

**ASSOCIAÇÃO DO FOLATO E VITAMINAS ENVOLVIDAS
NO CICLO DO CARBONO-1 COM POLIMORFISMOS NO
GENE METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE
(*MTHFR*) E METILAÇÃO GLOBAL DO DNA EM
PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL**

ARIANA FERRARI

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Samuel Aguiar Junior

Co-Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Ferrari, Ariana

Associação do folato e vitaminas envolvidas no ciclo do carbono-1 com polimorfismos no gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) e metilação global do DNA em pacientes com câncer colorretal / Ariana Ferrari - São Paulo; 2015.

109p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientador: Samuel Aguiar Junior

Descritores: 1. ÁCIDOS PTEROILPOLIGLUTÂMICOS.
2. NEOPLASIAS COLORRETAIS. 3. ACIDO FOLICO. 4. VITAMINA B2.
5. VITAMINA B6. 6. VITAMINA B12. 7. BETANIA. 8. METIONINA
9. QUESTIONARIOS. 10. INGESTAO RECOMENDADA DE
NUTRIENTES. 11. INGESTAO ALIMENTAR.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais, Roseli e Alberto.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana.” Carl G. Jung

“Se há pessoas que não estudam ou que, se estudam, não aproveitam, elas que não se desencorajem e não desistam; se há pessoas que não interrogam os homens instruídos para esclarecer as suas dúvidas ou o que ignoram, ou que, mesmo interrogando-os, não conseguem ficar mais instruídas, elas que não se desencorajem e não desistam; se há pessoas que não meditam ou que, mesmo que meditem, não conseguem adquirir um conhecimento claro do princípio do bem, elas que não se desencorajem e não desistam; se há pessoas que não distinguem o bem do mal ou que, mesmo que distingam, não têm uma percepção clara e nítida, elas que não se desencorajem e não desistam; se há pessoas que não praticam o bem ou que, mesmo que o pratiquem, não podem aplicar nisso todas as suas forças, elas que não se desencorajem e não desistam; o que outros fariam numa só vez, elas o farão em dez, o que outros fariam em cem vezes, elas o farão em mil, porque aquele que seguir verdadeiramente esta regra da perseverança, por mais ignorante que seja, tornar-se-á uma pessoa esclarecida, por mais fraco que seja, tornar-se-á necessariamente forte.” Confúcio, in 'A Sabedoria de Confúcio'

AGRADECIMENTOS

À Deus, que por sua presença, luz e força me iluminou e guiou durante todo esse tempo. Por me capacitar e abrir minha mente, sempre me encorajando e me dando força pra sempre seguir em frente apesar de todos os obstáculos.

Aos meus pais Roseli e Alberto, principais responsáveis pela formação do meu caráter, disciplina ao trabalho e pela sabedoria em me educar. Obrigada pelo apoio e por me ensinarem os verdadeiros valores da vida. Os mais belos exemplos de amor incondicional, força, dedicação e determinação. Por terem feito o possível e o impossível para eu continuar estudando, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando que as dificuldades anulassem meus sonhos. Serei eternamente grata!

Ao meu irmão Tiago (Tizinho”, “Tika”), por expressar tão perfeitamente o verdadeiro significado de “irmão”. Obrigada pelo amor, risadas, incentivo e por sempre me fazer acreditar que sou capaz! A minha cunhada Laís, por ter entrado em nossa família de uma maneira tão especial e por sempre me incentivar.

A minha avó Dolores (*in memoriam*), pelo amor e por todos os “mimos”. Apesar de há três anos ter nos deixado, está sempre presente em meus pensamentos e no meu coração. Tenho certeza que se estivesse presente neste momento estaria muito orgulhosa de mim! A saudade é imensa...

A todos os pacientes com câncer que convivi nesses últimos anos, desde as crianças até os “vozinhos”, que mesmo passando por um momento tão difícil da vida, me encheram de sorrisos, abraços, beijos, carinhos e confidências. Vocês são os responsáveis por eu ter me tornado uma pessoa apaixonada pela oncologia! Sem vocês esta pesquisa não seria possível...

Ao meu orientador, professor e amigo Dr. Samuel Aguiar Jr., que mesmo não me conhecendo anteriormente, confiou e acreditou em mim. Agradeço a paciência e tranquilidade que teve comigo para me transmitir os ensinamentos do câncer colorretal, durante todo o mestrado e, agora, o doutorado. Por me conduzir no caminho da pesquisa científica de maneira ética e pelo exemplo de amor à ciência.

À Dra. Dirce Maria Carraro por ter confiado em mim e por todos os aprendizados valiosos. Exemplo de dedicação, competência e simplicidade.

À professora de estatística Rosângela Getirana Santana (UEM) por todos os ensinamentos valiosos e por me conduzir de maneira tranquila durante toda a análise estatística do trabalho.

À minha amiga Giovana Tardin Torrezan que me ensinou desde como “pipetar uma amostra” até como avaliar polimorfismos e metilações. Foi muita paciência para me passar os conhecimentos necessários para eu fazer as análises já que eu nunca tinha sequer sentado em uma bancada. Foi maravilhoso aprender tudo o que você me passou! Serei eternamente grata!

À equipe médica do Núcleo de Tumores Colorretais do AC Camargo Cancer Center, Dr. Ademar Lopes, Dr. Celso Milani, Dr. Fábio de Oliveira Ferreira, Dr. Ranyell Spencer e Dr. Wilson Nakagawa. Agradeço pela ajuda incansável durante todo o decorrer do trabalho, pelo apoio e paciência.

Aos meus amigos pelo carinho, amor, conversas, distrações, risadas, pelo ombro amigo nos momentos difíceis e por entenderem minha ausência em vários momentos esse ano.

À toda minha família, em especial as minhas “primas-irmãs”, por fazerem parte, sem dúvida, dos melhores momentos de alegrias e risadas durante essa jornada.

À Pós-graduação pela oportunidade do mestrado e por me ajudar em tudo que precisei durante esses anos. Agradeço em especial a Vanusa, Reinaldo, Luciana e Ana.

À Biblioteca, em especial à Suely, que no decorrer da realização deste trabalho me ajudaram de maneira especial, mesmo a distância, sempre dispostos e com um sorriso carinhos.

À FAPESP pela oportunidade com a bolsa concedida para a realização dessa tese.

RESUMO

Ferrari A. **Associação do folato e vitaminas envolvidas no ciclo do carbono-1 com polimorfismos no gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) e metilação global do DNA em pacientes com câncer colorretal.** São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Folato, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, colina e betaína são nutrientes envolvidos no ciclo do carbono-1 que podem alterar os níveis de metilação do DNA e influenciar na gênese e/ou progressão tumoral. **Objetivo:** Avaliar a associação de folato e vitaminas envolvidas no ciclo do carbono-1 com polimorfismos no gene *MTHFR* e metilação global do DNA em pacientes com câncer colorretal. **Material e Métodos:** 189 pacientes casos novos com adenocarcinoma colorretal responderem a um questionário de avaliação clínica e um Questionário de Frequência Alimentar (QFA) validado para pacientes com câncer de cólon e reto. Foram coletadas amostras de sangue para a avaliação dos polimorfismos no gene *MTHFR* da metilação global do DNA no sangue e no tumor. **Resultados:** Os valores de folato sérico foram correlacionados positivamente com o equivalente dietético de folato total (DFE total) ($\rho= 0,51$ e $p= 0.03$) e com a metilação global do DNA ($\rho= 0,20$ e $p= 0.03$). Indivíduos com idade igual ou superior a 61 anos ($p= 0.01$), em estadiamento clínico-patológico III e IV ($p= 0.01$) e com genótipos homozigotos mutados + heterozigotos para o gene *MTHFR* A1298C apresentaram maiores níveis de metilação global do DNA ($p= 0.04$). A associação entre a ingestão dietética de folato, folato sérico e estadiamento do tumor foram preditoras da metilação global do DNA no sangue dos pacientes. **Conclusão:** Os níveis de folato sérico e dietético, além do estadiamento clínico-patológico podem influenciar no status de metilação do DNA.

SUMMARY

Ferrari A. [**Association of folate and vitamins involved in the one-carbon cycle with polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene and global DNA methylation in patients with colorectal cancer**]. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Folate, vitamin B2, vitamin B6, vitamin B12, choline and betaine are nutrients involved in the one-carbon cycle that can alter the levels of DNA methylation and influence the genesis and/or tumor progression.

Objective: Evaluate the association of folate and vitamins involved in the one-carbon cycle and *MTHFR* polymorphisms in global DNA methylation in patients with colorectal cancer gene.

Material and Methods: 189 new cases with colorectal adenocarcinoma answering a clinical evaluation questionnaire and the Food Frequency Questionnaire (FFQ) validated for patients with colon and rectal cancer. Blood samples were collected for evaluation of *MTHFR* gene polymorphisms in the global DNA methylation in blood and in tumor. **Results:** The values for serum folate were positively correlated with the equivalent total dietary folate (total DFE) ($\rho = 0.51$, $p = 0.03$) and the global DNA methylation ($\rho = 0.20$, $p = 0.03$). Individuals aged over 61 years ($p = 0.01$) in staging clinicopathological III and IV ($P = 0.01$) and with + heterozygous mutated homozygous genotypes for the *MTHFR* A1298C gene had higher levels of global DNA methylation ($p = 0.04$). The association between dietary intake of folate, serum folate, and tumor stage were predictive of global DNA methylation in patients' blood. **Conclusion:** The levels of serum and dietary folate, the clinical-pathological staging can influence the status of DNA methylation.

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

Figura 1	Fluxograma dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal incluídos no estudo.....	32
Figura 2	Cromatograma de um paciente heterozigoto para a mutação (CT), localizado no éxon 4, com alteração do aminoácido na posição 222 de alanina para valina (MTHFR p.A222V).....	46
Figura 3	Cromatograma de um paciente heterozigoto para a mutação (AC), localizado no éxon 7, com alteração do aminoácido na posição 429 de glutamato para alanina (MTHFR p.E429A).....	47
Quadro 1	Primers utilizados para avaliação dos polimorfismos C677T e A1298C.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição de pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo as características sociodemográficas e clínicas.....	43
Tabela 2	Média, DP, mínimo e máximo de nutrientes provenientes do QFA de pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.....	44
Tabela 3	Coefficiente de correlação de Spearman (ρ) do folato sérico com as variáveis dietéticas de pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.....	45
Tabela 4	Frequência genotípica e alélica dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo os polimorfismos no gene <i>MTHFR</i>	48
Tabela 5	Teste exato de Fisher para comparação entre a prevalência dos polimorfismos do gene <i>MTHFR</i> (C677T e A1298C) em pacientes pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo características sociodemográficas e clínicas.....	49
Tabela 6	Teste Qui-Quadrado para comparação entre a prevalência dos polimorfismos do gene <i>MTHFR</i> agrupados em genótipos homocigoto selvagem e homocigoto mutado+heterocigoto em pacientes pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo características sociodemográficas e clínicas.....	50

Tabela 7	Teste de Anova para comparação dos níveis séricos de folato de acordo com os polimorfismos do gene MTHFR (C677T e A1298C) em pacientes pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo características sociodemográficas e clínicas.....	51
Tabela 8	Teste T para comparação dos níveis séricos de folato de acordo com os polimorfismos do gene MTHFR (C677T e A1298C) agrupados em genótipos homozigoto selvagem e homozigoto mutado+heterozigoto em pacientes pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo características sociodemográficas e clínicas.....	51
Tabela 9	Média, DP, mínimo e máximo dos níveis de metilação global do DNA no tumor e sangue dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.....	52
Tabela 10	Associação entre os níveis de metilação global do DNA com as variáveis sociodemográficas dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.....	53
Tabela 11	Associação entre os níveis de metilação global do DNA com as variáveis clínicas dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.....	54
Tabela 12	Valores mínimos e máximos de ingestão dietética dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal que foram avaliados segundo a metilação global do DNA no tumor.....	55
Tabela 13	Valores mínimos e máximos de ingestão dietética dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal que foram avaliados segundo a metilação global do DNA no sangue.....	56

Tabela 14	Associação entre os níveis de metilação global do DNA com a ingestão dietética de folato, álcool e metionina dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.	56
Tabela 15	Associação entre os níveis de metilação global do DNA com a ingestão dietética de nutrientes envolvidos no ciclo do carbono-1 dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.....	57
Tabela 16	Correlação entre os níveis de metilação global do DNA com os valores plasmáticos de folato dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.....	58
Tabela 17	Modelo de covariância e significância das variáveis predictoras da metilação global do DNA dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

5-MTHF	N ⁵ -metil-tetraidrofolato
5,10-MTHF	N ^{5,10} -metileno-FH ₄
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALDH	Aldeído desidrogenase
ATP	Adenosina trifosfato
CCR	Câncer Colorretal
DFE	Equivalente dietético de folato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMTs	DNA metiltransferases
dTMP	Desoxitimidina
dUMP	Monofosfato de desoxiuridina
EUA	Estados Unidos da América
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FH₄	5, 6, 7, 8-Tetraidrofolato
FIGLU	N-formiminoglutamato
FMN	Flavina adenina mononucleotídeo
G	Gramas
IMC	Índice de Massa Corporal
<i>MTHFR</i>	5,10 metilenotetraidrofolato redutase
PCFT	Transportador de folato próton acoplado
PLP	Piridoxal 5-fosfato
PMP	Piridoxamina 5-fosfato
PNP	Piridoxina 5-fosfato
PTE	Ácido pteróico
QFA	Questionário de frequência alimentar
RNAs	Ácidos ribonucléicos
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer colorretal	1
1.2	Fatores Envolvidos na Carcinogênese Colorretal.....	3
1.3	Dieta e Câncer Colorretal	5
1.4	Folato e Nutrientes envolvidos no Ciclo do Carbono-1.....	10
1.5	Polimorfismos no Gene <i>MTHFR</i> e Metilação do DNA.....	23
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo Geral.....	28
2.2	Objetivos Específicos	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Desenho do Estudo	30
3.2	Casuística.....	30
3.2.1	Critérios de Inclusão.....	30
3.2.2	Critérios de Exclusão.....	31
3.2.3	Fluxo dos Pacientes	31
3.3	Aspectos Éticos	32
3.4	Avaliação Clínica	33
3.5	Avaliação Dietética	33
3.6	Determinação do Folato Sérico	36
3.7	Avaliação do Polimorfismo do Gene <i>MTHFR</i>	36
3.8	Avaliação da Metilação Global do DNA.....	38
3.9	Análise Estatística	39
4	RESULTADOS	42
5	DISCUSSÃO	60

6	CONCLUSÃO	76
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	78

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Anexo 3** Questionário de Avaliação Clínica
- Anexo 4** Questionário de Frequência Alimentar

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL

Nas últimas décadas, o Brasil, vem passando por processos de transição epidemiológica e demográfica, os quais são caracterizados por um aumento na expectativa de vida, redução da taxa de fecundidade, redução nos índices de mortalidade infantil e aumento na incidência de doenças crônicas não-transmissíveis, como doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* e câncer (MENDES et al. 2012).

O câncer é considerado uma das maiores causas de mortalidade em todo mundo e sua incidência vem aumentando principalmente nos países em desenvolvimento. Em 2030 estimam-se 27 milhões de casos novos de câncer e 13,1 milhões de mortes em todo mundo (World Health Organization-WHO 2014).

No Brasil, para 2014 e 2015, o número de casos de câncer estimado será de 576 mil casos novos, o que reflete em um aumento de 11% em relação à estimativa de 2012. Dentre os diversos tipos de câncer, o câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) é o mais incidente, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo uterino (15 mil). Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto,

estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo uterino, pulmão e glândula tireoide (Ministério da Saúde 2014).

Em relação ao câncer colorretal (CCR), estima-se para 2014, 32.600 casos novos, sendo 15.070 homens e 17.530 mulheres. Esses números refletem uma estimativa de 15,44 casos novos a cada 100 mil homens e 17,24 a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2014). Desconsiderando os casos de câncer de pele não melanoma, o CCR é considerado a terceira neoplasia mais incidente no mundo no sexo masculino (DENIPOTE et al. 2010). Já quando considerado apenas o sexo feminino, essa neoplasia é a segunda mais comum em todo o mundo. A população brasileira residente em regiões mais desenvolvidas é a mais atingida (Ministério da Saúde 2014).

Desconsiderando os tumores da pele não melanoma, os tumores colorretais nos homens são o segundo tipo mais frequente na região Sudeste (22,67/100 mil), terceiro na região Sul (20,43/100 mil), terceiro na região Centro-Oeste (12,22/100 mil), quarta na região Norte (4,48/100 mil) e a quinta na região Nordeste (6,19/100 mil). Quando analisado o sexo feminino, esse tipo de câncer é o segundo mais frequente nas regiões Sudeste (24,56/100 mil) e Sul (21,85/100 mil), o terceiro nas regiões Centro-Oeste (14,82/100 mil) e Nordeste (7,81/100 mil), e o quarto mais frequente na região Norte (5,30/100 mil) (Ministério da Saúde 2014).

O CCR se desenvolve lentamente, a partir de lesões pré-neoplásicas, as quais através de um acúmulo crescente de alterações genéticas resultam em mudanças histológicas e moleculares com consequente transformação

do epitélio colônico normal em pólipos adenomatosos e, posteriormente, em câncer (RADTKE e CLEVERS 2005). Os pólipos adenomatosos são considerados lesões benignas, porém, em torno de 5% desses pólipos progridem para tumores malignos em até 10 anos (LYALL et al. 2006). Quando diagnosticado precocemente, o CCR apresenta um bom prognóstico. A sobrevida média global é de 55% e 40% nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente (Ministério da Saúde 2014), porém pode atingir taxas de cura acima de 90% nos estádios mais iniciais.

1.2 FATORES ENVOLVIDOS NA CARCINOGENESE COLORRETAL

O desenvolvimento do CCR está relacionado com fatores genéticos, de estilo de vida, ambientais e dietéticos (ARANCETA e RODRIGO 2002). Os principais fatores de risco incluem história familiar de câncer colorretal, idade, tabagismo, álcool, obesidade, diabetes, sedentarismo, doença inflamatória intestinal e dieta pobre em fibras e folato (AL-SOHAILY et al. 2012; DYSON e RUTTER 2012).

O cigarro tem sido associado ao aumento de incidência e mortalidade por CCR. Segundo um grupo integrante do *International Agency for Research on Cancer* (IARC) o tabagismo aumenta tanto o risco para os tumores em cólon quanto em reto (International Agency for Research on Cancer - IARC 2012). BOTTERI et al. (2008) investigou 106 estudos

observacionais e mostrou um risco para CCR de 1.18 para as pessoas que fumavam quando comparadas aos não fumantes (BOTTERI et al. 2008). Além disso, sabe-se que, em torno de 12% das mortes por CCR podem ser atribuídas ao cigarro (ZISMAN et al. 2006; HAGGAR e BOUSHEY 2009). Um recente e grande estudo de coorte realizou um acompanhamento durante 14 anos com um grupo de noruegueses com diagnóstico de CCR e mostrou que o tabagismo está associado ao aumento da mortalidade por CCR, em ambos os sexos, em torno de 20% quando comparados com pacientes que nunca fumaram (PARAJULI et al. 2014).

A obesidade é considerada um fator de risco para diversas neoplasias (RENEHAN et al. 2008). Um grande estudo de coorte demonstrou um risco relativo de 1.45 para o desenvolvimento de CCR em mulheres com o índice de massa corporal maior que 29 Kg/m^2 em relação a mulheres com índice de massa corporal menor que 21 Kg/m^2 (MARTINEZ et al. 1997). Em uma recente meta-análise, a qual avaliou 56 estudos, ficou esclarecido que um Índice de Massa Corporal (IMC) $< 23,0 \text{ kg/m}^2$, IMC entre 23,0 a 24,9, IMC entre 25,0 a 27,4, IMC entre 27,5 a 29,9 e IMC $>$ ou $=$ a $30,0 \text{ kg/m}^2$ estão associados a um aumento de risco para CCR de 14%, 19%, 24% e 41%, respectivamente (NING et al. 2010).

O tecido adiposo é um órgão endócrino secretando diversos hormônios e citocinas pró-inflamatórias que estão relacionadas à gênese do processo fisiopatológico da obesidade e suas complicações, como por exemplo, a resistência à insulina e a hipertrigliceridemia (GUTIERREZ et al. 2009; KUMOR et al. 2009; DALAMAGA et al. 2013). A resistência insulínica,

por sua vez, conduz a um quadro de hiperinsulinemia, o qual juntamente com o Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 contribui para a carcinogênese (CALLE e KAAKS et al. 2004).

Algumas medicações vêm sendo estudadas na prevenção e mortalidade por CCR. Em relação aos antiinflamatórios não-esteróides, estudos mostram que, indivíduos com história prévia de adenomas, porém sem predisposição genética para CCR, possuem um menor risco relativo de recorrência de adenomas quando comparados com pessoas que não utilizavam tais medicações. Entretanto, o tempo de seguimento não foi suficiente para determinar se esses antiinflamatórios atuam também na diminuição na incidência de CCR (ARBER et al. 2006; BERTAGNOLLI et al. 2006; LANAS et al. 2007). Já a utilização diária da aspirina, por no mínimo cinco anos, mostrou eficácia na redução da incidência e mortalidade por CCR (FLOSSMANN et al. 2007; ROTHWELL et al. 2010, 2011). Além disso, segundo CHLEBOWSKI et al. (2004), mulheres que faziam a utilização de estrógeno combinado com progesterona pós-menopausa tinham redução de 44% na incidência de CCR quando comparadas com mulheres que não utilizavam essa medicação.

1.3 DIETA E CÂNCER COLORRETAL

A relação entre dieta e câncer também vem sendo muito estudada (DURKO e MALECKA-PANAS 2014; Ministério da Saúde 2014). Estima-se

que mais 30% dos casos de câncer em todo mundo poderiam ser evitados através de mudanças comportamentais e dietéticas (WHO 2014).

Uma meta-análise de 52 estudos observacionais demonstrou que pessoas que praticavam atividade física regular possuíam 24% de diminuição na incidência de CCR quando comparadas com indivíduos que não praticavam exercício (WOLIN et al. 2009). Além disso, os mesmos autores em 2011, concluíram, através de uma revisão sistemática, que a atividade física pode reduzir em 16% a incidência de adenomas e, em 35%, a incidência de pólipos intestinais (WOLIN et al. 2011).

Em relação à dieta, uma alimentação rica em carne processada, carboidratos simples, gorduras saturadas, proteínas de origem animal e calorias, favorece o aparecimento de neoplasias em cólon e reto. Em contrapartida alimentos contendo fibras, folato, selênio, cálcio, vitamina D e antioxidantes agem como agentes protetores contra o desenvolvimento dessas neoplasias (CAMPOS et al. 2005; MARTINEZ et al. 2008; GESCHER et al. 2010; CHAN e GIOVANNUCCI 2010).

Uma dieta rica em carne vermelha também tem sido associada diretamente ou indiretamente a carcinogênese colorretal, já que indivíduos que consomem muita carne vermelha podem ter uma dieta também baixa em verduras e legumes. Um dos possíveis mecanismos que explica o potencial carcinogênico da carne vermelha de boi, porco ou cordeiro, envolve o processamento e preparo das carnes, como o processo de fritar, grelhar, cozinhar ou assar (PERICLEOUS et al. 2013). Isso porque cozinhar a carne em altas temperaturas pode levar à produção de aminas

heterocíclicas, devido a pirólise de alguns aminoácidos, ou pela reação entre creatinina, bem como a formação de compostos N-nitrosos (FELTON et al. 2007; CHAN et al. 2011). Essas, e outras substâncias tóxicas ao intestino, tais como nitratos, nitritos, indóis, fenóis, sulfitos, amônia e aminas, possuem um efeito carcinogênico e mutagênico (HUGHES et al. 2000), que, por sua vez, podem aumentar a produção de radicais livres e lesionar células (EICHHOLZER et al. 2012; ZANDONAI et al. 2012). O risco de CCR aumenta em 14% a cada aumento de 100g no consumo de carne vermelha ou processada (CHAN et al. 2011).

A associação entre a ingestão de gorduras e CCR é controversa e também vem sendo muito estudada (PERICLEOUS et al. 2013). Uma dieta rica em gorduras, principalmente em gordura animal, também pode aumentar o risco de CCR (HAMER et al. 2008). Um grande estudo realizado em 2010 mostrou que pacientes que consumiam uma dieta baixa em gordura animal possuíam uma redução em 20% do risco de CCR (FUNG et al. 2010). Os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 presentes nos peixes, azeite de oliva, semente de linhaça, nozes e óleo de canola também tem sido alvo de muitos estudos. Alguns trabalhos prospectivos (WEIJENBERG et al. 2007; HALL et al. 2008; SASAZUKI et al. 2011) e de caso controle (KIMURA et al. 2007; THEODORATOU et al. 2007; KIM et al. 2010; HABERMANN et al. 2013) mostraram uma associação inversa entre o consumo de ômega-3 e CCR.

Vários estudos têm mostrado o efeito protetor de frutas e hortaliças contra as neoplasias colorretais (TERRY et al. 2001; VAN DUIJNHOFEN et

al. 2009; SCHATZKIN et al. 2010; VOGTMANN et al. 2013). Entretanto, torna-se difícil estabelecer apenas um componente anticarcinogênico, já que esses alimentos são fontes de diversas vitaminas, sais minerais, fibras, flavonoides, indóis, antioxidantes, ácido linoleico, entre outros (DEMARINI 1998; GARÓFOLO et al. 2004). Sabe-se que, por exemplo, substâncias como os indóis e isotiocianatos que são encontradas nos brócolis, repolhos e couve-flor, possuem um papel importante durante a detoxificação (CAMPOS et al. 2004). Já as fibras estão relacionadas com a redução do trânsito intestinal e de metabólitos tóxicos, bem como a produção de ácidos graxos de cadeia curta os quais diminuem o pH intestinal e podem inibir a carcinogênese (SCHARLAU et al. 2009; ZHONG et al. 2014). Além disso, os probióticos são capazes de competir com bactérias patogênicas, diminuir a produção de ácidos biliares secundários carcinogênicos e aumentar a quantidade de ácidos graxos de cadeia curta (CHONG 2014).

O mineral cálcio e a vitamina D estão relacionados na proteção contra o câncer devido as suas propriedades em diminuir a proliferação celular, inibir o processo de angiogênese, estimular a apoptose e promover da diferenciação das células (PETERS et al. 2001; ZHANG e GIOVANNUCCI 2011). A vitamina D está associada não somente com prevenção de tumores colorretais, mas também com a progressão e mortalidade por esses tumores (GIOVANNUCCI 2013). GORHAM et al. (2005) realizou uma meta-análise e mostrou que indivíduos, com ingestão de vitamina D maior ou igual a 1000 IU/dia, ou, com níveis de 25-hidroxivitamina D maior ou igual a 33 ng/ml, tinham 50% a menos de chances de desenvolver CCR. Em relação ao

cálcio, um trabalho prospectivo realizado com 61.463 mulheres mostrou que as que ingeriam uma maior quantidade de cálcio (mediana de 914 mg/dia) tiveram um risco reduzido para a neoplasia colorretal em relação as mulheres com o menor consumo (mediana 486 mg/dia), sendo essa associação mais forte entre mulheres com idade mais avançada e com cânceres distais (TERRY et al. 2002), concordando com outro grande estudo de coorte realizado com 60.866 homens e 66.883 mulheres (MCCULLOUGH et al. 2003).

Polifenóis são substâncias encontradas em alguns alimentos, tais como nas frutas, vegetais, cúrcuma, chá verde, café e vinho tinto (PERICLEOUS et al. 2013). Estudos recentes evidenciam a importância dessas substâncias durante a carcinogênese (WANG et al. 2013), inibindo a proliferação celular (SHIN et al. 2013), induzindo a parada do ciclo celular (RAMOS 2007; SHIN et al. 2013) e interagindo com vias de apoptose (ARAÚJO et al. 2011). A cúrcuma, por exemplo, possui efeitos antioxidantes e antiinflamatórios, e pode inibir o crescimento e metástase de células tumorais (CHEN et al. 2006, 2013), diminuir o número e tamanho de adenomas em pacientes com polipose adenomatosa familiar (CRUZ-CORREA et al. 2006) e modular a metilação do DNA (LINK et al. 2013).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado a importância do folato durante a carcinogênese colorretal, devido ao seu papel chave durante a metilação e síntese de nucleotídeos (MASON et al. 2008). Tem sido observado um aumento significativo na incidência de adenomas pré-malignos em pacientes com ingestão alimentar e níveis séricos reduzidos de

folato. A explicação para esse processo é que baixos níveis de folato estão relacionados tanto a incorporação errônea de uracil ao DNA e quanto ao aumento da quebra de cromossomos, como o favorecimento da hipometilação do DNA (GIOVANNUCCI 2003).

Entretanto, estudos epidemiológicos realizados com animais e citado por WEI et al. (2010), relataram associação nula ou positiva entre suplementação de folato e recorrência de adenomas. Tais contradições podem ser entendidos pelo duplo papel do ácido fólico na molécula de DNA. Em primeiro lugar a deficiência de ácido fólico na mucosa intestinal normal pode levar a instabilidade do DNA e incorporação do uracil na molécula de DNA, e, portanto, a ingestão alimentar adequada em folato poderia agir como um agente protetor contra a carcinogênese em neoplasias de cólon e reto. Entretanto, quando há uma lesão pré-neoplásica e, conseqüentemente, intensa divisão celular, a deficiência de folato poderia atuar como substrato para o crescimento e replicação tumoral, aumentando a chances da evolução da doença (WEI et al. 2010; LEE e CHAN 2011).

1.4 FOLATO E NUTRIENTES ENVOLVIDOS NO CICLO DO CARBONO-1

O termo folato, derivado do latim *folium* o qual significa folha, é utilizado para citar todas as formas de uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B, também conhecida como pteroilglutamatos,

ácido fólico, ácido pteroilglutâmico, vitamina Bc, vitamina B9 ou vitamina M (LIMA et al. 2003; BRITO et al. 2012).

Pteroilpoliglutamatos são moléculas formadas por ácido pteróico (PTE) ligadas a glutamatos. O PTE, principal componente dos folatos, é composto por um anel de pteridina bicíclico e pelo ácido para-aminobenzóico. A partir dessa estrutura química existem diversas formas químicas de folatos diferenciando entre si de acordo ao número de resíduos de glutamato, ao estado de oxidação do anel de pterina e as ligações com unidades de carbono (BRITO et al. 2012). A maioria dessas moléculas intracelulares está na forma de pteroilpentapoliglutamato (BOLLHEIMER et al. 2005).

O ácido pteroilglutâmico ou ácido fólico é a forma monoglutamil, totalmente oxidada, formado a partir da ligação do grupo carboxil terminal do PTE com uma única molécula de glutamato. Nesse ácido, o anel de pteridina não está na sua forma reduzida e, por esse motivo, possui maior resistência à oxidação química (SCOTT 1999). Devido a sua melhor estabilidade, o ácido fólico é a forma farmacêutica sintética utilizada em suplementos alimentares contendo folato e na fortificação de alimentos com folato (OHRVIK e WITTHOFT 2011). Apesar de ser a forma mais estável, nos alimentos, a forma de folato mais encontrada é como poliglutamatos, como por exemplo, o N⁵-formil-tetraidrofolato, N¹⁰-formil-tetraidrofolato, N⁵-formimino-tetraidrofolato, N^{5,10}-metenil-tetraidrofolato, N^{5,10}-metileno-tetraidrofolato e o N⁵-metil-tetraidrofolato (5-MTHF) (HAYASHI et al. 2007).

As moléculas de poliglutamatos, forma do folato presente nos alimentos, estão envolvidas na biossíntese de unidades de carbono, em eventos epigenéticos (LAANPERE et al. 2010; ROY et al. 2012; AMELIO et al. 2014) e na metilação da homocisteína em metionina (TALAULIKAR e ARULKUMARAN 2011; KARABACAK et al. 2014).

Como citado anteriormente, a maior parte do folato dos alimentos está em sua forma reduzida, como 5, 6, 7, 8-tetraidrofolato (FH₄), as quais são muito instáveis quimicamente e não conseguem ultrapassar a membrana celular (SCOTT 1999). Antes de serem absorvidos no terço proximal do intestino delgado, esses poliglutamatos são degradados em monoglutamatos através da enzima glutamato carboxipeptidase 2, retirando assim os resíduos de glutamato da molécula do FH₄ (NAZKI et al. 2014). O transporte dos monoglutamatos até os enterócitos é realizado através do transportador de folato próton acoplado (PCFT) (HAYASHI et al. 2007; LAANPERE et al. 2010).

Entretanto, no interior dos enterócitos o folato é convertido, principalmente, em N⁵-metil-tetraidrofolato (5-MTHF), sendo esta a principal forma presente no plasma. Para a absorção celular é necessário a proteína carreadora de folato reduzido 1. Já no transporte transmembrana para o fígado e intestino é utilizado o PCFT. Alguns monoglutamatos são reconvertidos em poliglutamatos e utilizados em outras reações no organismo (NAZKI et al. 2014). Uma quantidade maior de folato vai até a bile onde é reabsorvida. Em menor quantidade, parte do folato é degradada e eliminada pela urina (SMITH et al. 2007). A maioria do folato tecidual estão

na forma de poliglutamato, porém cada estrutura química age de maneira específica no metabolismo intracelular (PIETRZIK et al. 2010).

A forma FH_4 é o subgrupo do folato mais importante já que é o principal transportador de carbono-1 no organismo. O FH_4 pode ligar-se a unidades de carbono nas posições N^5 , N^{10} ou a ambos, gerando diferentes formas de folatos biologicamente ativos. Os diferentes compostos doadores de unidades de carbono incluem os grupos metil, metileno, metenil, formil ou formimino (BOLLHEIMER et al. 2005). A forma mais oxidada do FH_4 é o N^{10} -formil- FH_4 e a forma mais reduzida é o N^5 -metil- FH_4 , sendo que esta quando formada não pode ser reoxidada e por isso tende a se acumular na célula (SMITH et al. 2007).

Os folatos participam como doadores e receptores de unidades de folato. A recepção dessas unidades pela molécula de FH_4 ocorre durante o catabolismo e/ou interconversão de aminoácidos (BLANCQUAERT et al. 2014).

A principal reação enzimática de transferência do carbono em seres humanos ocorre durante a conversão reversível de serina em glicina. Nesse caso, o grupo de hidroximetil da molécula de serina é aceito pela molécula FH_4 , resultando em glicina e $\text{N}^{5,10}$ -metileno-tetrahidrofolato (5,10-MTHF). Esta molécula sofre ação da enzima 5,10 metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) sendo convertido em 5-MTHF, forma de folato mais presente no plasma e substrato responsável pela conversão da homocisteína em metionina. A metionina é posteriormente metabolizada à S-

adenosilmetionina (SAM), a qual será responsável pela metilação do DNA (SHARP e LITTLE 2004).

Além disso, a estrutura química de 5,10-MTHF, juntamente com a vitamina B6, é utilizada para a metilação do componente desoxitimidina (dTMP) da molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA), através da monofosfato de desoxiuridina (dUMP) (SELHUB 2002; FENECH 2012). A molécula de dTMP, por sua vez, é essencial para a síntese de DNA. Segundo ULRICH et al. (2002), as células do cólon necessitam de altas taxas de síntese de DNA para a sua renovação celular. Além disso, o mecanismo de reparo do DNA é fundamental para a mucosa do cólon, sendo o status de metilação e a disponibilidade de nucleotídeos essenciais para esse processo (ULRICH et al. 2002).

Outra reação que contribui na transferência de unidades de carbono à molécula de FH_4 ocorre durante a degradação de histidina em glutamato. A desaminação da histidina produz a molécula de N-formiminoglutamato (FIGLU). A união do grupo formimino do FIGLU ao FH_4 forma a molécula de N^5 -formimino- FH_4 e libera o aminoácido glutamato (BOLLHEIMER et al. 2005).

A terceira forma de recepção de unidades de carbono pelo FH_4 ocorre durante o catabolismo do aminoácido triptofano. A N-formil-quinurenina é formada durante a oxidação do triptofano, na via das quinureninas (BOLLHEIMER et al. 2005). O formato reage com o FH_4 e forma N^{10} -formil- FH_4 , molécula esta que, posteriormente, fornecerá os carbonos 2 e 8 para biossíntese de purinas (SMITH et al. 2007; MACFARLANE et al. 2009).

Apesar da variação dos teores de folato nos alimentos, as hortaliças espinafre, brócolis, frutas cítricas, fígado e tomate são consideradas como alimentos fontes dessa vitamina (LIMA et al. 2003). Além disso, no Brasil e nos países onde alguns alimentos são fortificados, estes são fontes importantes de ácido fólico (Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA 2002).

Não apenas o folato mas outras vitaminas do complexo B, a colina, betaína e o álcool interferem no ciclo do carbono-1 (BAILEY 2003). A vitamina B2, por exemplo, é uma vitamina hidrossolúvel, isolada pela primeira vez em 1879 no soro do leite. Engloba três compostos: riboflavina livre, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina adenina mononucleotídeo (FMN) (POWERS 2003; FISCHER e BACHER 2011), sendo na forma de FAD a maior parte da vitamina B2 presente nos alimentos (KONINGS e Committee on Food Nutrition 2006). A riboflavina livre é composta por uma molécula de isoaloxazina com uma cadeia lateral de ribitol e está presente em pequena quantidade nos alimentos. Além disso, uma pequena parte pode ser encontrada como FMN nos alimentos (HOEY et al. 2009).

Em relação ao metabolismo da vitamina B2, as moléculas de FAD e FMN que são ingeridas através da alimentação estão ligadas a proteínas e, no estômago, devido a presença de ácido ocorre a liberação dessas coenzimas (TEIXEIRA NETO e SILVA 2003). A ação das fosfatases não específicas presentes na membrana da borda em escova dos enterócitos permite a hidrólise das coenzimas em riboflavinas livres. Estas então são absorvidas, principalmente, no terço proximal do intestino delgado na forma

livre ou como pirofosfato. Dentro dos enterócitos a riboflavina livre é convertida, então, em FMN através da flavoquinase citosólica em uma reação de fosforilação dependente de adenosina trifosfato (ATP). Posteriormente, a FMN é convertida em FAD através da FAD sintetase. Após sua absorção a vitamina B2 chega ao fígado pelo sistema porta, podendo ser armazenada nesse local, ou no coração, rins ou baço. Sua excreção ocorre principalmente pelos rins na forma de riboflavina livre (POWERS 2003).

Suas formas biologicamente ativas mais importantes são FAD e FMN. Estas são consideradas potentes antioxidantes, funcionando como carregadores de elétrons em várias reações redox essenciais para o funcionamento das células aeróbicas (POWERS 2003; ASHOORI e SAEDISOMEOLIA 2014). A vitamina B2, juntamente com a vitamina B12 e o folato, atua também na remetilação da homocisteína em metionina. Além disso, a molécula de FAD age como cofator da *MTHFR* e da piridoxina fosfato oxidase, sendo esta última responsável por converter a vitamina B6 da dieta na sua forma ativa de piridoxal 5-fosfato (PLP) (HOEY et al. 2009). A riboflavina pode ser encontrada no leite e seus derivados, folhas verdes, ovos e carnes (TEIXEIRA NETO e SILVA 2003).

A vitamina B6 pode ser encontrada no organismo com a forma de piridoxal, piridoxamina, piridoxina, PLP, piridoxamina 5-fosfato (PMP) e piridoxina 5-fosfato (PNP), podendo ser interconvertidas durante algumas reações enzimáticas no metabolismo humano (NATERA et al. 2012).

Para ser absorvida no lúmen intestinal, a vitamina B6 sofre hidrólise de suas formas fosforiladas através da fosfatase alcalina. Após o processo de absorção, a vitamina B6 pode ser fosforilada novamente, entretanto suas formas não fosforiladas são as mais encontradas fora da membrana intestinal. Ao chegar no fígado a enzima piridoxalquinase é responsável pela fosforilação das formas não fosforiladas. Já a enzima flavina mononucleotídeo oxidase converte as moléculas PNP e PMP em PLP. Além disso, a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e a FAD podem transformar o piridoxal em ácido 4-piridóxico (LEKLEM 2003; HELLMANN e MOONEY 2010).

A vitamina B6 exerce múltiplas funções no organismo humano. A PLP, forma ativa dessa vitamina, por exemplo, funciona como cofator de enzimas que estão envolvidas no metabolismo de aminoácidos (TANAKA et al. 2005) e possui papel fundamental no metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 (MCNULTY et al. 2008).

Além disso, como dito anteriormente, a metionina depois de formada é convertida em SAM, através da enzima metionina adenosiltransferase, a qual é um importante doador de metila. A S-adenosilhomocisteína (SAH), subproduto da SAM, é então hidrolisada em adenosina e homocisteína através da adenosilhomocisteína hidrolase (BLOM e SMULDERS 2011). A homocisteína pode seguir por duas vias metabólicas: remetilação e a transulfuração. Durante a remetilação, em todos os tecidos humanos, a metionina sintase dependente de vitamina B12, utiliza a 5-MTHF como doador do grupamento metil, e a converte em metionina. Outra via de

remetilação, que ocorre no fígado, é através da betaína. Já durante a transulfuração, a molécula de homocisteína reage com a serina, de forma irreversível, através da cistationa- β -sintase dependente da vitamina B6, e é produzida a cistationa. Esta molécula por sua vez, através da cistationina- γ -liase, é hidrolisada em cisteína e α -cetobutirato (HOFFER 2004; BLOM e SMULDERS 2011). Esta, quando em excesso pode ser oxidada em taurina e sulfatos inorgânicos, ou ser excretada na urina (SELHUB 1999; PERLA-KAJÁN et al. 2007; SELHUB 2008). As principais fontes de vitamina B6 são o levedo de trigo, fígado bovino, carne de porco, banana, espinafre e tubérculos (TEIXEIRA NETO e SILVA 2003).

Outra vitamina importante no ciclo do carbono-1 é a cobalamina, ou vitamina B12. É hidrossolúvel e composta por um anel tetrapirrólico com uma molécula de cobalto no centro. Além disso, possui um ligante inferior 5,6-dimetilbenzimidazol e um grupo ribofuranosil-fosfato (SCOTT 1999).

Nos alimentos, a cobalamina encontra-se ligada a proteínas. Ao chegar ao estômago o ácido clorídrico, produzido pelas células parietais, age hidrolizando essa ligação. As vitaminas livres, ainda no estômago, são acopladas às haptocorrinas formando um complexo para a não desnaturação química (HERRMANN et al. 2003). A lise desse complexo ocorre através da ação de proteases pancreáticas no intestino delgado. Após esse processo, a vitamina B12 liga-se ao fator intrínseco, molécula produzida pelas células parietais no estômago, permitindo assim a não degradação da vitamina através das enzimas proteolíticas no intestino e a ligação da vitamina à receptores específicos nos enterócitos do íleo terminal

para a sua posterior absorção (AFMAN et al. 2001). Após a absorção, a cobalamina é ligada e transportada pelas transcobalaminas na corrente sanguínea e estocada no fígado (SMITH et al. 2007).

Muitas são as funções das diferentes formas da vitamina B12. A enzima metionina sintase dependente de cobalamina está envolvida na metilação da homocisteína para a produção de metionina (MCNULTY et al. 2008; GRUBER et al. 2011). A cobalamina também possui papel fundamental na isomerização de L-metilmalonil-CoA para succinil-CoA, através da enzima metilmalonil-coA mutase que é dependente da 5'-deoxiadenosilcobalamina. Essa forma química de vitamina B12 é caracterizada pela presença de S-deoxiadenosina ligada a molécula de cobalto. Outras duas formas enzimáticas existem na natureza, a hidroxocobalamina, na qual uma molécula hidroxil se liga ao cobalto, e a aquocobalamina que possui a água agregada ao cobalto (SCOTT 1999).

No soro a forma mais encontrada é a metilcobalamina, e no citosol a 5'-deoxiadenosilcobalamina (KLEE 2000). Nos suplementos alimentares e nos alimentos fortificados a vitamina B12 encontra-se como cianocobalamina, sendo esta caracterizada por uma molécula de cianeto ligado ao cobalto (SCOTT 1999). A vitamina B12 não é produzida no organismo e por isso deve ser ingerida através da alimentação, em alimentos como a carne vermelha, rins bovinos, fígado, ovos, peixes, leite e derivados (TEIXEIRA NETO e SILVA 2003).

As aminas quartenárias, colina e betaína, estão envolvidas no metabolismo lipídico e no ciclo do carbono-1 dependente de folato, sendo

consideradas como importantes doadores de grupos metil. A colina é encontrada no organismo na forma de fosfolípido, sendo que, em tecidos mamários, 95% estão como fosfatidilcolina e, os demais 5% como acetilcolina, fosfocolina, glicerofosfocolina e citidina 5-difosfocolina (UELAND 2011). A fosfatidilcolina é sintetizada a partir da molécula de fosfatidiletanolamina através da ação da fosfatidiletanolamina N-metiltransferase e consome três moléculas de SAM. Como resultado, para cada molécula de fosfatidilcolina formada geram-se três moléculas de SAH. Desse modo, a síntese de fosfatidilcolina exerce um papel fundamental nas reações de transmetilação dependentes de SAM e, conseqüentemente, na geração de homocisteína (HOLLENBECK 2012; SALVI e GADDA 2013).

No rim e no fígado, a molécula de colina é oxidada em betaína aldeído através da enzima colina desidrogenase. Na mitocôndria ou no citoplasma, a segunda etapa do metabolismo ocorre quando a betaína aldeído é oxidada em betaína pela enzima betaína aldeído desidrogenase. Uma das funções da betaína é agir como doador de metil na reação da conversão de homocisteína em metionina a qual é catalisada pela betaína homocisteína metiltransferase (UELAND et al. 2005).

A remetilação da homocisteína também é catalisada pela metionina sintetase a qual requer a doação do grupo metil da molécula de 5-MTHF e a vitamina B12 como cofator. Durante a privação de colina diminui-se a quantidade de betaína e, conseqüentemente, é necessária uma quantidade maior de folato devido ao aumento na utilização de 5-MTHF na remetilação da homocisteína. Do mesmo modo, quando há uma privação de folato,

aumentam-se as necessidades de colina já que são utilizados em maior quantidade os grupos metil da colina e da betaína (OLTHOF e VEROEF 2005; UELAND 2011).

Vários trabalhos tem demonstrado uma associação positiva entre a ingestão de álcool e o CCR (PELUCCHI et al. 2011; CHO et al. 2012; KIM et al. 2012; ZHAO et al. 2012; CROUS-BOU et al. 2013; STONE et al. 2014). Múltiplos mecanismos podem estar envolvidos nesse processo. Primeiramente, o etanol pode ser um importante antagonista do folato, interferindo no metabolismo do carbono-1, diminuindo sua absorção e aumentando sua excreção (SEITZ et al. 1990; KIM et al. 2012). Em segundo lugar, o etanol interfere diretamente no metabolismo da vitamina B6 (TEIXEIRA NETO e SILVA 2003) e na metilação normal do DNA (CHOI et al. 1999; BOFFETTA e HASHIVE et al. 2006; SEITZ e STICKEL 2007). Além disso, sabe-se que o etanol metabolizado pelo sistema citocromo P450 leva à produção de acetaldeído, o qual é considerado um agente mutagênico, e de espécies reativas de oxigênio (STONE et al. 2014).

Após a ingestão de bebida alcóolica, o etanol é absorvido, principalmente, na mucosa gástrica e na porção proximal do intestino delgado (CRABB et al. 2004). Uma pequena quantidade do etanol é excretada e o restante é oxidado no fígado, onde essa substância é convertida em acetaldeído com a ação da enzima álcool desidrogenase. Usualmente, ainda no fígado, a enzima aldeído desidrogenase (ALDH) faz a conversão rapidamente do acetaldeído em acetato e água, que por sua vez serão eliminados através de várias reações enzimáticas sequenciais

(BRENNAN et al. 2004). Entretanto, algumas situações são capazes de promover o acúmulo de acetaldeído, como por exemplo, a baixa atividade enzimática da ALDH, particularmente de sua variante ALDH2 com consequente menor oxidação do acetaldeído, e, acúmulo desse metabólito, o qual está envolvido na quebra da molécula de DNA e na indução da carcinogênese (LI et al. 2011).

A quantidade de álcool necessária para causar um aumento no risco para as neoplasias colorretais também tem sido alvo de alguns estudos. CHO et al. (2012) demonstraram em seu estudo que a ingestão elevada de álcool, principalmente acima de 30 gramas (g) por dia, estava associada com o aumento no risco relativo de 2.8 para CCR, sendo que essa relação aumentava quando havia alguém na família com esse mesmo tumor (CHO et al. 2012). Uma meta-análise envolvendo 27 estudos de coorte e 34 casos controle mostrou uma elevação no risco para CCR em indivíduos com ingestão moderada de álcool (12,6 a 49,9 g/dia) e alta ingestão de álcool (maior de 50 g/dia) quando comparado com pessoas que não ingeriam bebida alcóolica (ZHAO et al. 2012).

Segundo alguns trabalhos, a população oriental possui uma maior prevalência na variante de ALDH2, com consequente acumulação moléculas de acetaldeídos (MIZOUE et al. 2006; OZE et al. 2009). Um trabalho realizado com 8 estudos de coorte em 5 países e com ocidentais demonstrou um aumento de 20% no risco de desenvolvimento de CCR em indivíduos que consumiam 45 g/dia de álcool (CHO et al. 2004). Em contrapartida, outros 3 estudos realizados com a população oriental indicou

um risco bem superior aos encontrados nos estudos com indivíduos ocidentais, sendo o risco relativo de 2.7 (SHIMIZU et al. 2003), 2.1 (OTANI et al. 2003) e 2.4 (WAKAI et al. 2006) para o consumo de 37, 47 e 69 g/dia de álcool, respectivamente.

1.5 POLIMORFISMOS NO GENE *MTHFR* E METILAÇÃO DO DNA

A *MTHFR*, enzima chave para o metabolismo do carbono-1, é essencial para a redução da molécula de 5,10-MTHF em 5-MTHF, sendo esta responsável pela remetilação da homocisteína em metionina, que, por sua vez, é precursora da molécula SAM (MOLLOY et al. 2009; ZHU et al. 2014). Sabe-se que a SAM exerce um papel fundamental na doação do grupamento metil em 80% das reações celulares, permitindo assim a metilação do DNA (SHARP e LITTLE 2004). Considerando que a enzima *MTHFR* participa das vias metabólicas de degradação da homocisteína, que por sua vez é metabolizada a SAM, mutações no gene dessa enzima tem sido alvo de muitos estudos. Alterações genéticas no gene *MTHFR* resultam na expressão de uma enzima termolábil de baixa atividade (MOLLOY et al. 2009; TRIMMER 2013).

A enzima *MTHFR* é uma flavoproteína codificada pelo gene *MTHFR*, o qual está localizado no cromossomo 1 (1p-36.3), e é responsável pela metilação do DNA. Os dois polimorfismos mais estudados são *MTHFR* C677T e A1298C e estão associados com a diminuição na atividade da enzima *MTHFR* (FABRIS et al. 2009).

O polimorfismo *MTHFR* 677C>T (rs1801133), localizado no éxon 4, altera o aminoácido na posição 222 de alanina para valina (*MTHFR* p.A222V), devido a substituição de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677 (MEI et al. 2012). Acredita-se que indivíduos homozigotos 677TT, têm apenas 25% da atividade da enzima *MTHFR* (MEI et al. 2012). Já indivíduos heterozigotos para o polimorfismo (CT) têm uma diminuição de 60% da atividade da enzima *MTHFR* quando comparados aos indivíduos sem mutação (CC) (NAZKI et al. 2014).

Como resultado, os estudos avaliando este polimorfismo mostram a possibilidade de redução nos níveis séricos de folato (5-MTHFR) com consequente aumento da homocisteína plasmática, hipometilação do DNA e aumento do risco para o CCR (HEAVEY et al. 2004; MEI et al. 2012). Por outro lado, indivíduos homozigotos (CC) ou heterozigotos mutados (CT) podem apresentar níveis aumentados de 5,10 *MTHFR*, favorecimento da síntese e reparo da molécula de DNA, menor incorporação errônea de uracila no DNA e quebra do mesmo, evitando assim o aparecimento de tumores (LITTLE et al. 2003). Um recente estudo realizado por ZACHO et al. (2011) mostrou um efeito protetor para o CCR em indivíduos homozigotos para 677TT (ZACHO et al. 2011). FERNÁNDEZ-PERALTA et al. (2010) também concluiu em seu trabalho que os genótipos TT e CT do *MTHFR* C677T são menos frequentes entre pacientes com CCR em relação a um grupo controle (FERNÁNDEZ-PERALTA et al. 2010).

Um segundo polimorfismo comum da *MTHFR*, o 1298A>C (rs1801121), está localizado no éxon 7. Neste caso a adenina é substituída

por uma citosina no nucleotídeo 1298, resultando na troca do aminoácido na posição 429 de glutamato para alanina (*MTHFR* p.E429A) (GHODKE et al. 2011; TRIMMER 2013). Trabalhos revelam que indivíduos homocigotos para o alelo 1298C também têm diminuição na atividade da enzima *MTHFR*, porém tal redução não implica em uma diminuição nos níveis de homocisteína (BRUSTOLIN et al. 2010; TRIMMER 2013).

A epigenética é definida como alterações herdadas na expressão de genes, porém sem alterar a sequência de bases do DNA, podendo ser reversível, ao contrário das alterações genéticas. Os mecanismos epigenéticos mais estudados são: metilação do DNA, modificações de histonas e ação de ácidos ribonucléicos (RNAs) não codificadores (GHAVIFEKR FAKHR et al. 2013; SARKAR et al. 2013). Evidências recentes têm apontado para a participação de alterações epigenéticas na gênese de neoplasias. A metilação do DNA é essencial para a regulação da expressão de genes no organismo. Um padrão aberrante na metilação do DNA, por exemplo, pode levar a uma instabilidade genômica e alterar a transcrição do gene, contribuindo assim para o desenvolvimento de várias neoplasias (YANG et al. 2010; GHAVIFEKR FAKHR et al. 2013). Segundo SILVA et al. (2013), durante a carcinogênese colorretal há uma associação entre a hipometilação global do DNA com hipermetilação em regiões promotoras de genes específicos que agem na regulação do ciclo celular, reparação do DNA, apoptose, angiogênese e aderência celular (SILVA et al. 2013; JIA e GUO 2013).

A molécula de SAM é essencial para as reações de metilação do DNA, já que é um importante doador de grupo metil. A metilação do DNA está relacionada, geralmente, ao silenciamento de genes e consiste na adição covalente de um grupo metil ao carbono na posição 5 do anel de pirimidina do nucleotídeo citosina do DNA, que geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeos CG) (HUGHES et al. 2012), resultando na formação da 5-metilcitosina, forma metilada da citosina. Para essa reação é essencial a ação das enzima DNA metiltransferases (DNMTs) (SUBRAMANIAM et al. 2014).

Como dito anteriormente, a metilação do DNA é essencial para a regulação gênica. Entretanto, anormalidades do tipo hipometilação ou hipermetilação, são importantes na gênese de tumores e são encontradas frequentemente na presença de células neoplásicas (KULIS e ESTELLER 2010; OLIVEIRA et al. 2010; WANG et al. 2014).

O folato e outras vitaminas do complexo B vêm sido apontados como papel chave no ciclo do carbono-1, já que são nutrientes essenciais para síntese de DNA e de SAM. A molécula de SAM, por sua vez, é um importante doador de grupamento metil necessário nas reações de metilação do DNA. Portanto, deficiências dessas vitaminas podem contribuir para alterações nos níveis de SAM e na metilação do DNA. Entretanto, alguns estudos recentes mostram que essas vitaminas agem como um importante substrato para a progressão tumoral quando já há uma lesão pré-neoplásica estabelecida. Desta forma, este trabalho se justifica pela necessidade do conhecimento acerca do consumo alimentar desses

nutrientes em pacientes com adenocarcinoma colorretal pré-tratamento, bem como verificar se esses nutrientes influenciam na metilação global do DNA, na presença ou não de polimorfismos importantes do gene chave para o metabolismo do folato.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação de folato e vitaminas envolvidas no ciclo do carbono-1 com polimorfismos no gene *MTHFR* e metilação global do DNA em pacientes com câncer colorretal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os valores plasmáticos de folato com a ingestão dietética de folato;
- Verificar possíveis associações entre os níveis séricos de folato com os demais nutrientes envolvidos no ciclo do carbono-1;
- Averiguar a associação entre polimorfismos no gene *MTHFR* com as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes;
- Averiguar a associação entre polimorfismos no gene *MTHFR* com os valores de folato sérico;
- Avaliar se há diferença entre os níveis de metilação global do DNA no sangue e tumor;
- Verificar possíveis associações entre a metilação global do DNA com demais variáveis sócio-demográficas e clínicas;

- Determinar se polimorfismos no gene *MTHFR* interferem a metilação global do DNA;
- Avaliar se a ingestão dietética de folato e de vitaminas envolvidas no ciclo do carbono-1 interfere na metilação global de DNA;
- Avaliar se os níveis séricos de folato interferem na metilação global de DNA;
- Verificar quais variáveis são preditoras da metilação global do DNA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional de corte transversal com coleta prospectiva de dados.

3.2 CASUÍSTICA

A população do presente estudo foi composta pelos pacientes que participaram do estudo de mestrado da aluna, a qual foi recrutada consecutivamente, a partir da admissão de casos novos de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de cólon e reto no Núcleo de Tumores Colorretais A.C. Camargo Cancer Center, no período de maio de 2011 à maio de 2012 (FERRARI 2012).

3.2.1 Critérios de Inclusão

Pacientes portadores de adenocarcinoma de cólon ou reto, admitidos no Departamento de Cirurgia Pélvica - Núcleo de Tumores Colorretais do A.C. Camargo Cancer Center, em qualquer estágio da doença, com indicação de intervenção cirúrgica sobre o sítio primário.

3.2.2 Critérios de Exclusão

Pacientes previamente submetidos à cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia para tumor colorretal; com tumores de cólon ou reto recidivado; que tenha feito tratamento prévio com quimioterapia para outra neoplasia nos últimos 3 meses da coleta dos dados; que durante a entrevista não apresentaram condições clínicas e/ou compreensão durante o preenchimento dos questionários ou que não aceitaram e não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2.3 Fluxo dos Pacientes

A coleta de dados foi realizada durante o mestrado da aluna. Baseado no fluxo de casos novos de pacientes atendidos no Serviço de Cirurgia Pélvica do A.C. Camargo Cancer Center, os pacientes admitidos no hospital, após diagnóstico confirmado de adenocarcinoma colorretal em consulta médica e que preenchiam os critérios de inclusão do estudo foram convidados a responder um questionário de Avaliação Clínica (Anexo 1) e um Questionário de Frequência Alimentar (QFA) (Anexo 2). A Figura 1 mostra o fluxograma dos pacientes.

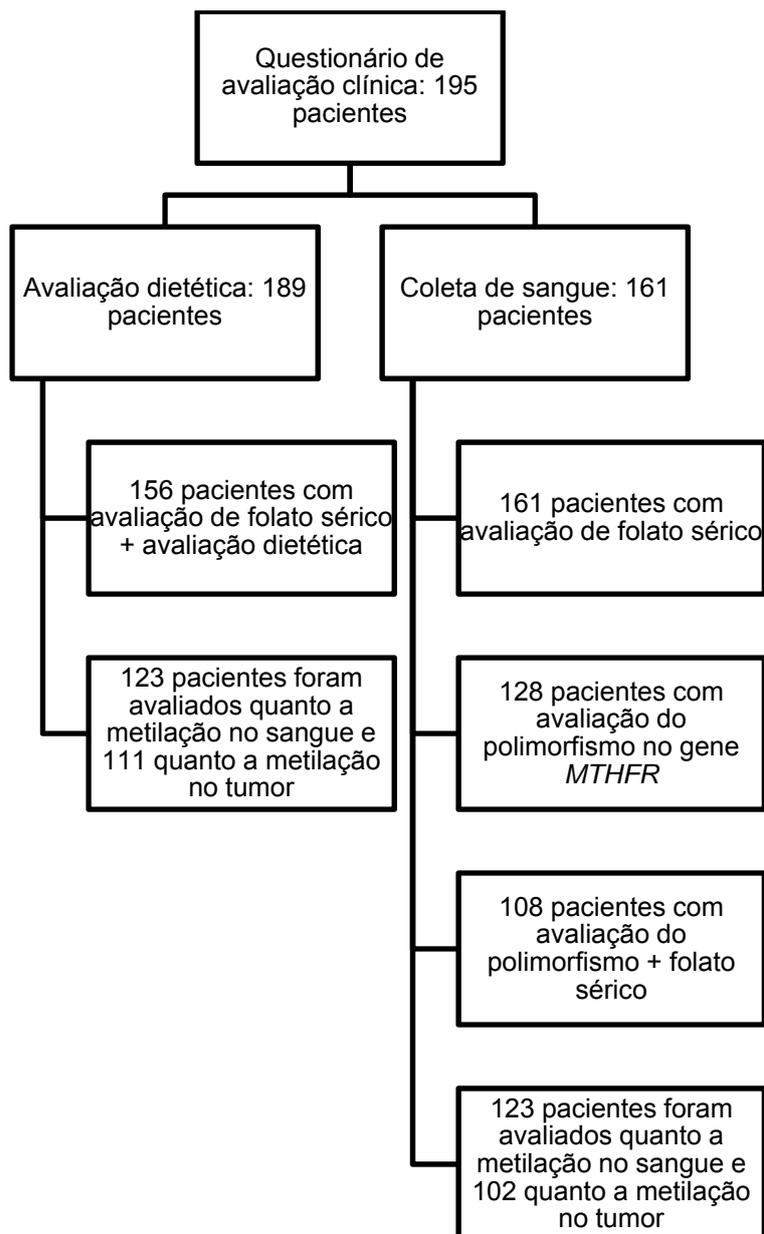


Figura 1 - Fluxograma dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal incluídos no estudo.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente, sob o nº 1861/14 (Anexo 3).

3.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

O questionário de Avaliação Clínica (Anexo 1) abrangeu questões sociodemográficas, história pessoal e familiar de câncer, patologias associadas, hábitos de estilo de vida e ingestão de suplementos de ácido fólico. Para o estadiamento clínico-patológico foi utilizado *Cancer Staging Manual* publicado pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (EDGE et al. 2010). No total, 195 pacientes responderam o questionário de avaliação clínica.

3.5 AVALIAÇÃO DIETÉTICA

Foi realizada a avaliação do consumo habitual de álcool, folato, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, colina, betaína, metionina, energia, carboidrato, proteína e lipídeo utilizando um QFA específico para pacientes com câncer colorretal (LAMEZA 2010). O QFA foi aplicado pela própria pesquisadora e possui 110 itens alimentares os quais foram elaborados baseados no consumo habitual de residentes do município de São Paulo e validados para pacientes com tumores colorretais.

Durante o preenchimento do QFA era questionado ao paciente a frequência de consumo de cada alimento no último ano (de 1 a 10 vezes por dia, semana, mês ou ano) e o tamanho da porção (pequena, média ou grande). Para a tabulação dos dados, a porção selecionada de cada alimento foi multiplicada pela frequência de consumo e dividida pelo número

de dias (1, 7, 30 ou 365 dias). Logo após, esses valores foram convertidos em valores de energia e nutrientes através do *software Nutrition Data System for Research-NDSR* (Nutrition Coordinating Center - NCC 2007) o qual utiliza dados da tabela norte-americana do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture-USDA 2011).

Em relação ao consumo de folato foram calculados, separadamente, o consumo de:

a) Folato natural

Folato presente naturalmente nos alimentos.

b) Folato sintético da dieta

Os valores de folato sintético da dieta foram corrigidos considerando a fortificação mandatória de farinhas de trigo e milho (150 µg de ácido fólico/100 g de farinha) (ANVISA 2002). Além disso, foram consideradas as diferenças na quantidade de adição de ácido fólico nos alimentos fortificados no Brasil, de 150 µg/100 g de farinha, e dos Estados Unidos da América (EUA), de 140 µg/100 g de farinha.

Folato sintético da dieta (µg) = $(150/140) \times$ Quantidade de folato sintético presente no alimento fortificado em µg

c) Folato sintético do suplemento

Ácido fólico ingerido através de suplementação nutricional.

d) Equivalente dietético de folato da dieta (DFE dieta)

Calculado de acordo com a diferença da biodisponibilidade do folato presente naturalmente nos alimentos e o ácido fólico fortificado nos alimentos (1 µg de folato sintético = 1,7 µg de folato) (SUITOR e BAILEY 2000).

$$\text{DFE dieta } (\mu\text{g}) = \text{Quantidade de folato natural presente nos alimentos em } \mu\text{g} + (1,7 \times \text{Quantidade de folato sintético da dieta em } \mu\text{g})$$

e) Equivalente dietético de folato do suplemento (DFE suplemento)

Considerou-se que a cada 1 µg de ácido fólico como suplemento, com o estômago vazio, oferece 2.0 µg de DFE (Dietary Reference Intakes - DRI 1998).

$$\text{DFE suplemento } (\mu\text{g}) = \text{Quantidade de folato sintético do suplemento em } \mu\text{g} \times 2$$

f) Equivalente dietético de folato total (DFE total)

Obtido a partir da soma do DFE da dieta e DFE do suplemento.

Dos 195 pacientes que responderam a avaliação clínica, 189 participaram da avaliação dietética, sendo que 169 apresentavam a ingestão de folato provenientes apenas da dieta e 20 pacientes utilizavam suplementos com ácido fólico.

3.6 DETERMINAÇÃO DO FOLATO SÉRICO

Para a avaliação do folato sérico foi coletado 10 ml de sangue dos pacientes em 4 horas de jejum por punção venosa e no pré-operatório. Para os pacientes candidatos a tratamento neoadjuvante, foram colhidas amostras de sangue periférico antes da radioquimioterapia.

A obtenção do soro foi obtida por método de centrifugação sendo a técnica de imunoenensaio enzimático competitivo utilizada para análise da concentração sérica de ácido fólico (PUFULETE et al. 2003). 161 pacientes realizaram o exame de ácido fólico sérico.

3.7 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE *MTHFR*

As amostras de DNA foram obtidas a partir de sangue periférico e o DNA foi extraído a partir de 8 ml de sangue total (4 ml em cada tubo com EDTA) usando o QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit seguindo as instruções do fabricante. Estes procedimentos foram realizados pelo Banco de Macromoléculas do A.C. Camargo Cancer Center.

Para avaliação dos polimorfismos C677T e A1298C no gene *MTHFR*, as amostras coletadas foram submetidas ao sequenciamento direto (Método de Sanger). O DNA foi amplificado em uma reação contendo 1X GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), 0,25 μ M de cada iniciador (*primer*) e 25 ng de DNA genômico, em um volume final de 20 μ l. As condições da PCR foram: desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 20

segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 1 minuto a 72°C, seguido de extensão final de 72°C por 7 minutos. Os *primers* utilizados para a reação de amplificação e sequenciamento de cada polimorfismo estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - *Primers* utilizados para avaliação dos polimorfismos C677T e A1298C.

Polim.	dbSNP	Éxon	<i>Primer forward</i> (5'-3')	<i>Primer reverse</i> (5'-3')	Tam (pb)
C677T*	rs1801133	4	TGAAGGAGAAGGTGT CTGCGGGA	AGGACGGTGCGGTGA GAGTG	198
A1298C	rs1801131	7	GGCAATTCCTCTTCCC CTG	CTTACCCTTCTCCCTT TGCC	322

Polim. - Polimorfismo

dbSNP - dbSNP database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

Tam - Tamanho do fragmento amplificado

pb = Pares de base

*Para a amplificação do polimorfismo C677T foram utilizados os *primers* descritos por Frosst et al.1995.

Os produtos amplificados foram verificados em gel de agarose 1% corado com Sybr Safe (Invitrogen). Para reação de sequenciamento direto, alíquotas de 5,0 µL dos produtos de PCR foram purificadas com exonuclease I e fosfatase alcalina na proporção de 5 µl de PCR para 1µl de ExoSAP-IT (USB Corporation). A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C, seguida da inativação das enzimas a 80°C por 15 minutos, conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

As reações de sequenciamento foram realizadas com 2,5 µl do produto de PCR purificado, 1 µl de BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), 1,5 µl de tampão e 0,25 µM de cada iniciador específico em um volume final de 10 µl. As reações de sequenciamento foram realizadas

segundo a seguinte ciclagem: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação (95°C por 18 segundos, 55°C por 18 segundos, 60°C por 4 minutos). A precipitação da reação de sequenciamento foi realizada com metodologia baseada em etanol. As amostras foram ressuspensas em 13 µl de formamida, desnaturadas a 95°C por 5 minutos e imediatamente acondicionadas em gelo por 3 minutos. O sequenciamento foi realizado no equipamento ABI3130XL (Applied Biosystems).

As sequências resultantes foram analisadas pelo software CLC Bio e comparadas com a sequência do gene *MTHFR*.

3.8 AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO GLOBAL DO DNA

A metilação global do DNA genômico tumoral e sanguíneo foi avaliada utilizando um teste imunoenzimático (Elisa) para a detecção de anticorpos de citosinas metiladas presentes em determinada amostra. O DNA genômico foi quantificado utilizando Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies). 200 ng de DNA genômico foram utilizados para a reação de quantificação de metilação utilizando o Kit Imprint® Methylated DNA Quantification Kit (MDQ1-96RXN – Sigma), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, foram realizadas as etapas de ligação do DNA à superfície da placa, seguida de múltiplas etapas de lavagem e ligação dos anticorpos de captura e de detecção. Após a reação colorimétrica, a quantidade de DNA metilado presente na amostra é medida pela absorbância (450 nm) de cada amostra

em um espectrofotômetro de placa (SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Reader).

Em cada placa de reação foi realizada uma curva padrão utilizando cinco diluições de um DNA metilado controle fornecido no kit (100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng e 6,25 ng do DNA controle). As amostras dos pacientes foram avaliadas em duplicata, e a média do valor de absorbância de cada duplicata foi utilizado para calcular a quantidade de metilação relativa ao DNA metilado controle, através de um cálculo de regressão linear (considerando as cinco diluições do controle como 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% metiladas).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita através do *software Statistical Analysis System-SAS* versão 9.3 (Statistical Analysis System - SAS 2013). O nível de significância considerado nas análises foi de 5%.

Para a estatística descritiva das variáveis sexo, cor, grau de escolaridade, localização do tumor e estadiamento clínico-patológico foram calculadas frequências absolutas e relativas. Já na descrição dos nutrientes provenientes do QFA, foram calculadas a média, mediana, desvio-padrão, valores máximos e mínimos.

Foi aplicado o teste de Shapiro Wilk para o teste de normalidade dos dados. O Teste de Spearman foi utilizado para verificar a correlação entre o folato sérico e as variáveis dietéticas. Para essa análise foram incluídos 156

pacientes com apenas dieta e 20 pacientes que ingeriam suplementação de ácido fólico. Para as análises que incluíram a avaliação de DFE_dieta, DFE_total, vitamina B2, vitamina B6, metionina, colina, betaína e álcool, esses nutrientes foram divididos em tercís (1º, 2º e 3º tercíl).

Na estatística descritiva dos polimorfismos do gene *MTHFR* foi realizada as frequências genótípicas e alélicas das variáveis C677T e A1298C.

A idade foi categorizada para a análise estatística inferencial, sendo o ponto de corte considerado igual ao valor de sua mediana, ou seja, de 61 anos. A cor foi dividida em amarela, branca e parda/negra. O grau de escolaridade foi agrupado em 3 grupos: até ensino fundamental completo, ensino médio/superior incompleto e superior completo/ Pós-graduação. Em relação ao estadiamento clínico-patológico, os pacientes foram agrupados em 2 grupos: estadiamentos I e II, III e IV. Os polimorfismos do gene *MTHFR* também foram agrupados em genótipos. Para o polimorfismo C677T foram considerados os homozigotos selvagens (CC) e os homozigotos mutados + heterozigotos (TT + CT). Já para o polimorfismo A1298C foram considerados os homozigotos selvagens (AA) e os homozigotos mutados + heterozigotos (CC + AC). O Teste Exato de Fischer e o Teste Qui-Quadrado foram empregados para a comparação dos polimorfismos C677T e A1298C de acordo com as variáveis sociodemográficas e clínicas. Além disso, os polimorfismos também foram divididos em genótipos. Já para avaliar a relação entre os polimorfismos e os níveis plasmáticos de folato foram utilizados os testes Anova e Teste T.

Em relação a metilação global do DNA, foram avaliados os níveis de metilação presente no sangue e no tumor dos pacientes. Foram calculadas a média, mediana, desvio-padrão, valores máximos, mínimos e realizado o Teste T Pareado para definir o nível de semelhança ou diferença entre as duas variáveis. Para a associação da metilação do DNA com as variáveis idade, localização do tumor, estadiamento clínico-patológico e suplementação foi utilizado o Teste T Student. Já para a associação com a cor, grau de escolaridade, polimorfismos, DFE_dieta, DFE_total, vitamina B2, vitamina B6, metionina, colina, betaína e álcool foi utilizado o Teste de ANOVA. Antes de aplicar cada Teste T verificou-se o teste de variâncias. Além disso, caso encontrado diferença significativa entre tratamentos, foi utilizado o Teste de Tukey permite testar qualquer contraste entre duas médias. O Teste de Pearson foi aplicado para avaliar a associação entre folato sérico e metilação global do DNA. Ademais, foi realizado uma análise de covariância com DFE_dieta, estadiamento e folato sérico para investigar a influências dessas variáveis na metilação global do DNA.

4 RESULTADOS

Foram incluídos 189 pacientes no presente estudo. A mediana da idade foi de 61 anos (IQ_{25-75%}: 59.79 – 63.58 anos). Em relação à escolaridade dos pacientes a maioria (38.10%) tinham ensino superior completo ou pós-graduação. Além disso, identificou-se a predominância da cor branca (71.43%) seguida da cor amarela e cor parda ou negra. No atual trabalho, a maioria dos pacientes tinham tumores de cólon e estavam no estadiamento clínico-patológico estadiamentos I e II (Tabela 1).

No que se refere à dieta, a Tabela 2 apresenta os valores das médias, desvios-padrão, valores mínimo e máximo dos nutrientes provenientes do QFA. Dos 189 pacientes analisados, 169 (89.42%) pacientes apresentavam ingestão de folato apenas através da dieta e 20 (10.58%) pacientes ingeriam folato também através de suplementos dietéticos.

Tabela 1 - Distribuição de pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo as características sociodemográficas e clínicas.

Características sociodemográficas e clínicas	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Sexo		
Feminino	93	49.21
Masculino	96	50.79
Cor		
Amarela	35	18.52
Branca	135	71.43
Parda/Negra	19	10.05
Grau de escolaridade		
Até ensino fundamental completo	62	32.80
Ensino médio/Superior incompleto	55	29.10
Superior completo/ Pós-graduação	72	38.10
Localização do tumor		
Cólon	125	66.14
Reto	64	33.86
Estadiamento clínico-patológico		
Não avaliável	3	1.59
I e II	97	51.32
III e IV	89	47.09
Total	189	100

Tabela 2 - Média, DP, mínimo e máximo de nutrientes provenientes do QFA de pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.

Nutrientes QFA (n= 189)	Média	DP	Mínimo	Máximo
Energia (Kcal)	3144.58	1119.22	1120.72	6312.25
Gordura (g)	103.35	40.29	38.48	242.95
Carboidrato (g)	434.48	208.84	69.28	1280.54
Proteína (g)	122.31	50.06	50.29	304.53
Álcool (g)	8.41	21.90	0	214.99
Vitamina B2 (mg)	2.46	0.89	0.78	5.46
Vitamina B6 (mg)	2.95	1.70	0.78	12.28
Vitamina B12 (µg)	7.75	3.90	1.38	22.14
Metionina (g)	2.71	1.22	1.02	7.22
Folato natural (µg)	376.18	167.80	95.59	1075.83
Folato sintético (µg)	146.61	90.52	10.77	549.99
DFE dieta ¹ (µg)	625.43	257.29	116.26	1584.56
Colina (mg)	449.85	184.52	178.73	1140.15
Betaína (mg)	255.58	198.69	23.98	1692.13

QFA - Questionário de frequência alimentar

DP - Desvio-padrão

DFE - Equivalente Dietético de Folato

¹DFE dieta = folato natural + 1.7 x (folato sintético da dieta)

Para avaliar a correlação entre os valores de ingestão de folato e nutrientes envolvidos no ciclo do carbono-1 foi utilizado o teste de correlação de Spearman (Tabela 3). Observa-se uma correlação moderada e significativa entre a ingestão de DFE total e os níveis de folato sérico ($p=0.03$). Não houve correlação entre a dosagem de folato sérico com os demais nutrientes.

Tabela 3 - Coeficiente de correlação de Spearman (rho) do folato sérico com as variáveis dietéticas de pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.

	Folato sérico (ng/ml)		
	n	rho	p
DFE dieta ¹ (µg)	156	0.00	0.96
DFE total ² (µg)	20	0.51	0.03*
Vitamina B2 (mg)	156	0.10	0.17
Vitamina B6 (mg)	156	0.06	0.42
Vitamina B12 (µg)	156	-0.05	0.46
Metionina (g)	156	-0.04	0.57
Colina (mg)	156	0.00	0.95
Betaína (mg)	156	-0.02	0.71
Álcool (g)	156	-0.12	0.12

DFE - Equivalente Dietético de Folato

¹DFE dieta = folato natural + 1.7 x (folato sintético da dieta)

²DFE total = DFE dieta + DFE suplemento

* p<0.05

A Tabela 4 apresenta a frequência genotípica e alélica dos pacientes segundo os polimorfismos no gene *MTHFR*. Para o polimorfismo C677T, as frequências do genótipo homozigoto C e do heterozigoto foram iguais. Já 18.75% dos pacientes eram do genótipo homozigoto T. Em relação ao polimorfismo A1298C, a maioria dos pacientes possuía genótipo homozigoto A (61.72%), e 6.25% tinham genótipo homozigoto C.

As Figuras 2 e 3 apresentam, como exemplo, um cromatograma de um paciente heterozigoto para a mutação CT e AC, respectivamente.

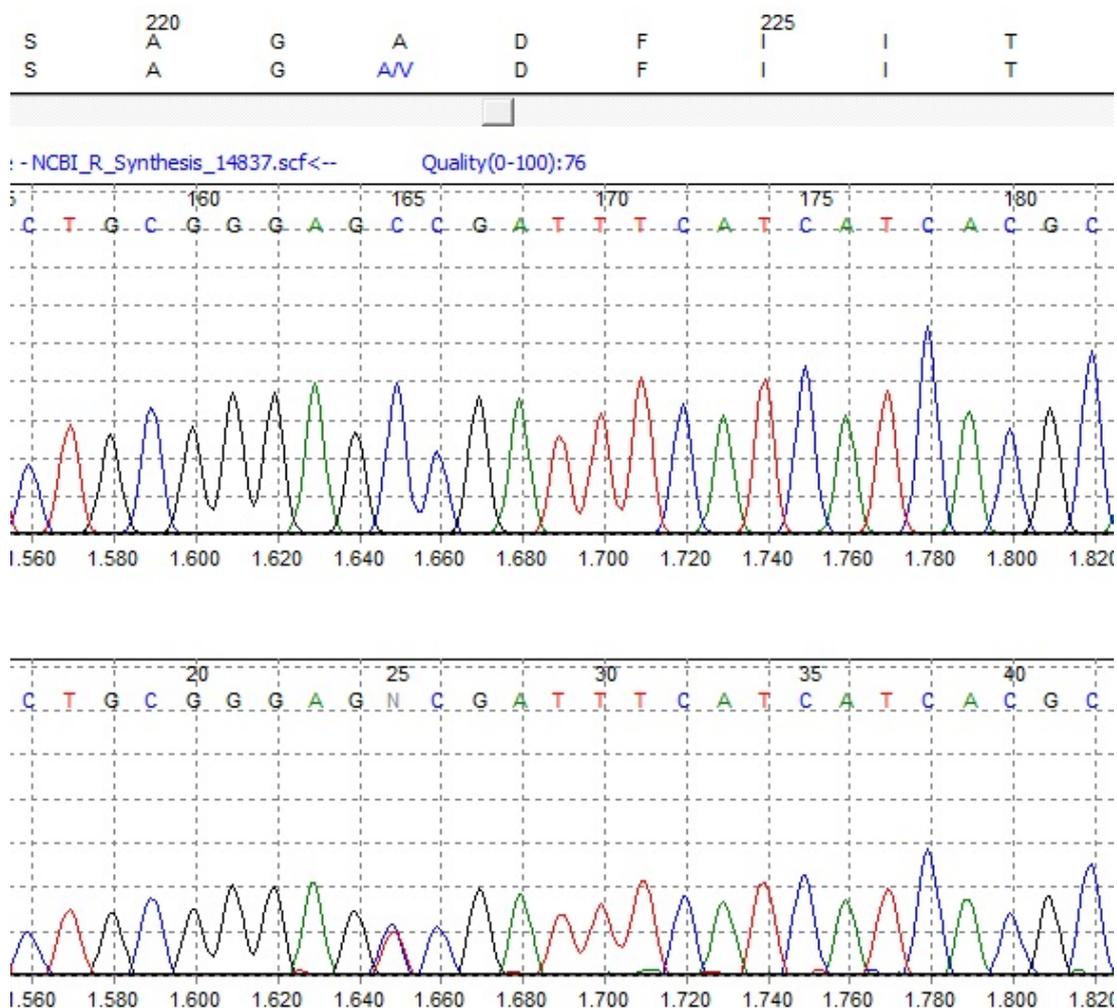


Figura 2 - Cromatograma de um paciente heterozigoto para a mutação (CT), localizado no éxon 4, com alteração do aminoácido na posição 222 de alanina para valina (MTHFR p.A222V).

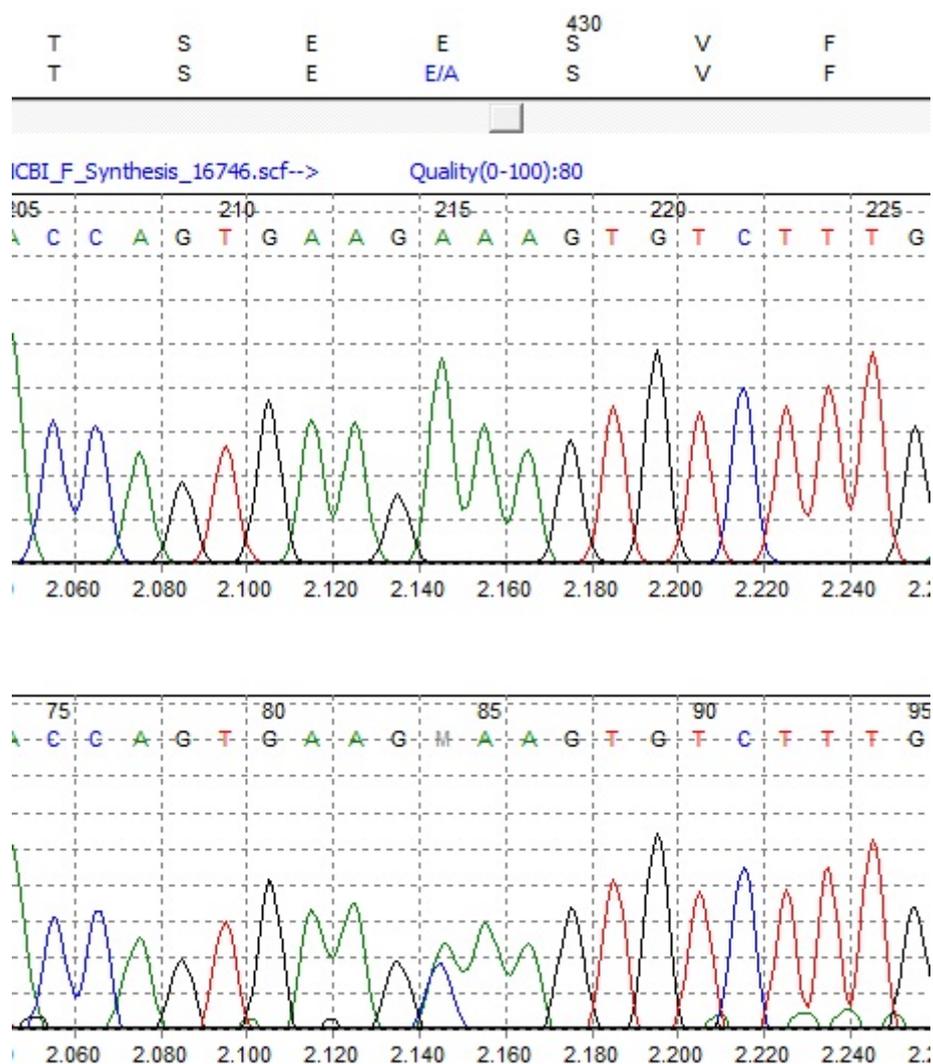


Figura 3 - Cromatograma de um paciente heterozigoto para a mutação (AC), localizado no éxon 7, com alteração do aminoácido na posição 429 de glutamato para alanina (MTHFR p.E429A).

Os polimorfismos do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) não foram associados significativamente com as variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes (Tabelas 5 e 6). Nas Tabelas 7 e 8 é possível verificar que não houve diferença significativa entre os níveis séricos de folato em relação aos diferentes genótipos dos polimorfismos no gene *MTHFR*.

Tabela 4 - Frequência genotípica e alélica dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo os polimorfismos no gene *MTHFR*.

Polimorfismos no gene <i>MTHFR</i>		n	%
C677T			
Frequência genotípica	CC	52	40.63
	CT	52	40.63
	TT	24	18.75
Frequência alélica	C		60.94
	T		39.06
A1298C			
Frequência genotípica	AA	79	61.72
	AC	41	32.03
	CC	8	6.25
Frequência alélica	A		77.73
	C		22.27

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato redutase

Tabela 5 - Teste exato de Fisher para comparação entre a prevalência dos polimorfismos do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) em pacientes pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo características sociodemográficas e clínicas.

		C677T				p	A1298C				p
		n			Total n (%)		n			Total n (%)	
		CC	CT	TT			AA	AC	CC		
Idade	< 61 anos	21	24	9	54 (43.20%)	0.64	35	16	3	54 (43.20%)	0.91
	>= 61 anos	30	26	15	71 (56.80%)		43	23	5	71 (56.80%)	
Cor	Amarela	9	10	5	24 (19.20%)	0.88	19	4	1	24 (19.20%)	0.32
	Branca	36	34	18	88 (70.40%)		50	31	7	88 (70.40%)	
	Parda/Negra	6	6	1	13 (10.40%)		9	4	0	13 (10.40%)	
Grau de escolaridade	Até ensino fundamental completo	17	15	11	43 (34.40%)	0.26	26	14	3	43 (34.40%)	0.89
	Ensino médio/Superior incompleto	19	13	4	36 (28.80%)		21	12	3	36 (28.80%)	
	Superior completo/Pós-graduação	15	22	9	46 (36.80%)		31	13	2	46 (36.80%)	
Localização do tumor	Cólon	38	39	17	94 (75.20%)	0.76	58	29	7	94 (75.20%)	0.88
	Reto	13	11	7	31 (24.80%)		20	10	1	31 (24.80%)	
Estadiamento clínico-patológico	I e II	24	30	14	68 (54.40%)	0.41	46	17	5	68 (54.40%)	0.26
	III e IV	27	20	10	57 (45.60%)		32	22	3	57 (45.60%)	

Tabela 6 - Teste Qui-Quadrado para comparação entre a prevalência dos polimorfismos do gene *MTHFR* agrupados em genótipos homocigoto selvagem e homocigoto mutado+heterocigoto em pacientes pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo características sociodemográficas e clínicas.

		C677T			A1298C				
		n		Total n (%)	p	n		Total n (%)	p
		CC	TT+CT			AA	CC+AC		
Idade	< 61 anos	21	33	54 (43.20%)	0.70	35	19	54 (43.20%)	0.62
	>= 61 anos	30	41	71 (56,80%)		43	28	71 (56,80%)	
Cor	Amarela	9	15	24 (19.20%)	0.87	19	5	24 (19.20%)	0.11
	Branca	36	52	88 (70.40%)		50	38	88 (70.40%)	
	Parda/Negra	6	7	13 (10.40%)		9	4	13 (10.40%)	
Grau de escolaridade	Até ensino fundamental completo	17	26	43 (34.40%)	0.17	26	17	43 (34.40%)	0.66
	Ensino médio/Superior incompleto	19	17	36 (28.80%)		21	15	36 (28.80%)	
	Superior completo/Pós-graduação	15	31	46 (36.80%)		31	15	46 (36.80%)	
Localização do tumor	Cólon	38	56	94 (75.20%)	0.88	58	36	94 (75.20%)	0.77
	Reto	13	18	31 (24.80%)		20	11	31 (24.80%)	
Estadiamento clínico-patológico	I e II	24	44	68 (54.40%)	0.17	46	22	68 (54.40%)	0.18
	III e IV	27	30	57 (45.60%)		32	25	57 (45.60%)	

Tabela 7 - Teste de Anova para comparação dos níveis séricos de folato de acordo com os polimorfismos do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) em pacientes pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo características sociodemográficas e clínicas.

Polimorfismos no gene <i>MTHFR</i>	Folato sérico		
	n	Média (DP)	p
Polimorfismos C677T			
CC	45	13.31 (±6.05)	0.27
CT	43	11.82 (±5.92)	
TT	20	10.97 (±5.76)	
Polimorfismos A1298C			
AA	70	12.17 (±5.81)	0.96
AC	31	12.45 (±6.39)	
CC	7	12.59 (±6.44)	

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato redutase

DP – Desvio-padrão

Tabela 8 - Teste T para comparação dos níveis séricos de folato de acordo com os polimorfismos do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) agrupados em genótipos homocigoto selvagem e homocigoto mutado+heterocigoto em pacientes pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal segundo características sociodemográficas e clínicas.

Polimorfismos no gene <i>MTHFR</i>	Folato sérico		
	n	Média (DP)	p
Polimorfismos C677T			
CC	45	13.31 (±6.05)	0.13
TT + CT	63	11.55 (±5.83)	
Polimorfismos A1298C			
AA	70	12.17 (±5.18)	0.80
CC + AC	38	12.48 (±6.31)	

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato redutase

DP – Desvio-padrão

Em relação à metilação global do DNA, a Tabela 9 apresenta os valores das médias, desvios-padrão, valores mínimo e máximo. A média dos níveis de metilação do DNA encontrada nos tumores foi significativamente maior do que a média dos níveis de metilação no sangue ($p=0.00$).

Tabela 9 - Média, DP, mínimo e máximo dos níveis de metilação global do DNA no tumor e sangue dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.

Metilação global do DNA	n	Média	DP	Mínimo	Máximo	p
Tumor (%)	111	51.87	24.21	21.25	147.35	0.00*
Sangue (%)	123	27.06	19.00	8.28	182.92	

DP - Desvio-padrão

* $p<0.05$

A Tabela 10 apresenta a associação entre as variáveis sociodemográficas com a metilação global do DNA no tumor e no sangue dos pacientes. Nota-se que os pacientes com idade igual ou superior a 61 anos apresentavam níveis de metilação global do DNA no tumor maior quando comparados aos indivíduos com idade menor que 61 anos ($p=0.01$).

Tabela 10 - Associação entre os níveis de metilação global do DNA com as variáveis sociodemográficas dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.

Variáveis sociodemográficas	Metilação global do DNA no tumor (%)			Metilação global do DNA no sangue (%)		
	n	Média (DP)	p	n	Média (DP)	p
Idade	111			123		
< 61 anos	49	46.05 (±17.00)	0.01*	52	28.20 (±23.63)	0.59
>= 61 anos	62	56.47 (±27.95)		71	26.23 (±14.86)	
Cor	111			123		
Amarela	21	61.72 (±32.83)	0.10	24	27.34 (±11.16)	0.35
Branca	79	50.02 (±21.54)		86	28.06 (±21.72)	
Parda/Negra	11	46.35 (±20.021)		13	19.90 (±5.18)	
Grau de escolaridade	111			123		
Até ensino fundamental completo	39	51.84 (±23.23)	0.81	43	24.38 (±9.71)	0.47
Ensino médio/Superior incompleto	33	49.88 (±19.29)		34	27.39 (±18.75)	
Superior completo/Pós-graduação	46	29.33 (±24.92)		39	53.59 (±28.94)	

DP - Desvio-padrão

* p<0.05

Em relação às variáveis clínicas, os pacientes com estadiamento clínico-patológico mais avançado apresentaram níveis significativamente maiores de metilação global no sangue em relação aos pacientes com estadiamento I ou II (p=0.01) (Tabela 11). Também foi verificado se a associação conjunta entre o polimorfismo no gene *MTHFR* C677T e A1298C interferia na metilação do DNA, porém não foi encontrada uma associação significativa. Entretanto, na avaliação do polimorfismo A1298C, quando comparados os genótipos homocigoto selvagem (AA) versus homocigoto mutado + heterocigoto (CC + AC), os pacientes com genótipos homocigoto selvagem apresentaram maiores níveis estatisticamente significativos de

metilação global do DNA no tumor em relação aos pacientes homozigoto mutado + heterozigoto ($p=0.04$).

Tabela 11 - Associação entre os níveis de metilação global do DNA com as variáveis clínicas dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.

Variáveis clínicas	Metilação global do DNA no tumor (%)			Metilação global do DNA no sangue (%)		
	n	Média (DP)	p	n	Média (DP)	p
Localização do tumor	111			123		
Cólon	83	53.12 (± 23.55)	0.35	92	25.60 (± 13.23)	0.30
Reto	28	48.16 (± 26.18)		31	31.39 (± 30.20)	
Estadiamento clínico-patológico	111			123		
I e II	58	50.15 (± 23.49)	0.43	68	23.29 (± 8.17)	0.01*
III e IV	53	53.76 (± 25.07)		55	31.73 (± 26.32)	
Polimorfismos C677T	102			123		
CC	43	53.77 (± 25.21)	0.84	50	27.21 (± 16.15)	0.91
CT	42	51.53 (± 24.35)		49	27.61 (± 24.57)	
TT	17	55.28 (± 25.60)		24	25.62 (± 9.84)	
Polimorfismos A1298C	102			123		
AA	62	56.72 (± 27.42)	0.11	78	27.15 (± 20.27)	0.74
AC	33	49.19 (± 19.69)		37	27.92 (± 18.26)	
CC	7	39.44 (± 11.41)		8	22.19 (± 5.34)	
Polimorfismos C677T	102			123		
CC ^a	43	53.77 (25.21)	0.81	50	27.21 (± 16.15)	0.94
TT + CT ^b	59	52.61 (24.55)		73	26.96 (± 20.84)	
Polimorfismos A1298C	102			123		
AA ^a	62	56.72 (27.42)	0.04*	78	27.15 (± 20.27)	0.94
CC + AC ^b	40	47.48 (18.77)		45	26.90 (± 16.80)	

DP – Desvio-padrão

^a Homozigoto selvagem

^b Homozigoto mutado+heterozigoto

* $p < 0.05$

As Tabelas 12 e 13 descrevem os valores mínimos e máximos de ingestão dietética dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal que foram avaliados segundo a metilação global do DNA no tumor e no sangue, respectivamente. Não foi observada associação significativa entre essas variáveis e a metilação global do DNA (Tabelas 14 e 15). Entretanto, quando avaliada a correlação entre folato sérico e metilação do DNA, foi observada uma correlação fraca, porém significativa positiva entre os níveis plasmáticos de folato com a metilação global do DNA no sangue ($\rho=0.20$ e $p=0.03$) (Tabela 16).

Tabela 12 – Valores mínimos e máximos de ingestão dietética dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal que foram avaliados segundo a metilação global do DNA no tumor.

Variáveis dietéticas	1º tercil		2º tercil		3º tercil	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
DFE dieta ¹ (µg)	116.26	487.38	495.09	654.20	663.72	1584.56
DFE_total ² (µg)	569.46	831.99	837.44	8368.21	8396.01	20382.30
Álcool (g)	0.00	0.13	0.14	3.69	4.03	122.71
Metionina (g)	1.16	2.00	2.02	2.93	2.97	7.22
Vitamina B2 (mg)	0.78	1.99	2.00	2.84	2.89	5.46
Vitamina B6 (mg)	0.78	2.10	2.23	2.99	3.04	12.28
Vitamina B12 (µg)	1.56	5.65	5.70	8.33	8.51	22.14
Colina (mg)	180.49	351.03	354.65	484.39	491.02	999.53
Betaína (mg)	23.98	159.95	163.29	271.48	277.08	1692.13

¹DFE dieta = folato natural + 1.7 x (folato sintético da dieta)

²DFE total = DFE dieta + DFE suplemento

Tabela 13 - Valores mínimos e máximos de ingestão dietética dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal que foram avaliados segundo a metilação global do DNA no sangue.

Variáveis dietéticas	1º tercil		2º tercil		3º tercil	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
DFE dieta ¹ (µg)	116.26	487.38	495.09	654.20	673.37	1584.56
DFE_total ² (µg)	569.46	831.99	837.44	8368.21	8396.01	20382.30
Álcool (g)	0.00	0.13	0.15	3.69	4.03	122.71
Metionina (g)	1.16	2.00	2.02	2.93	2.97	7.22
Vitamina B2 (mg)	0.78	1.97	2.00	2.83	2.84	5.46
Vitamina B6 (mg)	0.78	2.19	2.23	2.99	3.04	12.28
Vitamina B12 (µg)	1.56	5.67	5.70	8.33	8.51	22.14
Colina (mg)	180.49	351.03	354.65	486.35	489.53	1037.25
Betaína (mg)	23.98	159.95	164.49	271.48	283.22	1692.13

¹DFE dieta = folato natural + 1.7 x (folato sintético da dieta)

²DFE total = DFE dieta + DFE suplemento

Tabela 14 - Associação entre os níveis de metilação global do DNA com a ingestão dietética de folato, álcool e metionina dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.

Variáveis dietéticas (folato, álcool e metionina)	Metilação global do DNA no tumor (%)			Metilação global do DNA no sangue (%)		
	n	Média (DP)	p	n	Média (DP)	p
Suplementação	111			123		
Não	99	52.02 (±24.60)	0.85	111	27.13 (±19.89)	0.81
Sim	12	50.68 (±21.65)		12	26.47 (±6.97)	
DFE dieta ¹	111			123		
1º tercil	35	49.82 (±22.36)	0.26	44	32.29 (±28.96)	0.06
2º tercil	40	56.83 (±26.41)		40	24.86 (±9.08)	
3º tercil	36	48.36 (±23.11)		39	23.42 (±8.68)	
DFE_total ²	12			12		
1º tercil	1	34.22	0.71	1	25.44	0.34
2º tercil	5	49.44 (±13.25)		5	30.03 (±7.54)	
3º tercil	6	54.46 (±28.61)		6	23.67 (±6.24)	
Álcool	111			123		
1º tercil	36	51.81 (±22.65)	0.96	37	24.67 (±8.42)	0.64
2º tercil	41	52.54 (±25.46)		46	27.65 (±25.55)	
3º tercil	34	51.13 (±24.97)		40	28.59 (±17.90)	
Metionina	111			123		
1º tercil	34	54.89 (±25.90)	0.65	38	31.59 (±30.76)	0.15
2º tercil	38	51.43 (±26.22)		45	26.49 (±9.80)	
3º tercil	39	49.67 (±20.79)		40	23.40 (±9.48)	

DP – Desvio-padrão

DFE - Equivalente Dietético de Folato

¹DFE dieta = folato natural + 1.7 x (folato sintético da dieta)

²DFE total = DFE dieta + DFE suplemento

Tabela 15 - Associação entre os níveis de metilação global do DNA com a ingestão dietética de nutrientes envolvidos no ciclo do carbono-1 dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.

Variáveis dietéticas	Metilação global do DNA no tumor (%)			Metilação global do DNA no sangue (%)		
	n	Média (DP)	p	n	Média (DP)	p
Vitamina B2	111			123		
1º tercil	36	52.42 (±24.25)		41	28.70 (±17.73)	
2º tercil	33	55.66 (±24.32)	0.43	38	28.31 (±27.14)	0.52
3º tercil	42	48.42 (±24.19)		44	24.46 (±9.35)	
Vitamina B6	111			123		
1º tercil	30	53.60 (±29.67)		40	31.03 (±30.04)	
2º tercil	41	50.26 (±19.86)	0.84	44	27.51 (±10.60)	0.13
3º tercil	40	52.23 (±24.27)		39	22.48 (±8.23)	
Vitamina B12	111			123		
1º tercil	36	53.49 (±26.52)		41	27.34 (±17.52)	
2º tercil	37	52.58 (±24.21)	0.77	42	29.30 (±26.01)	0.50
3º tercil	38	49.65 (±22.35)		40	24.42 (±9.55)	
Colina	111			123		
1º tercil	35	52.02 (±24.86)		40	32.70 (±29.83)	
2º tercil	39	54.19 (±25.69)	0.68	44	23.80 (±8.81)	0.07
3º tercil	37	49.29 (±22.32)		39	24.96 (±10.39)	
Betaína	111			123		
1º tercil	37	49.99 (±18.42)		46	29.07 (±24.89)	
2º tercil	36	53.24 (±27.85)	0.83	40	28.56 (±18.11)	0.28
3º tercil	38	52.41 (±25.95)		37	22.94 (±8.34)	

DP – Desvio-padrão

Tabela 16 - Correlação entre os níveis de metilação global do DNA com os valores plasmáticos de folato dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.

Metilação global do DNA	Folato sérico
No tumor	
Rho	0.12
P	0.23
No sangue	
Rho	0.20
P	0.03*

* $p < 0.05$

Para a avaliação das variáveis preditoras da metilação do DNA foi realizado uma análise de covariância, conforme a Tabela 17. Nota-se que a associação entre a ingestão dietética de folato, folato sérico e estadiamento do tumor foram preditoras da metilação global do DNA no sangue dos pacientes.

Tabela 17 - Modelo de covariância e significância das variáveis predictoras da metilação global do DNA dos pacientes em pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal.

Metilação Global do DNA	p
No tumor	
Modelo (DFE_dieta + folato sérico + estadiamento do tumor)	0.37
DFE_dieta	0.41
Estadiamento do tumor	0.39
Folato sérico	0.24
No sangue	
Modelo (DFE_dieta + folato sérico + estadiamento do tumor)	0.01*
DFE_dieta	0.15
Estadiamento do tumor	0.03*
Folato sérico	0.02*

DFE - Equivalente Dietético de Folato

¹DFE dieta = folato natural + 1.7 x (folato sintético da dieta)

* p<0.05

5 DISCUSSÃO

O CCR esporádico é consequência da acumulação de alterações genéticas e epigenéticas que induzem a conversão de células colônicas normais em adenocarcinoma (SILVA et al. 2013). Por ser uma vitamina envolvida em múltiplos processos bioquímicos, o folato vem sendo estudado como um importante modulador da carcinogênese (KINGSLEY 2010; PROTIVA et al. 2011; ZIEGLER 2012). O ácido fólico é um nutriente essencial para o ciclo do carbono-1, que por vez participa da síntese de nucleotídeos e de reações de metilação no organismo humano (TOMASZEWSKI et al. 2014). No presente trabalho a ingestão de folato foi avaliada separadamente, sendo considerados os valores provenientes da dieta (DFE dieta), provenientes da suplementação através da fortificação e suplementos (DFE suplemento) e o folato proveniente da dieta somado ao suplemento (DFE total). Além disso, para a avaliação do *status* de folato foram considerados os valores de folato sérico, a fim de minimizar as possíveis falhas do QFA (KAAKS et al. 2002).

Em relação ao ácido fólico dietético, STEVENS et al. (2011), enfocam a importância de avaliar a ingestão do DFE total, já que este engloba as diferentes fontes de folato. De fato, no atual estudo foi encontrada uma correlação positiva entre o DFE total e o folato sérico, o que não aconteceu com as demais variáveis do folato (DFE dieta e DFE suplemento). Além da avaliação do *status* de folato, foi investigada a ingestão de vitamina B2,

vitamina B6, vitamina B12, colina, betaína e álcool, partindo do pressuposto que estes nutrientes também fazem parte das inúmeras reações bioquímicas envolvidas no ciclo do carbono-1. Entretanto, quando avaliada a correlação do folato sérico com esses nutrientes não foram encontradas diferenças significativas.

Juntamente com os nutrientes envolvidos no ciclo do carbono-1 a enzima *MTHFR* possui um papel importante durante a síntese, reparo e metilação do DNA, podendo promover alterações nos níveis de folato circulante (FERNÁNDEZ-PERALTA et al. 2010). A *MTHFR* é responsável pela redução do 5,10-MTHFR a 5-MTHF. Esta molécula, por sua vez, é necessária para a produção de metionina e S-adenosilmetionina, principal doador do grupamento metil para o DNA e essencial para a síntese de DNA. Desse modo, um polimorfismo na enzima *MTHFH* pode levar a uma diminuição de sua atividade e, conseqüentemente, uma elevação nos níveis de 5,10-MTHFR (BAILEY 2003).

Apesar que controversos, alguns trabalhos mostram a ação dos polimorfismos da *MTHFR* na sobrevida de pacientes com CCR. AFZAL et al. (2009) em seu estudo analisou 331 pacientes que fizeram quimioterapia com 5-fluorouracil após a ressecção do tumor e não encontrou associação entre polimorfismos no gene *MTHFR* e sobrevida dos pacientes (ALZAL et al. 2009). Entretanto, um estudo realizado por FERNÁNDEZ-PERALTA et al. (2010), mostrou que indivíduos com CCR portadores do alelo *MTHFR* 677T têm um aumento da sensibilidade ao tratamento com 5-fluorouracil e melhor sobrevida após a quimioterapia quando comparados com pacientes com o

genótipo homozigoto CC (FERNÁNDEZ-PERALTA et al. 2010). Segundo JANG et al. (2014), o *status* de folato do organismo pode ter influenciado nos diferentes resultados encontrados nos estudos.

No atual trabalho, o percentual de indivíduos carreadores do genótipo 677TT foi de 18.75% e do genótipo 1298CC de 6.25%. NARAYANAN et al. (2004) realizou um estudo com 199 indivíduos na Escócia e encontrou frequências dos genótipos homozigotos 677TT menores do que as do presente trabalho. As frequências do polimorfismo C677T para o genótipo CC, CT e TT foi de 45.2%, 42.2% e 12.6%, respectivamente. Já para o polimorfismo A1298C para o genótipo AA, AC e CC foram de 46.7%, 38,7% e 14.6%, respectivamente (NARAYANAN et al. 2004). Um estudo realizado no Brasil com 106 amostras de CCR também encontrou um percentual menor de pacientes com genótipo TT, contabilizando um total de 14% dos indivíduos (CLARIZIA et al. 2006). Para o polimorfismo no gene *MTHFR* C677T, a frequência do alelo T de 39.06% do presente trabalho foi maior do que estudos que não foram realizados com neoplasias, como trabalhos feitos no Brasil (CUNHA et al. 2002; PEREZ et al. 2003; ALÉSSIO et al. 2004; BARBOSA et al. 2008) e em estudos realizados fora do país (CHANGO et al. 2000; RUSSO et al. 2003; FILLON-EMERY et al. 2004).

Não foi encontrada associação entre os polimorfismos e os níveis de folato sérico neste trabalho. HANKS et al. (2013), avaliando pacientes sem neoplasias colorretais também não encontrou associação entre o folato sérico e o polimorfismo *MTHFR*. Alguns trabalhos porém, mostram que este

tipo de polimorfismo pode reduzir os níveis séricos de folato (5-MTHFR) (HEAVEY et al. 2004; MEI et al. 2012).

A metilação do DNA é um evento epigenético importante para a expressão genética, manutenção e integridade do DNA (CHOI e MASON 2002; KIM 2004a; ULRICH e POTTER 2006). Em nosso estudo encontramos um percentual de metilação global do DNA significativamente maior no tumor em relação àquela encontrada no sangue dos pacientes. Entretanto, não foi encontrado na literatura trabalhos que comparassem esse tipo de análise.

No presente trabalho, em relação à idade dos pacientes aqueles com idade superior a 61 anos apresentavam níveis de metilação global no tumor maior que os pacientes com idade inferior. Este dado, corrobora com o estudo de WALLACE et al. (2010), o qual avaliou 1000 biópsias de mucosa colorretal normal em 389 pacientes, encontrando um aumento da metilação nas “ilhas CpG” de acordo com o aumento da idade dos indivíduos (WALLACE et al. 2010). Diferentemente, BOLLATI et al. (2009), avaliou a metilação do DNA em 1097 amostras de sangue em 718 indivíduos saudáveis entre 55 e 92 anos e encontrou uma perda progressiva da metilação do DNA em elementos repetitivos ao longo do genoma (BOLLATI et al. 2009).

Em nosso estudo, o polimorfismo no gene *MTHFR* C677T não foi associados significativamente com a metilação do DNA. Diversamente, CASTRO et al. (2004), em seu trabalho com 96 indivíduos saudáveis, mostrou uma menor taxa de metilação nos indivíduos portadores de genótipo TT para o polimorfismo *MTHFR* C677T quando comparados aos

indivíduos com genótipo CC (CASTRO et al. 2004). Além disso, FRISO et al. (2002), encontrou que indivíduos com níveis menores de folato sérico e de genótipo TT tinham uma taxa de metilação menor do que aqueles com baixo folato sérico porém com genótipo CC.

Alguns trabalhos afirmam que baixos níveis de folato associados ao polimorfismo do gene *MTHFR* C677T (genótipo TT) está associado com a hipometilação do DNA (KAUWELL et al. 2000; RAMPERSAUD et al. 2000; FRISO e CHOI 2002). NARAYANAN et al. (2004), em seu estudo não encontrou associação entre o polimorfismo *MTHFR* C677T e a metilação global do DNA, condizendo com nosso trabalho.

Em relação ao polimorfismo *MTHFR* A1298C, os pacientes com genótipos homozigotos mutados associados aos heterozigotos (CC + AC) tiveram menores níveis de metilação global do DNA no tumor em relação aos pacientes com genótipos selvagens (AA). A associação foi fraca porém significativa. Segundo SHARP e LITTLE (2004), os genótipos CC e AC estão associados com a diminuição da enzima MTHFR em menor e maior grau, respectivamente, quando comparados com o genótipo homozigoto selvagem. De fato, alguns trabalhos mostram que esse polimorfismo pode diminuir a atividade da enzima *MTHFR* e levar a um estado de hipometilação do DNA (CHEN et al. 1996; OGINO e WILSON 2003; ZHAO et al. 2013).

Um dado que chamou a atenção foi a associação entre o estadiamento clínico-patológico com a metilação global do DNA no sangue, sendo que os pacientes com estadiamentos mais avançados tiveram maiores níveis de metilação global do DNA . Entretanto, não foi encontrado

na literatura trabalhos que avaliassem tal associação em pacientes pré-tratamento por CCR. Por esse motivo, serão apresentadas apenas algumas hipóteses para esse achado.

Durante décadas o câncer foi atribuído apenas às causas genéticas. Entretanto, sabe-se que fatores epigenéticos podem interferir durante a oncogênese (SARKAR et al. 2013). O termo epigenética refere-se às mudanças herdáveis na expressão gênica, sem que haja alteração na sequência primária de DNA sendo fundamentais para a função celular normal (WOLFFE e GUSCHIN 2000).

A metilação do DNA é considerada o principal processo epigenético envolvido na regulação da expressão gênica. Dentre outras funções, esse evento epigenético atua na regulação gênica, no *imprinting* genômico e em modificações da cromatina (LUO et al. 2014). Consiste na adição de um radical metil no carbono 5 de citosina, geralmente seguida por guanina (dinucleotídeos CG), catalisada por enzimas DNMTs (HUGHES et al. 2012). A distribuição dos grupamentos CpG no genoma é assimétrica, e localizam-se principalmente reunidos em “ilhas CpG” (regiões com alta concentração dos dinucleotídeos CG) (MOJARAD et al. 2013). Cerca de 4% do total de citosinas no DNA estão metilados, sendo que 67.7% das “ilhas CpGs” são metiladas (LISTER et al. 2009).

Estima-se que metade dos genes possuem “ilhas de CpG” em suas regiões promotoras, sendo que são nessas localidades que vários fatores transcricionais se acoplam iniciando assim a produção de RNA mensageiro (RNAm) a partir da sequência de DNA. Desse modo, alterações na região do

promotor podem inativar o gene. Já as regiões com poucos CpGs geralmente estão localizadas em porções intergênicas e intrônicas do genoma (SAXONOV et al. 2006).

A metilação aberrante do DNA vem sendo estudada como uma importante alteração epigenética na neoplasia de cólon e reto. Responsável por uma série de modificações moleculares no DNA e na estrutura da cromatina, influencia em genes que promovem a iniciação e progressão tumoral (LUO et al. 2014; PEASE et al. 2013).

Frequentemente, em células normais as regiões com CpGs distribuídas pelo genoma encontram-se metiladas e as “ilhas CpGs” hipometiladas. A região não metilada apresenta estrutura de cromatina aberta, e transcrição ativa para a regulação gênica (GRADY 2005; JOHNSON e BELSHAW 2008). Um exemplo é a região promotora do gene supressor de tumor, que se encontra hipometilada em células normais (JIA e GUO 2013).

Entretanto, durante o desenvolvimento tumoral, estudos apontam duas alterações epigenéticas importantes. Em primeiro lugar, a hipermetilação de regiões promotoras ricas em dinucleotídeos CG, conduzindo a um silenciamento de genes supressores de tumor (WORTHLEY et al. 2007; LAO e GRADY 2011; HUGHES et al. 2012; NAZEMALHOSSEINI MOJARAD et al. 2013). O mecanismo de silenciamento ocorre, possivelmente, devido a uma falha na ligação de fatores de transcrição e alterações na estrutura da cromatina, já que o DNA metilado recruta complexos de proteínas que promovem a deacetilação das

histonas levando a compactação da cromatina. Assim, a metilação do DNA reprime a transcrição pela inibição da ligação de fatores de transcrição e pelo recrutamento de proteínas que se ligam ao CpG metilado (LUO et al. 2014). O silenciamento de genes supressores tumorais pode promover o início da carcinogênese e a progressão neoplásica através da inibição das vias apoptose e autofagia em células cancerígenas (MAEDA et al. 2006; MENÉNDEZ et al. 2012; SARKAR et al. 2013).

Além disso, sabe-se que quando a molécula de citosina é metilada e convertida em 5-metilcitosina, esta por ser instável pode sofrer desaminação espontânea, sendo convertida em timina. Este tipo de mutação pontual (C-G para T-A) pode influenciar na função dos oncogenes ou dos genes supressores de tumor (MALFOY 2000).

Em segundo lugar, é observado a hipometilação global do DNA, interferindo na estabilidade genômica, na reativação de elementos transponíveis e na perda dos padrões de *imprinting* gênico (PLASS e SOLOWAY 2002; EHRLICH 2002), contribuindo assim para o desenvolvimento tumoral (KULIS e ESTELLER 2010; BARCHITTA et al. 2014; LUO et al. 2014).

Além desses mecanismos, alguns estudos sugerem que alterações nos mecanismos epigenéticos podem influenciar na transição epitélio-mesenquimal, através do silenciamento de integrinas, e, conseqüentemente, na progressão tumoral (PARK et al. 2004; SARKAR et al. 2013). Sabe-se também, que os mecanismos epigenéticos podem interferir nos miRNA, os

quais estão envolvidos com o desenvolvimento e progressão tumoral (LUJAMBIO e ESTELLER 2009).

No presente estudo, os pacientes com estadiamento mais avançados apresentavam maiores níveis de metilação global do DNA quando comparados com pacientes em estadiamentos mais precoces. Já é bem estabelecido que a hipometilação global do DNA é característica frequente e precoce da carcinogênese, sendo elencado com o prognóstico de vários tipos de tumores (WIDSCHWENDTER et al. 2004; COPPEDÈ 2014). Entretanto, não foi encontrado trabalhos que avaliassem os níveis de metilação nos diferentes estadiamentos de câncer colorretal. WEI et al. (2002), avaliou a metilação global do DNA de 19 pacientes em estadiamentos III e IV com carcinoma de ovário. Como resultado, pacientes do grupo com hipermetilação global do DNA foram associados com pior prognóstico e recorrência após tratamento quimioterápico quando comparados com pacientes com menores níveis de metilação ($p < 0.001$). O estudo sugere marcadores epigenéticos para predizer o resultado do tratamento em pacientes com câncer de ovário (WEI et al. 2002). Já Moore e colaboradores realizaram um trabalho caso-controle com câncer de bexiga e não encontraram diferença significativa entre a metilação global do DNA e estadiamento nos diferentes grupos de pacientes (MOORE et al. 2008).

Desse modo, no início da tumorigênese, já é bem estabelecido a presença de hipometilação global do DNA que pode acarretar em instabilidade genômica. Entretanto, como encontrado no presente trabalho, em estadiamentos clínico-patológicos mais avançados, uma das possíveis

hipóteses seria a hipermetilação global do DNA, podendo ser a causa do estadiamento mais avançado ou a consequência do mesmo. Outro ponto importante se diz respeito à metodologia empregada para avaliação da metilação do DNA. Muitos trabalhos analisam a metilação global do DNA em elementos repetitivos tipo LINE-1, metodologia esta diferente da realizada no atual trabalho, o que pode ter influenciado nos resultados diferentes encontrados.

O estadiamento clínico-patológico e os níveis séricos de folato foram variáveis preditoras desse evento epigenético. Entretanto, não foram encontrados outros trabalhos com pacientes em pré-tratamento por CCR que avaliassem essas variáveis como sendo preditoras da metilação global do DNA.

A fortificação dos alimentos com ácido fólico foi implantada em vários países no mundo com o objetivo de prevenir defeitos do tubo neural embrionário e algumas patologias, como as neoplasias (PORCELLI et al. 2011). No Brasil, desde 2004, é obrigatória a fortificação de 150 µg de ácido fólico em farinha de trigo e milho (ANVISA 2002). Já nos EUA e no Canadá, a fortificação obrigatória foi instituída em 1997 e 1998, respectivamente (U.S. Food and Drug Administration 1996). Após a fortificação obrigatória nos EUA e Canadá, observou-se um aumento significativo nos níveis de folato sérico circulante na população em geral (RAY 2004; PFEIFFER et al. 2005, 2007).

Apesar da ação protetora do ácido fólico contra o CCR (GIOVANNUCCI et al. 1998; JACOBS et al. 2001; KIM 2005), alguns trabalhos chamam atenção devido ao seu duplo papel, partindo do

pressuposto que a ingestão de folato, mediante uma lesão pré-neoplásica já estabelecida, pode acelerar o crescimento das células tumorais (GIOVANNUCCI 2002; ULRICH e POTTER 2006, 2007; MASON et al. 2007; KIM 2003, 2004b, 2006, 2007 e 2008; SMITH et al. 2008).

Algumas teorias tentam explicar o duplo papel do ácido fólico durante a carcinogênese colorretal. Em primeiro lugar é importante ressaltar que a ingestão adequada de folato é associada a inúmeros benefícios a saúde, as quais englobam a redução de defeitos do tubo neural, diminuição do risco de doenças cardiovasculares e câncer (ULRICH e POTTER 2006). Entretanto, em indivíduos sem lesão pré ou neoplásicas, a baixa ingestão de folato e os níveis diminuídos de folato sérico vêm sendo associados com o aumento do risco de tumores colorretais (AL-GHNANIEM et al. 2007). O mecanismo pelo qual a deficiência de folato pode levar ao CCR está relacionado à síntese de purinas e timidilato. Assim, níveis adequados são essenciais para a síntese, estabilidade, integridade e reparo adequado do DNA (KIM 2007; MIGHELI e MIGLIORE 2012). Além disso, a deficiência de folato também está associada a instabilidade cromossômica, mudanças na regulação da transcrição, a má incorporação do uracil ao DNA, e a hipometilação dessa molécula (BAILEY e GREGORY 1999; FENECH 2001; CHOI e MASON 2002; LAMPRECHT e LIPKIN 2003; CABELOF et al. 2004).

Entretanto, em células com divisão celular intensa, o ácido fólico parece agir de maneira diferente. Em primeiro lugar, partindo do pressuposto de que lesões pré-neoplásicas ou em células neoplásicas possuem altas taxas de replicação e proliferação, altos níveis de folato poderiam favorecer

a síntese e replicação do DNA através da síntese de nucleotídeos (MIGHELI e MIGLIORE 2012). Desse modo, em células neoplásicas, a deficiência de ácido fólico poderia levar a uma alteração do seu metabolismo e da síntese de DNA, resultando assim na inibição do crescimento do tumor (SONG et al. 2000a; CHOI e MASON 2002) e até a regressão do tumor (CHOI e MASON 2002; KIM 2006).

KIM (2004c), analisando estudos em animais e observações clínicas, enfocou o duplo papel do folato na carcinogênese, mostrando que esse nutriente em doses acima do recomendado pode aumentar a progressão da doença quando já há uma pré-lesão. De fato, alguns autores chamam a atenção em seu trabalho, enfocando que a ingestão de folato acima da recomendação nutricional diária além de não diminuir o risco para o CCR, aumenta o risco de um indivíduo desenvolver esse tipo de tumor e, até mesmo, a recorrência de adenomas (BOLLHEIMER et al. 2005; FIGUEIREDO et al. 2008; LOGAN et al. 2008). A preocupação aumenta quando é lembrado a respeito da fortificação obrigatória de ácido fólico nos alimentos, ação esta a mais importante no campo da nutrição e saúde pública (ROSENBERG 2005).

Entretanto, WOLPIN et al. (2008) avaliou o folato sérico de 301 pacientes com tumores colorretais, com o objetivo de verificar se esse nutriente influencia na progressão dessas neoplasias. Assim como no presente trabalho, os pacientes que consumiam uma maior quantidade de folato dietético e que ingeriam suplementos dietéticos regularmente apresentavam maiores níveis plasmáticos de ácido fólico. Neste trabalho, os

altos níveis séricos de folato não foram associados positivamente com a mortalidade geral ou específico do câncer colorretal (WOLPIN et al. 2008).

Ao contrário, um grande estudo multicêntrico com 1.021 indivíduos com adenomas colorretais ressecados, os quais foram randomizados para receber 1 mg de ácido fólico ou um placebo durante um período de 3 a 5 anos, também mostrou um aumento na recorrência dos adenomas (COLE et al. 2007). A preocupação com o folato também ocorre durante o tratamento quimioterápico. Embora melhore a tolerância à toxicidade causada pelos agentes citotóxicos, evidências apontam que o ácido fólico pode alterar a eficiência dos quimioterápicos e, possivelmente, promover o aumento do tumor (PORCELLI et al. 2011).

Esses mecanismos também foram observados, por exemplo, quando em estudos com modelos animais, a deficiência de ácido fólico antes da presença de focos neoplásicos, aumentou o desenvolvimento e a progressão de adenomas, enquanto a suplementação com esse nutriente suprimiu o desenvolvimento e progressão desses adenomas. Porém, quando a intervenção com folato foi feita após o estabelecimento de lesão pré-neoplásica, a deficiência moderada de folato dietético, além de suprimir o crescimento e progressão do tumor, promoveu a regressão da neoplasia (SONG et al. 2000a e b). Outro trabalho com ratos, conduzido por LINDZON et al. (2009), mostrou que após a suplementação com ácido fólico, o número de focos de criptas aberrantes, a carga tumoral e a proliferação epitelial retal aumentou conforme foi aumentando a quantidade da suplementação.

Além disso, o ácido fólico participaria de um importante evento epigenético, a metilação do DNA, resultando em alteração da expressão gênica de proto-oncogenes e genes supressores de tumor (LARSSON et al. 2006; KIM 2007; DUTHIE 2011). Assim como no presente trabalho, outros estudos observaram que o status de folato interferem nos níveis de metilação do DNA (KIM et al. 2001; ROSS 2003; PUFULETE et al. 2003; KIM 2004a).

Segundo GHAVIFEKR FAKHR et al. (2013), a metilação aberrante de “ilhas CpG” pode ser considerado um importante fator de proliferação de células tumorais, levando a um silenciamento de genes supressores tumorais e moléculas envolvidas na diferenciação celular. A hipermetilação, freqüentemente observado em casos de câncer esporádicos (ESTELLER et al. 2001), é um evento que pode atingir diversos genes simultaneamente, alguns dos quais responsáveis pela gênese e/ou progressão tumoral (ESTELLER et al. 2001; COPPEDÈ 2014). Sabe-se que mais da metade dos CCR apresentaram hipermetilação em pelo menos uma região promotora de genes supressores do tumor (DAPK - gene associado a apoptose ligado a proteína quinase; p16INK4a e p14ARF - genes envolvidos no ciclo celular), genes de reparo (MGMT - O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase; hMLH1 - homólogo humano do MutL bacteriano) (ANACLETO et al. 2005a e b), genes envolvidos na progressão e metástases (TIMP3, CXCL12, ID4 e IRF8) (LAO e GRADY 2011). Alguns estudos, por exemplo, mostram que uma hipermetilação de ilhas CpG, na região promotora do gene, pode levar a perda de MGMT (CAI et al. 2008). Além disso, segundo FERNÁNDEZ-

PERALTA et al. (2010), os mecanismos reparo do DNA podem ser afetados de acordo com o *status* de metilação do DNA e disponibilidade de nucleotídeos.

Desse modo, taxas aumentadas de ácido fólico podem levar a hipermetilação de genes supressores de tumor e outros genes antineoplásicos, inativando-os, e promovendo a progressão tumoral (KIM 2007).

A suplementação com altas doses de ácido fólico é capaz de aumentar a metilação do DNA (KIM et al. 2001; PUFULETE et al. 2005). KIM et al. (2001), realizou um estudo randomizado, onde 20 pacientes com adenomas receberam ou não suplementação de ácido fólico durante 1 ano após a polipectomia. Como resultado encontrou que a suplementação com folato aumentou tanto os níveis de folato sérico quanto o grau de metilação do DNA, sendo este último observado em 6 meses para os pacientes com a suplementação e 1 ano para o grupo placebo (KIM et al. 2001). Um outro estudo semelhante, conduzido por PUFULETE et al. (2005), também concluiu que a suplementação com ácido fólico aumenta os níveis de folato sérico e a metilação do DNA (PUFULETE et al. 2005). Entretanto, segundo CRIDER et al. (2012), estudos que buscam associação entre o status de folato e a metilação global do DNA podem trazer diferentes resultados devido ao desenho do trabalho, tipo de tumor e método de avaliação da metilação global do DNA.

Desse modo, os eventos epigenéticos vêm cada vez mais sendo estudados já que não atingem as informações de genes alterados e,

portanto, são potencialmente reversíveis. A metilação do DNA é considerado o mais importante fenômeno epigenético, pois é essencial para a expressão gênica normal, manutenção e integridade do DNA, modificações cromossômicas bem como para o aparecimento de mutações. Este evento ocorre quando a enzima DNA metil transferase transfere um grupamento metil da molécula de SAM para resíduos de citosina das “ilhas de CpG”.

Na última década, vários estudos em animais e epidemiológicos relatam efeitos benéficos do folato durante a carcinogênese em diferentes órgãos. Entretanto, trabalhos recentes demonstram preocupação devido ao duplo papel que o ácido fólico pode exercer, dependendo da dose e do momento que tal nutriente é ingerido. Em nosso estudo encontramos que os valores de DFE total interferem nos níveis de folato sérico. Além do folato plasmático, a idade e o estadiamento interferem na metilação global do DNA. Além disso, os valores de DFE dieta, folato sérico e estadiamento clínico-patológico foram preditoras da metilação global do DNA no sangue dos pacientes.

Desse modo, o presente estudo encontrou o consumo de ácido fólico e o estadiamento clínico-patológico como preditores da metilação global do DNA. Apesar do presente trabalho não ter sido desenhado para avaliar a metilação do DNA como um biomarcador de metástase, os dados aqui encontrados podem estimular investigações posteriores que visem conhecer melhor essa associação e a metilação do DNA como um potencial biomarcador da progressão tumoral.

6 CONCLUSÃO

Com base nos objetivos do presente estudo foi possível concluir que:

- Não houve associação entre os polimorfismos no gene *MTHFR* C677T e A1298C e os níveis de folato sérico;
- Na avaliação do polimorfismo A1298C os pacientes com genótipos homozigoto selvagem apresentaram maiores níveis estatisticamente significativos de metilação global do DNA no tumor quando comparados com os pacientes homozigotos mutado + heterozigoto;
- Os níveis séricos de folato tiveram correlação fraca, porém significativa, com a metilação global do DNA no sangue;
- Os níveis plasmáticos de folato tiveram correlação moderada e significativa com os valores de DFE total;
- Não houve correlação entre os valores de folato sérico com a ingestão dietética de vitamina B2, B6, B12, metionina, colina, betaína ou álcool;
- Não houve associação entre os polimorfismos no gene *MTHFR* C677T e A1298C com as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes (idade, cor, grau de escolaridade, localização do tumor e estadiamento clínico-patológico);
- A média dos níveis de metilação global do DNA nos tumores foi significativamente maior do que a média no sangue;

- Os pacientes com idade igual ou superior a 61 anos apresentavam níveis de metilação global do DNA no tumor maior que os pacientes com idade inferior;
- Não houve diferença significativa entre a metilação global do DNA e cor, grau de escolaridade e localização do tumor;
- Os pacientes com estadiamento clínico-patológico III e IV tiveram níveis de metilação global de DNA no sangue significativamente maior do que os pacientes com a doença menos avançada;
- Não houve correlação das variáveis dietéticas com os níveis de metilação global do DNA;
- As variáveis de ingestão dietética de DFE dieta, folato sérico e estadiamento clínico-patológico foram preditoras da metilação global do DNA no sangue dos pacientes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n°. 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante no anexo desta resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 dez 2002. Disponível em: <URL:http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/344_02rdc.htm> [2012 maio 12].

[DRI]. **Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline**. 1998. Available from: <<http://fnic.nal.usda.gov/dietary-guidance/dri-reports/thiamin-riboflavin-niacin-vitamin-b6-folate-vitamin-b12-pantothenic>> [2014 maio 12].

Afman LA, Van Der Put NM, Thomas CM, Trijbels JM, Blom HJ. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. **QJM** 2001; 94:159-66.

Afzal S, Jensen SA, Vainer B, et al. *MTHFR* polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. **Ann Oncol** 2009; 20:1660-6.

Aléssio AC, Annichino-Bizzacchi JM, Bydlowski SP, Eberlin MN, Vellasco AP, Höehr NF. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. **Am J Med Genet A** 2004; 128A:256-60.

Al-Ghnaniem R, Peters J, Foresti R, Heaton N, Pufulete M. Methylation of estrogen receptor alpha and mutL homolog 1 in normal colonic mucosa: association with folate and vitamin B-12 status in subjects with and without colorectal neoplasia. **Am J Clin Nutr** 2007; 86:1064-72.

Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. **J Gastroenterol Hepatol** 2012; 27:1423-31.

Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M, Melino G. Serine and glycine metabolism in cancer. **Trends Biochem Sci** 2014; 39:191-8.

Anacleto C, Rossi B, Lopes A, et al. Development and application of a multiplex PCR procedure for the detection of DNA methylation in colorectal cancer. **Oncol Rep** 2005a; 13:325-8.

Anacleto C, Leopoldino AM, Rossi B, et al. Colorectal cancer "methylator phenotype": fact or artifact? **Neoplasia** 2005b; 7:331-5.

Aranceta J, Rodrigo CP. Epidemiologia nutricional de las enfermedades del aparato digestivo. **Rev Bras Nutr Clin** 2002; 17:8-13.

Araújo JR, Gonçalves P, Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. **Nutr Res** 2011; 31:77-87.

Arber N, Eagle CJ, Spicak J, et al. Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. **N Engl J Med** 2006; 355:885-95.

Ashoori M, Saedisomeolia A. Riboflavin (vitamin B2) and oxidative stress: a review. **Br J Nutr** 2014; 20:1-7.

Bailey LB, Gregory JF. Folate metabolism and requirements. **J Nutr** 1999; 129:779-82.

Bailey LB. Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the *MTHFR* 677C->T polymorphism affect cancer risk: intake recommendations. **J Nutr** 2003; 133:3748S-53S.

Barbosa PR, Stabler SP, Trentin R, et al. Evaluation of nutritional and genetic determinants of total homocysteine, methylmalonic acid and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine values in Brazilian childbearing-age women. **Clin Chim Acta** 2008; 388:139-47.

Barchitta M, Quattrocchi A, Maugeri A, Vinciguerra M, Agodi A. LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One** 2014; 9:e109478.

Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, et al. APC Study Investigators. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. **N Engl J Med** 2006; 355:873-84.

Blancquaert D, De Steur H, Gellynck X, Van Der Straeten D. Present and future of folate biofortification of crop plants. **J Exp Bot** 2014; 65:895-906.

Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism: with special references to cardiovascular disease and neural tube defects. **J Inherit Metab Dis** 2011; 34:75-81.

Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. **Lancet Oncol** 2006; 7:149-56.

Bollati V, Schwartz J, Wright R, et al. Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. **Mech Ageing Dev** 2009; 130:234-9.

Bollheimer LC, Buettner R, Kullmann A, Kullmann F. Folate and its preventive potential in colorectal carcinogenesis. How strong is the biological and epidemiological evidence? **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 55:13-36.

Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. **JAMA** 2008; 300:2765-78.

Brennan P, Lewis S, Hashibe M, et al. Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a HuGE review. **Am J Epidemiol** 2004; 159:1-16.

Brito A, Hertrampf E, Olivares M, et al. Folate, vitamin B12 and human health. **Rev Med Chil** 2012; 140:1464-75.

Brustolin S, Giugliani R, Félix TM. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. **Braz J Med Biol Res** 2010; 43:1-7.

Cabelof DC, Raffoul JJ, Nakamura J, Kapoor D, Abdalla H, Heydari AR. Imbalanced base excision repair in response to folate deficiency is accelerated by polymerase beta haploinsufficiency. **J Biol Chem** 2004; 279:36504-13.

Cai G, Xu Y, Lu H, et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic microsatellite and chromosomal-stable colorectal cancers. **Int J Colorectal Dis** 2008; 23:365-73.

Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:579-91.

Campos FG, Waitzberg DL, Habr-Gama A. Influência da dieta na gênese do câncer colorretal. In: Waitzberg DL, editor. **Dieta, nutrição e câncer**. São Paulo: Atheneu; 2004. p.247-52.

Campos FG, Logullo Waitzberg AG, Kiss DR, Waitzberg DL, Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J. Diet and colorectal cancer: current evidence for etiology and prevention. **Nutr Hosp** 2005; 20:18-25.

Castro R, Rivera I, Ravasco P, et al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677C-->T and 1298A-->C mutations are associated with DNA hypomethylation. **J Med Genet** 2004; 41:454-8.

Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:2029-43.

Chan DS, Lau R, Aune D, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. **PLoS One** 2011; 6:e20456.

Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. **Mol Genet Metab** 2000; 70:310-5.

Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. **Cancer Res** 1996; 56:4862-4.

Chen A, Xu J, Johnson AC. Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1. **Oncogene** 2006; 25:278-87.

Chen CC, Sureshbabul M, Chen HW, et al. Curcumin Suppresses Metastasis via Sp-1, FAK Inhibition, and E-Cadherin Upregulation in Colorectal Cancer. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2013; 2013:541695.

Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, et al. Women's Health Initiative Investigators. Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. **N Engl J Med** 2004; 350:991-1004.

Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. **Ann Intern Med** 2004; 140:603-13.

Cho E, Lee JE, Rimm EB, Fuchs CS, Giovannucci EL. Alcohol consumption and the risk of colon cancer by family history of colorectal cancer. **Am J Clin Nutr** 2012; 95:413-9.

Choi SW, Stickel F, Baik HW, Kim YI, Seitz HK, Mason JB. Chronic alcohol consumption induces genomic but not p53-specific DNA hypomethylation in rat colon. **J Nutr** 1999; 129:1945-50.

Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. **J Nutr** 2002; 132:2413S-2418S.

Chong ES. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. **World J Microbiol Biotechnol** 2014; 30:351-74.

Clarizia AD, Bastos-Rodrigues L, Pena HB, et al. Relationship of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with microsatellite instability and promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancer. **Genet Mol Res** 2006; 5:315-22.

Cole BF, Baron JA, Sandler RS, et al. Polyp Prevention Study Group. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. **JAMA** 2007; 297:2351-9.

Coppedè F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: focus on DNA methylation. **Cancer Lett** 2014; 342:238-47.

Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. **Proc Nutr Soc** 2004; 63:49-63.

Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. **Adv Nutr** 2012; 3:21-38.

Crous-Bou M, Rennert G, Cuadras D, et al. Polymorphisms in alcohol metabolism genes ADH1B and ALDH2, alcohol consumption and colorectal cancer. **PLoS One** 2013; 8:e80158.

Cruz-Correa M, Shoskes DA, Sanchez P, et al. Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2006; 4:1035-8.

Cunha AL, Hirata MH, Kim CA, Guerra-Shinohara EM, Nonoyama K, Hirata RD. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the *MTHFR* gene in Brazilian children with neural tube defects. **Clin Chim Acta** 2002; 318:139-43.

Dalamaga M, Karmaniolas K, Papadavid E, Pelekanos N, Sotiropoulos G, Lekka A. Hyperresistinemia is associated with postmenopausal breast cancer. **Menopause** 2013; 20:845-51.

DeMarini DM. Dietary interventions of human carcinogenesis. **Mutat Res** 1998; 400:457-65.

Denipote FG, Trindade EBSM, Burini RC. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arq Gastroenterol** 2010; 7:93-8.

Durko L, Malecka-Panas E. Lifestyle modifications and colorectal cancer. **Curr Colorectal Cancer Rep** 2014; 10:45-54.

Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. **J Inherit Metab Dis** 2011; 34:101-9.

Dyson JK, Rutter MD. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? **World J Gastroenterol** 2012; 18:3839-48.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Colon and rectum; p.143-59.

Eichholzer M, Rohrmann S, Barbir A, et al. Polymorphisms in heterocyclic aromatic amines metabolism-related genes are associated with colorectal adenoma risk. **Int J Mol Epidemiol Genet** 2012; 3:96-106.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene** 2002; 21:5400-13.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res** 2001; 61:3225-9.

Fabris C, Toniutto P, Falletti E, et al. *MTHFR* C677T polymorphism and risk of HCC in patients with liver cirrhosis: role of male gender and alcohol consumption. **Alcohol Clin Exp Res** 2009; 33:102-7.

Felton JS, Knize MG, Wu RW, Colvin ME, Hatch FT, Malfatti MA. Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines. **Mutat Res** 2007; 616:90-4.

Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. **Mutat Res** 2001; 475:57-67.

Fenech M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. **Mutat Res** 2012; 733:21-33.

Fernández-Peralta AM, Daimiel L, Nejda N, Iglesias D, Medina Arana V, González-Aguilera JJ. Association of polymorphisms *MTHFR* C677T and A1298C with risk of colorectal cancer, genetic and epigenetic characteristic of tumors, and response to chemotherapy. **Int J Colorectal Dis** 2010; 25:141-51.

Ferrari A. **Folato e nutrientes envolvidos no ciclo do carbono-1 em pacientes pré-tratamento por adenocarcinoma colorretal em um centro de referência oncológica na região Sudeste do Brasil**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Figueiredo JC, Levine AJ, Grau MV, et al. Colorectal adenomas in a randomized folate trial: the role of baseline dietary and circulating folate levels. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:2625-31.

Fillon-Emery N, Chango A, Mircher C, et al. Homocysteine concentrations in adults with trisomy 21: effect of B vitamins and genetic polymorphisms. **Am J Clin Nutr** 2004; 80:1551-7.

Fischer M, Bacher A. Biosynthesis of vitamin B2: a unique way to assemble a xylene ring. **ChemBiochem** 2011; 12:670-80.

Flossmann E, Rothwell PM. British Doctors Aspirin Trial and the UK-TIA Aspirin Trial. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. **Lancet** 2007; 369:1603-13.

Friso S, Choi SW, Girelli D, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:5606-11.

Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. **J Nutr** 2002; 132:2382S-2387S.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat Genet** 1995; 10:111-3.

Fung TT, Hu FB, Wu K, Chiuve SE, Fuchs CS, Giovannucci E. The Mediterranean and Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diets and colorectal cancer. **Am J Clin Nutr** 2010; 92:1429-35.

Garófolo A, Avesani CM, Camargo KG, et al. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Rev Nutr** 2004; 17:491-505.

Gescher AJ, Sharma RA, Steward WP. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. **Lancet Oncol** 2010; 2:371-9.

Ghavifekr Fakhr M, Farshdousti Hagh M, Shanebandi D, Baradaran B. DNA Methylation Pattern as Important Epigenetic Criterion in Cancer. **Genet Res Int** 2013; 2013:317569.

Ghodke Y, Chopra A, Shintre P, Puranik A, Joshi K, Patwardhan B. Profiling single nucleotide polymorphisms (SNPs) across intracellular folate metabolic pathway in healthy Indians. **Indian J Med Res** 2011; 133:274-9.

Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. **Ann Intern Med** 1998; 129:517-24.

Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. **J Nutr** 2002; 132:2350-5S.

Giovannucci E. Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. **J Womens Health (Larchmt)** 2003; 12:173-82.

Giovannucci E. Epidemiology of vitamin D and colorectal cancer. **Anticancer Agents Med Chem** 2013; 13:11-9.

Gorham ED, Garland CF, Garland FC, et al. Vitamin D and prevention of colorectal cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol** 2005; 97:179-94.

Grady WM. Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer. **Biochem Soc Trans** 2005; 33:684-8.

Gruber K, Puffer B, Kräutler B. Vitamin B12-derivatives-enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. **Chem Soc Rev** 2011; 40:4346-63.

Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. **Curr Diab Rep** 2009; 9:26-32.

Habermann N, Ulrich CM, Lundgreen A, et al. PTGS1, PTGS2, ALOX5, ALOX12, ALOX15, and FLAP SNPs: interaction with fatty acids in colon cancer and rectal cancer. **Genes Nutr** 2013; 8:115-26.

Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Clin Colon Rectal Surg** 2009; 22:191–197.

Hall MN, Chavarro JE, Lee IM, Willett WC, Ma J. A 22-year prospective study of fish, n-3 fatty acid intake, and colorectal cancer risk in men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:1136-43.

Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Aliment Pharmacol Ther** 2008; 27:104-19.

Hanks J, Ayed I, Kukreja N, et al. The association between MTHFR 677C>T genotype and folate status and genomic and gene-specific DNA methylation in the colon of individuals without colorectal neoplasia. **Am J Clin Nutr** 2013; 98:1564-74.

Hayashi I, Sohn KJ, Stempak JM, Croxford R, Kim YI. Folate deficiency induces cell-specific changes in the steady-state transcript levels of genes involved in folate metabolism and 1-carbon transfer reactions in human colonic epithelial cells. **J Nutr** 2007; 137:607-13.

Heavey PM, McKenna D, Rowland IR. Colorectal cancer and the relationship between genes and the environment. **Nutr Cancer** 2004; 48:124-41.

Hellmann H, Mooney S. Vitamin B6: a molecule for human health? **Molecules** 2010; 15:442-59.

Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. **Am J Clin Nutr** 2003; 78:131-6.

Hoey L, McNulty H, Strain JJ. Studies of biomarker responses to intervention with riboflavin: a systematic review. **Am J Clin Nutr** 2009; 89:1960S-80S.

Hoffer LJ. Homocysteine remethylation and trans-sulfuration. **Metabolism** 2004; 53:1480-3.

Hollenbeck CB. An introduction to the nutrition and metabolism of choline. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem** 2012; 12:100-13.

Hughes LA, Khalid-de Bakker CA, Smits KM, et al. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems. **Biochim Biophys Acta** 2012; 1825:77-85.

Hughes R, Magee EA, Bingham S. Protein degradation in large intestine: relevance to colorectal cancer. **Curr Issues Intest Microbiol** 2000; 1:51-8.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. personal habits and indoor combustions: a review of human carcinogens**. Lyon: IARC Press; 2012.

Jacobs EJ, Connell CJ, Patel AV, et al. Multivitamin use and colon cancer mortality in the Cancer Prevention Study II cohort (United States). **Cancer Causes Control** 2001; 12:927-34.

Jang MJ, Kim JW, Jeon YJ, et al. Polymorphisms of folate metabolism-related genes and survival of patients with colorectal cancer in the Korean population. **Gene** 2014; 533:558-64.

Jia Y, Guo M. Epigenetic changes in colorectal cancer. **Chin J Cancer** 2013; 32:21-30.

Johnson IT, Belshaw NJ. Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. **Food Chem Toxicol** 2008; 46:1346-59.

Kaaks R, Ferrari P, Ciampi A, Plummer M, Riboli E. Uses and limitations of statistical accounting for random error correlations, in the validation of dietary questionnaire assessments. **Public Health Nutr** 2002; 5:969-76.

Karabacak E, Aydin E, Ozcan O, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677C>T gene polymorphism as a possible factor for reducing clinical severity of psoriasis. **Int J Clin Exp Med** 2014; 7:697-702.

Kauwell GP, Wilsky CE, Cerda JJ, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation (677C-->T) negatively influences plasma homocysteine response to marginal folate intake in elderly women. **Metabolism** 2000; 49:1440-3.

Kim J, Cho YA, Kim DH, et al. Dietary intake of folate and alcohol, *MTHFR* C677T polymorphism, and colorectal cancer risk in Korea. **Am J Clin Nutr** 2012; 95:405-12.

Kim S, Sandler DP, Galanko J, Martin C, Sandler RS. Intake of polyunsaturated fatty acids and distal large bowel cancer risk in whites and African Americans. **Am J Epidemiol** 2010; 171:969-79.

Kim YI, Baik HW, Fawaz K, et al. Effects of folate supplementation on two provisional molecular markers of colon cancer: a prospective, randomized trial. **Am J Gastroenterol** 2001; 96:184-95.

Kim YI. Role of folate in colon cancer development and progression. **J Nutr** 2003; 133(Suppl 1):3731S-9S.

Kim YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2004a; 13:511-9.

Kim YI. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? **Am J Clin Nutr** 2004b; 80:1123-8.

Kim YI. Folate, colorectal carcinogenesis, and DNA methylation: lessons from animal studies. **Environ Mol Mutagen** 2004c; 44:10-25.

Kim YI. Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. **J Nutr** 2005; 135:2703-9.

Kim YI. Folate: a magic bullet or a double edged sword for colorectal cancer prevention? **Gut** 2006; 55:1387-9.

Kim YI. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. **Mol Nutr Food Res** 2007; 51:267-92.

Kim YI. Folic acid supplementation and cancer risk: point. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:2220-5.

Kimura Y, Kono S, Toyomura K, et al. Meat, fish and fat intake in relation to subsite-specific risk of colorectal cancer: The Fukuoka Colorectal Cancer Study. **Cancer Sci** 2007; 98:590-7.

Kingsley K. Potential effects of dietary folate supplementation on oral carcinogenesis, development and progression. **J Diet Suppl** 2010; 7:51-9.

Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. **Clin Chem** 2000; 46:1277-83.

Konings EJ, Committee on Food Nutrition. Water-soluble vitamins. **J AOAC Int** 2006; 89:285-8.

Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. **Adv Genet** 2010; 70:27-56.

Kumor A, Daniel P, Pietruczuk M, Małecką-Panas E. Serum leptin, adiponectin, and resistin concentration in colorectal adenoma and carcinoma (CC) patients. **Int J Colorectal Dis** 2009; 24:275-81.

Laanpere M, Altmäe S, Stavreus-Evers A, Nilsson TK, Yngve A, Salumets A. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. **Nutr Rev** 2010; 68:99-113.

Lameza MMS. **Validação de questionário de frequência alimentar para pacientes tratados de câncer colorretal**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:601-14.

Lanas A, Baron JA, Sandler RS, et al. Peptic ulcer and bleeding events associated with rofecoxib in a 3-year colorectal adenoma chemoprevention trial. **Gastroenterology** 2007; 132:490-7.

Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 2011; 8:686-700.

Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate intake, *MTHFR* polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis. **Gastroenterology** 2006; 131:1271-83.

Lee JE, Chan AT. Fruit, vegetables, and folate: cultivating the evidence for cancer prevention. **Gastroenterology** 2011; 141:16-20.

Leklem JE. Vitamina B₆. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editores. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. São Paulo: Manole; 2003. p.439-48.

Li Y, Yang H, Cao J. Association between alcohol consumption and cancers in the Chinese population--a systematic review and meta-analysis. **PLoS One** 2011; 6:e18776.

Lima JA, Catharino RR, Godoy HT. Folatos em vegetais: importância, efeito do processamento e biodisponibilidade. **Alim Nutr** 2003; 14:123-9.

Lindzon GM, Medline A, Sohn KJ, Depeint F, Croxford R, Kim YI. Effect of folic acid supplementation on the progression of colorectal aberrant crypt foci. **Carcinogenesis** 2009; 30:1536-43.

Link A, Balaguer F, Shen Y, et al. Curcumin modulates DNA methylation in colorectal cancer cells. **PLoS One** 2013; 8:e57709.

Lister R, Pelizzola M, Downen RH, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature** 2009; 462:315-22.

Little J, Sharp L, Duthie S, Narayanan S. Colon cancer and genetic variation in folate metabolism: the clinical bottom line. **J Nutr** 2003; 133:3758S-66S.

Logan RF, Grainge MJ, Shepherd VC, Armitage NC, Muir KR, ukCAP Trial Group. Aspirin and folic acid for the prevention of recurrent colorectal adenomas. **Gastroenterology** 2008; 134:29-38.

Lujambio A, Esteller M. How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs. **Cell Cycle** 2009; 8:377-82.

Luo Y, Yu M, Grady WM. Field cancerization in the colon: a role for aberrant DNA methylation? **Gastroenterol Rep (Oxf)** 2014; 2:16-20.

Lyall MS, Dundas SR, Curran S, et al. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2006; 12:1184-91.

MacFarlane AJ, Perry CA, Girnary HH, et al. Mthfd1 is an essential gene in mice and alters biomarkers of impaired one-carbon metabolism. **J Biol Chem** 2009; 284:1533-9.

Maeda O, Ando T, Watanabe O, et al. DNA hypermethylation in colorectal neoplasms and inflammatory bowel disease: a mini review. **Inflammopharmacology** 2006; 14:204-6.

Malfroy B. The revival of DNA methylation. **J Cell Sci** 2000; 113:3887-8.

Martinez ME, Giovannucci E, Spiegelman D, Hunter DJ, Willett WC, Colditz GA. Leisure-time physical activity, body size, and colon cancer in women. Nurses'Health Study Research Group. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:948-55.

Martinez ME, Marshall JR, Giovannucci E. Diet and cancer prevention: the roles of observation and experimentation. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:694-703.

Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, et al. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2007; 16:1325-9.

Mason JB, Choi SW, Liu Z. Other one-carbon micronutrients and age modulate the effects of folate on colorectal carcinogenesis. **Nutr Rev** 2008; 66:S15-7.

McCullough ML, Robertson AS, Rodriguez C, et al. Calcium, vitamin D, dairy products, and risk of colorectal cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort (United States). **Cancer Causes Control** 2003; 14:1-12.

McNulty H, Pentieva K, Hoey L, Ward M. Homocysteine, B-vitamins and CVD. **Proc Nutr Soc** 2008; 67:232-7.

Mei Q, Zhou D, Gao J, et al. The association between *MTHFR* 677C>T polymorphism and cervical cancer: evidence from a meta-analysis. **BMC Cancer** 2012; 12:467.

Mendes ACG, Sá DA, Miranda GMD, Lyra, et al. Assistência pública de saúde no contexto da transição demográfica brasileira: exigências atuais e futuras. **Cad Saúde Pública** 2012; 28:955-64.

Menéndez SP, Villarejo CP, Padilla VD. Epigenética y cáncer colorrectal. **Cirugía Española** 2012; 90:277-283.

Migheli F, Migliore L. Epigenetics of colorectal cancer. **Clin Genet** 2012; 81:312-8.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alecar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. **Jpn J Clin Oncol** 2006; 36:582-97.

Mojarad EN, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench** 2013; 6:120-8.

Molloy AM, Brody LC, Mills JL, Scott JM, Kirke PN. The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of human neural tube defects. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol** 2009; 85:285-94.

Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, et al. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. **Lancet Oncol** 2008; 9:359-66.

Narayanan S, McConnell J, Little J, et al. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2004; 13:1436-43.

Natera J, Massad W, García NA. The role of vitamin B6 as an antioxidant in the presence of vitamin B2-photogenerated reactive oxygen species: a kinetic and mechanistic study. **Photochem Photobiol Sci** 2012; 11:938-45.

Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench** 2013; 6:120-8.

Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. **Gene** 2014; 533:11-20.

Ning Y, Wang L, Giovannucci EL. A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. **Obes Rev** 2010; 11:19-30.

[NCC] Nutrition Coordinating Center. **Nutrition data system for research**. [computer program]. Version 2007. Minneapolis: University of Minnesota; 2007.

Ogino S, Wilson RB. Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. **J Hum Genet** 2003; 48:1-7.

Ohrvik VE, Witthoft CM. Human folate bioavailability. **Nutrients** 2011; 3:475-90.

Oliveira NFP, Planello AC, Andia DC, Pardo APS. Metilação de DNA e câncer. **Rev Bras Cancerol** 2010; 56:493-9.

Olthof MR, Verhoef P. Effects of betaine intake on plasma homocysteine concentrations and consequences for health. **Curr Drug Metab** 2005; 6:15-22.

Otani T, Iwasaki M, Yamamoto S, et al. Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Alcohol consumption, smoking, and subsequent risk of colorectal cancer in middle-aged and elderly Japanese men and women: Japan Public Health Center-based prospective study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2003; 12:1492-500.

Oze I, Matsuo K, Suzuki T, et al. Impact of multiple alcohol dehydrogenase gene polymorphisms on risk of upper aerodigestive tract cancers in a Japanese population. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:3097-102.

Parajuli R, Bjerkaas E, Tverdal A, Le Marchand L, Weiderpass E, Gram IT. Cigarette smoking and colorectal cancer mortality among 602,242 Norwegian males and females. **Clin Epidemiol** 2014; 6:137-45.

Park J, Song SH, Kim TY, et al. Aberrant methylation of integrin alpha4 gene in human gastric cancer cells. **Oncogene** 2004; 23:3474-80.

Pease M, Ling C, Mack WJ, Wang K, Zada G. The role of epigenetic modification in tumorigenesis and progression of pituitary adenomas: a systematic review of the literature. **PLoS One** 2013; 8:e82619.

Pelucchi C, Tramacere I, Boffetta P, Negri E, La Vecchia C. Alcohol consumption and cancer risk. **Nutr Cancer** 2011; 63:983-90.

Perez AB, D'Almeida V, Vergani N, de Oliveira AC, de Lima FT, Brunoni D. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. **Am J Med Genet A** 2003; 119A:20-5.

Pericleous M, Mandair D, Caplin ME. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. **J Gastrointest Oncol** 2013; 4:409-23.

Perla-Kaján J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. **Amino Acids** 2007; 32:561-72.

Peters U, McGlynn KA, Chatterjee N, et al. Vitamin D, calcium, and vitamin D receptor polymorphism in colorectal adenomas. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10:1267-74.

Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. **Am J Clin Nutr** 2005; 82:442-50.

Pfeiffer CM, Johnson CL, Jain RB, et al. Trends in blood folate and vitamin B-12 concentrations in the United States, 1988 2004. **Am J Clin Nutr** 2007; 86:718-27.

Pietrzik K, Bailey L, Shane B. Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate: comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Clin Pharmacokinet** 2010; 49:535-48.

Plass C, Soloway PD. DNA methylation, imprinting and cancer. **Eur J Hum Genet** 2002; 10:6-16.

Porcelli L, Assaraf YG, Azzariti A, Paradiso A, Jansen G, Peters GJ. The impact of folate status on the efficacy of colorectal cancer treatment. **Curr Drug Metab** 2011; 12:975-84.

Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. **Am J Clin Nutr** 2003; 77:1352-60.

Protiva P, Mason JB, Liu Z, et al. Altered folate availability modifies the molecular environment of the human colorectum: implications for colorectal carcinogenesis. **Cancer Prev Res (Phila)** 2011; 4:530-43.

Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Leather AJ, et al. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. **Gastroenterology** 2003; 124:1240-8.

Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Khushal A, et al. Effect of folic acid supplementation on genomic DNA methylation in patients with colorectal adenoma. **Gut** 2005; 54:648-53.

Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. **Science** 2005; 307:1904-9.

Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **J Nutr Biochem** 2007; 18:427-42.

Rampersaud GC, Kauwell GP, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. **Am J Clin Nutr** 2000; 72:998-1003.

Ray JG. Folic acid food fortification in Canada. **Nutr Rev** 2004; 62:S35-9.

Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **Lancet** 2008; 371:569-78.

Rosenberg IH. Science-based micronutrient fortification: which nutrients, how much, and how to know? **Am J Clin Nutr** 2005; 2005:279-80.

Ross SA. Diet and DNA methylation interactions in cancer prevention. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 983:197-207.

Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. **Lancet** 2010; 376:1741-50.

Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. **Lancet** 2011; 377:31-41.

Roy A, Evers SE, Campbell MK. Dietary supplement use and iron, zinc and folate intake in pregnant women in London, Ontario. **Chronic Dis Inj Can** 2012; 32:76-83.

Russo GT, Friso S, Jacques PF, et al; Framingham Offspring Study Cohort. Age and gender affect the relation between methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and fasting plasma homocysteine concentrations in the Framingham Offspring Study Cohort. **J Nutr** 2003; 133:3416-21.

Salvi F, Gadda G. Human choline dehydrogenase: medical promises and biochemical challenges. **Arch Biochem Biophys** 2013; 537:243-52.

Sarkar S, Horn G, Moulton K, et al. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. **Int J Mol Sci** 2013; 14:21087-113.

SAS Institute Inc. **The SAS System, release 9.3**. Cary: NC: SAS Institute Inc; 2013.

Sasazuki S, Inoue M, Iwasaki M, et al; Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group. Intake of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids and development of colorectal cancer by subsite: Japan Public Health Center-based prospective study. **Int J Cancer** 2011; 129:1718-29.

Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103:1412-7.

Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, et al. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. **Mutat Res** 2009; 682:39-53.

Schatzkin A, Lanza E, Corle D, et al. Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. **N Engl J Med** 2000; 342:1149-55.

Scott JM. Folate and vitamin B12. **Proc Nutr Soc** 1999; 58:441-8.

Seitz HK, Simanowski UA, Garzon FT, et al. Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. **Gastroenterology** 1990; 98:406-13.

Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:599-612.

Selhub J. Homocysteine metabolism. **Annu Rev Nutr** 1999; 19:217-46.

Selhub J. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. **J Nutr Health Aging** 2002; 6:39-42.

Selhub J. Public health significance of elevated homocysteine. **Food Nutr Bull** 2008; 29:S116-25.

Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. **Am J Epidemiol** 2004; 159:423-43.

Shimizu N, Nagata C, Shimizu H, et al. Height, weight, and alcohol consumption in relation to the risk of colorectal cancer in Japan: a prospective study. **Br J Cancer** 2003; 88:1038-43.

Shin SY, Yoon H, Ahn S, et al. Structural properties of polyphenols causing cell cycle arrest at G1 phase in HCT116 human colorectal cancer cell lines. **Int J Mol Sci** 2013; 14:16970-85.

Silva TD, Vidigal VM, Felipe AV, et al. DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer. **Oncol Lett** 2013; 6:1687-92.

Smith AD, Kim YI, Refsum H. Is folic acid good for everyone? **Am J Clin Nutr** 2008; 87:517-33.

Smith C, Marks AD, Lieberman M. **Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2007. Tetraidrofolato. vitamina B12 e S-adenosilmetionina; p.732-45.

Song J, Medline A, Mason JB, Gallinger S, Kim YI. Effects of dietary folate on intestinal tumorigenesis in the apcMin mouse. **Cancer Res** 2000a; 60:5434-40.

Song J, Sohn KJ, Medline A, Ash C, Gallinger S, Kim YI. Chemopreventive effects of dietary folate on intestinal polyps in Apc^{+/-}Msh2^{-/-} mice. **Cancer Res** 2000b; 60:3191-9.

Stevens VL, McCullough ML, Sun J, Jacobs EJ, Campbell PT, Gapstur SM. High levels of folate from supplements and fortification are not associated with increased risk of colorectal cancer. **Gastroenterology** 2011; 141:98-105.

Stone WL, Krishnan K, Campbell SE, Palau VE. The role of antioxidants and pro-oxidants in colon cancer. **World J Gastrointest Oncol** 2014; 6:55-66.

Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S. DNA Methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. **Front Oncol** 2014; 4:80.

Suitor CW, Bailey LB. Dietary folate equivalents: interpretation and application. **J Am Diet Assoc** 2000; 100:88-94.

Talaulikar VS, Arulkumaran S. Folic acid in obstetric practice: a review. **Obstet Gynecol Surv** 2011; 66:240-7.

Tanaka T, Tateno Y, Gojobori T. Evolution of vitamin B6 (pyridoxine) metabolism by gain and loss of genes. **Mol Biol Evol** 2005; 22:243-50.

Teixeira Neto F, Silva LMG. Vitaminas. In: Teixeira Neto F, editor. **Nutrição clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p.65-77.

Terry P, Giovannucci E, Michels KB, et al. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:525-33.

Terry P, Baron JA, Bergkvist L, Holmberg L, Wolk A. Dietary calcium and vitamin D intake and risk of colorectal cancer: a prospective cohort study in women. **Nutr Cancer** 2002; 43:39-46.

Theodoratou E, McNeill G, Cetnarskyj R, et al. Dietary fatty acids and colorectal cancer: a case-control study. **Am J Epidemiol** 2007; 166:181-95.

Tomaszewski JJ, Richman EL, Sadetsky N, et al. Impact of folate intake on prostate cancer recurrence following definitive therapy: data from CaPSURE™. **J Urol** 2014; 191:971-6.

Trimmer EE. Methylene tetrahydrofolate reductase: biochemical characterization and medical significance. **Curr Pharm Des** 2013; 19:2574-93.

U.S. Food and Drug Administration. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. Final rule. 21 CFR Parts 136, 137, and 139. **Fed Regist** 1996; 61:8781–807.

Ueland PM, Holm PI, Hustad S. Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. **Clin Chem Lab Med** 2005; 43:1069-75.

Ueland PM. Choline and betaine in health and disease. **J Inherit Metab Dis** 2011; 34:3-15.

Ulrich CM, Bigler J, Bostick R, Fosdick L, Potter JD. Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas. **Cancer Res** 2002; 62:3361-4.

Ulrich CM, Potter JD. Folate and cancer--timing is everything. **JAMA** 2007; 297:2408-9.

Ulrich CM, Potter JD. Folate supplementation: too much of a good thing? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2006; 15:189-93.

van Duijnhoven FJ, Bueno-De-Mesquita HB, Ferrari P, et al. Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **Am J Clin Nutr** 2009; 89:1441-52.

[USDA] United States Department of Agriculture. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference**. 2011. Available from: <URL:<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>> [2012 jan 25].

Vogtmann E, Xiang YB, Li HL, et al. Fruit and vegetable intake and the risk of colorectal cancer: results from the Shanghai Men's Health Study. **Cancer Causes Control** 2013; 24:1935-45.

Wakai K, Hirose K, Matsuo K, et al. Dietary risk factors for colon and rectal cancers: a comparative case-control study. **J Epidemiol** 2006; 16:125-35.

Wallace K, Grau MV, Levine AJ, et al. Association between folate levels and CpG Island hypermethylation in normal colorectal mucosa. **Cancer Prev Res (Phila)** 2010; 3:1552-64.

Wang X, Kuang YY, Hu XT. Advances in epigenetic biomarker research in colorectal cancer. **World J Gastroenterol** 2014; 20:4276-87.

Wang ZJ, Ohnaka K, Morita M, et al. Dietary polyphenols and colorectal cancer risk: the Fukuoka colorectal cancer study. **World J Gastroenterol** 2013; 19:2683-90.

Wei SH, Chen CM, Strathdee G. Methylation microarray analysis of late-stage ovarian carcinomas distinguishes progression-free survival in patients and identifies candidate epigenetic markers. **Clin Cancer Res** 2002; 8:2246-52.

Wei EK, Wolin KY, Colditz GA. Time course of risk factors in cancer etiology and progression. **J Clin Oncol** 2010; 28:4052-7.

Weijenberg MP, Lüchtenborg M, de Goeij AF, et al. Dietary fat and risk of colon and rectal cancer with aberrant MLH1 expression, APC or KRAS genes. **Cancer Causes Control** 2007; 18:865-79.

[WHO] World Health Organization. **Cancer: fact sheet n° 297**. Available from: <URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> [2014 abr 14].

Widschwendter M, Jiang G, Woods C, et al. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. **Cancer Res** 2004; 64:4472-80.

Wolffe AP, Guschin D. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. **J Struct Biol** 2000; 129:102-22.

Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee IM. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. **Br J Cancer** 2009; 100:611-6.

Wolin KY, Yan Y, Colditz GA. Physical activity and risk of colon adenoma: a meta-analysis. **Br J Cancer** 2011; 104:882-5.

Wolpin BM, Wei EK, Ng K, et al. Prediagnostic plasma folate and the risk of death in patients with colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26: 3222-8.

Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. **World J Gastroenterol** 2007; 13:3784-91.

Yang X, Lay F, Han H, Jones PA. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. **Trends Pharmacol Sci** 2010; 31:536-46.

Zacho J, Yazdanyar S, Bojesen SE, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase c.677C>T polymorphism and risk of cancer: cross-sectional and prospective studies and meta-analyses of 75,000 cases and 93,000 controls. **Int J Cancer** 2011; 128:644-52.

Zandonai AP, Sonobe HM, Sawada NO. The dietary risk factors for colorectal cancer related to meat consumption. **Rev Esc Enferm USP** 2012; 46:234-9.

Zhang X, Giovannucci E. Calcium, vitamin D and colorectal cancer chemoprevention. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2011; 25:485-94.

Zhao J, Zhu Y, Wang PP, et al. Interaction between alcohol drinking and obesity in relation to colorectal cancer risk: a case-control study in Newfoundland and Labrador, Canada. **BMC Public Health** 2012; 12:94.

Zhao M, Li X, Xing C, Zhou B. Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms with colorectal cancer risk: A meta-analysis. **Biomed Rep** 2013; 1:781-91.

Zhong X, Fang YJ, Pan ZZ, et al. Dietary fiber and fiber fraction intakes and colorectal cancer risk in Chinese adults. **Nutr Cancer** 2014; 66:351-61.

Zhu B, Xiahou Z, Zhao H, Peng B, Zhao H, Xu X. *MTHFR* promotes heterochromatin maintenance. **Biochem Biophys Res Commun** 2014; 447:702-6.

Ziegler RG. Following up folate and its function in colorectal carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst** 2012; 104:1525-7.

Zisman AL, Nickolov A, Brand RE, Gorchow A, Roy HK. Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. **Arch Intern Med** 2006; 166:629-34.

Anexo 1 - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 11 de dezembro de 2012.

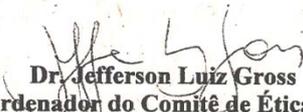
Ao
Dr. Samuel Aguiar Junior.

Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1542/11
“Associação entre ingestão dietética, níveis séricos e eritrocitários de folato com polimorfismo no gene da metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR) em Pacientes portadores carcinoma colorretal.”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/12/2012, tomaram conhecimento e aprovaram do seguinte documento:

- Solicitação de alteração de nível de Mestrado para Doutorado da aluna Ariana Ferrari do estudo em questão, mantendo o título inicial do projeto e justificativas para tal;
- Cronograma de execução do Doutorado (2012 – 2016).

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

São Paulo, 22 de Junho de 2011.

Ao
Dr. Samuel Aguiar Júnior

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1542/11

“Associação entre ingestão dietética, níveis séricos e eritrocitários de folato com polimorfismos no gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em pacientes portadores carcinoma colorretal”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 14/06/2011, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 12/04/2011, aprovaram a realização do estudo em referência, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido datado de 09/05/2011 / 2ª versão, Questionário de Freqüência Alimentar para Pacientes Portadores de Carcinoma Colorretal e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre o Plano de recrutamento dos Sujeitos de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela Obtenção do TCLE;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre a publicação dos dados de pesquisa utilizando amostras fornecidas e processadas pelo Biobanco do Hospital A.C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do Hospital A.C. Camargo;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Núcleo de Tumores Colorretais do Departamento de Cirurgia Pélvica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia Pélvica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: ASSOCIAÇÃO ENTRE INGESTÃO DIETÉTICA, NÍVEIS SÉRICOS DE FOLATO COM AS VITAMINAS ENVOLVIDAS NO CICLO DO CARBONO-1, ÁLCCOL, POLIMORFISMOS NO GENE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR) E METILAÇÃO GLOBAL DO DNA EM PACIENTES SAUDÁVEIS, PORTADORES DE PÓLIPOS ADENOMATOSOS E COM ADENOCARCINOMA COLORRETAL

Você está sendo convidado a participar de um estudo que está sendo realizado no AC Camargo Cancer Center.

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária nesta pesquisa para ajuda-lo a decidir sobre sua participação.

1. O objetivo principal desta pesquisa é estudar a quantidade de uma vitamina chamada folato na sua dieta e a quantidade desta vitamina que circula no sangue. Esse estudo também tem por objetivo verificar se existe associação entre a quantidade de folato, alterações genéticas e a importância na prevenção do câncer de intestino grosso. Outros nutrientes também serão estudados. Por isso é importante a participação de pessoas que estão fazendo um exame preventivo.

2. Caso você aceite participar do estudo, você será entrevistado para uma avaliação do estado nutricional e receberá dois questionários para preencher em casa: um questionário sobre a frequência com que consome os alimentos e um para registro de sua alimentação de três dias. Será agendada uma data para retorno dos questionários. Também serão coletadas 12 ml (1 colher e meia de sopa) de sangue. Uma parte será usada para medir a quantidade de folato circulante e a outra parte será usada para avaliar alterações genéticas chamadas (SNPs) que podem modificar o risco

de desenvolver câncer. Estas alterações podem ser importantes para entender o risco de desenvolver pólipos e câncer de intestino grosso.

3. Esse estudo não altera em nada o seu exame, não há procedimentos adicionais, ou riscos na participação na pesquisa. 4. Caso você decida participar deste estudo e tiver alguma dúvida poderá entrar em contato com a nutricionista Maria Teresa Campos, Paula Araújo ou Ariana Ferrari no telefone 011 2189-5151. Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramais 2069 ou 5020, de segunda-feira à quinta-feira das 7 horas às 18 horas e sexta-feira das 7 horas às 16 horas. 5. Você pode deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo, a qualquer momento. 6. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. 7. Você tem o direito de ficar atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. 8. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre a pesquisa, que foram respondidas, descrevendo o estudo “Associação entre ingestão dietética, níveis séricos de folato com as vitaminas envolvidas no ciclo do carbono-1, álcool, polimorfismos no gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e metilação global do DNA em pacientes saudáveis, portadores de pólipos adenomatosos e com adenocarcinoma colorretal”. Eu discuti com um dos pesquisadores sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e

poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Data / /

Assinatura do paciente/representante legal

Assinatura do pesquisador principal

Anexo 3 - Questionário de Avaliação Clínica

Data																													
Iniciais																													
Prontuário																													
Sexo	() F () M																												
Idade																													
Raça	() Branca () Parda () Negra () Amarela																												
Grau de escolaridade	() Analfabeto () Alfabetizado () Ensino fundamental incompleto () Ensino fundamental completo () Ensino médio incompleto () Ensino médio completo () Superior incompleto () Superior completo () Pós-graduação																												
Renda familiar mensal																													
Antecedentes familiares com câncer	() Não () Sim																												
Patologias associadas	() Não () Doença Inflamatória Intestinal () Outras: _____																												
Tabagismo	() Nunca () No momento não. Parou há _____ () Sim																												
Ingestão de álcool	() Não () Sim. Quantidade: _____g/dia <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Nome</th> <th>Quantidade (mL)</th> <th>% álcool v/v</th> <th>média de gramas de álcool</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Cerveja</td> <td>350</td> <td>4 a 6</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>Vinho branco/tinto</td> <td>100</td> <td>13 a 15</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Gim, Rum, Vodka</td> <td>45</td> <td>35-45</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>Aguardente</td> <td>45</td> <td>30 a 38</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>Uísque</td> <td>45</td> <td>40 a 45</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>Licores</td> <td>30</td> <td>20 a 40</td> <td>7</td> </tr> </tbody> </table>	Nome	Quantidade (mL)	% álcool v/v	média de gramas de álcool	Cerveja	350	4 a 6	13	Vinho branco/tinto	100	13 a 15	10	Gim, Rum, Vodka	45	35-45	16	Aguardente	45	30 a 38	12	Uísque	45	40 a 45	16	Licores	30	20 a 40	7
Nome	Quantidade (mL)	% álcool v/v	média de gramas de álcool																										
Cerveja	350	4 a 6	13																										
Vinho branco/tinto	100	13 a 15	10																										
Gim, Rum, Vodka	45	35-45	16																										
Aguardente	45	30 a 38	12																										
Uísque	45	40 a 45	16																										
Licores	30	20 a 40	7																										
Supl. de ácido fólico	() Não () Sim Qual? _____ Quanto? _____																												
Estadiamento	T N M																												
Nº da Bx																													

Anexo 4 - Questionário de Frequência Alimentar

LEITE E DERIVADOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO	
Leite - tipo: () Integral () desnatado () semi-desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1/2 xícara pequena (60ml) 1 xícara pequena (120ml) 2 xícaras pequenas (240ml)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Iogurte Integral - tipo: () natural () com frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1/2 pote peq. nat. (83g). 1 pote fruta (110g) 1 pote peq. nat. ou 1 1/2 potes fruta (165g) 1 1/2 potes peq. nat. ou 2 potes fruta (230g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Queijo mussarela, prato, parmesão, provolone	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia média (20g) 1 1/2 fatias médias (30g) 2 fatias médias (40g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Queijo minas, ricota	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1/2 fatia média (15g) 1 fatia média (30g) 2 fatias médias (60g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Vitamina de Frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	< 1/2 copo de requeijão (<120ml) 1/2 copo de requeijão (120ml) 1 copo de requeijão (240ml)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G

PÃES, BISCOITOS e COMPLEMENTOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO	
Pão francês e pão de forma	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1/2 unidade ou 1 fatia (25g) 1 unidade ou 2 fatias (50g) 2 unidades ou 4 fatias (100g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Pão Integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia (25g) 2 fatias (50g) 4 fatias (100g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Biscoito sem recheio (doce, salgado)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 unidades (12g) 4 unidades (24g) 6 unidades (36g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Biscoito recheado, waffer, amanteigado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 unidades (20g) 4 unidades (40g) 6 unidades (60g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Bolo Simples	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1/2 fatia média (30g) 1 fatia média (60g) 2 fatias médias (12g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Bolo Recheado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1/2 fatia média (50g) 1 fatia média (100g) 2 fatias médias (200g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Cereal Matinal	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 colheres de sopa cheias (15g) 6 colheres de sopa cheias (30g) 10 colheres de sopa cheias (50g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Avela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 1/2 colheres de sopa cheias (22,5g) 2 1/2 colheres de sopa cheias (37,5g) 4 colheres de sopa cheias (50g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G
Manteiga ou margarina () comum () light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 ponta de faca (7g) 2 pontas de faca (14g) 3 pontas de faca (21g)	<input type="radio"/> P <input type="radio"/> M <input type="radio"/> G