G.P.S.	51	M	C	+	-	N
51	J.S.	50	M	N	+	+	N
52	L.T.O.	58	F	C	-	+	N
53	E.B.N.	52	M	C	+	+	N
54	U.T.	50	M	C	+	+	N
55	J.G.S.	53	M	C	-	+	P
56	J.G.A.S.	55	M	C	+	-	P
57	P.J.S.	55	M	C	-	+	N
58	A.S.L.	57	F	C	+	-	N
59	D.A.S.	53	M	C	-	+	N
60	P.A.S.	55	M	C	-	+	N
61	A.L.A.	52	F	C	+	+	N
62	J.G.S.S.	52	M	C	-	+	N
63	J.R.C.	51	M	C	+	+	N
64	J.P.S.	55	M	C	-	+	N
65	J.C.L.	53	M	C	+	-	N
66	J.M.F.	51	M	C	+	+	N
67	I.R.P.	56	F	C	+	+	N
68	L.A.S.	56	F	C	-	+	N
69	O.M.	50	M	C	-	+	N
70	A.V.G.	52	F	C	+	+	N
71	D.A.A.	50	M	N	-	-	N
72	N.Y.	58	M	A	+	+	N
73	J.M.S.	53	F	C	-	+	N
74	V.S.P.F.	56	F	C	-	-	P
75	J.A.F.	59	M	C	+	+	N
76	J.A.C.	58	M	C	+	-	N
77	C.D.	53	M	N	+	+	N
78	A.D.	52	M	C	+	+	N
79	H.C.L.	56	F	C	-	+	N
80	L.G.O.	57	M	C	-	+	N
81	W.M.S.	57	M	C	+	+	N
82	R.B.A.N.	56	M	C	-	+	N
83	A.B.S.	51	M	C	-	+	N
84	A.O.L.	55	M	C	+	+	N
85	E.B.	56	M	C	+	-	N
86	M.A.B.B.	51	F	C	+	+	N
87	A.C.F.	50	M	C	+	-	N
88	T.A.F.	50	F	N	-	+	P
89	F.L.G.F.	50	M	C	+	+	N

Continuação

90	A.B.C.M.	55	M	C	-	+	N
91	P.N.O.S.	56	M	C	-	+	N
92	V.A.	54	M	C	+	+	N
93	C.J.F.	52	M	C	+	-	N
94	L.G.T.	59	M	C	+	+	N
95	A.R.S.	58	M	N	+	+	N
96	A.R.	50	M	N	-	+	N
97	E.F.S.	51	M	N	+	-	N
98	L.M.	53	M	N	-	-	P
99	V.A.	55	M	C	-	+	N
100	O.R.P.	56	M	C	-	+	N
101	M.C.P.	50	F	C	+	-	N
102	J.A.S.	57	M	C	+	-	N
103	J.B.M.L.	52	M	C	-	-	P
104	H.P.L.	58	M	N	-	+	N
105	J.S.N.	58	M	C	+	+	P
106	A.S.	51	M	C	+	-	N
107	J.S.F.P.	50	M	C	+	+	P
108	S.P.U.	50	F	C	-	+	P
109	C.A.P.	50	M	N	+	+	N
110	A.B.	51	M	C	+	+	N
111	F.D.	52	M	C	+	+	N
112	B.B.	57	M	C	+	+	N
113	S.F.R.	56	M	C	+	+	N
114	E.F.S.	52	M	N	+	+	N
115	B.A.	56	M	C	+	+	N
116	J.P.A.	57	M	C	-	+	N
117	A.L.G.	51	M	C	+	+	N
118	A.C.B.	56	M	C	+	+	N
119	R.R.E.	55	M	C	+	+	N
120	N.C.	51	M	C	-	+	N
121	A.C.C.	50	M	C	-	+	N
122	A.R.P.	50	M	C	-	+	P
123	S.B.	50	M	C	+	+	P
124	M.P.M.	59	F	C	-	+	N
125	M.J.G.J.	51	F	N	-	-	N
126	R.F.M.	58	M	C	+	+	N
127	L.C.	56	M	C	-	-	N
128	E.C.B.	49	F	C	+	+	N
129	M.J.B.	58	M	C	+	+	N
130	S.T.	50	M	N	-	+	N
131	L.A.S.B.	55	M	C	-	+	N
132	M.H.P.	60	M	C	+	+	N
133	O.C.	51	M	C	+	+	P
134	J.D.S.	60	M	C	-	+	N
135	G.T.L.	53	M	C	+	+	N
136	I.F.	57	M	C	+	-	N

Continuação

137	J.V.F.	53	M	C	+	+	N
138	C.A.F.	51	M	C	+	+	N
139	F.P.B.	50	M	N	-	+	N
140	W.F.	60	M	C	-	-	N
141	G.T.S.	51	M	N	+	+	N
142	J.S.	54	M	C	-	+	N
143	A.L.F.	51	M	C	+	+	N
144	O.S.R.	50	M	C	+	+	N
145	B.C.	56	M	C	-	+	N
146	A.C.C.	52	M	C	-	+	N
147	K.K.	56	M	C	+	-	N
148	J.P.L.F.	52	M	C	+	+	N
149	A.S.	51	M	C	-	+	N
150	J.M.S.	50	M	C	+	-	N
151	J.C.M.	50	M	C	-	+	N
152	B.J.Z.	52	M	N	+	+	N
153	C.M.	59	M	C	+	+	N
154	M.S.	54	M	C	-	+	N
155	C.R.	51	F	C	-	+	P
156	A.F.D.O.	59	F	N	-	+	N
157	J.A.S.	59	M	C	+	+	N
158	A.C.S.R.	52	M	C	+	+	N
159	J.R.F.	55	M	N	-	-	N
160	S.T.	54	M	C	-	+	N
161	A.C.S.	50	M	C	+	+	N
162	E.C.C.	52	M	C	+	+	P
163	M.F.N.	51	M	C	+	+	N
164	Z.F.	54	F	C	+	+	N
165	E.S.R.	60	M	N	-	-	N
166	F.S.	51	M	C	-	+	N
167	J.M.H.M.	55	M	C	-	+	N
168	R.B.M.	56	M	C	+	+	N
169	L.O.	52	M	N	+	+	N
170	J.R.S.	55	M	C	+	-	N
171	C.P.L.	53	F	C	+	+	N
172	T.J.P.R.	54	F	C	-	+	N
173	L.S.S.	53	M	C	-	-	P
174	A.C.	54	M	C	+	+	N
175	V.A.B.	53	M	C	+	+	N
176	S.P.B.	51	M	C	+	+	N
177	E.C.L.	50	M	C	+	+	N
178	D.B.	52	M	C	-	-	N
179	A.P.	59	M	C	-	+	N
180	L.A.L.	54	M	C	+	+	N
181	A.R.O.	51	M	C	+	+	N
182	R.M.	51	M	C	+	+	N
183	A.R.	58	M	C	-	+	N

Continuação

184	A.J.	52	M	C	+	+	N
185	M.R.S.	53	M	C	+	+	N
186	L.G.	56	M	C	-	+	P
187	M.C.T.	58	F	C	-	-	N
188	S.N.	55	M	C	-	+	N
189	F.A.S.	50	M	C	-	+	N
190	A.G.	52	M	C	+	+	N
191	L.F.S.	51	M	C	+	+	P
192	L.O.R.	58	F	C	+	+	N
193	P.R.	53	M	C	+	+	N
194	J.E.P.	58	M	C	-	+	N
195	J.S.B.	57	M	C	+	+	N
196	M.A.T.	52	F	C	+	+	N
197	J.C.Q.	55	M	C	-	+	N
198	A.B.	56	M	C	+	+	N
199	J.I.A.	55	M	N	+	+	N
200	F.B.F.	52	M	C	-	+	N
201	R.M.	54	M	C	+	+	P
202	C.M.	54	F	C	-	+	P
203	D.L.S.	56	F	C	-	+	N
204	A.A.Z.	57	F	C	+	+	N
205	J.V.R.	54	M	N	+	+	N
206	M.B.M.	58	F	C	-	+	N
207	J.F.S.	51	M	C	+	+	N
208	I.M.L.C.	52	F	C	+	-	N
209	C.C.P.	57	M	C	-	-	N
210	T.F.M.	53	F	C	+	-	N
211	A.M.S.C.	54	F	N	+	+	N
212	F.D.F.	59	M	C	+	-	N
213	J.L.S.	52	M	C	+	+	N
214	A.A.B.P.	54	F	C	-	+	N
215	J.A.S.	51	M	C	-	+	N
216	A.S.F.	52	M	C	-	+	N
217	W.F.	56	M	N	-	+	N
218	L.S.	52	M	C	-	+	N
219	M.J.S.	53	M	C	+	+	N
220	W.A.C.	57	M	C	+	+	N
221	L.A.S.	58	M	C	-	+	N
222	A.C.	53	M	C	+	+	N
223	B.T.N.	55	M	C	+	+	P
224	A.B.	50	M	C	-	+	N
225	A.L.R.	53	M	C	+	+	P
226	J.A.S.	55	M	N	+	+	N
227	R.A.L.	50	M	C	+	+	N
228	A.R.	55	M	C	+	+	N
229	O.F.	52	M	C	+	+	N
230	J.B.O.	51	M	C	+	+	N

Continuação

231	C.V.S.	55	M	N	+	+	N
232	J.A.R.	60	M	C	+	+	N
233	A.B.	58	M	C	+	-	N
234	J.R.S.	51	M	C	-	+	P
235	W.V.S.	52	M	C	+	+	N
236	J.S.	51	M	C	-	-	N
237	M.A.C.G.	52	F	C	-	-	P
238	M.A.R.S.M.	50	F	C	+	+	N
239	E.P.I.	58	F	C	+	+	N
240	D.M.B.	54	F	C	+	-	N
241	J.S.N.	59	M	C	+	+	P
242	E.A.C.	51	M	C	+	+	N
243	C.S.F.	53	F	C	+	+	N
244	M.S.F.	59	M	C	+	+	P
245	C.M.C.	50	F	C	+	-	P
246	E.A.B.	55	F	C	+	+	N
247	O.N.I.S.M.	52	F	C	+		N
248	B.A.	55	F	C	-	+	N
249	G.S.P.S.	56	F	C	-	+	N
250	M.S.O.R.	54	F	C	+	+	N
251	D.F.G.	60	M	C	+	+	P
252	B.M.S.J.	54	F	C	+	+	N
253	E.F.	60	F	C	-	+	N
254	M.P.S.G.	50	F	N	+	-	N
255	A.L.F.R.	51	F	N	+	+	N
256	G.M.C.	58	F	C	+	+	N
257	M.S.C.O.	53	F	C	+	+	N
258	N.R.P.	52	F	C	-	+	N
259	M.J.C.	53	F	C	+	-	P
260	T.A.F.	51	F	N	-	+	P
261	S.C.M.	56	F	C	+	+	N
262	M.D.A.L.	52	F	C	-	-	P
263	C.S.T.	58	F	C	-	+	P
264	D.A.A.	53	F	C	-	+	N
265	M.V.C.N.	55	M	C	+	+	N
266	I.Z.S.	50	F	C	+	+	N
267	A.M.S.B.	52	F	C	+	+	N
268	M.J.L.	59	F	C	-	+	N
269	M.C.S.	56	F	N	-	+	N
270	M.A.S.F.	58	F	C	-	-	N
271	R.O.P.	50	F	C	-	-	P
272	O.B.S.B.	55	F	C	-	+	N
273	M.Q.C.V.	53	F	C	+	+	N
274	C.A.S.	58	F	C	-	+	N
275	A.S.S.	51	F	C	-	+	N
276	M.A.P.	53	F	C	-	+	N
277	L.F.C.	53	F	C	+	+	P

Continuação

278	M.L.G.F.	55	F	C	-	+	P
279	M.G.R.	56	F	C	+	+	N
280	E.Z.O.	57	F	C	-	+	P
281	C.O.	51	F	C	+	+	N
282	E.M.R.S.	55	F	C	+	+	N
283	A.E.P.C.	51	F	C	-	-	N
284	A.E.P.O.	54	F	C	-	-	N
285	D.J.B.	59	F	C	+	-	P
286	M.M.S.	59	F	C	+	+	N
287	M.C.S.	56	F	N	+	+	N
288	I.G.M.	51	F	C	+	+	N
289	E.F.L.	50	F	C	+	+	N
290	M.C.V.R.	53	F	C	+	+	P
291	H.T.M.	56	F	C	-	+	N
292	L.C.	57	F	C	+	+	N
293	M.H.Z.	54	F	C	-	+	N
394	E.P.D.	54	F	C	-	+	N
395	N.P.C.	57	F	C	-	+	N
296	M.H.S.	51	F	C	-	+	N
297	D.C.F.	58	F	C	+	+	N
298	Z.V.Z.	53	F	C	-	+	P
299	M.A.M.	51	F	C	-	+	N
300	I.G.S.B.	50	F	C	+	+	N

Sendo: N.º, número; F, feminino; M, masculino; C, caucasiano; N, negróide; A, asiático; ( - ) deleção homozigótica do gene *GSTM1* ou *GSTT1*; ( + ) presença do gene *GSTM1* ou *GSTT1*; N, polimorfismo *D104N* não identificado; P, presença do polimorfismo *D104N*

**Anexo 6**