



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

---

**GLAUCIA MARIA DE MENDONÇA  
FERNANDES**

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E  
EPIDEMIOLÓGICA DE GENES DO  
METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS EM  
PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL  
ESPORÁDICO**

**São José do Rio Preto  
2013**

**Glaucia Maria de Mendonça Fernandes**

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E  
EPIDEMIOLÓGICA DE GENES DO  
METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS EM  
PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL  
ESPORÁDICO**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo**

**São José do Rio Preto  
2013**

Fernandes, Glaucia Maria de Mendonça  
INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA DE  
GENES DO METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS EM  
PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO

São José do Rio Preto, 2013

111 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio  
Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

1.Polimorfismos; 2.Metabolismo dos xenobióticos 3. Câncer colorretal;

Glaucia Maria de Mendonça Fernandes

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E  
EPIDEMIOLÓGICA DE GENES DO  
METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS EM  
PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL  
ESPORÁDICO**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE

Presidente e Orientador: Eny Maria Goloni-Bertollo

1º Examinador: Patricia Matos Biselle Chicote

2º Examinador: Joice Matos Biselli

1º Suplente: Ana Elizabete Silva

2º Suplente: Rosa Sayoko Kawasaki Oyama

São José do Rio Preto, 12 /12 /2013.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Tabelas .....	v
Lista de Abreviaturas e símbolos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	02
1.1. Objetivos .....	06
2. Resultados.....	08
Artigo 1. Clinical and epidemiological evaluation of patients with sporadic colorectal cancer.....	11
Artigo 2 . CYP2E1 (PstI) and CYP1A1 (MspI) polymorphisms in colorectal cancer: a case-control study.....	34
Artigo3. Estudo caso-controle de seis polimorfismos dos genes CYP1A1, CYP2E1 e EPHX1 em câncer colorretal esporádico.....	57
3. Conclusões.....	84
4. Referências Bibliográficas .....	86
5. Anexos .....	91
Anexo I. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP) .....	92
Anexo II.Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	93
Anexo III. Questionário do Projeto.....	94

## ***Dedicatória***

**Aos meus pais**, Sergio Fernandes Casquet e Rosa Maria de Mendonça Fernandes, pelo eterno amor, carinho, dedicação, educação e ensinamentos.

**Aos meus irmãos**, Diego de Mendonça Fernandes e Dante de Mendonça Fernandes, por fazerem parte da minha família e da minha vida, principalmente como amigos.

**Aos meus avós**, mesmo em sua ausência deixaram as marcas de sua vida pelos exemplos de humanidade, determinação e educação em especial à minha avó Rosa Jesus de Mendonça que acreditou nos meus sonhos.

## *Agradecimentos*

A Deus pelo dom da vida e bênçãos concedidas em cada momento de minha vida

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eny Maria Goloni-Bertollo e Prof<sup>a</sup> Dra. Érika Cristina Pavarino, pela oportunidade de ganho de conhecimento e experiência profissional, que com competência e sabedoria me acolheram, meus sinceros agradecimentos pela confiança e apoio, durante a realização deste trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação da FAMERP por compartilharem seus saberes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para desenvolver este projeto.

Á Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, e a equipe do Laboratório de Investigações Moleculares do Câncer pela participação em meu crescimento profissional.

Aos meus companheiros da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular e aos meus queridos amigos que sempre estiveram dispostos a ajudar,

Rodrigo Castro, Maria Eduarda Lopes Baitello, Gislaine Ferreira Dionísio, Ana Lúvia Silva Galbiati, Patricia Matos Biselli-Chicote, Joice Matos Biselli.

A Anelise Russo por sempre me guiar a todo o momento no decorrer do meu projeto, meus sinceros agradecimentos.

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

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

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

Nada que se realiza no mundo se constrói sozinho, meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desta pesquisa.



## *Epígrafe*

*“Determinação coragem e autoconfiança  
são fatores decisivos para o sucesso.*

*Se estamos possuídos por uma inabalável  
determinação conseguiremos superá-los.*

*“Independentemente das circunstâncias,  
devemos ser sempre humildes, recatados e  
despidos de orgulho”.*

*Dalai Lama*

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

**ARTIGO 1**

**Table 1.** Percent distribution of occupational activities .....26

**Table 2.** Signs and symptoms reported in the first consultation, in accordance with the anatomical groups.....26

**Table 3.** Comorbidities in patients with cancer of the colon and rectum.....26

**Table 4.** Percentage distribution of the primary site of cancer.....27

**Table 5.** Signs and symptoms reported in the first consultation, in accordance with anatomical groups .....28

**ARTIGO 2**

**Table 1.** Distribution in odds ratio (OR) of the gender, age, risk factor, PstI-*CYP2E1* and MspI-*CYP1A1* genotypes between CRC patients and controls.....46

**Table 2.** Distribution of the clinical histopathological parameter to *CYP2E1* \*PstI) and *CYP1A1* (Msp I) Polymorphisms.....47

**ARTIGO 3**

**Quadro 1:** Descrição das sequências dos primers e enzimas de restrição.....55

**Tabela 1.** Dados sócio-demográficos dos pacientes com câncer colorretal e indivíduos controles.....65

**Tabela 2.** Associação dos polimorfismos *CYP1A1*\*2A, *CYP1A1*\*2C, *CYP2E1*\*5B, *CYP2E1*\*6, *EPHX1* Tyr113His e *EPHX1* His139Arg com o câncer colorretal, ajustado para gênero, idade, tabagismo e etilismo.....66

<b>Tabela 3.</b> Interação entre os polimorfismos CYP1A1*2A, CYP1A1*2C, CYP2E1*5B, CYP2E1*6, EPHX1-113 e EPHX1-139 e hábito tabagista ou etilista no risco do CCRE.....	68
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos parâmetros clínico-histopatológicos em relação aos polimorfismos CYP1A1*2A, CYP1A1*2C, CYP2E1*5B, CYP2E1*6, EPHX1-113 e EPHX1-139 em pacientes com câncer colorretal.....	69
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos parâmetros clínicos em pacientes com câncer colorretal em relação aos polimorfismos estudados.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AH	Aminas Heterocíclicas
BaP	benzo[a]pireno
CCRE	Câncer Colorretal Esporádico
CI95%	Intervalo de Confiança 95% ( <i>Confidence Interval 95%</i> )
CNPq	Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<i>CYP1A1</i>	Citocromo P-450 1A1
<i>CYP2E1</i>	Citocromo P-450 2E1
<i>CYP450</i>	Citocromo P-450
DNA	Ácido desoxirribonucléico ( <i>Desoxirribonucleic acid</i> )
EMX	Enzimas Metabolizadoras De Xenobióticos
<i>EPHX1</i>	Hidrolase Epoxi Microsomal
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto ( <i>São José do Rio Preto Medical School</i> )
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo ( <i>São Paulo State Research Foundation</i> )
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )

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

**Resumo**

**Introdução:** Os xenobióticos são substâncias exógenas ao organismo, tais como as N-nitrosaminas, aminas heterocíclicas (HAs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que podem formar adutos de DNA. Polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo dos xenobióticos podem contribuir com este processo e, conseqüentemente, modular o desenvolvimento de câncer. **Objetivos:** Investigar os polimorfismos *CYP1A1*\*2A (rs 4646903), *CYP1A1*\*2C (rs1048943), *CYP2E1*\*5B (rs 2031920), *CYP1E1*\*6 (rs 6413432), *EPHX1* Tyr113His (rs1051740) e *EPHX1* His139Arg (rs2234922), relacionados com o metabolismo dos xenobióticos, no risco de câncer de colorretal esporádico (CCRE), a interação desses polimorfismos com os hábitos de vida (tabagismo e etilismo) e parâmetros clínico-histopatológicos e avaliar a associação do CCRE com os fatores sócio-demográficos. **Métodos:** Um estudo caso-controle foi realizado em 641 indivíduos da população brasileira (241 pacientes com câncer de colorretal e 400 controles (indivíduos sem histórico de câncer). As técnicas de PCR em Tempo Real e PCR-RFLP foram realizadas para a genotipagem dos polimorfismos. A análise estatística utilizou os testes de Qui-Quadrado e Regressão Logística Múltipla Binária. **Resultados:** Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos caso e controle para idade superior a 50 anos (OR=8,21; IC95%=5,49-12,28, p<0,01) e gênero masculino (OR=0,50; IC95%=0,32-0,87, p<0,01). A análise dos polimorfismos revelou associação entre os alelos polimórficos *CYP2E1*\*5B (OR=2,84; IC95%=1,78-4,52; p<0,01, modelo aditivo) e *CYP2E1*\*6 (OR=2,78; IC95%=1,91-4,06, p<0,01, modelo aditivo) e o CCRE. O tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos e sítio primário da doença não foram associados com os polimorfismos. **Conclusão:** Os polimorfismos *CYP2E1*\*5B e

*CYP2E1*\*6 estão envolvidos no risco de CCRE e indivíduos com idade superior ou igual a 50 anos são mais suscetíveis a este tipo tumoral, enquanto aqueles do gênero masculino são menos suscetíveis.

**Palavras Chave:** Polimorfismos genéticos, Neoplasias Colorretais, Hábito de Fumar, Álcool, Citocromo P-450 *CYP2E1*, Citocromo P-450 *CYP1A1*, Epóxido Hidrolases.

**Abstract**

**Introduction:** The xenobiotics are exogenous substances to the organism, as N-nitrosamines, heterocyclic amines (HAs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), can which result in DNA adducts formation. Polymorphisms in genes involved in the metabolism of xenobiotics could contribute to this process and modulate the development of cancer. **Objectives:** To investigate the CYP1A1\*2A (rs4646903), CYP1A1\*2C (rs1048943), CYP2E1\*5B (rs2031920), CYP1E1\*6 (rs6413432), Tyr113His EPHX1 (rs1051740) and His139Arg EPHX1 (rs2234922) polymorphisms related to the metabolism of xenobiotics, the risk of sporadic colorectal (SCRC) cancer, the interaction of these polymorphisms with lifestyle (smoking and drinking) and clinical and histopathological parameters and to evaluate the association of SCRC with socio-demographic factors. **Methods:** A case-control study was conducted in 641 subjects in the Brazilian population (241 patients with colorectal cancer and 400 controls (individuals without a history of cancer). Real-Time PCR and PCR-RFLP was performed for genotyping. Statistical analysis was performed using the chi-square test and multiple logistic regression binary. **Results:** The results showed statistically significant differences between the case and control groups for age greater than 50 years (OR=8.21, 95%CI=5.49-12.28,  $p<0.01$ ) and male gender (OR=0.50, 95%CI=0.32-0.87,  $p<0.01$ ) The analysis of polymorphisms revealed an association between the alleles polymorphic CYP2E1\*5B (OR=2.84, 95%CI=1.78-4.52,  $p<0.01$ , additive model) and CYP2E1\*6 (OR=2.78, 95%CI=1.91-4.06,  $p<0.01$ , additive model) and the SCRC. Tumor size, lymph node involvement and disease primary site were not associated with polymorphisms. **Conclusion:** The CYP2E1\*5B and CYP2E1\*6 polymorphisms are



involved in the risk of SCRC and individuals with age  $\geq 50$  years are more susceptible to this tumor type, of males are less susceptible.

**Key words:** Polymorphism Genetic, Neoplasias Colorretais, Smoking, Alcohol, Cytochrome P-450 *CYP2E1*; Cytochrome P-450 *CYP1A1*; Epoxide Hydrolases.

# *1. INTRODUÇÃO*

## **1. Introdução**

O câncer colorretal esporádico (CCRE) é um termo que abrange as neoplasias malignas que ocorrem no intestino grosso (cólon) e reto, <sup>(1)</sup> em indivíduos sem histórico familiar de câncer. Este tipo de câncer é o segundo mais frequente em países ocidentais <sup>(2,3)</sup> e apresenta alta incidência também no Brasil. <sup>(1)</sup> Estudos realizados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam para o ano de 2013 cerca de 30.140 casos novos <sup>(1)</sup> e a literatura mostra que a incidência entre homens e mulheres é semelhante. <sup>(4,5)</sup>

Em 90% dos casos de CCRE este tipo tumoral inicia-se com o desenvolvimento de pólipos adenomatosos, precursor do adenocarcinoma reto-cólico. <sup>(5,6)</sup> O CCRE caracteriza-se por uma doença multifatorial, resultante de fatores ambientais e genéticos. <sup>(7)</sup> A carcinogênese do CCRE envolve danos causados ao DNA de células somáticas por fatores ambientais e polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) relacionados às enzimas metabolizadoras de xenobióticos, tais como N-nitrosaminas, aminas heterocíclicas (AHs) <sup>(8-10)</sup> e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), <sup>(11,12)</sup> esses polimorfismos podem alterar a expressão ou função enzimática e, conseqüentemente essas substâncias são atraídas por moléculas com alta densidade eletrônica, como é o caso das bases do DNA, às quais acabam se ligando e levando à formação de adutos, tais adutos podem levar a mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor e iniciar o processo de carcinogênese. <sup>(8-12)</sup>

Os SNPs, presentes em pelo menos 1% da população, <sup>(13)</sup> podem ser utilizados como marcadores prognósticos e preditivos, tanto isoladamente, quanto em conjuntos de haplótipos, e estão envolvidos no processo de metabolização de xenobióticos originando variantes enzimáticas que podem acelerar o metabolismo, <sup>(7,10)</sup> ou suprimir a remoção dos carcinógenos. <sup>(9,14)</sup>

No metabolismo de xenobióticos, muitos compostos como N-nitrosaminas, AHs e HPAs são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas da Fase I que são, principalmente, enzimas da super-família CYP450 e hidrolase epóxide microsomal (EPHX1). Desta forma, as enzimas de Fase I, por meio da introdução de um ou mais agrupamentos hidroxila no substrato, podem converter um pró-carcinógeno a carcinógeno. As reações da Fase II envolvem a conjugação do metabólito com o substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) por meio das enzimas glutathiona-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da Fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção. Polimorfismos em genes que codificam essas enzimas podem alterar sua expressão ou função, alterando a ativação ou detoxificação de compostos carcinogênicos.<sup>(15,16)</sup> Assim, enzimas de Fase I que atuam na via de metabolização dos xenobióticos, responsáveis pela ativação de compostos provenientes do tabaco e álcool, podem participar de forma indireta do mecanismo de carcinogênese<sup>(16,17,18)</sup> e no desenvolvimento do CCRE.<sup>(19)</sup>

O cigarro expõe o organismo ao benzo[a]pireno (BaP), um HPA, que é quimicamente inerte no ambiente.<sup>(20)</sup> Após sua metabolização, o BaP é convertido ao composto benzo[a]pireno diol-epóxido (BPDE), um agente carcinogênico que pode formar adutos de DNA.<sup>(21,22)</sup> Polimorfismos nos genes *CYP1A1*, *CYP2E1* e *EPHX1* são importantes na ativação de BaP e, devido às associações entre neoplasia colorretal e exposições resultantes da ingestão de BaP, estudos passaram a investigar a relação entre polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos e CCRE.<sup>(23)</sup>

O álcool possui como metabólito primário o acetaldeído, o qual é altamente reativo ligando-se as proteínas, aos constituintes celulares e ao DNA, formando adutos

estáveis. <sup>(24-26)</sup> Este composto pode levar a deficiências nutricionais devido à falhas na absorção intestinal e à alterações em algumas vias metabólicas. <sup>(19,27)</sup> Além disso, suprime a remoção de moléculas de nitrosaminas de baixo peso molecular liberadas pelo cigarro. <sup>(7)</sup>

A superfamília de enzimas CYP450 representa uma das principais classes de biotransformação da Fase I, por meio de suas mais de 500 isoenzimas. Estima-se que no genoma humano existam em torno de 60 a 100 genes codificadores de enzimas CYP450, e aproximadamente 20 deles estão envolvidos na codificação de enzimas que metabolizam compostos exógenos. Essas enzimas participam tanto da biossíntese como da degradação de esteróides, vitaminas, ácidos graxos, prostaglandinas, amins, ferormônios e metabólitos vegetais. Metabolizam ainda, inúmeras drogas e carcinógenos / mutágenos químicos, entre outros poluentes ambientais denominados xenobióticos. <sup>(28)</sup>

Em relação à superfamília dos genes *CYP450*, os genes *CYP1A1* e *CYP2E1* apresentam grande importância no processo da carcinogênese humana, pode modificar a expressão ou função da enzima, resultando na ativação de pró-carcinógenos <sup>(29)</sup>. O gene *CYP1A1* localizado no cromossomo 15, que tem como produto a enzima aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH), cuja transcrição, além de ser induzida por muitos agentes ambientais, tem expressão diferenciada entre os tipos celulares. Neste gene, destacam-se os polimorfismos *CYP1A1\*2A* (rs4646903), resultante da substituição de uma timina por citosina (T3801C) na cauda poli (A) da região 3' não traduzida do gene e o *CYP1A1\*2C* (rs1048943), que resulta da transição de adenina para guanina (A2455G) levando a substituição de isoleucina por valina no resíduo de aminoácido 462

da proteína (Ile462Val). Os alelos selvagens podem proporcionar uma maior estabilidade e/ou actividade da enzima. <sup>(20)</sup>

O gene *CYP2E1*, localizado no cromossomo 10, tem a transcrição induzida pelo etanol e seu produto (dimetilnitrosamina desmetilase) está envolvido no metabolismo oxidativo do próprio etanol, bem como de inúmeros carcinógenos ambientais como compostos hidrofílicos de baixo peso molecular, benzeno, cloreto de vinila e as nitrosaminas encontradas na fumaça do cigarro. <sup>(31)</sup>

Os polimorfismos do gene *CYP2E1* estão ligados à maior transcrição e um aumento da actividade enzimática e têm sido considerados como indicadores potenciais da susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer associado ao gene citocromo P450. Dentre os polimorfismos, os mais estudados são o *CYP2E1\*5B* (rs3813867), que ocorre em função da substituição G-1293C e o *CYP2E1\*6* (rs6413432), causado pela transversão T7632A. <sup>(32)</sup>

O gene *EPHX1*, localizado no cromossomo 1, codifica a enzima *EPHX1*, também importante na ativação de produtos químicos exógenos, como o composto ambiental BaP. <sup>(20)</sup> Dois polimorfismos funcionais no gene *EPHX1* têm sido bem caracterizados, o polimorfismo *EPHX1* Tyr113His (rs1051740) localizado no éxon 3 do gene que resulta na substituição do aminoácido tirosina por histidina na posição 113 da proteína. Associado à diminuição de 40% da actividade da enzima *in vitro*, e o polimorfismo *EPHX1* His139Arg (rs2234922), é localizado no éxon 4 que resulta na substituição do aminoácido histidina por arginina na posição 139 da proteína; essa alteração confere aumento de 25% na actividade da enzima. <sup>(20,11)</sup>

Polimorfismos nos genes *CYP1A1*, *CYP2E1* e *EPHX1* têm sido associados ao desenvolvimento do CCRE. <sup>(31,33-35)</sup> Dessa forma, o estudo desses polimorfismos torna-

se importante para contribuir com o esclarecimento dos processos que levam ao desenvolvimento do CCRE.

### **1.1 Objetivos**

1. Realizar um levantamento de dados clínicos, sociodemográficos e fatores de risco de pacientes com câncer colorretal esporádico, tratados entre 2004 e 2008, no Serviço de Coloproctologia de um hospital de ensino na região Noroeste de São Paulo.
2. Comparar os dados sócio-demográficos entre pacientes com câncer colorretal esporádico e controles;
3. Avaliar a associação dos polimorfismos *CYP1A1*\*2A, *CYP1A1*\*2C, *CYP2E1*\*5B, *CYP1A1*\*6, *EPHX1* Tyr113His e *EPHX1* His139Arg com o desenvolvimento do câncer colorretal esporádico;
4. Avaliar a interação entre esses polimorfismos com os hábitos tabagista e etilista no risco para esta doença;
5. Avaliar a associação entre os polimorfismos e os parâmetros clínico-histopatológicos do câncer colorretal esporádico.

## 2. RESULTADOS



## 2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados estão apresentados em forma de artigos. No total estão apresentados três artigos, um a ser submetidos e dois submetidos a publicação e em análise pelas revistas.

### **Artigo 1:**

**Título:** Clinical and epidemiological evaluation of patients with sporadic colorectal cancer.

**Autores:** **Glaucia Maria de Mendonça Fernandes**; Cássia Veridiana Dourado Leme; Mariângela Torreglosa Ruiz Cintra; Érika Cristina Pavarino; João Gomes Netinho; Eny Maria Goloni-Bertollo.

**Periódico:** Journal of Coloproctology, submetido

### **Artigo 2**

**Título:** CYP2E1 (PstI) and CYP1A1 (MspI) polymorphisms in colorectal cancer: a case-control study

**Autores:**, Marcela Alcântara Proença, **Glaucia Maria de Mendonça Fernandes** Ana Lívia Silva Galbiatti, Anelise Russo, Roliana Bravo Lelis, João Gomes Netinho, Geni Satomi Cunrath, Ana Elizabete Silva, Eny Maria Goloni-Bertollo, Érika Cristina Pavarino.

**Periódico:** Clinical Colorectal Cancer, submetido

**Artigo 3**

**Título:** Estudo caso-controle de seis polimorfismos dos genes CYP1A1, CYP2E1 e EPHX1 em câncer colorretal esporádico.

**Autores:** **Glaucia Maria de Mendonça Fernandes**, Anelise Russo, Marcela Alcântara Proença, Nathália Fernanda Gazola, Ana Elizabete Silva João Gomes Netinho, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo

**Periódico:** European Journal of Cancer, a ser submetido

# ARTIGO CIENTÍFICO 1

**Artigo 1:**

**Título:** Clinical and epidemiological evaluation of patients with sporadic colorectal cancer.

**Autores:** **Glaucia Maria de Mendonça Fernandes;** Cássia Veridiana Dourado Leme; Mariângela Torreglosa Ruiz Cintra; Érika Cristina Pavarino; João Gomes Netinho; Eny Maria Goloni-Bertollo.

**Periódico:** Journal of Coloproctology, submetido

## **Original Article**

### **Clinical and epidemiological evaluation of patients with sporadic colorectal cancer.**

Autores: Gláucia Maria de Mendonça Fernandes<sup>1</sup> Cássia Veridiana Dourado Leme<sup>2</sup>; Mariângela Torreglosa Ruiz Cintra<sup>3</sup>; Érika Cristina Pavarino<sup>4</sup>; João Gomes Netinho<sup>5</sup>; Eny Maria Goloni-Bertollo<sup>4</sup>.

1- MSc Student of Health Sciences at FAMERP, Research Unit in Genetics and Molecular Biology(UPGEM); 2- MD in FAMERP; 3- PhD, Department of Biological Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM); 4- PhD. Adjunct professor, Department of Molecular Biology, FAMERP, UPGEM; 5- PhD. Adjunct professor, Department of Coloproctology, Department of Surgery, FAMERP.

The study was carried out at the Medical School of São José do Rio Preto - FAMERP.

#### **Corresponding author:**

Eny Maria Goloni Bertollo

E-mail: eny.goloni@famerp.br

FAMERP, Depto. de Biologia Molecular

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro - CEP: 15090-000.

There are no conflicts of interest.

## **ABSTRACT**

**BACKGROUND.** This study aims to perform a survey on clinical data, sociodemographic and risk factors from patients with sporadic colorectal cancer (SCRC) treated between 2004 and 2008 in the Coloproctology Service of a teaching hospital in the North-western region of São Paulo.

**METHODS** We analysed 749 medical records. Of these, 460 were from colon cancer patients and 289 from rectal cancer patients. Most of the individuals had white skin and were aged over 62 years. The variables that were analysed included gender, age, skin color, professional occupation, alcohol drinking and cigarette smoking, family history of cancer, and comorbidities. Establish the clinical-sociodemographic profile and risk factors in a population with the SCRC the northwest region of São Paulo that collaborates with prevention strategies.

**RESULTS.** The occurrence of SCRC did not differ much between genders. The most prevalent professional occupations were those related to household chores, agricultural and commercial activities. Among the comorbidities, hypertension and cholelithiasis were the most representative. The most common diagnosis method and treatment for the majority of patients were colonoscopy and surgery, respectively. On average, the time of the disease progression was eight months. The median number of lymph nodes excised ranged between 11 and 14. The most common metastasis was hepatic.

**CONCLUSION.** The occurrence of colorectal cancer is more frequent in men's white skin with aged over 62 years. Professional occupation seems to be more important for those exposed to carcinogenic agents. This type of tumour mostly affects the distal regions of the colon and rectum with the occurrence of liver metastasis. The affected individuals usually have low survival due to its high aggressiveness.

**Key words:** Colorectal neoplasms; Epidemiology; Risk Factors; Clinical symptoms.

## **BACKGROUND**

Sporadic colorectal cancer (SCRC) is a term for malignant neoplasms that are not a familial or inherited disease, which occur in the large intestine (colon) and rectum [1]. It often initially develops as an adenomatous polyp [2,3,4,5,6].

This type of cancer is the second most common in Western countries [3,7]. In 2012, a study conducted by the Brazilian National Cancer Institute (BNCI) reported an estimated 518.510 new cases of cancer in the country. Of these, approximately 30.000 are colorectal cancer. It ranks fifth as the most frequent cause of death in Brazil. Approximately 14.180 cases in men and 15.960 cases in women are newly diagnosed each year [1].

The carcinogenesis of colorectal and rectum cancers involve the interaction between environmental and genetic factors [8,9]. Some risk factors are well-established, such as age over 50 years [1,9,10,12], lifestyle habits, such as highly-saturated fatty acid diet and red meat [1,3,7,8,10], alcohol consumption, and smoking [2,8,9], besides comorbidities, such as cholelithiasis, metabolic syndrome, and diabetes.

Signs and symptoms of colorectal cancer occur according to the anatomical region affected. SCRC also depends on its physiology and clinical parameters such as size, extent, and spread of the neoplasia. It is a characteristic of this tumour to present intestinal obstruction, bleeding (hematochezia, enterorrhagia), change in bowel habits, and systemic settings such as significant weight loss [1,3,12,13].

The prevention of sporadic SCRC involves three phases of action in health as follows: the primary phase aims to prevent the development of the disease, such as eating an adequate diet, physical exercise training, and absence of tobacco and alcohol consumption [5,12]; the secondary phase is the prevention through an early diagnosis by means of a physical examination performed by a proctologist, laboratory tests (fecal

occult blood test, carcinoembryonic antigen [CEA] test), and imaging screenings (colonoscopy, proctosigmoidoscopy) [1,3]; and the tertiary phase is the prevention of sporadic SCRC with relief of the symptoms and prevention of consequences [7].

In Brazil there is a shortage of detailed population data in SCRC. Therefore the present study aims establish the clinical-sociodemographic profile and risk factors in a population with the SCRC the northwest region of São Paulo that collaborates with prevention strategies.

## **METHODS**

The study was approved by the Local Ethics Committee (CEP) - São José do Rio Preto Medical School – FAMERP (nº216/2009).

Were included in the study, the clinical reports of all patients who had a clinical diagnosis and/or histopathological of colon cancer by the physician between 2004 and 2008 and rectal cancer between 2005 and 2008 in the Department of Coloproctology of a university hospital in the region northwest of São Paulo, and were excluded patients having family members diagnosed with cancer or in cases of hereditary colorectal cancer, according to colorectal evaluation responsible for service.

The variables that were analysed included gender, age, skin color, professional occupation, alcohol drinking and cigarette smoking and comorbidities. Skin colour was classified as white or non-white; we considered individuals whose skin colour was non-white as Grayish-browns, Blacks and Yellows.

We considered smokers those patients who smoked over a 100 cigarettes and alcoholics those patients who drank more than four drinks per week for six months or longer [8].

By analysing the medical records, we obtained the following clinical data: symptomatology, comorbidities, primary site of tumour, location of the tumour were



classified in the large intestine as either proximal (cecum, ascending or transverse colon) or distal (descending colon, sigmoid, rectosigmoid junction or rectum), clinical stage, level of histologic differentiation, and patient survival. Staging of Dukes is classified in Stage A (growth limited to the wall of the rectum without extension to outside the rectal tissues and without lymph nodes metastasis), Stage B (growth extends through the wall in the outside the rectal tissues, but the lymph nodes are free of metastasis), Stage C (lymph nodes involved with tumor) and stage D (distant metastasis) [14].

Astler-Coller considers staging in Stage B1 and B2 (respectively, incomplete and complete penetration of the muscularis propria), B3 (complete penetration of the distal muscularis propria), Stages C1 (absence of lymph nodes), C2 (presence of lymph nodes), C3 (presence of lymph nodes affected in the ligation point proximal vascular) and stage D (distant metastasis) [14].

Currently the classification adopted in accordance with the International Union Control Cancer (UICC), issued in 2002, the Clinical staging (TNM), Used to analyze the aggressiveness of tumors, is divided into stages I through IV. Tumors were classified according to the TNM following three criteria: tumor extent (T), presence of lymph node involvement regional (N) and presence of distant metastasis (M) [14,15].

The data were analyzed by descriptive statistics, using the Excel software (version 2007).

## **RESULTS**

We analysed the medical records of 749 patients. Of these, 460 were affected by colon cancer (Group I) and 289 by rectal cancer (Group II).

Group I was composed of 212 women (46.08%) and 248 men (53.91%). Group II included 135 women (46.71%) and 154 men (53.28%). The mean age at diagnosis for

colon cancer patients and rectal cancer patients was 63 years ( $\pm 14.7$ ) and 62.6 ( $\pm 14.5$ ) years, respectively.

As for skin colour, the group of colon cancer patients included 181 white individuals (91.87%), while in the group of rectal cancer patients, only 54.63% were white.

The assessment of the patients' professional occupation showed a higher frequency of individuals whose working activities related to household chores (37.24%), agricultural (17.35%) and commercial activities (12.55%). The percentages allocated to the occurrence of neoplastic are shown in Table 1.

Smoking habit was observed in 26.90% and 26.82% of the patients in Groups I and II, respectively. Alcohol addiction corresponded to 20.81% in the first and 20.48% in the second group.

The most common symptoms presented by patients with colon cancer were intestinal obstruction (10%), bleeding (8.91%), and abdominal pain (8.26%). Among those who presented neoplasia in the rectum, bleeding (32.17%), diarrhea (14.53%), and weight loss (8.99%) were predominant (Table 2).

The most prevalent comorbidities are shown in Table 3. In which the most frequent was the systemic hypertension in patients with colon cancer and 17.82% in patients with rectal cancer (26.29%) followed by cholelithiasis, 9.78% and 21.79%, in patients with cancer of the colon and rectum, respectively.

The distribution of the occurrence of cancer according to the primary tumour site predominance of occurrence of the rectum (41.70%). Signs and symptoms vary according to the anatomical region.

Regarding diagnosis, colonoscopy was the most method used in 54.31% of the colon cancer patients, the remaining patients received a diagnosis by rectosigmoidoscopy

or an emergency surgical procedure. Among the patients diagnosed with colon cancer, 75.70% had neoplasms in stage III and IV equally distributed by gender of which about one third died. For individuals with rectum cancer, colonoscopy was the method of diagnosis of 52.68% of patients. Of these, 62.96% had tumors in stages I and II equally distributed by gender of which 44.11% of the patients died.

The mean age of the patients at death was 67.8 years ( $\pm 15.21$ ) and 68 years ( $\pm 15.34$ ) in Groups I and II, respectively. The time between diagnosis and death was correspondingly 4 and 5 months ( $\pm 8.31$ ) and 9.8 months ( $\pm 12.25$ ) in Groups I and II, respectively.

The coexistence of cancer and adenoma was identified in 46 and 27 patients in Groups I and II, respectively. The predominant histological type was the adenocarcinoma, which represented 88.83% of colon cancers and 93.65% of rectal cancers. In some cases, histological identification was not possible.

Regarding the treatment, surgery was performed in 77.15% of patients in the first group and 65.85% in the second group. In addition, chemotherapy was performed using 5-fluorouracil in combination with folinic acid in 47.20% and 55.12% of patients in Groups I and II, respectively.

The initial clinicopathologic stages (TNM) of colon and rectal cancers are shown in Table 5. The median number of lymph nodes parched during surgery for histopathological analysis was 14 and 11 in colon and rectal surgery, respectively.

The main sites of dissemination of patients who presented metastatic colon cancer were liver (64.51%), peritoneum (19.35%), and lung (9.67%); among the metastases observed in rectal cancer patients, the liver was also the most affected organ (54.11%), followed by the peritoneum (12.94%), lung (11.76%), bone (8.23%), central nervous system (5.88%), and urinary system (7.05%).

## **DISCUSSION**

Our findings showed that the occurrence of SCRC did not differ between gender, which corroborates other studies that also report a similar distribution between men and women [1,5,6,16]; although Santos et al 2007 [5] observed a higher incidence of colon cancer in women and rectal cancer in men [5].

Steele et al 2008 [16] reported a predominance of occurrence of SCRC in white-skinned individuals with percentage ranging up to 80%. Our study found similar results in relation to colon cancer (91.87%) and showed a smaller percentage (54.63%) in rectal cancer. Other studies have shown a higher incidence and survival of sporadic SCRC among African-Americans [16,17]. It is worth mentioning that the Brazilian population, which is representative of our study, has an ethnic composition with great confluence of several other ethnic groups, making it difficult to analyse the influence of this variable.

It is established in the literature the age of 50 years as risk factor for developing sporadic SCRC [1,5,9,10, 12,18]. Corroborated with the literature, in our study, the mean age at diagnosis was 63 years ( $\pm 14.7$ ) for patients with colon cancer and 62.6 years ( $\pm 14.5$ ) for patients with rectal cancer.

Regarding the professional occupation, our data showed a predominance of SCRC in those who perform activities related to household chores, agricultural and commercial activities. In fact, the exposure to some carcinogenic agents used in agriculture, and in some industries is related to the SCRC, such as dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE), and polychlorinated biphenyl (PCB) [19]. In our study, however, the investigation of such exposures was not possible.

Several etiological factors resulting from the interaction of environmental and genetic factors are involved in the development of colon and rectal cancers. Among

them we can mention family history, alcohol drinking and smoking [3,8,9], a highly-saturated fat diet and red meat [1,6,20], and the presence of comorbidities, such as cholelithiasis [20,21,22], metabolic syndrome [23], type II diabetes [20,24,25], and obesity [26,27].

Smoking habit is a risk factor for SCRC [28,29], and its occurrence seems to reflect more on the building up of the amount of yearly exposure than on the time of exposure [29-31], especially in rectal cancer [31]. Alcohol drinking increases the risk of developing SCRC in individuals who drink 30-45 grams per day, and especially those who ingest more than 45g/day [33]. An increased risk of those who drink more than 100 g/week [34] has also been demonstrated. Genetic polymorphisms of enzymes that act on the metabolism of ethanol, folate, and DNA repair together, these factors may determine a genotoxic effect and also act as a solvent to tobacco carcinogens and also, which might induce the production of free radicals [32] and decrease the absorption of folate in alcoholics [33]; also, they would stimulate the production of free radicals [32] and decrease the absorption of folate in alcoholics [33]. Smoking and drinking were observed in our study; however, it was not possible to determine the amount of exposure due to the retrospective nature of the study.

Regarding the diet, although studies are still controversial, it is notoriously known that fruits, leguminous plants, green vegetables, and dairy products play a protective role against cancer of the alimentary system. On the other hand, excessive intake of meat and animal fat is not recommended [1,7,9]. We did not evaluate the food habits in our study. As it is a review of medical records, these do not show this information.

Among other comorbidities associated with the development of sporadic SCRC are hyperinsulinemia, obesity [24,25], and metabolic syndrome [23]. The latter is also

related to a higher incidence of liver metastasis and tumour recurrence. It also is a probable independent factor of worse prognosis in survival of patients with this type of neoplasm [35].

In our study, cholelithiasis was one of the most prevalent comorbidities; however, the association between cholecystectomy and SCRC is contradictory in the literature. Goldacre and colleagues [22] did not observe this association, while other studies have found it [20,22], especially in women [20]. It was not possible to identify the relationship with cholelithiasis in the researched literature.

The weight gain in both gender has been associated with an increased risk of SCRC, although the body mass index increment does not seem to contribute to the development of this neoplasia [21,27]. Thus, it becomes important to identify individuals with metabolic syndrome. They may represent a population susceptible to the development of SCRC. In our study, we were unable to assess the frequency of metabolic syndrome among those who developed this type of neoplasia.

Regarding the most affected anatomical region, our study found a higher incidence of SCRC in the rectum, which is consistent with the findings of other studies [5,6]. As each anatomical region presents distinct embryological development and physiology when exposed to carcinogens, the mechanism of development of neoplasia as well as the symptoms presented by the patient in each anatomical segment is peculiar to their location. Thus, the correct identification of the primary site of tumour development is of vital importance to assist in the choice of treatment among the different therapeutic approaches [36].

Symptoms of SCRC are expressed according to tumour location in association with the anatomy and physiology of the affected region, such as an obstruction, bleeding (hematochezia, enterorrhagia), change in bowel habits, and significant weight

loss [1,3,12,13,37], and these symptoms may help in the early detection of this neoplasm [38]. In this study, as found in the literature, the most common symptoms presented by patients with colon cancer were intestinal obstruction, rectal bleeding, and abdominal pain [1,37,38].

Colonoscopy is an important additional test for the detection of SCRC and as well as of its precursor lesion, the adenoma. When identified at an early stage, a five-year survival appears to be greater than 90% [37,39,40]. Some protocols, such as the EPAGEII, which was developed in Europe, determine the screening method to be performed. It is based on the symptomatology as well as on the presence of risk factors and age of the patient [39]. Thus, coloscopy, the gold standard for detection of SCRC, acts at the secondary prevention level of cancer [39,40], and it represents an important tool used in public health programs. In this study, 54.31% of patients with colon cancer and 52.68% of patients with rectal cancer were subjected to this test. This percentage reflects the fact that the majority (75.70%) of them was referred to the Coloproctology Service in an advanced stage of the neoplastic process (T3 and T4).

The predominant histological malignant neoplasm type in our study was the adenocarcinoma (88.83% of colon cancers and 93.65% of rectal cancers). It is responsible for more than 90% of the cases reported in the literature [2, 3]. Because the adenoma is typically a premalignant lesion [36], its early detection is of utmost importance, since it is an independent risk predictor for the SCRC [41]. Other histological malignant neoplasm types, including mucinous adenocarcinoma (17%), of which 2-4% are squamoussignet-ring cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and undifferentiated carcinoma [3].

Among the therapeutic options available for colorectal cancer, chemotherapy stands out, whose toxicity is variable according to the agent applied and that can

decrease the quality of life of patients in relation to psychological and physical activity [42,43]. Currently, the public health network uses an association between 5-fluorouracil and folinic acid-leucovorin [38]. This drug therapy has been associated with improved survival and decreased tumour recurrence in patients undergoing this therapeutic regimen [36,43,44]. Although there are other drugs that have shown a significant improvement in these patients' survival, such as the bevacizumab [36,42,43]. In our study, 47.20% of the colon cancer patients and 55.12% of the rectal cancer patients underwent chemotherapy using mainly 5-fluorouracil and folinic acid.

Another therapeutic method used is the surgical resection of the tumour associated with the removal of lymph nodes for adequate staging [40]. International consensus and scientific papers recommend an evaluation of at least 12 regional lymph nodes in the anatomical sample during the curative treatment by surgery, in order to obtain more reliable data for the appropriate clinical staging [18,45]. In our study, we observed that the procedure performed at our institution is in accordance with that established in the literature, since the median number of lymph nodes resected was 14 in colon surgery and 11 in rectal surgery.

Regarding the systemic dissemination of colon and rectal cancers, the literature indicates that the main mechanism of tumour spread occurs via a hematogenous pathway and, to a lesser extent, by the lymphatic route with possible implantation of tumour cells in organs such as liver, lungs, bones, cerebrum, ovaries, and skin [2,18]. Additionally, the dissemination of neoplastic cells can occur by continuity, which happens through the wall of the organs [2,12,19]. In this study, we found a higher incidence of liver metastases, followed by those affecting the peritoneum, lung, bones, central nervous system, and urinary system.

In 2004, Tucunduva *et al* [46] conducted a study with non-oncologists



physicians at a health service in order to assess their knowledge and attitude towards preventive measures for the most common cancers. It was highlighted that these physicians showed interest in the prevention of various cancers, but they had difficulty in carrying out the counselling recommended by the consensus [47]. Thus, the study of colorectal cancer is relevant because a better knowledge of preventive measures, risk factors, associated signs and symptoms, research methods, and appropriate time for referral to specialists, including general practitioners contribute to the reduction of survival morbidity and improve public health and quality of life.

### **CONCLUSION**

Malignant tumours SCRC treated in the department of surgery at a university hospital in the northwest of São Paulo occur more frequently among individuals over 62 years of age, with a main of men's white skin, professional activities of agricultural, commercial and domestic. The most frequent comorbidities were hypertension and cholelithiasis. The regions of the distal colon and rectum were the most affected, with a prevalence of hepatic metastasis. The high rate of patients with stages III and IV indicated late demand in treatment centers, which reflects the need for preventive education campaigns in order to achieve early diagnosis of the disease.

### **REFERENCES**

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>  
Acessado em: 2012 (Mai1)
2. Giurizato CSB, Areias MAC. Estudo da prevalência de câncer colorretal no período de 2005 em um hospital do Sistema Único de Saúde na cidade de Dourados-MS. *Interbio*, 2008; 2(2): 21-28.
3. Zampino MG, Labianca R, Beretta GD, et al. Rectal cancer.

- CritRevOncolHematol, 2009; 70:160-182.
4. Cerato MM, Cerato NL, Meurer L, et al. Variabilidade Interobservador no Diagnóstico Histológico dos Pólipos Colorretais. RevBrasColoproct, 2007;27(1): 007-015.
  5. Santos JR, M JC. Câncer ano-reto-cólico: aspectos atuais III - câncer de reto - terapêutica neoadjuvante. Rev Bras. Coloproctol, 2008; 28(1):108-11.
  6. Cruz GMG; Ferreira RMRS; Neves PM. Cancer Retal: Estudo Demográfico, Diagnóstico e Estadiamento de 380 Pacientes Acompanhados ao Longo de Quatro Décadas. RevBrasColoproct, 2004;24(3):208-224.
  7. Pinho M, Rossi BM. Conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal. RevBrasColoproct, 1999; 19(1): 57-60.
  8. Gertig DM, Hunter DJ. Genes and environment in the etiology of colorectal cancer. CancerBiol,1998;8:285-298.
  9. Rogin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. J Den Res, 86, 104-114, 2007.
  10. Giacosa A, Rondanelli M, Cena H, Frascio F, Hill MJ. Diet and colorectal cancer risk: current views: current views. Annals of Gastroenterology, 2002; 15(4):324-332.
  11. Mallmann ACM, KoshimizuRT, Carvalho LP, Muxfeldt RA. Rastreamento do câncer colorretal. Mom. &Perspec. Saúde, 2003;16(1):13-15.
  12. Diniz BSO, Lacerda-Filho A. Prevenção secundária do câncer colorretal em indivíduos de baixo risco. RevMed Minas Gerais, 2004;14(1):46-52.

13. Capelhuchnik P, Nadal CRM, Bianchini PA, Bin FC, Klug WA. Sinais e sintomas do câncer colorretal e diagnóstico precoce. *Revbras Colo-Proct*, 1991; 11(4): 125-127.
14. Keighley MRB, Williams NS, editores. *Cirurgia do ânus, reto e colo*. São Paulo: Manole;1998. p.811-814.
15. Instituto Nacional do Câncer. UICC- União Internacional Contra o Câncer, 2002 – TNM – Classificação de Tumores Malignos 6ª. Ed. Rio de Janeiro: INCA 2004.
16. Steele SR, Brown TA, Rush RM, Martin MJ. Laparoscopic vs open colectomy for colon cancer: results from a large nationwide population-based analysis. *J GastrointestSurg*, 2008;12(3):583-591.
17. Polite BN, DignamJJ, Olopade OI. Colorectal cancer and race: understanding the differences in outcomes between African American and whites. *Med Clin North Am*, 2005;58(4):771-93.
18. Byrne LH, Janku F, Bird BR, et al. The correlation between the number of lymph nodes identified and treatment outcomes in colorectal patients: Single-institution experience. *J ClinOncol*, 2010;28(15):e14096.
19. Chen K, Zhao YW, Ma XY, Zhang LJ, Zheng S. Relationship between organochlorine pollution in soil and rice and the incidence of colorectal cancer in Jiashan county, Zhejiang province. *Zhonghua Liu Xing Bing XueZaZhi*, 2004;25(6):479-83.
20. Huang CW, Sun LC, Shih YL, et al. The impact on clinical outcome of high prevalence of diabetes mellitus in taiwanese patients with colorectal cancer. *World J SurgOncol*. 2012 May 3;10(1):76.

21. Silva EJ, Pelosi A; Almeida EC. Índice de massa corpórea, obesidade abdominal e risco de neoplasia de cólon: estudo prospectivo. *RevbrasColoproct*, 2010;30(2):199-202.
22. Goldacre MJ, Abisgold JD, Seagroatt V, Yeates D. Cancer after cholecystectomy: record-linkage cohort study. *Brit j cancer*, 2005;92:1307-1309.
23. Siddiqui AA. Metabolic syndrome and its association with colorectal cancer: a review. *Am J Med Sci*, 2010, [Epubaheadofprint]
24. Matthew CE, Sui X, LaMonteMJ, et al. Metabolic syndrome and risk of death from cancers of the digestive system. *Metabolis*, 2010;59(8):1231-9.
25. Costa FO, Rocha GZ, Dias MM, Carvalheira JBC. Mecanismos epidemiológicos e moleculares que associam obesidade e câncer. *ArqBrasEndocrinolMetabol*, 2009;53(2):145-150.
26. Shen Z, Ye Y, Bin L, et al. Metabolic syndrome is an important factor for the evolution of prognosis of colorectal cancer: survival, recurrence, and liver metastasis. *Am J Surg*, 2010;200(1):59-63.
27. Engeland A, Tretli S, Austad G, Bjorge T. Height and Body Mass Index in Relation to Colorectal and Gallbladder Cancer in Two Million Norwegian Men and Women. *Causes Cancerandcontrol*, 2010;1(8):987-996.
28. Lo AC; Soliman AS; Khaled HM; Aboelyazid A; GreensonJK. Lifestyle, Occupational, and Reproductive Factors and Risk of Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum*, 2010;53(5):830-837.
29. Boyle P, Leon ME. Epidemiology of colorectal cancer. *Br med Bull*, 2002;641-25.

30. Lüchtenborg M, White KKL, Wilkens L, Kolonel LN, Marchand LL. Smoking and colorectal cancer: different effects by type of cigarettes? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007;16(7): 1341-7.
31. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 2009;124(10):2406-15.
32. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*, 2006;7(2):149-156.
33. Lin OS. Acquired risk factors for colorectal cancer. *Cancer epidemiology. Methods in molecula biology*, 2009;472:361-372.
34. Moskal A, Norat T, Ferrari P, Riboli E. Alcohol intake and colorectal cancer risk: a dose-responde meta-analysis of published cohort studies. *Int J Cancer*, 2007;210(3):664-671.
35. Oh SW, Kim YH, Choi YS, et al. The comparison of the risk factors and clinical manifestations of proximal and distal colorectal cancer. *Dis Colon rectum*, 2008;51(1):56-61.
36. Shernhammer ES, Leitzmann MF, Michaud DS, et al. Cholecystectomy and the risk for developing colorectal cancer and distal colorectal adenomas. *Br J Cancer*, 2003;88:79-83.
37. Santos JR. JCM. Câncer Ano-Reto-Cólico: Aspectos Atuais II – Câncer Colorretal – Fatores de Riscos e Prevenção. *RevBrasColoproct*, 2007;27(4): 459-473.
38. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, et al. Primary colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2010;Suppl 5:70(7).

39. Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento Cirúrgico e Multidisciplinar do Câncer Colorretal; 2001.
40. Juillerat P, Peytremann-Bridevaux I, Vader JP, et al. Appropriateness of colonoscopy in Europe (EPAGE II) – Presentation of methodology, general results, and analysis of complications. *Endoscopy*, 2009;41(3):240-246.
41. Bixquert-Jimenez M. Selective colorectal cancer screening in average-risk populations. *Rev Esp Enferm Dig*, 2009;101(12):821-825.
42. Kaminski MF, Regula J, Kraszeska E, et al. Quality indicators for colonoscopy and the risk of interval cancer. *N Engl J Med*, 2010; 362(19):1795-803.
43. Roque VMN, Forones NM. Avaliação da qualidade de vida e toxicidades em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia adjuvante baseada em fluoropirimidinas. *Arq Gastroenterol*, 2006;43(2):94-101.
44. Tonon LM, Secoli SR, Caponero R. Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe. *Rev Bras Cancerol*, 2007;53(2):173-182.
45. Wolpin BM, Mayier RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2008;134(5):1296-31.
46. Tucunduva LTCM, Sá VHLC, Koshimura ET, et al. Estudo da atitude e do conhecimento dos médicos não oncologistas em relação às medidas de prevenção e rastreamento do câncer. *Rev Assoc Med Bras*, 2004; 50(3):257-62.
47. Chou JF, Row D, Gonen M, et al. Clinical and pathologic factors that predict lymph node yield from surgical specimens in colorectal cancer. *Cancer*, 2010;116(11):2560-2570.

Financial Support: PIBIC / CNPq, Researcher Exchange (BAP) - FAMERP and CNPq;

Support: FAMERP-FUNFARME.

**Table 1:** Percent distribution of occupational activities.

<b>Occupation</b>	<b>Frequency (n)</b>	<b>Percentage (%)</b>
Domestic Services	279	37.24
Agricultural	130	17.35
Commercial	94	12.55
Metallurgy	55	7.34
Construction civil	45	6.00
Administrative	43	5.74
Driver	40	5.34
Divers	28	3.73
No Information	35	4.67
<b>Total</b>	<b>749</b>	<b>100 (99.96)</b>

**Table 2:** Signs and symptoms reported in the first consultation, in accordance with the anatomical groups

<b>Signs and symptoms</b>	<b>Colon</b>		<b>Rectum</b>	
	<b>Frequency</b>	<b>Percentage</b>	<b>Frequency</b>	<b>Percentage</b>
	<b>(n)</b>	<b>(%)</b>	<b>(n)</b>	<b>(%)</b>
Bleeding	41	8.91	93	32.17
Abdominal pain	38	8.26	10	3.46
Diarrhea	22	4.78	42	14.53
AA <sup>+</sup> Obstructive	46	10	13	4.49
Weight Loss	21	4.56	26	8.99
Stools Tape	6	1.30	6	2.07
AA <sup>+</sup> Inflammatory	6	1.30	0	0
Anemia	7	1.52	0	0

<sup>+</sup>AA= Acute Abdomen

**Table 3:** Comorbidities in patients with cancer of the colon and rectum

<b>Comorbidities</b>	<b>Colon</b>		<b>Rectum</b>	
	<b>Frequency</b>	<b>Percentage</b>	<b>Frequency</b>	<b>Percentage</b>
	<b>(n)</b>	<b>(%)</b>	<b>(n)</b>	<b>(%)</b>
HAS <sup>+</sup>	82	17.82	76	26.29
DM-2 <sup>++</sup>	30	6.52	17	5.88
Cholelithiasis	45	9.78	63	21.79
Diverticular Disease	38	8.26	32	11.07
Renal Cyst	33	7.1	25	8.65
Hepatic Steatosis	28	6.08	37	12.80

<sup>+</sup>HAS = hypertension arterial systemic, <sup>++</sup>DM-2 diabetes mellitus



**Table 5:** Adenocarcinoma of Colon and Rectum and clinical-pathological staging

Variable	Colon		Rectum		
	N	%	N	%	
<b>TNM</b>					
T	Is	3	0.65	0	
	1	17	3.69	14	4.84
	2	57	12.39	40	13.84
	3	210	45.65	79	27.33
	4	28	6.08	7	2.42
	NI	145	31.52	149	51.55
N	0	197	42.82	92	31.83
	1	95	20.65	28	9.68
	2	57	12.39	21	7.26
	NI	111	24.13	148	51.21
M	0	224	48.69	98	33.91
	1	146	31.73	72	24.91
	NI	90	19.56	119	41.17
<b>Duke</b>					
	A	18	3.91	42	14.53
	B	123	26.73	28	9.68
	C	87	18.91	27	9.34
	D	147	31.95	70	24.22
	NI	85	18.47	122	42.21
<b>Astler-Coller</b>					
	A	13	2.82	13	4.49
	B1	41	8.91	29	10.03
	B2	82	17.82	28	9.68
	B3	2	0.43	0	0
	C1	20	4.34	6	2.07
	C2	62	13.47	20	6.92
	C3	7	1.52	0	0
	D	146	31.73	71	24.56
	NI	87	18.91	122	42.21

Is: in situ; NI: no information

## *ARTIGO CIENTÍFICO 2*

**Artigo 2**

**Título:** CYP2E1 (PstI) and CYP1A1 (MspI) polymorphisms in colorectal cancer: a case-control study

**Autores:** **Glaucia Maria de Mendonça Fernandes**, Marcela Alcântara Proençaa, Ana Livia Silva Galbiatti, Anelise Russo, , Roliana Bravo Lelis, João Gomes Netinho, Geni Satomi Cunrath, Ana Elizabete Silva, Eny Maria Goloni-Bertollo, Érika Cristina Pavarino.

**Periódico:** Clinical Colorectal Cancer

**CYP2E1 (PstI) and CYP1A1 (MspI) polymorphisms in colorectal cancer: a case-control study**

Glaucia Maria de Mendonça Fernandes<sup>1</sup>, Anelise Russo<sup>1</sup>, Marcela Alcântara Proença<sup>1,2</sup>, Roliana Bravo Lelis<sup>a</sup>, João Gomes Netinho<sup>3</sup>, Geni Satomi Cunrath<sup>3</sup>, Ana Elizabete Silva<sup>1</sup>, Érika Cristina Pavarino<sup>1</sup>, Eny Maria Goloni-Bertollo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNESP – São Paulo State University, São José do Rio Preto, SP, Brazil

<sup>2</sup>Genetics and Molecular Biology Research Unit-UPGEM, São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brazil

<sup>3</sup>Departament of Surgery and Coloproctology Service, São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brazil

Funding sources:

*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.*

*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.*

*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.*

*FAMERP/FUNFARME.*

Running title: *PstI-CYP2E1/MspI-CYP1A1 polymorphisms in SCRC*

**Corresponding author:**

**Eny Maria Goloni Bertollo**

Departament of Molecular Biology, São José do Rio Preto Medical School (FAMERP)

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416

Zip code: 15090-000

São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Phone: + 55 17 3201-5720.

e-mail: eny.goloni@famerp.br

Conflict of Interest: **All authors have no conflicts of interest.**

### **ABSTRACT**

Sporadic colorectal cancer (SCRC) can be efficiently treated when diagnosed at early stages, thus there is an importance of searching for novel markers. Polymorphisms in genes that encode P450 cytochrome enzymes may increase the risk of SCRC. We investigate the association between SCRC and *CYP2E1*(*PstI*) and *CYP1A1*(*MspI*) polymorphisms in a case-control study. Moreover, we determined if there is an association of this disease with sociodemographic factors. The study included 273 individuals (74 patients and 199 control). The variables analyzed were gender, age, exposure to smoking and alcohol consumption, and clinical histopathological parameters of tumors. Molecular analysis was performed by PCR-RFLP technique. Multiple logistic regression was used to evaluate the influence of the polymorphisms in the SCRC development. Furthermore, it was used to assess the association of this disease with sociodemographic factors. The combined genotype was also evaluated. The results showed that there were statistically significant differences between patients and controls regarding male gender (OR=0.19, 95% CI 0.08-0.46;  $p \leq 0.05$ ) and age  $\geq 44$  years (median=44; OR=96.84, 95% CI 21.78-430.49;  $p \leq 0.05$ ). The polymorphisms evaluated were not associated with SCRC (*PstI-CYP2E1*: OR=0.93, 95% CI 0.30-2.85;  $p=0.897$ ; *MspI-CYP1A1*: OR=0.75, 95% CI 0.35-1.61;  $p=0.463$ ) and the combined genotypes also did not show association with the disease risk. Individuals with age  $\geq 44$

years are more susceptible to SCRC, while those male gender are less susceptible. The *CYP2E1*(*Pst*I) and *CYP1A1*(*Msp*I) polymorphisms are not associated with SCRC in this sample of Brazilian population.

**Keywords:** Colorectal Neoplasms, Cytochrome P-450 CYP2E1; Cytochrome P-450 *CYP1A1*; Polymorphism Genetic; Smoking, Alcohol Drinking.

## INTRODUCTION

Sporadic colorectal cancer (SCRC) is a term used to designate malignancies that occur in the large intestine (colon) and rectum<sup>1</sup>, in individuals with no family history of cancer. The most frequent histological type is adenocarcinoma, which accounts more than 90% of cases<sup>2,3</sup>. Of these cases, 60% are located in the last 20 cm of the colon (sigmoid distal and rectal)<sup>4-7</sup> and in recent years has been seen an increased occurrence in the right colon<sup>7,8</sup>. The disease is the second most common in Western countries<sup>3,9</sup>. In Brazil, for 2013, are expected 30.140 new cases of SCRC<sup>1</sup>.

The most common etiological factors for SCRC include age over 60 years<sup>1,10,11</sup>, alcohol consumption<sup>12</sup>, tobacco habits<sup>12,13</sup>, and diet poor in calcium and folate as well as with high content of saturated fat, red meat, bread, pasta and refined sugar<sup>3,9-12,14</sup>. On the other hand, the increased intake of polyunsaturated fatty acids (chiefly derived from olive oil and seed oils) and the consumption of fruits and vegetables may provide protection against this type of cancer<sup>3,12,14</sup>. In addition, the epidemiological evidence consistently showed that physical activity reduces the risk of SCRC<sup>10</sup>. Other factors that may influence the development of SCRC are obesity and sedentary lifestyle<sup>12</sup>.

The carcinogenesis of SCRC involves damage to the DNA of somatic cells by environmental factors, forming DNA adducts. Some genetic variants codify enzymes

highly polymorphic that may accelerate this process. Thus, the development of SCRC results of the interaction of environmental factors and genetic inheritance<sup>13,15-17</sup>.

The balance of the rates of absorption and elimination of xenobiotics has an important role in preventing DNA damage, caused by chemical carcinogens<sup>18</sup>. Some studies show that many carcinogens contained in cigarettes and from the alcohol degradation are metabolized to active forms having deleterious effects on the body. These substances can cause oxidative reactions in tissues, that produce free radicals in different cellular events. The presence of reactive oxygen can cause damage to proteins, carbohydrates, lipids and DNA, consequently resulting in mutagenesis and alterations in the cellular cycle<sup>19,20</sup>.

The machinery of xenobiotic metabolism has two types of enzymes: the oxidative metabolism mediated or Phase I enzymes and Phase II. Many compounds are converted to highly reactive metabolites by Phase I oxidative that are mainly from super-family of enzymes cytochrome P450 (CYPs). The *CYP2E1* and *CYP1A1* genes have great importance in the process of human carcinogenesis because they are involved in the metabolic activation of xenobiotics that may contribute to the risk of developing diseases, like cancer<sup>21,22</sup>.

Polymorphisms in *CYP2E1* and *CYP1A1* genes can modify the expression or enzyme function, resulting in activation of procarcinogenic compounds<sup>13,21,23,24</sup>. These polymorphisms can be potential candidates for predictive biomarkers that may help to identify the subset of patients who would have risk of development of SCRC<sup>25</sup>. Regarding to the *CYP1A1* gene, there is a polymorphism for the restriction enzyme *MspI* named *CYP1A1\*2A*. This polymorphism results from a change of a single base (T→C) at position 3801 of the tail poly (A) in the 3' untranslated region of the gene and can provide a higher stability and/or activity of the enzyme<sup>26,27</sup>. The *CYP1A1* wild type

(*wt*) allele and the polymorphic allele (*mI*) may influence the development of the cancers related to tobacco as oral cancer, cervical, lung and SCRC<sup>28-31</sup>.

The *PstI* polymorphism (-1293 G→C) of the *CYP2E1* gene, also is a potential indicator of susceptibility to cancer. This polymorphism, located in the promoter region of the gene, was found to be associated with higher-transcription and increased enzyme activity<sup>32,33</sup>. The *CYP2E1* wild-type (*c1*) and the less common (*c2*) alleles has been associated with increased risk for oral [34], esophageal<sup>35</sup>, lung<sup>36</sup>, gastric cancer<sup>37</sup> and SCRC<sup>13,38,39</sup>. There is evidence that the polymorphic allele *PstI-CYP2E1* (*c2*) combined with alcohol consumption, smoking and red meat consumption may significantly increase the susceptibility to colon cancer<sup>39</sup>.

Based on the above evidence, the aim of this study was to investigate the association between SCRC and *CYP2E1* (*PstI*) and *CYP1A1* (*MspI*) polymorphisms in a case- control study. Moreover, we determined if there is an association of this disease with sociodemographic factors.

## **PATIENTS AND METHODS**

The study included a total of 273 individuals (74 patients and 199 controls) with a mean age of  $47.2 \pm 13.4$  years. All individual adults agreed to participate of the study after the informed consent. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee (CEP) - São José do Rio Preto Medical School – FAMERP (n°216/2009).

The case group consisted of 74 patients who were diagnosed with SCRC by clinical histopathological parameters at Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brazil. The inclusion criteria were patients with sporadic cancer and exclusion criteria were patients with hereditary cancer. The control group included 199 Brazilian healthy blood donors. The inclusion criteria were age older than 40 years and absence of the



diagnosis of cancer. According to government guidelines for donated blood were tested 20 related diseases<sup>40</sup>. The exclusion criterion was a family history of cancer.

The variables analyzed were gender, age, tobacco habits and alcohol consumption, extension of the tumor (T), lymph node involvement (N), and the polymorphisms. Individuals who had smoked more than 100 cigarettes in their lifetime and also that at the time of the interview continued to smoke either every day or at least on some days if the week, they were considered to be smokers. Individuals who drink four doses of alcohol per week were considered to be alcohol consumers<sup>15,41</sup>.

Each eligible subject was interviewed to obtain data on age, gender, smoking habit and alcohol consumption. All required information about clinical histopathological parameters was obtained from the patients' medical records. The tumors were classified according to the parameters of the International Union of Cancer Control (UICC) 2004<sup>42</sup> based on three criteria: extension of the tumor (T), presence of regional lymph node involvement (N), and presence of metastasis at distance (M).

Genomic DNA was obtained from peripheral blood leucocytes according to technique of Miller<sup>43</sup> (with modifications). The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was used to determine genotypes of the *PstI-CYP2E1* polymorphism<sup>44</sup> and *MspI-CYP1A1* polymorphism<sup>45</sup>. The primers used were: sense 5' CCA GTC GAC TCT ACA TTG TCA 3' and anti-sense 5' TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG 3' to the *PstI-CYP2E1* polymorphism and the primers sense 5' TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT 3' and anti-sense 5' CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT 3' to the *MspI-CYP1A1* polymorphism. The products were submitted to digestion with the *PstI* and *MspI* restriction enzymes, to the *CYP2E1* and *CYP1A1* polymorphisms, respectively. For polymorphism *PstI-CYP2E1*, one fragment of 410 base pairs (bp) was observed when the *c1* allele was present and a 290 bp and a

120 bp fragments were generated when the *c2* polymorphic allele was present. For polymorphism *MspI-CYP1A1*, one fragment of 340 bp was generated when the *wt* allele was present and fragments of 206 and 134 bp were observed when the *m1* polymorphic allele was present.

Statistical analysis was performed using the Minitab computer program for Windows (Version 14). The chi-square test was used to analyze Hardy-Weinberg equilibrium. The groups were compared by gender, age, smoking habit, drinking habit and presence of polymorphisms. Multiple logistic regression models were used to determine the association between the genetic polymorphisms and SCRC. The model included gender (reference: female), age (reference: < 44 years; median) smoking habit (reference: non-smokers), drinking habit (reference: non-drinkers) and polymorphisms (reference: wild-type homozygote genotypes).

The clinical histopathological parameters were also analyzed by multiple logistic regression. Extension of the tumor were classified as small (T1, T2) and large (T3, T4). The N classification was dichotomized into no lymph node involvement (N0) and involvement (N1, N2, N3).

For combined genotypes analysis, the *CYP2E1 c1c1* and *CYP1A1 wt/wt* genotypes were used as reference (Risk 0). The *CYP2E1 c1c1* and *CYP1A1 wt/m1* or *CYP2E1 c1c2* and *CYP1A1 wt/wt* genotypes (one wild-type homozygote and other heterozygote) were considered as risk 1; *CYP2E1 c1c1* and *CYP1A1 m1/m1* genotype (one mutant homozygote and other wild-type homozygote) was definite as risk 2 (in this case, the *CYP2E1 c2c2* and *CYP1A1 wt/wt* combination was not possible due to the absence of the *CYP2E1 c2c2* genotype in the sample); *CYP2E1 c1c2* and *CYP1A1 wt/m1* (both heterozygote genotypes) was classified as risk 3; and *CYP2E1 c1c2* and *CYP1A1 m1/m1* genotype (one polymorphic homozygote and other heterozygote or

both polymorphic genotypes) was classified as risk 4 (in this case, the *CYP2E1 c2c2* and *CYP1A1 ml/ml* or *CYP2E1 c2c2* and *CYP1A1 wt/ml* combinations was not possible due to the absence of the *CYP2E1 c2c2* genotype in the sample).

P-value < 0.05 was considered statistically significant. Results are shown as odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI).

## RESULTS

The analysis showed that there were statistically significant differences between patients and controls regarding male gender (OR= 0.19; 95% CI 0.08-0.46;  $p < 0.001$ ) and age  $\geq 44$  years (OR= 96.84, 95% CI 21.78-430.49;  $p < 0.001$ ). There were no statistically significant differences between patients and controls according to smoking habit (OR= 1.36, 95% CI 0.63-2.93;  $p = 0.436$ ) and alcohol consumption (OR= 0.89, 95% CI 0.40-1.97; 0.771). The polymorphisms evaluated were not associated with SCRC (*PstI-CYP2E1*: OR= 0.93, 95% CI 0.30-2.85;  $p = 0.897$ ; *MspI-CYP1A1*: OR= 0.75, 95% CI 0.35-1.61;  $p = 0.463$ ) (Table 1).

The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) showed that the genotypic distributions for *PstI-CYP2E1* were in equilibrium for both groups (case:  $X^2 = 0.2416$ ;  $p = 0.6230$ , and control:  $X^2 = 1.1396$ ;  $p = 0.2857$ ), and for *MspI-CYP1A1* were in equilibrium for case group and in disequilibrium for control group (case:  $X^2 = 1.1538$ ;  $p = 0.2827$ , and control:  $X^2 = 6.2501$ ;  $p = 0.0124$ ).

The multiple logistic regression analysis of the polymorphisms with clinical histopathological parameters did not detect any association with the tumor extension and lymph node involvement (Table 2).

We combined the genotypes with zero risk allele and used this combined group as the reference, the results did not show any statistically significant difference between the SCRC risk and the number of risk alleles (risk 1 - OR: 0.91; 95%CI = 0.42-1.99;  $p =$

0.817; risk 2 - OR: 0.57; 95%CI = 0.10-3.11; p = 0.512; risk 3 - OR: 1.00; 95% CI = 0.08-12.19; p = 0.998; risk 4 - OR: 0.20; 95%CI = 0.01-3.89; p = 0.290).

## DISCUSSION

The results showed that individuals over age ( $\geq 44$  years) are more susceptible to SCRC, similarly to literature data, which also shows that SCRC is more common in older people<sup>1,10,11</sup>. With respect to gender, different from the other studies<sup>46-48</sup> and the data National Cancer Institute<sup>49</sup>, we observed that male subjects are less susceptible to SCRC.

In relation to tobacco and alcohol, our study found no association with these variables. However, another studies<sup>31,50-53</sup> showed that one out of five SCRCs cases are attributed to smoking, and that the alcohol intake are associated with SCRC<sup>54,55</sup>.

According to the HWE analysis our study showed that in control group the *MspI-CYP1A1* gene is in disequilibrium. Case-control studies with SNP analysis have shown departure from HWE in patients, in controls or in both groups<sup>56,57</sup>.

The CYPs family is composed of genes involved in the metabolic activation of procarcinogens, and also are involved in the metabolization of some environmental pollutants, medicinal products, tobacco, alcohol, pesticides, chemicals and others known as xenobiotics<sup>21,51,59</sup>. The *CYP1A1* gene located on chromosome 15 encodes the enzyme aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) that is induced by many environmental agents and that has differential action between cell types<sup>29</sup>. The *CYP2E1* gene located on chromosome 10, encodes a product (dimetil nitrosamina desmetilase) involved in the oxidative metabolism of ethanol and numerous environmental carcinogens such as hydrophilic compounds of low molecular weight, benzene, vinyl chloride and nitrosamines, including the NNK (4-metilnitrosamino-1-3- butanone piridyl) found in cigarette smoke<sup>20, 60-62</sup>. The enzymatic expression of the *CYP2E1* gene is enhanced by

ethanol and exposure to cigarette smoke and benzene and is associated with lung cancer and liver cancer<sup>63</sup>.

In our study, the evaluated polymorphisms were not significantly associated with SCRC. We also found no association of polymorphisms with tumor extension and lymph node involvement. We had limited statistical power to determine the associations separately for polymorphic homozygous genotype of those who had one variant allele, due to low incidence, or even lack of polymorphic homozygous genotype in the sample. However, others studies of the literature performed in north American<sup>51</sup>, Australian<sup>63</sup>, United Kingdom<sup>64</sup> and other populations<sup>65, 66</sup> also did not find association between *PstI-CYP2E1* and *MspI-CYP1A1* polymorphisms and this disease. To our knowledge there are not studies in SCRC that evaluated the clinical histopathological parameters with the polymorphisms analyzed in this study. In lung cancer, Tan et al.<sup>67</sup> evaluated the association between the *CYP1A1\*2A* polymorphism and histopathological data, but found no association.

Different from our findings, another studies<sup>68-73</sup> found that the *c2* allele of the *PstI-CYP2E1* polymorphism seems to be associated with SCRC susceptibility. Le Marchand *et al.*<sup>69</sup> found that the risk of rectal cancer, but not colon cancer, was increased among individuals with the *c2* polymorphic allele for *PstI-CYP2E1* polymorphism. Unlike our findings, regarding to *MspI-CYP1A1* polymorphism, case-control studies have found an association between this polymorphism and SCRC<sup>51, 71, 74-</sup>

<sup>76</sup>.

## CONCLUSION

Our study shows that individuals with age  $\geq 44$  years are more susceptible to SCRC, while those male gender are less susceptible. The *CYP2E1 (PstI)* and *CYP1A1 (MspI)* polymorphisms are not associated with SCRC in this evaluated Brazilian

population. Further studies are needed to better understanding of the factors involved in SCRC etiology.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”-FAPESP, “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”-CAPES and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”-CNPq by financial support, FAMERP/FUNFARME by institutional support, Ana Livia Silva Galbiatti, MSc by statistical analysis, and Marcelo Maia Caixeta de Melo, MSc the doctor coloproctology.

### **REFERENCES**

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA) [Internet]. Accessed 2013 May 25. Available from: <http://www.inca.gov.br>.
2. Giurizato CSB, Areias MAC. Study of prevalence of colorectal cancer during 2005 in Hospital of the unified system of health in Dourados city- MS. *Interbio*. 2008; 2: 21-28.
3. Zampino MG, Magni E, Sonzogni A, et al. *K-ras* status in squamous cell anal carcinoma (SCC): it's time for target-oriented treatment? *Cancer Chemotherapy and Pharmacol*. 2009; 65: 197-9.
4. Lupinacci RM, Campos FGCM, Araújo SE, et al. Analysis comparative of the clinical, anatomic-pathological characteristics and supervised between patients with colorectal cancer below and above of 40 years old. [in Portuguese]. *Rev bras Coloproct*. 2003; 23: 155-62.
5. Carneiro Neto JD, Barreto JBP, Freitas NS, et al. Colorectal Cancer: Clinical And Anatomopathological Features in Patients Below 40 Years of Age. [in

- Portuguese]. *Rev bras Coloproct.* 2006; 26(4): 430-5.
6. Cerato MM, Cerato NL, Meurer L, et al. Interobserver variability in the histological diagnosis of colorectal polyps. [in Portuguese]. *Rev bras Coloproct.* 2007; 27(1): 7-15.
  7. Santos Junior JCM. Anal canal and colorectal cancer: current features: II - colorectal cancer - risks factors and prevention. [in Portuguese]. *Rev bras Coloproct.* 2007; 27(4): 459-73.
  8. Cruz GMG, Ferreira RMRS, Neves PM. Rectal cancer: demographic, diagnostic study and permanence of 380 patients folloied throughout four decades. [in Portuguese]. *Rev bras Coloproct.* 2004; 24(3): 208-24.
  9. Pinho M, Rossi BM. Actual concepts about colorectal carcinogenesis. [in Portuguese]. *Rev bras Coloproct.* 1999; 19(1): 57-60.
  10. Giacosa A, Rondanelli M, Cena H, et al. Diet and colorectal cancer risk: current views. *Annals of Gastroenterology.* 2002; 15(4): 324-32.
  11. Diniz BSO, Lacerda-Filho A. Screening of colorectal cancer in low risk assymptomatic patients: [review]. [in Portuguese]. *Rev Med Minas Gerais.* 2004; 14: 46-52.
  12. Hermann S, Rohrmann S, Linseisen J. Lifestyle factors, obesity and the risk of colorectal adenomas in EPIC-Heidelberg. *Cancer Causes Control.* 2009; 20(8): 1397-408.
  13. Gertig DM, Hunter DJ. Genes and environment in the etiology of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol.* 1998; 8(4): 285-98.
  14. Naccarati A, Pardini B, Hemminki K, et al. Sporadic colorectal cancer and individual susceptibility: A review of the association studies investigating the role of DNA repair genetic polymorphisms. *Mutat Res.* 2007; 635(2-3): 118-45.

15. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang MJ, Jen J, Sidransky D. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *Cancer Res.* 2000; 60(12): 3155-9.
16. Pytynia KB, Grant JR, Etzel CJ, Roberts DB, Wei Q, Sturgis EM. Matched-pair analysis of survival of never smokers and ever smokers with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2004; 22(19): 3981-8.
17. Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res.* 2007; 86(2): 104-14.
18. Hatagima, A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. [in Portuguese]. *Cad Saúde Pública* [online]. 2002; 18(2): 357-77.
19. Zain RB. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer--a brief overview. *Oral Oncol.* 2007; 37(3): 205-10.
20. Cury NM, Russo A, Galbiatti AL, et al. Polymorphisms of the *CYP1A1* and *CYP2E1* genes in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(2): 1055-63.
21. Abbas A, Delvinquiere K, Lechevrel M, et al. *GSTM1*, *GSTT*, *GSTP1* and *CYP1A1* genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(23): 3389-93.
22. Zhang JY, Wang Y, Prakash C. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human lung. *Curr Drug Metab.* 2006; 7(8): 939-48.
23. Evans AJ, Henner WD, Eilers KM, et al. Polymorphisms of *GTTT1* and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck.* 2004; 26(1): 63-70.



24. Liu CJ, Chang CS, Lui MT, et al. Association of GST genotypes with age of onset and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34(8): 473-7.
25. Chu E. An Update on the Current and Emerging Targeted Agents in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2011; 11(1): 1-13.
26. Bartsch H, Petruzzelli S, De Flora S, et al. Carcinogen metabolism in human lung tissues and the effect of tobacco smoking: results from a case--control multicenter study on lung cancer patients. *Environ Health Perspect.* 1992; 98:119-24.
27. Jose CS, Cabanillas A, Benitez J, Carrillo JA, et al. *CYP1A1* gene polymorphisms increase lung cancer risk in a high-incidence region of Spain: a case control study. *BMC Cancer.* 2010; 10: 463.
28. Sreeja L, Syamala V, Hariharan S, et al. Possible risk modification by *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* gene polymorphisms in lung cancer susceptibility in a South Indian population. *J Hum Genet.* 2005; 50(12): 618-27.
29. Cha IH, Park JY, Chung WY, et al. Polymorphisms of *CYP1A1* and *GSTM1* genes and susceptibility to oral cancer. *Yonsei Med J.* 2007; 48(2): 233-9.
30. Juárez-Cedillo T, Vallejo M, Fragoso JM, et al. The risk of developing cervical cancer in Mexican women is associated to *CYP1A1 MspI* polymorphism. *Eur J Cancer.* 2007; 43(10): 1590-5.
31. Yoshida K, Osawa K, Kasahara M, et al. Association of *CYP1A1*, *CYP1A2*, *GSTM1* and *NAT2* gene polymorphisms with colorectal cancer and smoking. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2007; 8(3): 438-44.
32. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem.* 1991; 110(4): 559-65.

33. Tang K, Li Y, Zhang Z, et al. The PstI/RsaI and DraI polymorphisms of *CYP2E1* and head and neck cancer risk: a meta-analysis based on 21 case-control studies. *BMC Cancer*. 2010, 10: 575.
34. Gattás GJ, de Carvalho MB, Siraque MS, et al. Genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, and *GSTT1* associated with head and neck cancer. *Head Neck* 2006; 28(9): 819-26.
35. Niu Y, Yuan H, Leng W, et al. *CYP2E1* Rsa I/Pst I polymorphism and esophageal cancer risk: a meta-analysis based on 1,088 cases and 2,238 controls. *Med Oncol*. 2011; 28(1): 182-7.
36. Zhan P, Wang J, Zhang Y, et al. *CYP2E1* Rsa I/Pst I polymorphism is associated with lung cancer risk among Asians. *Lung Cancer*. 2009; 69(1): 19-25.
37. González A, Ramírez V, Cuenca P, et al. Polymorphisms in detoxification genes *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTT1* and *GSTM1* in gastric cancer susceptibility. *Rev Biol Trop*. 2004; 52(3): 591-600.
38. Morita M, Le Marchand L, Kono S, et al. Genetic polymorphisms of *CYP2E1* and risk of colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(1): 235-41.
39. Zhou GW, Hu J, Li Q. *CYP2E1* PstI /RsaI polymorphism and colorectal cancer risk: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(23): 2949-53.
40. Bvsmms.saude.gov.br [Internet]. Qualidade do Sangue: Sangue e hemoderivados – Ministério da Saúde – Secretaria Executiva. [in Portuguese]. Accessed 2012 Jun 3. Available from:  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/qualidade\\_sangue.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/qualidade_sangue.pdf)
41. Kjaerheim K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10,900

- Norwegian men. *Cancer Causes Control*. 1998; 9(1): 99-108.
42. UICC- União Internacional Contra o Câncer [Internet]. TNM: Classificação de Tumores Malignos [in Portuguese] 6th ed. 2004, Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Accessed 2012 Jun 3. Available from: <http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf>.
43. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1998; 16(3): 1215.
44. Ulusoy G, Arinç E, Adali O. Genotype and allele frequencies of polymorphic *CYP2E1* in the Turkish population. *Arch Toxicol*. 2007; 81(10): 711-8.
45. Jarvis MD, Palmer BR, Pilbrow AP, et al. *CYP1A1 MSPI* (T6235C) gene polymorphism is associated with mortality in acute coronary syndrome patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010; 37(2): 193-8.
46. Deakin M, Elder J, Hendrickse C, et al. Glutathione S-transferase *GSTT1* genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with *GSTM1* in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis*. 1996; 17(4): 881-4.
47. Cotton SC, Sharp L, Little J, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGe review. *Am J Epidemiol*. 2000; 151(1): 7-32.
48. Arafa MA, Waly MI, Jriesat S, et al. Dietary and lifestyle characteristics of colorectal cancer in Jordan: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; 12(8): 1931-6.
49. SEER Database: Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program ([www.seer.cancer.gov](http://www.seer.cancer.gov)) SEER\* Start Database: Incidence – SEER 9 Regs Public – Use, Nov 2002 Sub (1973-2000), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, released April 2003, based on the November 2002 submission.

50. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, et al. NAT2, GSTM-1, cigarette smoking, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7(12): 1079-84.
51. Slattery ML, Samowitz W, Ma K, et al. *CYP1A1*, cigarette smoking, and colon and rectal cancer. *Am J Epidemiol.* 2004; 160(9): 842-52.
52. Ahmed FE. Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2004; 22(2): 91-147.
53. Raimondi S, Botteri E, Iodice S, et al. Gene-smoking interaction on colorectal adenoma and cancer risk: review and meta-analysis. *Mutat Res.* 2009; 670(1-2): 6-14.
54. Seitz HK, Maurer B, Stickel F. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Dig Dis.* 2005; 23(3-4): 297-303.
55. Gao CM, Takezaki T, Wu JZ, et al. CYP2E1 Rsa I polymorphism impacts on risk of colorectal cancer association with smoking and alcohol drinking. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(43): 5725-30.
56. Xu J, Turner A, Little J, et al. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet.* 2002; 111(6): 573-4.
57. Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet.* 2005; 76(6): 967-86.
58. Llorca J, Prieto-Salceda D, Combarros O, et al. Competing risks of death and Hardy-Weinberg equilibrium in case-control studies of gene-disease association. [in Spanish]. *Gac Sanit.* 2005; 19(4): 321-4.

59. Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician*. 2007; 76(3): 391-6.
60. Stewart BM, Kleihues P. World cancer report. IARC Press, Lyon 2003.
61. Guengerich FP. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: minireview. *J Biochem Mol Toxicol*. 2007; 21(4): 163-8.
62. Liu R, Yin LH, Pu YP. Association of combined CYP2E1 gene polymorphism with the risk for esophageal squamous cell carcinoma in Huai'an population, China. *Chin Med J (Engl)*. 2007; 120(20): 1797-802.
63. Butler WJ, Ryan P, Roberts-Thomson IC. Metabolic genotypes and risk for colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001; 16(6): 631-5.
64. Ye Z, Parry JM. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferase *M1* and T1, and susceptibility to colon cancer. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2002; 22(5): 385-92.
65. Ishibe N, Stampfer M, Hunter DJ, et al. A Prospective study of Cytochrome P450 1A1 polymorphisms and colorectal cancer risk in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9(8): 855-6.
66. Landi S, Gemignani F, Moreno V, et al. A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphisms and risk of colorectal cancer. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15(8): 535-46.
67. Tan C, Xu HY, Zhang CY, et al. Effect of *CYP1A1* MSPI polymorphism on the relationship between TP53 mutation and *CDKN2A* hypermethylation in non-small cell lung cancer. *Arch Med Res*. 2011;42(8):669-76.
68. Kiss I, Sándor J, Pajkos G, et al. Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase *M1* enzymes. *Anticancer Res*. 2000; 20(1B): 519-22.

69. Le Marchand L, Donlon T, Seifried A, et al. Red meat intake, *CYP2E1* genetic polymorphisms, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11(10 Pt 1): 1019-24.
70. Yu WP, Chen K, Ma XY, et al. Genetic polymorphism in cytochrome P450 2E1, salted food and colorectal cancer susceptibility: a case-control study. [in Chinese]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2004; 38(3): 162-6.
71. Kiss I, Orsós Z, Gombos K, et al. Association between allelic polymorphisms of metabolizing enzymes (*CYP 1A1*, *CYP 1A2*, *CYP 2E1*, *mEH*) and occurrence of colorectal cancer in Hungary. *Anticancer Res.* 2007; 274C: 2931-7.
72. Morita M, Le Marchand L, Kono S, et al. Genetic polymorphisms of *CYP2E1* and risk of colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(1):235-41.
73. Jiang O, Zhou R, Wu D, et al. *CYP2E1* polymorphisms and colorectal cancer risk: a HuGE systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013;34(2):1215-24.
74. Sivaraman L, Leatham MP, Yee J, et al. *CYP1A1* genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res.* 1994; 54(14): 3692-95.
75. Murtaugh MA, Sweeney C, Ma KN, et al. The *CYP1A1* Genotype May Alter the Association of Meat Consumption Patterns and Preparation with the Risk of Colorectal Cancer in Men and Women. *J Nutr.* 2005; 135(2): 179-86.
76. Yoshida K, Osawa K, Kasahara M, et al. Association of *CYP1A1*, *CYP1A2*, *GSTM1* and *NAT2* gene polymorphisms with colorectal cancer and smoking. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2007;8(3):438-444.

## TABLES

**Tabela 1:** Distribution in odds ratio (OR) of the gender, age, risk factors, *PstI-CYP2E1* and *MspI-CYP1A1* genotypes between CRC patients and controls.

Variables	Patients	Controls	Multiple logistic regression	
	n(%)	n(%)	OR (95% CI)	p
<b>N° of individuals</b>	74	199		
<b>Age (median)</b>				
< 44 years	2 (2.7)	133 (66.8)	Reference	
≥ 44 years	72 (97.3)	66 (33.2)	96.84 (21.78-430.49)	<b>&lt;0.001<sup>a</sup></b>
<b>Gender</b>				
Female	34 (45.9)	45 (22.6)	Reference	
Male	40 (54.1)	154 (77.4)	0.19 (0.08-0.46)	<b>&lt;0.001<sup>a</sup></b>
<b>Smoking habit</b>				
Non-smokers	41 (44.6)	116 (58.3)	Reference	
Smokers	33 (55.4)	83 (41.7)	1.36 (0.63-2.93)	0.436
<b>Drinking habit</b>				
non-drinkers	47 (63.5)	108 (54.3)	Reference	
Drinkers	27 (36.5)	91 (45.7)	0,89 (0.40-1.97)	0.771
<b>Genotypes</b>				
<b><i>PstI-CYP2E1</i></b>				
<i>c1c1</i> *	66 (89.2)	171 (85.9)	Reference	
<i>c1c2</i> and <i>c2c2</i> **	8 (10.8)	28 (14.1)	0.93 (0.30-2.85)	0.897
<b><i>MspI-CYP1A1</i></b>				
<i>wt/wt</i> *	54 (73.0)	129 (64.8)	Reference	
<i>wt/ml</i> and <i>ml/ml</i> **	20 (27.0)	70 (35.2)	0.75 (0.35-1.61)	0.463

Adjusted for age, gender, smoking and alcohol consumption.  $p \leq 0.05$  was considered significant in multiple logistic regression model.

<sup>a</sup>The bold values indicate  $p \leq 0.05$

\* wild type

\*\* mutant

**Table 2. Distribution of the clinical histopathological parameters to *CYP2E1* (*PstI*) and *CYP1A1* (*MspI*) polymorphisms.**

Polimorfismos			Tumor extension		N involvement	
			T0/T1/T2	T3/T4	N0	N1, N2, N3
<i>PstI-CYP2E1</i> <i>Genotypes</i>	<i>c1c1</i> (Ref)	n (%)	11 (19.3)	38 (66.7)	29 (50.9)	7 (12.3)
	<i>c1c2</i> and <i>c2c2</i>	n (%)	2 (3.5)	6 (10.5)	20 (35.1)	1 (1.7)
<b>OR</b> <b>(IC 95%, p-value)</b>			1.00 (Ref)	0.43 (0.06-3.15, 0.408)	1.00 (Ref)	0.29 (0.03-2.89, 0.294)
<i>MspI-CYP1A1</i> <i>Genotypes</i>	<i>wt/wt</i> (Ref)	n (%)	10 (17.5)	3 (5.3)	29 (50.9)	13 (22.8)
	<i>wt/m1</i> and <i>m1/m1</i>	n (%)	32 (56.1)	12 (21.1)	7 (12.3)	8 (14.0)
<b>OR</b> <b>(IC 95%, p-value)</b>			1.00 (Ref)	0.79 (0.16-3.87, 0.774)	1.00 (Ref)	3.28 (0.84-12.88, 0,088)

$p \leq 0.05$  was considered significant in multiple logistic regression model.



## *ARTIGO CIENTÍFICO 3*

**Artigo 3**

**Título:** Estudo caso-controle de seis polimorfismos dos genes CYP1A1, CYP2E1 e EPHX1 em câncer colorretal esporádico.

**Autores:** **Glaucia Maria de Mendonça Fernandes**, Anelise Russo, Marcela Alcântara Proença, Nathália Fernanda Gazola, Ana Elizabete Silva João Gomes Netinho, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo

**Periódico:** European Journal of Cancer, a ser submetido.

**Estudo caso-controle de seis polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *CYP2E1* e *EPHX1* em câncer colorretal esporádico.**

Gláucia Maria de Mendonça Fernandes<sup>1</sup>, Anelise Russo<sup>2</sup>, Marcela Alcântara Proença<sup>3</sup>, Natália Fernanda Gazola<sup>4</sup>; Ana Elizabete Silva<sup>5</sup>, João Gomes Netinho<sup>6</sup>, Érika Cristina Pavarino<sup>7</sup>, Eny Maria Goloni-Bertollo<sup>7</sup>.

1- Mestranda, Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM), Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP); 2- Doutoranda, UPGEM, FAMERP; 3- Doutoranda, Universidade Paulista – IBILCE/UNESP; 4- Graduanda de Medicina Bolsista Iniciação Científica PIBIC, UPGEM, FAMERP; 5-PhD Professora Adjunta do Departamento de Genética, IBILCE/UNESP; 6- PhD, Médico do Departamento de Coloproctologia - Cirurgia Geral, FAMERP; 7- PhD, Professora Adjunta do Departamento de Biologia Molecular, UPGEM, FAMERP; São Paulo, Brasil.

## RESUMO

Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em genes codificadores de enzimas metabolizadoras de xenobióticos podem contribuir para o processo da carcinogênese. Considerando que o câncer colorretal esporádico (CCRE) é o quinto tipo mais frequente na população brasileira, nós investigamos a associação entre os polimorfismos *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2C*, *CYP2E1\*5B*, *CYP1A1\*6*, *EPHX1 Tyr113His* e *EPHX1 His139Arg*, envolvidos no metabolismo de xenobióticos, e o CCRE e a interação entre esses polimorfismos com os hábitos tabagista e etilista no risco para esta doença. Além disso, avaliamos a associação do CCRE com fatores sócio-demográficos. O estudo incluiu 642 indivíduos (241 pacientes e 401 controles). As variáveis analisadas foram idade, sexo, hábitos tabagista e etilista e parâmetros clínico-histopatológicos do tumor. A análise dos polimorfismos foi realizada por meio das técnicas de PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase-polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e PCR em tempo real. Os testes Qui-quadrado e regressão logística múltipla binária foram utilizados para as análises estatísticas. Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos caso e controle para idade superior a 50 anos (OR=8,21; IC95%=5,49-12,28,  $p<0,01$ ) e gênero masculino (OR=0,50; IC95%=0,32-0,87,  $p<0,01$ ). A análise dos polimorfismos revelou associação entre os alelos polimórficos *CYP2E1\*5B* (OR=2,84; IC95%=1,78-4,52);  $p<0,01$ , modelo aditivo) e *CYP2E1\*6* (OR=2,78; IC95%=1,91-4,06,  $p<0,0$ , modelo aditivo) e o CCRE. Em conclusão, nossos dados demonstram a influência desses alelos polimórficos no desenvolvimento do CCRE na população estudada. Além disso, indivíduos com idade superior ou igual a 50 anos são mais suscetíveis ao CCRE, enquanto aqueles do gênero masculino são menos suscetíveis.

*Palavras Chave:* Polimorfismos genéticos, Neoplasias Colorretais, Hábito de Fumar, Álcool, Citocromo P-450 CYP2E1, Citocromo P-450 CYP1A1, Epóxido Hidrolases.

**ABSTRACT**

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding xenobiotic metabolizing enzymes may contribute to the process of carcinogenesis. Whereas sporadic colorectal cancer (SCRC) is the fifth most common type in our population. The aim of study was investigate the association between the *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2C*, *CYP2E1\*5B*, *CYP2E1\*6*, *EPHX1* Tyr113His and *EPHX1* His139Arg polymorphisms involved in metabolism of xenobiotics and CCRE; and the interaction between these polymorphisms with tobacco and alcohol consumption on the risk for this disease. Furthermore, we evaluate the association of CCRE with sociodemographic factors. The study included 642 subjects (241 patients and 401 controls). The variables analyzed were age, gender, tobacco and alcohol consumption and clinical-histopathological parameters of the tumor. The polymorphism analysis was performed using the PCR-RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and real-time PCR. Chi-square and Binary logistic regression were used for statistical analysis. The results showed statistically significant differences between case and control groups for age over 50 years (OR=8.21, 95%CI=5.49-12.28, p<0.01) and gender male (OR=0.50, 95%CI=0.32-0.87, p<0.01). Polymorphism analysis revealed an association between the *CYP2E1\*5B* polymorphism (OR=2.84, 95%CI=1.07-4.52, p<0.01, additive model) and *CYP2E1\*6* (OR=2.78, 95%CI=1.91-4.06, p<0.01, additive model) and the CCRE. In conclusion, our results demonstrate the influence of these polymorphic alleles in the development of CCRE in the studied population. In addition, individuals over the age of 50 are more susceptible to CCRE, while those males are less susceptible.

*Key words:* Polymorphism Genetic, Colorectal Neoplasms, Smoking, Alcohol, Cytochrome P-450 CYP2E1; Cytochrome P-450 *CYP1A1*; Epoxide Hydrolases.

## INTRODUÇÃO

O câncer colorretal esporádico (CCRE) abrange as neoplasias malignas que ocorrem no intestino grosso (cólon) e reto.<sup>1</sup> É o quinto tipo de câncer mais frequente no Brasil<sup>1</sup> e, segundo levantamento realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para os anos de 2012 e 2013 foi de cerca de 30.140 casos novos.<sup>1</sup> Dentre os fatores etiológicos relacionados ao CCRE destacam-se idade superior a 60 anos e os hábitos tabagista e etilista.<sup>1-3</sup>

A carcinogênese do CCRE envolve danos no DNA de células somáticas resultantes de fatores ambientais e/ou de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em genes que codificam enzimas metabolizadoras de xenobióticos. Tais polimorfismos podem alterar a expressão ou função enzimática e, conseqüentemente, a ativação ou detoxificação de compostos carcinogênicos.<sup>4-6</sup>

A maioria dos procarcinógenos ambientais como aqueles provenientes do tabaco e álcool, representados pelas N-nitrosaminas, aminas heterocíclicas (HAs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), é metabolicamente ativada a formas eletrofílicas antes de reagir com o DNA e formar adutos.<sup>4-6</sup> Participando desse processo estão as enzimas oxidativas de Fase I que convertem os compostos a metabólitos altamente reativos, por meio da introdução de um ou mais agrupamentos hidroxila no substrato. Estas reações são realizadas pelas enzimas da superfamília do citocromo P-450 (CYPs) e pela epoxide hidrolase microsossomal (EPHX1). Em uma segunda etapa do biometabolismo, a Fase II, esses metabólitos são conjugados com substratos endógenos (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) e se convertem a metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção.<sup>4</sup>

Polimorfismos nos genes *CYP1A1* e *CYP2E1*, que codificam enzimas da superfamília CYP450, apresentam grande importância no processo da carcinogênese



humana, pode modificar a expressão ou função da enzima, resultando na ativação de pró-carcinógenos e têm sido associados ao desenvolvimento do câncer colorretal.<sup>7,8</sup> Dentre os polimorfismos destacam-se o *CYP1A1*\*2A (rs4646903), resultante da substituição de uma timina por citosina (T3801C) na cauda poli (A) da região 3' não traduzida do gene; o *CYP1A1*\*2C (rs1048943), que resulta da transição de adenina para guanina (A2455G);<sup>9</sup> O *CYP2E1*\*5B (rs3813867), ocorre em função da substituição G-1293C e o *CYP2E1*\*6 (rs6413432), causado pela transversão T7632A. Estes SNPs estão ligados à maior transcrição e um aumento da actividade enzimática e têm sido considerados como indicadores potenciais da suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer associado ao gene citocromo P450.<sup>9,10</sup>

Em relação ao gene *EPHX1*, dois polimorfismos funcionais, Tyr113His (rs1051740) e His139Arg (rs2234922), têm sido bem caracterizados,<sup>11</sup> e foram associados na suscetibilidade para o CCRE.<sup>12,13</sup> O polimorfismo *EPHX1* Tyr113His localizado no éxon 3, posição 337 do gene, resulta na substituição do aminoácido tirosina por histidina na posição 113 da proteína; essa alteração diminuiu em 40-50% a atividade e estabilidade enzimática *in vitro*. O polimorfismo *EPHX1* His139Arg, localizado no éxon 4, posição 416 do gene, resulta na substituição do aminoácido histidina por arginina na posição 139 da proteína e aumenta 25% a atividade e estabilidade da enzima.<sup>11,14</sup>

No presente estudo, nós investigamos a associação entre os polimorfismos *CYP1A1*\*2A, *CYP1A1*\*2C, *CYP1A1*\*6, *CYP2E1*\*5B, *EPHX1* Tyr113His e *EPHX1* His139Arg e o CCRE, e a interação entre esses polimorfismos e os hábitos tabagista e etilista no risco para esta doença. Além disso, avaliamos a associação do CCRE com os fatores sócio-demográficos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

*Casuística*

Após a aprovação pelo Comitê Nacional de Ética (SISNEP-CAAE - 0237.0.140.000-11), os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Um total de 642 indivíduos (241 pacientes com câncer CCRE e 401 controles) foram incluídos no estudo no período de 2010 à 2013. O grupo caso foi constituído de indivíduos com diagnóstico clínico histopatológico de CCRE provenientes do Serviço de Proctologia do Hospital de Ensino da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). O critério de exclusão foi paciente previamente tratado com quimioterapia e/ou radioterapia. O grupo controle foi constituído por doadores de sangue saudáveis, com idade superior a 40 anos, do Hemocentro do Noroeste do Estado de São Paulo, no qual o sangue doado é testado para 20 doenças de acordo com a portaria do ministério da saúde (<http://www.hemonline.com.br/portarias/rdG53/indexframe.htm>). O critério de exclusão para os controles foi história pessoal e familiar de câncer em pelo menos três gerações anteriores.

Os indivíduos incluídos no estudo foram entrevistados para obtenção dos dados: idade, gênero, tabagismo, etilismo e histórico de câncer. Foram considerados tabagistas indivíduos que consumiram cerca de 100 cigarros durante toda a vida e também contiavam fumando e etilistas aqueles que consomem mais de quatro drinques por semana.<sup>15</sup>

Os tumores foram classificados de acordo com TNM seguindo três critérios: extensão do tumor (T), presença de envolvimento de linfonodos regionais (N) e presença de metástase à distância (M).<sup>16</sup> Tumores classificados em T1 e T2 foram considerados de menor extensão e T3 e T4 de maior extensão. O comprometimento dos linfonodos foi classificado quanto à ausência (N0) e presença (N1, N2, N3). O

estadiamento clínico (TNM), utilizado para analisar a agressividade de tumores, foi agrupado em não agressivo (estadio I and II) e agressivo (estadio III and IV). A obtenção dessas informações, bem como em relação à localização anatômica do sítio primário do tumor, não foi possível para todos os casos, portanto, a análise desses parâmetros, foi realizada em casuística menor.

### *Genotipagem*

A extração de DNA foi realizada a partir de leucócitos de sangue periférico segundo a técnica de Miller e colaboradores<sup>17</sup> com modificações. As quantificações das amostras de DNA, bem como o grau de pureza, foram determinadas por sua absorvância em comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 260 e 280 nm pelo espectrofotômetro Picodrop Pico200TM (*Thermo Scientific*).

As genotipagens dos polimorfismos *CYP1A1*\*2A (rs4646903), *CYP1A1*\*5B (rs3813867) e *CYP2E1*\*6 (rs6413432), foram realizadas por Reação de Cadeira da Polimerase - Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP). As sequências de *primers* utilizadas para a amplificação da região que apresenta estes polimorfismos e as enzimas utilizadas para identificar os sítios polimórficos estão apresentadas no Quadro 1.

**Quadro 1:** Descrição das sequências dos *primers* e enzimas de restrição.

<b>Polimorfismos</b>	<b>Sequências de <i>primers</i></b>	<b>Enzima de Restrição</b>
<b><i>CYP1A1</i>*2A</b>		<i>MspI</i>
<i>Primer sense</i>	5'- CGA TGA AGA GGT GTA GCC GCT -3'	
<i>Primer antisense</i>	5- TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT -3'	
<b><i>CYP2E1</i>*5B</b>		<i>PstI</i>
<i>Primer sense</i>	5' TCG TCA GTT CCT GAA AGC AGG 3'	
<i>Primer antisense</i>	5' GAG CTC TGA TGC AAG TAT CGC 3'	
<b><i>CYP2E1</i>*6</b>		<i>DraI</i>
<i>Primer sense</i>	5' TCG TCA GTT CCT GAA AGC AGG 3'	
<i>Primer antisense</i>	5' GAG CTC TGA TGC AAG TAT CGC 3'	

As genotipagens dos polimorfismos Tyr113His (rs1051740) e His139Arg (rs2234922) do gene *EPHX1* e *CYP1A1*\*2C (rs1048943) foram realizadas pela reação

de PCR em Tempo Real. As reações para cada polimorfismo foram estabelecidas segundo protocolo do fabricante (*Life Technologies*) com *primers* e sondas específicas validadas (TaqMan MGB-probes: Assay ID C\_2562488\_50, C\_\_14938\_30 e C\_\_11638783\_30, respectivamente). As reações foram realizadas no equipamento *Step One Plus™ Real-Time PCR System*.

#### *Análise estatística*

Estatísticas descritivas incluíram os valores médios, desvio padrão para dados contínuos e porcentagem para dados categóricos. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi avaliado pelo teste Qui-quadrado por meio do Programa BioEstat versão 5.0. O modelo de regressão logística binária, por meio do programa Minitab/ Windows - Versão 12.22, foi utilizado para avaliar a associação da idade, gênero, hábitos tabagista e etilista com CCRE e também para avaliar a associação dos polimorfismos com os parâmetros clínico-histopatológicos. A regressão logística múltipla binária, ajustada para idade, gênero e hábitos tabagista e etilista, também foi utilizada para avaliar a associação entre os polimorfismos e o desenvolvimento do CCRE por meio do programa SNPStats (disponível em: <[http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats\\_web](http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web)>). O efeito dos polimorfismos foi avaliado nos modelos (1) codominante (heterozigoto *versus* homozigoto selvagem e homozigoto polimórfico *versus* homozigoto selvagem); (2) dominante (heterozigoto + homozigoto polimórfico *versus* homozigoto selvagem); (3) recessivo (homozigoto polimórfico *versus* homozigoto selvagem + heterozigoto) e (4) *overdominante* (heterozigoto *versus* homozigoto selvagem + homozigoto polimórfico) (5) aditivo (homozigoto polimórfico com peso 2 + heterozigoto *versus* homozigoto selvagem); O programa SNPStats também foi usado para avaliar o potencial de interação da presença dos polimorfismos e hábito tabagista, ajustado para idade, gênero e etilismo, bem como para avaliar a interação do polimorfismo e hábito

etilista, ajustado para idade, gênero e tabagismo no risco do CCRE. Os resultados são apresentados como odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). O erro aceito foi de até 5% com nível de significância para  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os dados demográficos de pacientes com câncer colorretal e indivíduos controles. A mediana da idade foi de 50 anos ( $\geq 50$  anos; OR=8,21; IC95%=5,49-12,28,  $p < 0,01$ ) e gênero masculino (OR=0,50; IC95%=0,32-0,87,  $p < 0,01$ ) mostraram diferenças estatisticamente significantes entre caso e controle.

As frequências genotípicas apresentaram-se em equilíbrio de HWE em ambos os grupos para os polimorfismos *CYP2E1\*5B*, *CYP1A1\*6*, *EPHX1* Tyr113His e *EPHX1* His139Arg. Para os polimorfismos *CYP1A1\*2A* e *CYP1A1\*2C* apenas o grupo caso encontra-se em equilíbrio (*CYP1A1\*2A* caso:  $X^2=3,08$ ,  $p=0,08$  e controle:  $X^2=4,97$ ,  $p=0,03$ ; *CYP1A1\*2C* caso:  $X^2=3,40$ ,  $p=0,06$  e controle:  $X^2=8,59$ ,  $p=0,003$ ).

Os resultados da associação entre os seis polimorfismos e o CCRE estão apresentados na Tabela 2. Os polimorfismos *CYP2E1\*5B* e *CYP2E1\*6* foram associados ao CCRE em todos os modelos genotípicos, exceto no modelo recessivo para *CYP2E1\*5B*, uma vez que o alelo polimórfico não foi representativo no grupo controle. Os demais polimorfismos não foram associados ao CCRE.

No presente estudo, não foi evidenciado um potencial de interação significativa para a presença dos polimorfismos e hábitos tabagista ou etilista no risco para CRRE (Tabela 3). Pode-se observar que os indivíduos que apresentam os genótipos heterozigoto ou homozigoto polimórfico *CYP2E1\*5B* mostraram um risco aumentado para o CRRE independente do hábito tabagista (não tabagistas: OR=2,69; IC95%=1,41-5,10 e tabagistas: OR=2,68; IC95%=1,33-5,41) ou etilista (não etilista: OR=3,07; IC95%=1,63-5,80 e etilista: OR=3,90; IC95%=1,82-8,38). O mesmo foi observado para

aqueles que apresentam os genótipos heterozigoto ou homozigoto polimórfico *CYP2E1\*6* e não tabagistas (OR=2,89; IC95%=1,7-4,93), tabagistas (OR=2,99; IC95%=1,58-5,64), não etilistas (OR=3,14; IC95%=1,80-5,48) ou etilistas (OR=4,10; IC95%=2,18-7,72).

Em relação aos parâmetros clínico-histopatológicos do CCRE, as variáveis mais frequentes foram: extensão tumoral T3 e T4 (61,63%), ausência de comprometimento do linfonodo (52,91%) e reto como sítio primário (52,09%). As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados da análise de associação dos polimorfismos com esses parâmetros. É possível observar que não houve associação entre os parâmetros clínico-histopatológicos do CCRE e os seis polimorfismos avaliados.

## DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que indivíduos com idade mais avançada ( $\geq 50$  anos) são mais suscetíveis ao CCRE, o que corrobora com a literatura que considera a idade avançada como um fator etiológico para este tipo tumoral.<sup>1,18</sup> Em relação ao gênero, o masculino demonstrou menor suscetibilidade ao CCRE. Em outros estudos o gênero não parece influenciar no desenvolvimento do CCRE.<sup>7,12,19</sup> Os hábitos tabagistas e etilistas, no presente estudo, não mostraram associação com o CCRE. Em estudo caso-controle de Silva *et al.*<sup>19</sup> foi observada a associação entre este tipo tumoral e o tabagismo, por outro lado os estudos de Gertig & Hunter<sup>20</sup> e de Botteri *et al.*<sup>2</sup> não mostram tal associação. Em relação ao hábito etilista alguns estudos mostram que o excesso de álcool pode levar à deficiência nutricional e falhas na absorção intestinal, contribuindo para o desenvolvimento do CCRE.<sup>3</sup> Por outro lado, Silva *et al.*<sup>19</sup> e Everatt *et al.*<sup>21</sup>, similar ao nosso achado, não observaram associação entre exposição ao álcool e desenvolvimento do CCRE.

A análise de HWE revelou que os polimorfismos *CYP1A1\*2A* e *CYP1A1\*2C* não se encontram em equilíbrio no grupo controle. Estudos caso-controle com análise de SNP têm mostrado desequilíbrio de HWE em pacientes, em controles ou em ambos os grupos.<sup>22</sup> Polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo xenobióticos podem modificar a função destas enzimas, resultando na ativação de procarcinógenos. A enzima codificada pelo gene *CYP1A1*, aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH), apresenta expressão diferenciada entre os tipos celulares e é induzida por muitos agentes ambientais (CHA *et al.*, 2007). A enzima *CYP2E1* metaboliza uma grande quantidade de compostos de baixo peso molecular, muitos dos quais são cancerígenos, incluindo as N-nitrosaminas.<sup>8,23</sup> A enzima EPHX1 também desempenha um papel importante na ativação de produtos químicos,<sup>12,23</sup> como o benzo [a] pireno, um agente carcinogênico que pode formar adutos de DNA e aumentar potencialmente o risco de mutação e iniciação do CCRE.<sup>12,24</sup>

No presente estudo, os polimorfismos do gene *CYP1A1*, o *CYP1A1\*2A* e *CYP1A1\*2C*, bem como os *Tyr113His* e *His139Arg* do gene *EPHX1* não mostraram associação com CCRE. Os estudos da literatura são controversos; para o *CYP1A1\*2A* estudos realizados em população japonesa e libanesa também não encontraram associação com este tipo tumoral.<sup>25,26</sup> Por outro lado, o estudo de Yoshida *et al.*<sup>7</sup> realizado na Ásia mostrou que este polimorfismo, bem como o *CYP1A1\*2C*, aumenta o risco de CCRE nesta população. A associação do *CYP1A1\*2C* com CCRE também foi evidenciada por Kiss *et al.*<sup>4</sup> em estudo realizado na Hungria e confirmada, principalmente para os subgrupos étnicos asiáticos e caucasianos, em dois estudos de meta-análise.<sup>5,27</sup> Outros dois realizados em população asiática, similar ao nosso achado, não encontraram qualquer influência do *CYP1A1\*2C* para o CCRE.<sup>25,28</sup>

Em relação aos polimorfismos Tyr113His e His139Arg do gene *EPHX1*, nossos resultados estão de acordo com outros dois estudos realizados na população norte-americana.<sup>14,24</sup> Outros estudos revelam associação entre CCRE e estes polimorfismos.<sup>12,13,29</sup> A meta-análise realizada por Liu *et al.*<sup>23</sup> mostra que há divergências entre os estudos nas diferentes populações.

Os polimorfismos do gene *CYP2E1*, avaliados no presente estudo, *CYP2E1\*5B* e *CYP2E1\*6* conferiram risco aumentado para o CCRE. Alguns estudos também mostram que o genótipo polimórfico de *CYP2E1\*5B* (CC)<sup>4,8,30,31</sup> e o genótipo polimórfico *CYP2E1\*6* (AA)<sup>8,30</sup> aumentam o risco de CCRE em caucasianos. Porém, um estudo realizado na Holanda não observou essa associação para estes polimorfismos.<sup>29</sup> Outros estudos também não mostraram a associação do CCRE com os polimorfismos *CYP2E1\*5B* em população brasileira<sup>19</sup> e *CYP2E1\*6* em população húngara;<sup>26</sup> bem como em uma meta-análise realizada por QIAN *et al.*<sup>32</sup>

No presente estudo, não foi evidenciado um potencial de interação para a presença dos polimorfismos e hábitos tabagista ou etilista no risco para CRRE, o que corrobora com o estudo de Hamachi *et al.*<sup>33</sup> e Nisa *et al.*<sup>34</sup> que avaliaram a interação dessas variáveis com os polimorfismos *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2C*, *EPHX1-Tyr113His* e *EPHX1-His139Arg*, ambos em populações japonesas. Pelo nosso conhecimento, não há estudos que avaliam este potencial de interação para os polimorfismos *CYP2E1\*5B* e *CYP2E1\*6* avaliados no presente estudo. Vale salientar que a observação, no presente estudo, da suscetibilidade aumentada para o CCRE na presença dos polimorfismos *CYP2E1\*5B* e *CYP2E1\*6*, independente do hábito tabagista ou etilista, reforça influência desses polimorfismos na etiologia do CCRE.

O sítio primário mais representativo neste estudo foi o reto, o que está de acordo com o estudo de Wilkes & Hartshorn<sup>35</sup> que também mostrou maior ocorrência primária



do CCRE nesta localização anatômica. Em relação à extensão dos tumores houve prevalência daqueles classificados em T3/T4, embora a maioria dos tumores não apresente comprometimento dos linfonodos, o que ocorre frequentemente em hospitais terciários, pois os pacientes são encaminhados tardiamente para este serviço especializado. A extensão do tumor, presença de linfonodos comprometidos, bem como o estadiamento (TNM), não foram associados com os polimorfismos estudados. Na literatura não foram encontrados estudos em CCRE que avaliam estas variáveis clínicas com os polimorfismos analisados no presente estudo. Em câncer de pulmão, Tan *et al.*<sup>36</sup> avaliaram a associação entre o polimorfismo *CYP1A1\*2A* e dados clínico-histopatológicos, mas não encontraram associação.

Em conclusão, nossos dados demonstram a influência dos polimorfismos *CYP2E1\*5B* e *CYP2E1\*6* no desenvolvimento do CCRE na população estudada. Além disso, indivíduos com idade superior ou igual a 50 anos são mais suscetíveis ao CCRE, enquanto aqueles do gênero masculino são menos suscetíveis. O reto como sítio primário, tumores de maior extensão (T3/T4) e a ausência de linfonodos comprometidos são as variáveis clínicas mais frequentes na presente casuística. Estes resultados poderão contribuir para identificar populações de risco para a prevenção do CCRE.

### **AGRADECIMENTOS**

Agrademos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP; CAPES e CNPq pelo financiamento da pesquisa; a Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP e Fundação Faculdade de Medicina, FUNFARME pelo apoio institucional e Ana Livia Silva Galbiatti, MSc e Patrícia Matos Biselli-Chicote, PhD pela análise estatística.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA) – Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acessado em: 10 de Nov de 2013.
2. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, et al. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 2008;17;300(23):2765-78.
3. Pelucchi C, Tramacere I, Boffetta P, et al. Alcohol consumption and cancer risk. *Nutr Cancer*. 2011;63(7):983-90.
4. Kiss I, Orsós Z, Gombos K, et al. Association between allelic polymorphisms of metabolizing enzymes (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2E1*, *mEH*) and occurrence of colorectal cancer in Hungary. *Anticancer Res*. 2007; 27(4C):2931-7.
5. Jin JQ, Hu YY, Niu YM, et al. *CYP1A1* Ile462Val polymorphism contributes to colorectal cancer risk: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2011;14;17(2):260-6.
6. Wang J, Joshi AD, Corral R, et al. Carcinogen metabolism genes, red meat and poultry intake, and colorectal cancer risk. *Int J Cancer*. 2012;15;130(8):1898-907.
7. Yoshida K, Osawa K, Kasahara M, et al. Association of *CYP1A1*, *CYP1A2*, *GSTM1* and *NAT2* gene polymorphisms with colorectal cancer and smoking. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2007;8(3):438-444.
8. Sameer AS, Nissar S, Qadri Q, et al. Role of *CYP2E1* genotypes in susceptibility to colorectal cancer in the Kashmiri population. *Hum Genomics*. 2011;5(6):530-7.
9. Kristiansen W, Haugen TB, Witczak O, et al. *CYP1A1*, *CYP3A5* and *CYP3A7* polymorphisms and testicular cancer susceptibility. *Int J Androl*. 2011;34(1):77-83.
10. Ulusoy G, Arinç E, Adali O. Genotype and allele frequencies of polymorphic *CYP2E1* in the Turkish population. *Arch Toxicol*. 2007;81(10):711-8.
11. Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, et al. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum. Molec. Genet*. 1994;3:421-428.
12. Huang WY, Chatterjee N, Chanock S, et al. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and risk for advanced colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(1):152-7.

13. Hlavata I, Vrana D, Smerhovsky Z, Pardini B, Naccarati A, Vodicka P, Novotny J, Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P. Association between exposure-relevant polymorphisms in CYP1B1, EPHX1, NQO1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 and risk of colorectal cancer in a Czech population. *Oncol Rep.* 2010 Nov;24(5):1347-53.
14. Northwood EL, Elliott F, Forman D, et al. Polymorphisms in xenobiotic metabolizing enzymes and diet influence colorectal adenoma risk. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20(5):315-26.
15. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, et al. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *Cancer Res.* 2000;60, 3155-9.
16. Sobin LH, Wittelind CH. International union against cancer: TNM classification of malignant tumours. 6th Edn. New York: Wiley.
17. Miller SA, Dykesdd, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
18. Rosa I, Fidalgo P, Soares J, et al. Adenoma incidence decreases under the effect of polypectomy. *World J Gastroenterol.* 2012;21;18(11):1243-8.
19. Silva TD, Felipe AV, Pimenta CA, et al. *CYP2E1* RsaI and 96-bp insertion genetic polymorphisms associated with risk for colorectal cancer. *Genet Mol Res.* 2012;3;11(3):3138-45.
20. Gertig DM, Hunter DJ. Genes and environment in the etiology of colorectal cancer. *Cancer biology.* 1998;8:285-298.
21. Everatt R, Tamosiunas A, Virviciute D, et al. Consumption of alcohol and risk of cancer among men: a 30 year cohort study in Lithuania. *Eur J Epidemiol.* 2013;28(5):383-92.
22. Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy–Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet.* 2005;76:967–986.
23. Liu F, Yuan D, Wei Y, et al. Systematic review and meta-analysis of the relationship between EPHX1 polymorphisms and colorectal cancer risk. *PLoS One.* 2012;7(8):e43821.
24. Cortessis V, Siegmund K, Chen Q, et al. A case-control study of microsomal epoxide hydrolase, smoking, meat consumption, glutathione S-transferase M3, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res.* 2001;15;61(6):2381-5.

25. Nisa H, Kono S, Yin G, et al. Cigarette smoking, genetic polymorphisms and colorectal cancer risk: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *BMC Cancer*. 2010;10:10:274.
26. Darazy M, Balbaa M, Mugharbil A, et al. *CYP1A1*, *CYP2E1*, and *GSTM1* gene polymorphisms and susceptibility to colorectal and gastric cancer among Lebanese. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011;15(6):423-9.
27. Zheng Y, Wang JJ, Sun L, et al. Association between *CYP1A1* polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012;39(4):3533-40.
28. Yeh CC, Sung FC, Tang R, et al. Association between polymorphisms of biotransformation and DNA-repair genes and risk of colorectal cancer in Taiwan. *J Biomed Sci*. 2007;14(2):183-93.
29. van der Logt EM, Bergevoet SM, Roelofs HM, et al. Role of epoxide hydrolase, nad(p)h: Quinone oxidoreductase, cytochrome p450 2e1 or alcohol dehydrogenase genotypes in susceptibility to colorectal cancer. *Mutat Res*. 2006;593:39-49.
30. Morita M, Le Marchand L, Kono S, et al. Genetic polymorphisms of *CYP2E1* and risk of colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(1):235-41.
31. Jiang O, Zhou R, Wu D, et al. *CYP2E1* polymorphisms and colorectal cancer risk: a HuGE systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol*. 2013;34(2):1215-24.
32. Qian J, Song Z, LV Y, Huang X. *CYP2E1* T7632A and 9-bp insertion polymorphisms and colorectal cancer risk: a meta-analysis based on 4,592 cases and 5,918 controls. *Tumour Biol*. 2013;34(4):2225-31.
33. Hamachi T, Tajima O, Uezono K, et al. *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *NQO1* polymorphisms and colorectal adenomas in Japanese men. *World J Gastroenterol*. 2013;7;19(25):4023-30.
34. Nisa H, Budhathoki S, Morita M, et al. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms, cigarette smoking, and risk of colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Mol Carcinog*. 2013 Aug;52(8):619-26.
35. Wilkes G, Hartshorn K. Clinical update: colon, rectal, and anal cancers. *Semin Oncol Nurs*. 2012;28(4):e1-22.

36. Tan C, Xu HY, Zhang CY, et al. Effect of *CYP1A1* MSPI polymorphism on the relationship between TP53 mutation and CDKN2A hypermethylation in non-small cell lung cancer. *Arch Med Res.* 2011;42(8):669-76.

## TABELAS

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

<b>Variáveis</b>	<b>Caso (n=241)</b> n (%)	<b>Controle (n=401)</b> n (%)	<b>O.R.<sup>+</sup></b>	<b>IC 95%</b>	<b>p-valor</b>
<b>Gênero</b>					
Feminino	112 (46)	125 (31)	1,00		
Masculino	129 (54)	275 (69)	<b>0,50</b>	<b>0,32-0,879</b>	<b>&lt;0,01<sup>++</sup></b>
<b>Idade (Mediana)</b>					
<50	118 (48)	317 (79)	1,00		
≥50	123 (52)	83 (21)	<b>8,21</b>	<b>5,49-12,28</b>	<b>&lt;0,01<sup>++</sup></b>
<b>Hábito Tabagista</b>					
Não	131 (58)	243 (61)	1,00		
Sim	96 (42)	157 (39)	0,90	0,58-1,40	0,64
<b>Hábito Etilista</b>					
Não	134 (57)	218 (55)	1,00		
Sim	103 (43)	182 (45)	1,31	1,34-0,85	0,20

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

<sup>++</sup>valores de p significantes para p<0,05

**Tabela 2:** Associação dos polimorfismos *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2C*, *CYP2E1\*5B*, *CYP2E1\*6*, *EPHX1* Tyr113His e *EPHX1* His139Arg com o câncer colorretal, ajustado para gênero, idade, tabagismo e etilismo.

Modelo	Genótipo	Controle n(%)	Caso n(%)	OR <sup>+</sup> (95% CI)	Valor de p	Genótipo	Controle n(%)	Caso n(%)	OR <sup>+</sup> (95% CI)	Valor de p	
<b><i>CYP1A1*2A</i></b>						<b><i>CYP1A1*2C</i></b>					
Codominante	T/T	246 (61,5)	165 (72,7)	1,00	0,27	A/A	312 (78)	193 (85)	1,00	0,13	
	T/C	125 (31,2)	53 (23,4)	0,76 (0,49-1,18)		A/G	75 (18,8)	30 (13,2)	0,70 (0,41-1,20)		
	C/C	29 (7,2)	09 (4)	0,59 (0,25-1,39)		G/G	13 (3,2)	04 (1,8)	0,36 (0,10-1,31)		
Dominante	T/T	246 (61,5)	165 (72,7)	1,00	0,13	A/A	312 (78)	193 (85)	1,00	0,07	
	T/C-C/C	154 (38,5)	62 (27,3)	0,73 (0,49-1,10)		A/G-G/G	88 (22)	34 (15)	0,64 (0,38-1,06)		
Recessivo	T/T-T/C	371 (92,8)	218 (96)	1,00	0,29	A/A-T/G	387 (96,8)	223 (98,2)	1,00	0,12	
	C/C	29 (7,2)	9 (4%)	0,64 (0,27-1,50)		G/G	13 (3,2)	04 (1,8)	0,38 (0,10-1,38)		
Overdominante	T/T-C/C	275 (68,8)	174 (76,7)	1,00	0,30	A/A-G/G	325 (81,2)	197 (86,8)	1,00	0,23	
	T/C	125 (31,2)	53 (23,4)	0,80 (0,52-1,23)		A/G	75 (18,8)	30 (13,2)	0,72 (0,42-1,24)		
Aditivo	---	---	---	0,77 (0,55-1,06)	0,11	---	---	---	0,66 (0,43-1,00)	0,04	
<b><i>CYP2E1*5B</i></b>						<b><i>CYP1A1*6</i></b>					
Codominante	G/G	351 (87,8)	157 (69,2)	1,00	<0,01 <sup>++</sup>	T/T	314 (78,5)	126 (55,5)	1,00	<0,01 <sup>++</sup>	
	G/C	49 (12,2)	67 (29,5)	<b>2,66 (1,64-4,32)</b>		T/A	82 (20,5)	93 (41)	<b>2,81 (1,84-4,28)</b>		
	C/C	0	03 (1,3)	NA (0,00-NA)		A/A	04 (1)	08 (3,5)	<b>7,32 (1,85-28,96)</b>		
Dominante	G/G	351 (87,8)	157 (69,2)	1,00	<0,01 <sup>++</sup>	T/T	314 (78,5)	126 (55,5)	1,00	<0,01 <sup>++</sup>	
	G/C-C/C	49 (12,2)	70 (30,8)	<b>2,82 (1,74-4,55)</b>		T/A-A/A	86 (21,5)	101 (44,5)	<b>2,97 (1,97-4,50)</b>		
Recessivo	G/G-G/C	400 (100)	224 (98,7)	1,00	0,017	T/T-T/A	396 (99)	219 (96,5)	1,00	<b>0,016<sup>++</sup></b>	
	C/C	0	03 (1,3)	NA (0,00-NA)		A/A	04 (1)	08 (3,5)	<b>5,26 (1,35-20,50)</b>		
Overdominante	G/G-C/C	351 (87,8)	160 (70,5)	1,00	<0,01 <sup>++</sup>	T/T-A/A	318 (79,5)	134 (59)	1,00	<0,01 <sup>++</sup>	
	G/C	49 (12,2)	67 (29,5)	<b>2,58 (1,59-4,19)</b>		T/A	82 (20,5)	93 (41)	<b>2,64 (1,74-4,01)</b>		
Aditivo	---	---	---	<b>2,84 (1,78-4,52)</b>	<0,01 <sup>++</sup>	---	---	---	<b>2,78 (1,91-4,06)</b>	<0,01 <sup>++</sup>	

Continuação da Tabela 2

Modelo	Genótipo	Controle n(%)	Caso n(%)	OR <sup>+</sup> (95% CI)	Valor de p	Genótipo	Controle n(%)	Caso n(%)	OR <sup>+</sup> (95% CI)	Valor de p
<i>EPHX1-113</i>						<i>EPHX1-139</i>				
Codominante	T/T	214 (53,5)	126 (55,5)	1,00		A/A	235 (58,8)	153 (67,4)	1,00	
	T/C	158 (39,5)	88 (38,8)	0,95 (0,63-1,41)	0,84	A/G	145 (36,2)	67 (29,5)	0,79 (0,52-1,20)	0,18
	C/C	28 (7)	13 (5,7)	0,80 (0,36-1,76)		G/G	20 (5)	07 (3,1)	0,42 (0,14-1,26)	
Dominante	T/T	214 (53,5)	126 (55,5)	1,00		A/A	235 (58,8)	153 (67,4)	1,00	
	T/C-C/C	186 (46,5)	101 (44,5)	0,92 (0,63-1,36)	0,68	A/G-G/G	165 (41,2)	74 (32,6)	0,74 (0,50-1,11)	0,15
Recessivo	T/T-T/C	372 (93)	214 (94,3)	1,00		A/A-A/G	380 (95)	220 (96,9)	1,00	
	C/C	28 (7)	13 (5,7)	0,81 (0,37-1,77)	0,60	G/G	20 (5)	07 (3,1)	0,45 (0,15-1,35)	0,14
<i>Overdominante</i>	T/T-C/C	242 (60,5)	139 (61,2)	1,00		A/A-G/G	255 (63,8)	160 (70,5)	1,00	
	T/C	158 (39,5)	88 (38,8)	0,97 (0,65-1,44)	0,88	A/G	145 (36,2)	67 (29,5)	0,83 (0,55-1,25)	0,37
Aditivo	---	---	---	0,92 (0,67-1,25)	0,59	---	---	---	0,74 (0,52-1,04)	0,08

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

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



**Tabela 3:** Interação entre os polimorfismos *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2C*, *CYP2E1\*5B*, *CYP2E1\*6*, *EPHX1-113* e *EPHX1-139* e hábito tabagista ou etilista no risco do CCRE.

	Hábito Tabagista							Hábito Etilista								
	Não Fumante			Fumante				p de interação	Não Etilista			Etilista				p de interação
	Caso	Controle	OR <sup>†</sup> (95% CI)	Caso	Controle	OR <sup>†</sup> (95% CI)	Caso		Controle	OR <sup>†</sup> (95% CI)	Caso	Controle	OR <sup>†</sup> (95% CI)			
<i>CYP1A1*2A</i>																
<b>T/T</b>	156	96	1,00	90	69	1,12 (0,69-1,83)	0,33	137	92	1,00	109	73	1,62 (0,97-2,70)	0,35		
<b>T/C-C/C</b>	87	35	0,87 (0,51-1,49)	67	27	0,65 (0,35-1,21)		81	35	0,88 (0,50-1,52)	73	27	0,95 (0,50-1,81)			
<i>CYP1A1*2C</i>																
<b>A/A</b>	190	107	1,00	122	86	1,08 (0,68-1,69)	0,21	165	105	1,00	147	88	1,42 (0,89-2,29)	0,91		
<b>A/G-G/G</b>	53	24	0,81 (0,43-1,52)	35	10	0,44 (0,18-1,06)		53	22	0,65 (0,34-1,25)	35	12	0,87 (0,38-2,00)			
<i>CYP2E1*5B</i>																
<b>G/G</b>	215	94	1,00	136	63	0,90 (0,56-1,44)	0,83	190	85	1,00	161	72	1,56 (0,96-2,53)	0,68		
<b>G/C-C/C</b>	28	37	<b>2,69 (1,41-5,10)</b>	21	33	<b>2,68 (1,33-5,41)</b>		28	42	<b>3,07 (1,63-5,80)</b>	21	28	<b>3,90 (1,82-8,38)</b>			
<i>CYP2E1*6</i>																
<b>T/T</b>	189	72	1,00	125	54	0,96 (0,57-1,63)	0,87	171	70	1,00	143	56	1,47 (0,85-2,55)	0,78		
<b>T/A-A/C</b>	54	59	<b>2,89 (1,70-4,93)</b>	32	42	<b>2,99 (1,58-5,64)</b>		47	57	<b>3,14 (1,80-5,48)</b>	39	44	<b>4,10 (2,18-7,72)</b>			
<i>EPHX1-113</i>																
<b>T/T</b>	129	75	1,00	85	51	0,89 (0,51-1,54)	0,6	122	75	1,00	92	51	1,30 (0,74-2,31)	0,57		
<b>T/C-C/C</b>	114	56	0,84 (0,51-1,40)	72	45	0,92 (0,52-1,62)		96	52	0,83 (0,49-1,41)	90	49	1,36 (0,78-2,37)			
<i>EPHX1-139</i>																
<b>A/A</b>	141	89	1,00	94	64	0,87 (0,52-1,44)	0,38	132	83	1,00	103	70	1,66 (0,98-2,80)	0,34		
<b>A/G-G/G</b>	102	42	0,64 (0,38-1,09)	63	32	0,79 (0,44-1,44)		86	44	0,89 (0,52-1,53)	79	30	1,00 (0,54-1,85)			

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

**Tabela 4:** Distribuição dos parâmetros clínico-histohistopatológicos em relação aos polimorfismos *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2C*, *CYP2E1\*5B*, *CYP2E1\*6*, *EPHX1-113* e *EPHX1-139* em pacientes com câncer colorretal.

	Extensão Tumoral (n=200)				Acometimento de linfonodos regionais (n=198)				Agressividade (TNM) (n=114)			
	T1/T2	T3/T4	O.R. + (I.C.95%)	Valor de p	N=0	N≥1	O.R. + (I.C.95%)	Valor de p	Não-Agressivo	Agressivo	O.R. + (I.C.95%)	Valor de p
	n(%)	n(%)			n(%)	n(%)			n(%)	n(%)		
	52 (21,67)	148 (61,63)			127 (52,91)	71 (47,09)			29 (25,43)	85 (74,57)		
<b><i>CYP1A1*2A</i></b>												
T/T	38(73,08)	108(72,97)	1,00		96 (75,59)	49 (69,01)	1,00		19 (65,51)	51 (60)	1,00	
T/C e C/C	14(26,92)	40(27,03)	0,94 (0,44-2,03)	0,87	31 (24,41)	22 (30,99)	1,22 (0,60-2,48)	0,58	10 (34,49)	34 (40)	2,18 (0,60-7,97)	0,23
<b><i>CYP1A1*2C</i></b>												
A/A	44(84,62)	123(83,11)	1,00		110 (86,61)	55 (77,46)	1,00		21 (72,41)	66 (74,64)	1,00	
A/G e G/G	8(15,38)	25(16,89)	1,17 (0,47-2,93)	0,73	17 (13,39)	16 (22,54)	2,01 (0,90-4,57)	0,09	8 (27,59)	19 (22,36)	0,44 (0,11-1,76)	0,24
<b><i>CYP2E1*5B</i></b>												
G/G	38(73,08)	100(67,57)	1,00		86 (67,72)	52 (73,24)	1,00		24 (82,75)	76 (89,41)	1,00	
G/C e C/C	14(26,92)	48(32,43)	1,24 (0,61-2,52)	0,55	41 (32,28)	19 (26,76)	0,63 (0,32-1,23)	0,17	5 (17,25)	9 (10,59)	0,51 (0,11-2,29)	0,37
<b><i>CYP2E1*6</i></b>												
T/T	30(57,69)	86(58,11)	1,00		75 (59,06)	40 (56,34)	1,00		24 (82,75)	74 (88,23)	1,00	
T/A e A/A	22(42,31)	62(41,89)	0,92 (0,48-1,76)	0,80	52 (40,94)	31 (43,66)	1,20 (0,65-2,21)	0,56	5 (17,25)	11 (11,77)	0,91 (0,21-3,87)	0,89
<b><i>EPHX1 113</i></b>												
T/T	33(63,46)	78(52,70)	1,00		69 (54,33)	40 (56,34)	1,00		14 (48,27)	45 (52,94)	1,00	
T/C e C/C	19(36,54)	70(47,30)	1,44 (0,75-2,78)	0,27	58 (45,67)	31 (43,66)	0,85 (0,46-1,57)	0,59	15 (51,73)	40 (47,06)	0,93 (0,36-2,37)	0,87
<b><i>EPHX1 139</i></b>												
A/A	35(67,31)	100(67,57)	1,00		90 (70,87)	44 (61,97)	1,00		21 (72,41)	50 (58,82)	1,00	
A/G e G/G	17(32,69)	48(32,43)	1,02 (0,52-2,01)	0,96	37 (29,13)	27 (38,03)	1,67 (0,89-3,13)	0,11	8 (27,59)	35 (41,18)	1,94 (0,74-5,12)	0,18

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

**Tabela 5:** Distribuição dos parâmetros clínicos em pacientes com câncer colorretal em relação aos polimorfismos estudados.

	<b>Cólon</b>		<b>Reto</b>	
	n = 114 (47,91%)		n = 125 (52,09%)	
	n(%)	Valor de p	n(%)	Valor de p
<b>CYP1A1*2A</b>				
T/T	80 (64)		96 (83)	
T/C e C/C	34 (26)	0,96	29 (27)	0,98
<b>CYP1A1*2C</b>				
A/A	95 (76)		107 (93)	
A/G e G/G	19 (14)	0,86	18 (17)	0,87
<b>CYP2E1*5B</b>				
G/G	83 (66)		85 (73)	
G/C e C/C	31 (24)	0,99	40 (37)	0,97
<b>CYP2E1*6</b>				
T/T	68 (54)		69 (60)	
T/A e A/A	46 (36)	1,00	56 (40)	0,99
<b>EPHX1 113</b>				
T/T	64 (51)		69 (60)	
T/C e C/C	50 (40)	1,00	56 (40)	1,00
<b>EPHX1 139</b>				
A/A	75 (60)		88 (76)	
A/G e G/G	39 (31)	0,99	37 (34)	0,99

Teste Qui-Quadrado

## 4. CONCLUSÕES

#### 4. CONCLUSÕES

1. Os tumores colorretal esporádicos (CCRE), tratados no Departamento de Cirurgia em um hospital universitário, no noroeste de São Paulo ocorrem com maior frequência em homens com idade mais avançada, de pele branca, com atividades profissionais de agricultura, comercial e doméstica. As comorbidades mais frequentes são hipertensão e colelitíase. As regiões do cólon distal e reto são as mais afetadas, nos estágios III e IV.
2. Indivíduos com idade superior ou igual a 50 anos são mais suscetíveis ao CCRE, enquanto aqueles do gênero masculino são menos suscetíveis.
3. Os polimorfismos *CYP2E1*\*5B e *CYP2E1*\*6 estão associados com o risco do CCRE, enquanto os polimorfismos *CYP1A1*\*2A, *CYP1A1*\*2C, *EPHX1* Tyr113His e *EPHX1* His139Arg não mostram associação com este tipo tumoral.
4. Não há um potencial de interação para a presença dos polimorfismos e hábitos tabagista ou etilista no risco para CCRE na população avaliada, sugerindo um papel significativo para os polimorfismos *CYP2E1*\*5B e *CYP2E1*\*6 no risco para o CCRE, independente desses hábitos.
5. Os parâmetros clínico-histopatológicos do CCRE não estão associados com os polimorfismos avaliados; a extensão tumoral T3 e T4, ausência de comprometimento do linfonodo e reto como sítio primário são as variáveis clínicas mais frequentes na presente casuística.

## 5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA) - Disponível em:  
<<http://www.inca.gov.br>> Acessado em: 10 de junho de 2013.
2. Pinho M, Rossi BM. Conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal. *Rev bras Coloproct*, 1999; 19(1): 57-60
3. Zampino MG, Labianca R, Beretta GD, Magni E, Gatta G, Leonardi MC, et al. Rectal Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2009; 70:160-182.
4. Cruz GMG, Ferreira RMRS, Neves PM. Estudo Retrospectivo de 47 Complicações em 380 Pacientes Operados de Câncer Retal. *Rev bras Coloproct*, 2006;26(2):138-155.
5. Santos JR, JCM. Câncer Ano-Reto-Cólico: Aspectos Atuais II - Câncer Colorretal - Fatores de Riscos e Prevenção. *Rev Bras Coloproct*, v. 27, n.4, p. 459-473, 2007.
6. Coura Rdos S, Ashton-Prolla P, Prolla JC. Hereditary non-polipomatous colorectal cancer: hereditary predisposition, diagnosis and prevention. *Arq Gastroenterol*. 2005 Apr-Jun;42(2):99-106.
7. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Jen J, et al. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 60, 3155-9, 2000.
8. Bartsch H. DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. *Mutat Res*. 1996 Jun;340(2-3):67-79.
9. Joshi AD, Corral R, Siegmund KD, Haile RW, Le Marchand L, Martínez ME, et al. Red meat and poultry intake, polymorphisms in the nucleotide excision

- repair and mismatch repair pathways and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009;30:472-479.
10. Agudo A, Peluso M, Munnia A, Luján-Barroso L, Sánchez Mj, Molina-Montes E, et al. Aromatic DNA adducts and risk of gastrointestinal cancers: a case-cohort study within the EPIC-Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Apr;21(4):685-92. [Epub 2012 Feb 7].
  11. Pande M, Amos CI, Eng C, Frazier ML. Interactions between cigarette smoking and selected polymorphisms in xenobiotic metabolizing enzymes in risk for colorectal cancer: A case-only analysis. *Mol Carcinog*. 2010 Nov;49(11):974-80.
  12. Wang J, Joshi AD, Corral R, Siegmund KD, Marchand LL, Martinez ME, et al. Carcinogen metabolism genes, red meat and poultry intake, and colorectal cancer risk. *Int J Cancer*. 2012 Apr 15;130(8):1898-907.
  13. Turnpenny, P & Ellard, S (2009) *Emery - Genética Médica*. 13a Edição. Elsevier Editora Ltda, Rio de Janeiro, RJ, 426 pp.
  14. Yeh CC, Sung FC, Tang R, Chang-Chieh CR, Hsieh LL. Polymorphisms of cytochrome P450 1A2 and N-acetyltransferase genes, meat consumption, and risk of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2009;52:104-111.
  15. Koutros S, Berndt SI, Sinha R, Ma X, Chatterjee N, Alavanja MC, et al. Xenobiotic metabolizing gene variants, dietary heterocyclic amine intake, and risk of prostate cancer. *Cancer Res*. 2009 Mar 1;69(5):1877-84.
  16. Cury NM, Russo A, Galbiatti AL, Ruiz MT, Raposo LS, Maniglia JV, et al. Polymorphisms of the CYP1A1 and CYP2E1 genes in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep*. 2012 Feb;39(2):1055-63.



17. Geisler SA, Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2001 Jul. 15;154(2):95-105. Review.
18. Kajizono M, Saito M, Maeda M, Yamaji K, Fujiwara S, Kawasaki Y, et al. Cetuximab-induced skin reactions are suppressed by cigarette smoking in patients with advanced colorectal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2012 Jun 8.
19. Shin A, Hong CW, Sohn DK, Chang KB, Han KS, Chang HJ, et al. Associations of cigarette smoking and alcohol consumption with advanced or multiple colorectal adenoma risks: a colonoscopy-based case-control study in Korea. *Am J Epidemiol.* 2011 Sep 1;174(5):552-62.
20. Hassett, C., Aicher, L., Sidhu, J. S., Omiecinski, C. J. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum. Molec. Genet.* 3: 421-428, 1994.
21. Fang X, Kaduce TL, Weintraub NL, Harmon S, Teesch LM, Morisseau C, et al. Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *J Biol Chem.* 2001 May 4;276(18):14867-74.
22. Pereira SPV, Cotrim GSID, Manoukias FN. Relationship between genetic polymorphism of CYP1A1 at codon 462 (Ile462Val) in colorectal cancer. *Int J Biol Markers.* 2008, 23(1):18-23.
23. Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Mandelson MT, Adams SV, Wernli KJ, Shadman M, et al. Colorectal polyp type and the association with charre meat consumption, smoking, and microsomal epoxide hydrolase polymorphisms. *Nutr Cancer.* 2011;63(4):583-92.

24. Boffetta P, Hashibe M, LA Vecchia C, Zatonski W, Rehm J. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. *Int J Cancer*. 2006 Aug 15;119(4):884-7.
25. Hashibe M, Boffetta P, Janout V, Zaridze D, Shangina O, Mates D, et al. Esophageal cancer in Central and Eastern Europe: tobacco and alcohol. *Int J Cancer*. 2007 Apr 1;120(7):1518-22.
26. Warnakulasuriya S, Parkkila S, Nagao T, Preedy VR, Pasanen M, Koivisto H, et al. Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia(pre-cancer) and cancer. *J Oral Pathol Med*. 2008 Mar;37(3):157-65.
27. Pelucchi C, Tramacere I, Boffetta P, Negri E, LA Vecchia C. Alcohol consumption and cancer risk. *Nutr Cancer*. 2011;63(7):983-90. [Epub 2011 Aug 24. Review].
28. Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician*, v.76, n. 3, p. 391-396, 2007.
29. Liu CJ, Chang CS, Lui MT, Dang CW, Shih YH, Chang KW. Association of GST genotypes with age of onset and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34(8): 473-7.
30. Kristiansen W, Haugen TB, Witczak O, et al. CYP1A1, CYP3A5 and CYP3A7 polymorphisms and testicular cancer susceptibility. *Int J Androl*. 2011;34(1):77-83.
31. Sameer AS, Nissar S, Qadri Q, Alam S, Baba SM, Siddiqi MA. Role of CYP2E1 genotypes in susceptibility to colorectal cancer in the Kashmiri population. *Hum Genomics*. 2011 Oct;5(6):530-7.

32. Ulusoy G, Arinç E, Adali O. Genotype and allele frequencies of polymorphic CYP2E1 in the Turkish population. *Arch Toxicol.* 2007;81(10):711-8.
33. Huang WY, Chatterjee N, Chanock S, Dean M, Yeager M, Schoen RE, et al. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and risk for advanced colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(1):152-7.
34. Yoshida K, Osawa K, Kasahara M, Miyaishi A, Nakanishi K, Hayamizu S, et al. Association of CYP1A1, CYP1A2, GSTM1 and NAT2 gene polymorphisms with colorectal cancer and smoking. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2007;8(3):438-444.
35. Peng H, Xie SK, Huang MJ, Ren DL. Associations of CYP2E1 rs2031920 and rs3813867 polymorphisms with colorectal cancer risk: a systemic review and meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013 Aug;34(4):2389-95.

## 6. ANEXOS



# FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

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

Parecer n.º 012/2012

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nome do(a) **participante**:

Representante legal:

RG do prontuário médico:

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

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

Nome do(a) **pesquisador**:

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

Inscrição no Conselho Regional: .....

João Gomes Netinho - Departamento de Cirurgia

Gláucia Maria de Mendonça Fernandes

Av. Brigadeiro Faria Lima, no. 5416

FAMERP - Faculdade de Medicina de S.J. Rio Preto

São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000

Fone: (17) 3201-5726 ou ramal: 5720

**e-mails: [fernandes\\_glauca@hotmail.com](mailto:fernandes_glauca@hotmail.com); [jgnetinho@riopreto.com.br](mailto:jgnetinho@riopreto.com.br)**

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

## Questionário do Projeto

### I. IDENTIFICAÇÃO

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

### II. DADOS DO TUMOR

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

### III. FATORES DE RISCO AMBIENTAL

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

### IV. HISTÓRICO MÉDICO PESSOAL E FAMILIAL

Antecedentes pessoais:	Antecedentes familiares:	Grau de Parentesco
( ) Diabetes mellitus há ____ anos	( ) Diabetes mellitus há ____ anos	_____
( ) Doença de Crohn há ____ anos	( ) Doença de Crohn há ____ anos	_____
( ) Retocolite Ulcerativa Crônica _ anos	( ) Retocolite Ulcerativa Crônica há ____ anos	_____
( ) Pólipo ( ) Adenoma ( ) Câncer	( ) Pólipo ( ) Adenoma ( ) Câncer	_____
Tipo: _____	Tipo: _____	_____
Outras: _____	Outras: _____	_____

Tratamentos anteriores: ( ) Sim ( ) Não Tipo: \_\_\_\_\_  
 Cirurgias anteriores: ( ) Sim ( ) Não Tipo: \_\_\_\_\_  
 Uso de medicamentos: ( ) Sim ( ) Não Tipo: \_\_\_\_\_

### V. INFORMAÇÕES SOBRE ALIMENTAÇÃO

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

### DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Responsável pelo procedimento: \_\_\_\_\_