

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ADRIANA GAÍVA MATTOS DALL'OGGIO

**Estudo de associação entre polimorfismo no éxon 1 do
gene *CDKN1B* e câncer colorretal**

CURITIBA
2013

ADRIANA GAÍVA MATTOS DALL'OGLIO

**Estudo de associação entre polimorfismo no éxon 1 do
gene *CDKN1B* e câncer colorretal**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Ciências da Saúde da
Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, como requisito à obtenção ao
título de Mestre.

Orientadora: Dr.^a Vanessa Santos
Sotomaior

Coorientador: Dr. Fábio Rueda Faucz

CURITIBA

2013

Aos meus pais Francisco Salvador e Maria Nazaré, Irmã Cris, vovó Auta e avós,
caros amigos e marido, Marcos Vinicius. E a todos que se beneficiarem no futuro
com este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido que eu trilhasse meu caminho até chegar ao dia de hoje, conseguido a bolsa da Capes, colocando as pessoas e oportunidades na minha vida, me dando força, coragem, discernimento e sabedoria sempre.

Ao Prof. Dr. Fabio Rueda Faucz, inicialmente meu orientador por ter me aceitado como aluna especial, pelas oportunidades, paciência, orientação e por ter me encaminhado neste projeto.

Aos colegas e professores do NIMA, desde os que emprestaram a chave do laboratório para eu tirar cópia e ficar até mais de meia noite no laboratório, seja trabalhando lado a lado, até os que me permitiram errar e aprender auxiliando dia a dia com o seu próprio projeto, em especial as minhas colegas Giane e Dani, Bruna, Sili, e aos que me permitiram ensinar e por em prática os conhecimentos de bancada, em especial à Elke e Carla Frasson.

Gostaria de agradecer especialmente à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Vanessa Santos Sotomaior por ter me aceitado com extrema dedicação, pelos ensinamentos, disposição, paciência e por todos os sábios conselhos e críticas construtivas que resultaram na realização desta dissertação e por ser um exemplo de profissional e caráter a ser seguido, um verdadeiro modelo que me fez crescer em todos os sentidos.

Aos grandes amigos de outras vidas, Reginaldo Carmo, Ana Cristina, Evelyne, Luana, Helena Curvo, Eduardo Vicente, Marly, Ales, Elyssa, minhas irmãs Márcia e Kátia, e mentor pelo carinho e apoio sempre presente e orações.

Aos Doutores da banca e dos seminários Júnior e Sênior Carlos Aita, Salmo Raskin e Lilian Pereira-Ferra, que em muito contribuíram com suas sugestões e correção pontual e impecável, vírgula por vírgula, e que foram de suma importância para o meu projeto e experiência de senso crítico acadêmico.

A toda minha família, em especial a Cida Munhoz, José Benedito, madrinha Eide, avós Auta, Antonio, Jacy e Décio, e minha irmãzinha Cristhiane e aos meus sempre amigos e tutores, Francisco e Maria, pelo amor e apoio incondicional e igualmente ao meu companheiro de todas as horas Marcos Vinicius, pelas orações e sempre esperarem o melhor de mim, sem vocês eu não teria chegado ao fim, meu muito obrigada a todos!

EPÍGRAFE

"Muito obrigado Senhor!
Muito obrigado pelo que me deste.
Muito obrigado pelo que me dás.

Obrigado pelo pão, pela vida, pelo ar, pela paz.
Muito obrigado pela beleza que os meus olhos vêem no altar da natureza.
Olhos que fitam o céu, a terra e o mar
Que acompanham a ave ligeira que corre fagueira pelo céu de anil
E se detém na terra verde, salpicada de flores em tonalidades mil.

Muito obrigado Senhor!
Porque eu posso ver meu amor.
Mas diante da minha visão
Eu detecto cegos guiando na escuridão
que tropeçam na multidão
que choram na solidão.

Por eles eu oro e a ti imploro comiseração
porque eu sei que depois desta vida, na outra vida, eles também enxergarão!

Muito obrigado Senhor!
Pelos ouvidos meus que me foram dados por Deus.
Ouvidos que ouvem o tamborilar da chuva no telheiro
A melodia do vento nos ramos do olmeiro
As lágrimas que vertem os olhos do mundo inteiro!

Ouvidos que ouvem a música do povo que desce do morro na praça a cantar.
A melodia dos imortais, que se houve uma vez e ninguém a esquece nunca mais!
A voz melodiosa, canora, melancólica do boiadeiro.
E a dor que geme e que chora no coração do mundo inteiro!

Pela minha alegria de ouvir, pelos surdos, eu te quero pedir
Porque eu sei
Que depois desta dor, no teu reino de amor, voltarão a sentir!

Obrigado pela minha voz
Mas também pela sua voz
Pela voz que canta
Que ama, que ensina, que alfabetiza,
Que trauteia uma canção
E que o Teu nome profere com sentida emoção!

Diante da minha melodia
Eu quero rogar pelos que sofrem de afazia.
Eles não cantam de noite, eles não falam de dia.
Oro por eles
Porque eu sei, que depois desta prova, na vida nova
Eles cantarão!

Obrigado Senhor!
Pelas minhas mãos
Mas também pelas mãos que aram
Que semeiam, que agasalham.
Mãos de ternura que libertam da amargura
Mãos que apertam mãos
De caridade, de solidariedade
Mãos dos adeuses
Que ficam feridas
Que enxugam lágrimas e dores sofridas!

Pelas mãos de sinfonias, de poesias, de cirurgias, de psicografias!
Pelas mãos que atendem a velhice
A dor
O desamor!
Pelas mãos que no seio embalam o corpo de um filho alheio sem receio!
E pelos pés que me levam a andar, sem reclamar!

Obrigado Senhor!
Porque me posso movimentar.
Diante do meu corpo perfeito
Eu te quero rogar

Porque eu vejo na Terra
Aleijados, amputados, decepados, paralisados, que se não podem movimentar.

Eu oro por eles
Porque eu sei, que depois desta expiação
Na outra reencarnação
Eles também bailarão!

Obrigado por fim, pelo meu Lar.
É tão maravilhoso ter um lar!
Não é importante se este Lar é uma mansão, se é uma favela, uma tapera, um ninho, um
grabato de dor, um bangalô, uma casa do caminho ou seja lá o que for.

Que dentro dele, exista a figura
do amor de mãe, ou de pai
De mulher ou de marido
De filho ou de irmão
A presença de um amigo
A companhia de um cão
Alguém que nos dê a mão!

Mas se eu a ninguém tiver para me amar
Nem um tecto para me agasalhar,
nem uma cama para me deitar
Nem aí reclamarei.
Pelo contrário, eu te direi

Obrigado Senhor!
Porque eu nasci!
Obrigado porque creio em ti
Pelo teu amor, obrigado senhor!"

Poema de Gratidão - Amélia Rodrigues (Divaldo Pereira Franco)

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Conceitos em oncogenética.....	3
1.2 Câncer colorretal.....	5
1.3 Gene <i>CDKN1B</i> e o polimorfismo p.V109G.....	7
2. OBJETIVO	13
3. MÉTODOS	14
3.1 Pacientes e controles.....	14
3.2 Extração de DNA.....	14
3.3 Amplificação e genotipagem.....	14
3.4 Análise de associação.....	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS	24
8. APÊNDICE	33

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) abrange tumores que acometem o cólon, um segmento do intestino grosso e o reto. Mundialmente o CCR é a terceira neoplasia mais incidente no gênero masculino e a segunda no feminino. A etiologia do CCR envolve uma interação complexa de fatores genéticos e ambientais, sendo que em 80% dos casos apresentam-se sob a forma esporádica. O gene *CDKN1B* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) codifica uma proteína inibidora de quinase dependente de ciclina, a p27^{Kip1}, que atua como supressor tumoral e na regulação da proliferação celular. O polimorfismo T/G (rs2066827) que leva à substituição de uma valina por uma glicina na posição 109 da proteína p27^{Kip1}, conhecido como p.V109G, apresenta potencial de alteração funcional desta proteína. Recentemente, estudos sobre a relação entre o polimorfismo p.V109G e o risco de desenvolvimento de diferentes tipos de câncer em diversas populações foram conduzidos, mas nenhum deles até hoje correlacionou o polimorfismo p.V109G ao CCR. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar a associação entre o polimorfismo p.V109G do gene *CDKN1B* e CCR, em uma amostra da população sul-brasileira. As amostras dos pacientes analisados foram obtidas a partir de doadores voluntários atendidos na União Paranaense de Estudo e Combate ao Câncer, em Cascavel, Paraná, de agosto de 2011 até março de 2012, totalizando 50 indivíduos diagnosticados com CCR. Também foram coletadas 293 amostras controles. Todas as amostras foram genotipadas por ARMS-PCR (*amplification refractory mutation system - polymerase chain reaction*). As frequências observadas estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e foram semelhantes entre pacientes e controles ($\chi^2 = 1,281$ e $p = 0,473$). Portanto, não foi observada associação entre o polimorfismo p.V109G (rs2066827) do éxon 1 do gene *CDKN1B* e câncer colorretal, na amostra estudada.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) covers tumors that affect the colon, a segment of the large intestine, and rectum. Worldwide, the CRC is the third most frequent malignancy neoplasia in male and the second one among female. The etiology of CRC involves a complex interaction of genetic and environmental factors, and in 80% of cases they are sporadic. The gene *CDKN1B* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) encodes a protein inhibitor of cyclin-dependent kinase, the p27^{Kip1}, which is a putative tumor suppressor and regulates cell proliferation. A variant T to G (rs2066827) leading to a substitution of a Valin by Glycin in the position 109 in the p27^{Kip1}, known as p.V109G, shows a potential functional alteration in the protein. Recently, studies on the relationship between the p.V109G polymorphism and the risk of development of different types of cancer in several populations have been reported, but none of them linked the polymorphism p.V109G to CCR. In this context, this work aims to study the association between p.V109G polymorphism at *CDKN1B* gene and CCR in a Southern Brazilian sample. Analyzed patient samples were obtained from voluntary blood donors treated at the União Paranaense de Estudo e Combate ao Câncer in Cascavel, Paraná, from August 2011 to March 2012, totalizing 50 individuals diagnosed with CRC. Samples from 293 controls have also been collected. All samples were genotyped by ARMS-PCR (amplification refractory mutation system - polymerase chain reaction). The observed frequencies were at Hardy-Weinberg equilibrium and were similar between patients and controls ($\chi^2 = 1.281$ e $p = 0.473$). Therefore it was not possible to observe association between the polymorphism p.V109G (rs2066827) at exon1 of *CDKN1B* gene and CCR in the studied population.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conceitos em oncogenética

O câncer é uma neoplasia maligna originada por um conjunto de causas, onde o acúmulo de alterações genéticas hereditárias ou adquiridas parece ser fundamental. Caracteriza-se pela proliferação descontrolada de células cujo DNA está mutado e que, por isto, escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular (Volgstein *et al.*, 1988; Wu *et al.*, 2012).

As células tumorais são provenientes de uma única célula na qual o controle do ciclo celular foi perdido e cujas descendentes, eventualmente, também perdem a capacidade de aderência, passando a secretar enzimas que danificam a matriz extracelular, invadindo tecidos vizinhos, penetrando nos vasos sanguíneos e linfáticos, e se espalhando pelo corpo, produzindo tumores secundários ou metástases (Lu *et al.*, 2012).

Inicialmente o termo “tumor” era designado a qualquer aumento de volume de um órgão, sendo que, frequentemente, não passava de uma inflamação. Hoje ele é empregado para designar a proliferação celular anormal, sendo sinônimo de neoplasia – termo mais correto. Atualmente todos os tumores malignos são chamados de câncer, para diferenciar dos benignos – aqueles que não produzem metástase e cujo crescimento não é tão acelerado.

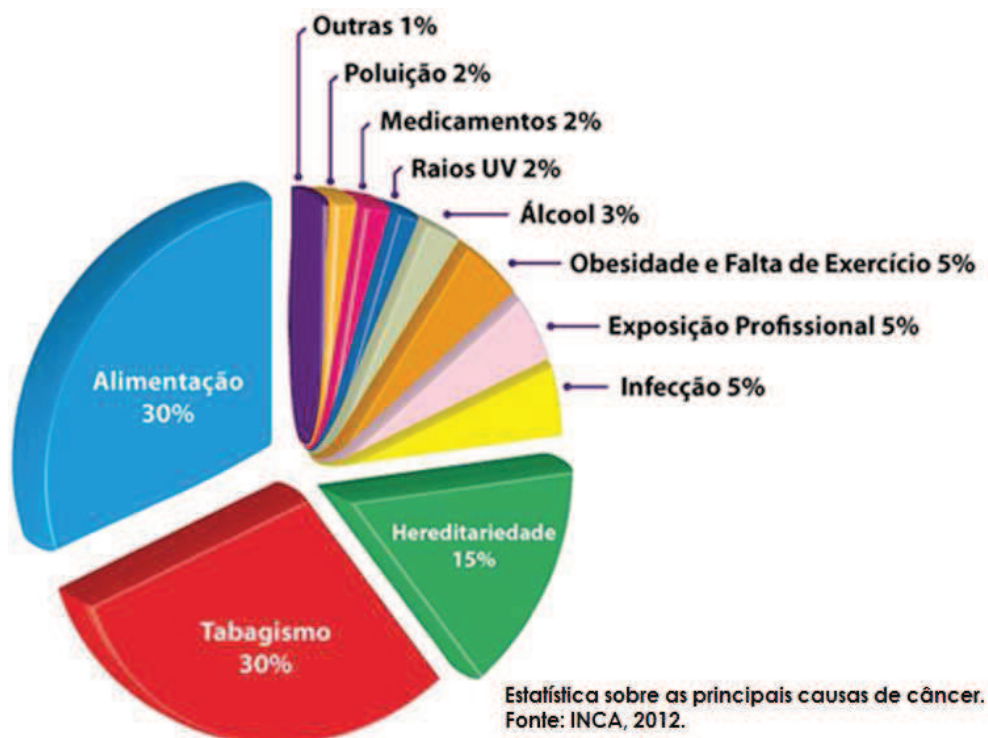
A proliferação de células normais é regulada basicamente por duas categorias de genes: os proto-oncogenes (promotores de crescimento) contrabalançados por genes supressores de tumor, que restringem o crescimento. Mutações que potencializam as atividades dos proto-oncogenes, promovem a sua conversão em oncogenes, os quais aceleram a multiplicação celular resultando no desenvolvimento de tumores. Inversamente, alterações genéticas que inativam genes supressores liberam as células da repressão imposta por estes genes, permitindo a proliferação de células cancerosas (Willis, 2012).

Muitos dos genes supressores tumorais foram inicialmente descritos pela análise de cânceres raros, nos quais a predisposição para desenvolver o câncer segue um padrão dominante de herança. A “Hipótese dos Dois Eventos”, elaborada

por Alfred e Knudson (1971) leva em consideração que duas mutações devem ocorrer, uma em cada alelo do gene envolvido, para desenvolver a doença. Nos tumores onde há uma concentração familiar, uma mutação é herdada da linhagem germinativa e outra mutação, desta vez somática, é adquirida ao longo da vida. Nos tumores esporádicos, as duas mutações são somáticas e adquiridas ao longo da vida. Isso explica como alguns tipos de câncer podem ser tanto esporádicos quanto hereditários, tais como a polipose adenomatosa familiar, o câncer de mama e o retinoblastoma. Essa hipótese esclarece também como algumas doenças hereditárias não se manifestam em todos os indivíduos da família, uma vez que a segunda mutação ocorre ao acaso.

Hoje o câncer é considerado uma doença multifatorial (Gráfico 1), independentemente de ocorrer de forma esporádica ou hereditária, pois a carcinogênese inicia-se com mutações no DNA. Genes envolvidos na apoptose, reparação do DNA e ciclo celular são frequentemente observados no desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres. Alguns tipos familiares podem ser explicados pela presença de mutações em genes específicos; por exemplo, as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* observadas nos cânceres de mama e ovário (Meyer *et al.*, 2010; Fasching *et al.*, 2009).

Gráfico 1. Principais causas do câncer, uma doença multifatorial.



1.2 Câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) abrange tumores que acometem o cólon, um segmento do intestino grosso, e o reto. Mundialmente o CCR é a terceira neoplasia mais incidente no gênero masculino e a segunda no feminino, ocupando o segundo lugar em mortalidade nos EUA (IARC - GLOBOCAN, 2008). No Brasil, a estimativa de novos casos de CCR para o ano de 2014 é de 15.070 em homens e 17.530 em mulheres, totalizando 32.600 novos casos; tendo sido observado aumento consistente da sua taxa de mortalidade ao longo das últimas décadas (INCA, 2014).

O CCR apresenta-se em aproximadamente 95% dos pacientes sob a forma esporádica, de caráter não familiar e resultante da ação cumulativa de agentes carcinógenos sobre a mucosa colorretal. Os 5% restantes possuem componentes genéticos hereditários caracterizados como síndromes de predisposição, que podem ser com ou sem pólipos (Centelles, 2012). As síndromes com pólipos são representadas principalmente pela polipose adenomatosa familiar (PAF), síndrome de Gardner e síndrome de Turcot. A síndrome sem pólipos é representada pelo câncer colorretal hereditário não polipomatoso (HNPCC) ou síndrome de Lynch (Menéndez *et al.*, 2004). Uma observação importante no estudo dos genes envolvidos nas alterações hereditárias é que os mesmos genes não estão envolvidos nos tumores esporádicos (Hoops e Traber, 1997).

A etiologia do CCR envolve uma interação complexa de fatores genéticos e ambientais. O aparecimento do CCR é fruto do acúmulo de mutações genéticas em um determinado clone de células epiteliais do cólon ou reto como resultado de herança ou não, conferindo a esta célula epitelial uma vantagem de proliferação ou mais especificamente uma falta de resposta aos determinantes inter e intracelulares de divisão, diferenciação e morte celular (Vogelstein *et al.*, 1988).

Dos tumores colorretais, 95% são adenocarcinomas (termo derivado de 'adeno', que significa 'pertencente a uma glândula' e 'carcinoma', que descreve um câncer que se desenvolveu em células epiteliais) origina-se inicialmente como um adenoma (um tumor benigno, constituído por tecido glandular) formado a partir de pólipos, que são lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso (Hanahan e Weinberg, 2011).

A sequência adenoma-carcinoma foi descrita pela primeira vez por Morson *et al* (1978). Desde então, tem sido intensamente estudada no intuito de definir

variáveis clínicas e marcadores moleculares de significado prognóstico, que possam identificar grupos de alto e baixo risco e, a partir daí, determinar a terapêutica mais adequada para cada paciente (Chen *et al.*, 2012).

Neste contexto, os sistemas de estadiamento para CCR permitem orientar o plano terapêutico, avaliar seus resultados e definir o prognóstico, baseando-se fundamentalmente em informações sobre a extensão da doença, compreendendo o estudo clínico e o anatomopatológico (Vogelstein *et al.*, 1988; Fearon e Vogelstein, 1990; Hoops e Traber, 1997; Edge *et al.*, 2010).

Atualmente, o sistema mais utilizado é o *Classification of Malignant Tumors* (TNM), proposto pela *American Joint Committee on Cancer* (Tabela 1). A classificação é a mesma para o estadiamento clínico ou patológico. Cânceres invasivos que estão confinados à parede do cólon (estádios I e II) são curáveis, mas se não tratados atingem os linfonodos regionais (estádio III) e evoluem para metástases em órgãos distantes (estádio IV) (Markowitz *et al.*, 2002; Centelles, 2012). Todavia, pacientes com a mesma classificação de estágio podem apresentar quadros de evolução bem distintos (Okuyama *et al.*, 2003).

Segundo Rossoni (2012), os genes que estão mutados em CCR foram inicialmente estudados em indivíduos consanguíneos acometidos por PAF e síndrome de Lynch. Mais tarde, foram estudadas alterações cromossômicas específicas envolvidas no desenvolvimento de pólipos e que continham genes possivelmente envolvidos no processo neoplásico. Recentemente, foram conduzidos estudos moleculares que permitiram observar que os genes implicados no aparecimento do CCR, assim como em outros tipos de câncer, são de quatro categorias: os proto-oncogenes, os genes supressores de tumor, os reparadores do DNA e os “genes modificadores”. Os genes associados com CCR mais estudados são: *APC* (*adenomatous polyposis coli*), *DCC* (*deleted in colorectal carcinoma*), *TP53* (*tumor protein p53*) e *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*). A biologia dos tumores vem sendo intensamente estudada em termos moleculares nas últimas décadas. Eventos genéticos e bioquímicos importantes para a transformação celular do epitélio do cólon em pólipo adenomatoso e, subsequentemente, em câncer estão, pouco a pouco, sendo descobertos e caracterizados.

Tabela 1 - Estadiamento do CCR (adaptado de Edge *et al*, 2010).

Estádio	TNM			
0	Tis	N0	M0	Tis - tumor <i>in situ</i>
				T1 - invasão de submucosa
I	T1	N0	M0	T2 - invasão de muscular própria
	T2	N0	M0	T3 - invasão de serosa ou gordura T4 - invasão de órgãos (continuidade)
II	T3	N0	M0	Tq - qualquer dos T
	T4	N0	M0	N0 - sem metástase linfonodal N1 - 1 a 3 linfonodos comprometidos
III	Tq	N1	M0	N2 - >4 linfonodos comprometidos
	Tq	N2, 3	M0	N3 - linfonodos comprometidos ao longo de grandes vasos M0 - sem metástase à distância
IV	Tq	N	M1	M1 - com metástase à distância

1.3 Gene *CDKN1B* e o polimorfismo p.V109G

O gene *CDKN1B* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) codifica uma proteína inibidora de quinase dependente de ciclina, a p27^{Kip1}. Este gene está localizado em 12p13 e possui 3 éxons (939, 129 e 1333 pb) e 2 íntrons (509 pb e 333 pb).

O *CDKN1B* atua como supressor tumoral e na regulação da proliferação celular (Toyoshima e Hunter, 1994; Polyak *et al.*, 1994; Itamochi *et al.*, 2011), o que foi demonstrado em ratos *knockout* para este gene, os quais apresentavam gigantismo devido ao número aumentado de células e ampliação significativa da tumorigênese, além de anormalidades do timo, retina, hipófise, glândulas adrenais e órgãos gonadais (Kiyokawa *et al.*, 1996). A perda de função de *CDKN1B* também foi associada com uma variedade de doenças malignas, como o câncer de próstata e o carcinoma tireoidiano medular esporádico (Slingerland e Pagano, 2000).

A proteína p27^{Kip1} é conhecida por inibir o complexo ciclina E-CDK2 e evitar a progressão do ciclo celular para a fase S (Sherr e Roberts, 1999; Miskimins *et al.*, 2001; Fearon, 2011). A progressão do ciclo celular é conduzida por quinases dependentes de ciclina (CDKs) que são negativamente reguladas por inibidoras de CDK (CDKIs) (Payton *et al.*, 2006; Starostina, 2012). Em G₀ e início de G₁, os níveis de tradução e estabilidade da proteína p27^{Kip1} são máximos e ela inibe o complexo

ciclina E-CDK2 e regula um ponto específico do ciclo celular de transição entre G₁-S (Sherr e Roberts, 1999; Miskimins *et al.*, 2001; Fearon, 2011). Durante G₁, ocorre uma diminuição progressiva de p27^{Kip1}, o que permite que os complexos ciclina E-CDK2 e ciclina A-CDK2 ativem a proteína retinoblastoma (pRb), responsável pela transcrição de genes necessários para a transição de G₁ para S, e participem do início da replicação do DNA (Nigg, 1993). Por outro lado, a p27^{Kip1} também contribui para a estabilidade do complexo D-Cdk4, permitindo a progressão do ciclo celular para a fase S (Wander *et al.*, 2011).

O inibidor p27^{Kip1} não somente tem a função de controlar a proliferação, funcionando como *checkpoint* entre G₁-S, como também tem a capacidade de regular a migração celular pela via de Rho (Chu, Hengst e Slingerland, 2008). Esta capacidade vem sendo proposta como um dos fatores reguladores de metástase. A perda de p27^{Kip1} pode modificar a adesão intercelular, o que facilitaria a metástase (Croix *et al.*, 1996). Fibroblastos p27^{Kip1}-*null* exibem uma redução dramática de sua motilidade quando comparados às células do tipo selvagem (Besson *et al.*, 2004; Pellegrin e Mellor, 2007).

Os níveis de p27^{Kip1} são regulados por muitas vias de transdução de sinal de forma que sua transcrição, tradução, localização e degradação constituem mecanismos complexos que integram diversos sinais para a decisão final entre proliferação ou saída do ciclo celular (Chu, Hengst e Slingerland, 2008).

Os níveis de RNA mensageiro desta proteína apresentam pouca variação ao longo do ciclo celular, mas podem ser reduzidos de maneira dependente das quinases PI₃K e AKT. Em células normais, os níveis de p27^{Kip1} são regulados por proteólise mediada por ubiquitinação. Durante o início de G₁, mitógenos promovem a fosforilação de p27^{Kip1} (serina 10) para facilitar a sua exportação do núcleo. Ao mesmo tempo, o complexo ciclina E-CDK2 é liberado de sua inibição pela degradação da p27^{Kip1} remanescente no citoplasma. A fosforilação das tirosinas 74, 88 e 89 elimina a ação de p27^{Kip1} sobre E-CDK2 e favorece a fosforilação da treonina 187 da p27^{Kip1} mediada por E-CDK2, o que permite a degradação da p27^{Kip1} promovida por SCF^{SKP2}. A fosforilação (tirosina) de p27^{Kip1} também é necessária para a ativação do complexo p27^{Kip1}-D1-CDK4. Assim, a fosforilação de p27^{Kip1} em sítios específicos por diferentes quinases pode reduzir a sua estabilidade, interferir na sua retenção nuclear e alterar a sua afinidade por seus alvos (Wander *et al.*, 2011).

A concentração mais elevada de proteína p27^{Kip1} é detectada em células quiescentes, mas os níveis desta proteína diminuem durante a fase G₁ e atingem o nível mais baixo na fase S (Slingerland e Pagano, 2000). A superexpressão da p27^{Kip1} impede a transição de G₁ para a fase S, inibindo a proliferação celular. Por outro lado, a sua degradação aumentada pode ser a causa da sua ausência ou redução em certos tumores (Loda *et al.*, 1997).

Em neoplasias humanas, os níveis de p27^{Kip1} podem apresentar-se elevados, como em câncer esofágico (Doki *et al.*, 1997), de mama (Sgambato *et al.*, 1997) e de cólon (Ciaparrone *et al.*, 1998). Porém, mais frequentemente, a síntese de p27^{Kip1} está reduzida (Alkarain e Slingerland, 2004; Molatore *et al.* 2010 e 2012) e sua degradação é acelerada (Loda *et al.*, 1997). A ausência ou baixa expressão desta proteína tem sido apontada como indicador de prognóstico ruim na maioria dos cânceres estudados (Loda *et al.*, 1997; Catzavelos *et al.*, 1997; Esposito *et al.*, 1997; Belluco *et al.*, 1999; Noguchi, 2003; Alkarain e Slingerland, 2004; Galizia *et al.*, 2004; Manne *et al.*, 2004; Prall, 2004; Li *et al.*, 2007; Farley, 2011). Embora alguns estudos não demonstrem um papel significativo do nível desta proteína no prognóstico (Mckay *et al.*, 2002) ou apontem que a perda de p27^{Kip1} estaria associada a um bom prognóstico (Leopoldo *et al.*, 2008; Sarli *et al.*, 2006). Recentemente, o papel da expressão de p27^{Kip1} no prognóstico em câncer foi indicado como sendo bem mais complexo do que inicialmente proposto (Duncan, 2010). Neste contexto, a localização da p27^{Kip1} parece ser tão importante, ou até mais importante, que a sua concentração. De qualquer forma, os estudos que consideram estes dois fatores ainda são limitados.

Em CCR, a perda de expressão de p27^{Kip1} e a sua localização citoplasmática tem sido observadas. Um bom prognóstico foi associado à localização citoplasmática de p27^{Kip1} em 418 amostras de pacientes com CCR (Watson *et al.*, 2006). No entanto, a maioria dos estudos anteriores (Belluco *et al.*, 1999; Noguchi, 2003; Manne *et al.*, 2004; Prall, 2004; Tornillo *et al.*, 2007; Zlobec *et al.*, 2008; Leopoldo *et al.*, 2008) simplesmente estudaram os tumores de acordo com o nível de expressão de p27^{Kip1}, sem levar em conta a sua localização celular.

A perda ou expressão reduzida de p27^{Kip1} em CCR foi descrita como um indicador de prognóstico ruim e associada a recidivas locais para CCR em estágio III (Manne *et al.*, 2004), bem como à baixa diferenciação de tumores em estágio II (Uchida *et al.*, 2003). Tal perfil de expressão também foi associado ao CCR de

grandes dimensões com metástases linfáticas e à baixa sobrevivência dos pacientes (Jessup *et al.*, 1997; Tenjo *et al.*, 2000). A superexpressão de p27^{Kip1} aumentou a indução de apoptose em células tratadas com 5-fluorouracil (Uchida *et al.*, 2003).

Assim, a ausência da expressão de p27^{Kip1} parece ser um importante preditor de baixa sobrevivência dos pacientes, e sua expressão reduzida pode tornar-se um marcador importante em uma série de neoplasias gastrointestinais, sendo possível correlacioná-la à capacidade de invasão das células neoplásicas, ao crescimento tumoral e aos diferentes estádios (Palmqvist *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999).

O uso de marcadores moleculares múltiplos, incluindo de expressão p27^{Kip1}, pode facilitar a identificação de CCR mais agressivos e o prognóstico, desta forma, permitindo a seleção de terapias mais agressivas para subgrupos de pacientes com CCR (Manne *et al.*, 1997; Manne *et al.*, 2001).

Recentemente, a combinação dos marcadores moleculares p53, p27^{Kip1}, bcl-2 e MUC-1 foram apontados como especialmente úteis no diagnóstico e prognóstico do CCR. Nenhum destes ou outro marcador parece até o momento capaz de trazer de modo independente a mesma informação. Contudo uma padronização técnica e de interpretação ainda é necessária para o seu uso mais amplo (Manne *et al.*, 2012).

Por outro lado, mutações no gene *CDKN1B* que codifica a p27^{Kip1} são pouco frequentes no CCR (Kawamata *et al.*, 1995; Castaneda-Ponce *et al.*, 1995). Evidências mais claras do papel de supressão tumoral desta proteína vêm da observação, entre outras, de que camundongos com mutações germinativas que inativam *CDKN1B* são predispostos ao câncer (Polyak, 2006).

Alterações potencialmente patogênicas no gene *CDKN1B* (c.-7G>C; c.283C>T, p.P95S; c.595T>C, p.X199QextX*60) foram descritas em pacientes com predisposição hereditária aos tumores MEN1-like (Agarwal *et al.*, 2009). Da mesma forma, uma mutação heterozigótica germinativa *nonsense* no códon 76 deste gene (c.692G>A, p.W76X) foi observada em vários membros de uma família com fenótipo semelhante, MENX (Pellegata *et al.*, 2006), e outra do tipo *frameshift* no códon 25 (c.59_77dup, p.K25fs) foi relatada em pacientes com carcinoma de pequenas células neuroendocrinocervicais, doença de Cushing, e hiperparatireoidismo (Georgitsi *et al.*, 2007).

O polimorfismo T/G (rs2066827), localizado no éxon 1 do gene *CDKN1B*, que leva à substituição de uma valina por uma glicina na posição 109 da p27^{Kip1}, conhecido como p.V109G, apresenta potencial de alteração funcional da proteína. Esta substituição poderia afetar a interação da p27^{Kip1} com outras proteínas e alterar sua expressão ou ativação (Pasquali *et al.*, 2011). Foi proposto que este polimorfismo acarretaria na degradação da variante de p27^{Kip1} e possivelmente levaria a desregulação do ciclo celular e tumorigênese (Kibel *et al.*, 2003, Liet *et al.*, 2004, Gaytheret *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008).

Recentemente, muitos estudos sobre a relação entre o polimorfismo p.V109G e o risco a diferentes tipos de câncer em diversas populações foram conduzidos (Huang, 2008; Chen, 2010; Chen, 2008; Chang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2004; Kibel *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2007; Naidu *et al.*, 2007; Spurdle, 2009; Landa, 2010; Feng Wei *et al.*, 2012), mas nenhum deles até hoje correlacionou este polimorfismo ao CCR.

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo contribuir para a elucidação do papel do polimorfismo p.V109G do gene *CDKN1B* no CCR. Para tanto foi realizado um estudo de associação com o recrutamento de pacientes e controles.

Este tipo de estudo constitui uma ferramenta valiosa para correlacionar variantes genéticas e doenças, sendo realizado a partir da comparação das frequências alélicas de um marcador genético entre os indivíduos afetados e não afetados. Um alelo determinado é considerado associado com o fenótipo estudado quando sua frequência é diferente entre afetados e não afetados, os controles. Implica na utilização de uma população de indivíduos não aparentados, assim como leva em conta informações referentes à origem étnica, gênero, idade, comportamentos de risco, entre outras. Na seleção dos casos é fundamental a definição clara do diagnóstico (fenótipo e endofenótipo), baseada na clínica e em testes laboratoriais.

Um dos maiores desafios da era genômica é proporcionar benefícios para a população. A diversidade genética no genoma humano deve ser considerada na identificação de fatores genéticos específicos que podem estar associados aos riscos a doenças, incidência e severidade, entre as diferentes populações, o que contribuirá diretamente na melhora dos diagnósticos, tratamento e prevenção das doenças. Tais avanços têm mudado a prática médica e contribuem para direções

futuras, no sentido de cuidados clínicos estarem baseados na informação genômica (Kricka e Resta, 2013).

A existência de uma relação entre o CCR e mutações germinativas no gene *CDKN1B* poderia fornecer maiores informações sobre a etiologia desta doença e possibilitaria a criação de novas ferramentas de diagnóstico e prognóstico mais precisas. Isto faria com que a análise do gene em estudo se tornasse uma importante ferramenta na triagem populacional (Vaughan *et al.*, 2012).

2. OBJETIVO

Estudar a associação entre o polimorfismo p.V109G (rs2066827) do éxon 1 do gene *CDKN1B* e câncer colorretal, em uma amostra de pacientes do sul do Brasil.

3. MÉTODOS

3.1 Pacientes e controles

As amostras de pacientes diagnosticados com CCR foram obtidas a partir de pacientes que foram atendidos na União Paranaense de Estudo e Combate ao Câncer, em Cascavel, Paraná, de agosto de 2011 até março de 2012.

As amostras de sangue de indivíduos controles foram obtidas a partir de doadores voluntários de sangue do Hemobanco, Curitiba, Paraná.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR sob o número 5044/11 e todos os participantes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 Extração de DNA

As amostras de DNA foram obtidas a partir de sangue periférico de pacientes e controles conforme descrito anteriormente (Lahiri e Nurnberger Jr., 1991).

Em linhas gerais, inicialmente as hemácias foram lisadas e sucessivas lavagens do *pellet* em TKM1 (Tris HCl pH7,6; KCl; MgCl₂ e EDTA) foram conduzidas. A seguir foi acrescentado TKM2 (Tris HCl pH7,6; KCl; MgCl₂; EDTA e NaCl), acrescido de 10% de SDS, para que houvesse a liberação do DNA. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 55 °C durante a noite. Para precipitar a proteína e separá-la do DNA foram adicionados 300 µl de NaCl (6 M). Utilizou-se o etanol absoluto a 20°C negativos para que o DNA fosse precipitado e etanol 70% a 4°C para sua lavagem.

Após a secagem do DNA, este foi ressuspensão em tampão TE e as amostras foram estocadas a 20°C negativos até o seu uso, quando foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 Thermo Scientific Uniscience) e diluídas a 25 ng/µl.

3.3 Amplificação e genotipagem

As amostras de DNA de pacientes e controles foram analisadas por ARMS-PCR (*amplification refractory mutation system - polymerase chain reaction*), em

reações de 25 µl contendo 25 ng de DNA genômico e 10 pmol de cada um dos iniciadores (Tabela 2), em tampão *Master Mix* 1X (Biolabs®).

Tabela 2. Iniciadores para ARMS-PCR: suas sequências, tamanho e temperatura de fusão (T_m).

Iniciador	Sequência	Tamanho (pb)	T_m (°C)
<i>CDKN1B</i> EXR	5' - TTGCAGGTCGCTTCCTTATT	20	53
<i>CDKN1B</i> EXF	5' - CAAACCCCTAGAGGGCAAGT	20	57
<i>CDKN1B</i> mutTF	5' - GCAGGAGAGCCAGGATGT	18	53
<i>CDKN1B</i> mutGF	5' - GCAGGAGAGCCAGGATGG	18	55

Os iniciadores *CDKN1B* EXR e *CDKN1B* EXF amplificam um fragmento maior e são nomeados de “iniciadores externos”. Os iniciadores *CDKN1B* mutTF e *CDKN1B* mutGF são alelo-específicos e nomeados de “iniciadores internos”. O *CDKN1B* mutTF é específico para a base T e o *CDKN1B* mutGF é específico para a base G. Esta especificidade vem da troca da última base do iniciador para a alteração específica (Figura 1).

Figura 1. Representação dos locais onde hibridam os iniciadores.

<p>>gnl dbSNP rs2066827 CCGGGACTTGGAGAAGCACTGCAGAGACATGGAAGAG CGAGCCAGCGCAAGTGGAAATTTTCGATTTTCAGAATCACAAACCCCTAGAGGGC AAGTACGAGTGGCAAGAGGTGGAGAAGGGCAGCTTGCCCGAGTTCTACTACA GACCCCGCGGCCCCCAAAGGTGCCTGCAAGGTGCCGGCGCAGGAGAGCC AGGATGKCAGCGGGAGCCGCCCGGCGGCCTTTAATTGGGGCTCCGGCTAA CTCTGAGGACACGCATTTGGTGGACCCAAAGACTGATCCGTCCGACAGCCAGA CGGGGTTAGCGGAGCAATGCGCAGGAATAAGGAAGCGACCTGCAACCGACG GTAATGACCCTTTCCCAACCATAGAATGTGTTTGGGGCCCCGCTTTGCCTG</p> <p>Iniciadores:</p> <p><i>CDKN1B</i> EXR 5' TTGCAGGTCGCTTCCTTATT</p> <p><i>CDKN1B</i> EXF 5' CAAACCCCTAGAGGGCAAGT</p> <p><i>CDKN1B</i> mutTF 5'GCAGGAGAGCCAGGATGT</p> <p><i>CDKN1B</i> mutGF 5'GCAGGAGAGCCAGGATGG</p>

Em cada reação de amplificação eram usados os dois iniciadores externos e apenas um dos internos. Sendo assim, todas as reações deveriam apresentar uma banda de 269 pb gerada pelos iniciadores externos. Outra banda de 161 pb podia ser gerada pela combinação do iniciador específico interno, *CDKN1B* mut^{TF} ou *CDKN1B* mut^{GF}, e o *CDKN1B* EXR externo, se o iniciador específico fosse capaz de hibridar a sequência-alvo. Se a amostra fosse homocigota apenas uma das reações com os iniciadores específicos deveria ser positiva, mas se fosse heterocigota, ambas seriam positivas.

As amplificações foram realizadas em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Gradient*), nos seguintes ciclos de temperatura:

- 1) 94 °C por 5 minutos – desnaturação;
 - 2) 94 °C por 30 segundos – desnaturação;
 - 3) 56 °C por 30 segundos – hibridação dos iniciadores;
 - 4) 72 °C por 45 segundos – síntese de novas cadeias de DNA;
- Os passos de 2 a 4 são repetidos 12 vezes.
- 5) 94 °C por 30 segundos – desnaturação;
 - 6) 54 °C por 30 segundos – hibridação dos iniciadores;
 - 7) 72 °C por 30 segundos – síntese de novas cadeias de DNA;
- Os passos de 5 a 7 são repetidos 28 vezes.
- 8) 72 °C por 7 minutos – finalização da síntese de novas cadeias de DNA

Os produtos de amplificação foram marcados com *gel red* (Life Technologies) e analisados em luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose 1%, a 250 V e por 40 minutos.

3.4 Análise de associação

Inicialmente as frequências alélicas foram testadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, e a significância das diferenças nas frequências observadas para o polimorfismo entre os grupos de pacientes e controles foi realizada por um teste padrão qui-quadrado e as diferenças foram consideradas significantes quando o valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

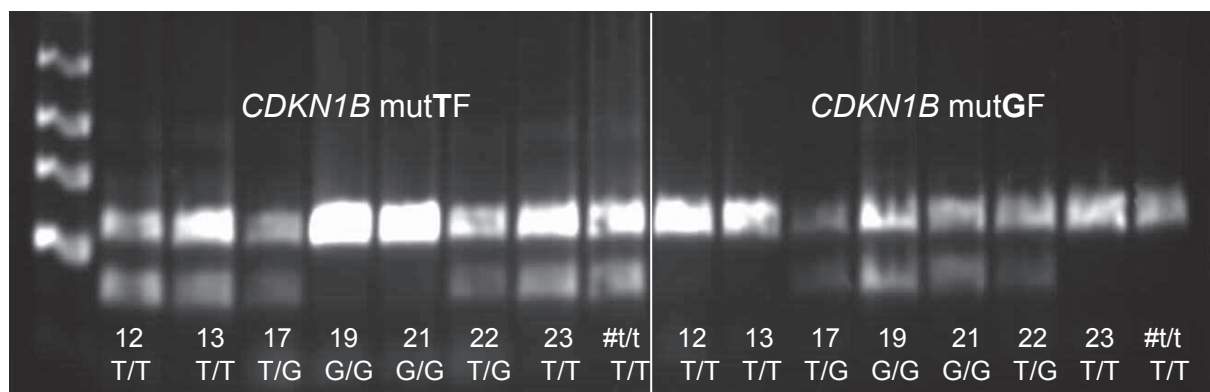
Foram analisadas amostras de 50 pacientes e 293 controles.

A idade dos pacientes variou de 31 a 89 anos, sendo que 27 (54%) pertenciam ao gênero feminino e 23 (46%) ao masculino. Em relação à localização dos tumores: 32 (64%) pacientes tiveram câncer colônico e 18 (36%) tiveram tumor retal. Vinte e um (42%) foram classificados no estágio II e 15 (30%) no estágio III. Em 19 casos (34%), o tumor invadiu a membrana serosa (T3) e, em 9 casos (18%), foi observada metástase à distância (Tabela 3).

Entre os controles, 99 (34%) pertencem ao gênero feminino e 194 (66%) ao masculino; a grande maioria (n=260; 89%), é de origem europeia e os outros são mulatos (n=33; 11%). A idade a média dos controles foi igual a $34,5 \pm 11,5$ anos.

As amostras de DNA de pacientes e controles foram extraídas, quantificadas, amplificadas e genotipadas conforme descrito anteriormente. A Figura 2 ilustra os resultados obtidos. A Tabela 4 apresenta as frequências genotípicas e alélicas observadas em pacientes e controles. As frequências observadas estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1,281$ e $p = 0,473$).

Figura 2. Perfil eletroforético, em gel de agarose 1%, da amplificação de algumas amostras estudadas.



Legenda: À direita, marcador molecular indicando as bandas de 200 (a primeira de baixo para cima), 300, 400 e 500 pb. Podem ser observados os produtos da amplificação com os iniciadores externos de 269 pb e da combinação do iniciador específico direto e do reverso geral de 161 pb.

Tabela 3. Características dos pacientes analisados.

Parâmetro	Número de pacientes	% de pacientes
Gênero		
Masculino	23	45
Feminino	27	55
Idade		
<56	18	36
>=56	32	64
Localização		
Cólon	32	64
Reto	18	36
Estagio TNM		
I	03	06
II	21	42
III	15	30
IV	09	18
Desconhecido	01	02
Tumor primário (T)		
T1	03	06
T2	06	12
T3	19	38
T4	17	34
Desconhecido	04	08
Linfonodo regional (N)		
N0	28	56
N	22	44
Metástase à distância (M)		
M0	41	82
M1	09	18

Legenda: T1 - invasão da submucosa; T2 - invasão da muscular própria; T3 - invasão da serosa ou gordura; T4 - invasão de órgãos; N0 - sem metástases linfonodais; N - gânglios linfáticos ao longo dos vasos principais; M0 - sem metástases à distância; M1 - com metástases à distância.

Tabela 4. Frequências genótípicas e alélicas observadas em pacientes e controles, considerando o polimorfismo p.V109G.

Genótipo	Pacientes		Controles	
	N	%	n	%
T/T	27	54,0	144	49,2
T/G	19	38,0	122	41,6
G/G	04	08,0	027	09,2
Total	50	100,0	293	100,0
Alelo	n	%	n	%
T	73	73,0	410	0,70
G	27	27,0	176	0,30
Total	100	100,0	586	100,0

5. DISCUSSÃO

Uma possível associação envolvendo o polimorfismo p.V109G no gene *CDKN1B* e CCR foi investigada no presente estudo. Este gene codifica um inibidor de quinase dependente de ciclina, a p27^{Kip1}. Esta proteína impede a ativação dos complexos ciclina E-CDK2 e ciclina D-CDK4, e assim controla a progressão do ciclo celular em G₁. A degradação da p27^{Kip1}, que é disparada por fosforilação dependente de CDK e subsequente ubiquitinação por complexos SCF, é necessária para a transição do estado celular quiescente para o proliferativo, o que levaria a crer em uma importância desta proteína no desenvolvimento de câncer colorretal.

Os níveis da p27^{Kip1} encontram-se reduzidos em uma série de tipos de câncer, incluindo em câncer colorretal, como já foi descrito por Sgambato e colaboradores (Sgambato et al, 1999) . Da mesma forma, a perda de função da p27^{Kip1} pode levar à formação de neoplasias malignas, como já foi descrito para vários tipos de tumores, como em mama (Mirchandani et al, 2011), rim (Sgambato et al, 2010), endométrio (Dellas et al, 2009), entre outros, incluindo o câncer colorretal (Ogino et al, 2010), o que nos leva a crer que alterações na sequência desta proteína possam efetivamente ser importantes para o seu desenvolvimento. Além disso estudos tem mostrado que o polimorfismo p.V109G promove uma alteração funcional desta proteína, aumentando a importância de sua análise neste tipo de tumor. Todavia, a caracterização do polimorfismo p.V109G como fator de risco para o desenvolvimento de cânceres em geral ainda está sendo investigado e existe uma grande contradição entre os trabalhos publicados.

Em nosso estudo não foi possível encontrar em associação entre este polimorfismo p.V109G e o câncer colorretal. Há várias razões às quais podemos atribuir essa falta de associação na população estudada.

Inicialmente há limitações importantes envolvendo a amostra estudada. A idade dos controles é reduzida quando comparada à dos casos, este fato pode trazer um viés para a análise, já que uma parte dos controles não atingiu a idade mais comum de manifestação da doença. A amostra é um pouco heterogênea quanto à localização e classificação do tumor, e não foi coletado registro sobre a ocorrência do tumor na família. Ainda que a maior parte dos casos, 95%, seja relatada na literatura como esporádica, não é possível descartar uma eventual

concentração de casos familiares, já que a União Paranaense de Estudo e Combate ao Câncer, em Cascavel, Paraná, é um centro de referência na região. Quando observados outros tipos de cânceres, os genes envolvidos nos tipos familiar e esporádico costumam ser diferentes. De qualquer forma, a amostra de casos e controles seria pequena para uma análise estratificada.

Outro aspecto importante é que o polimorfismo p.V109G foi avaliado em termos de variabilidade germinativa, ou seja, em amostras de sangue periférico. Não foram estudadas amostras dos tecidos neoplásicos, o que poderia apresentar um resultado distinto, apesar de que muitos dos trabalhos que avaliam a variabilidade do gene *CDKN1B* utilizam como amostra DNA de origem germinativa. Sendo assim, a variabilidade somática (presente na neoplasia) não foi considerada.

Ainda, é necessário ponderar que apesar das funções do gene *CDKN1B* justificarem sua proposição como um gene candidato a estar envolvido no desenvolvimento do câncer colorretal, a expressão da p27^{Kip1}, bem como sua função, pode estar sendo regulada por uma série de fatores que poderiam não incluir o gene estudado.

No entanto é importante considerar que outros estudos são necessários para melhor elucidar o possível envolvimento deste gene na formação e progressão do câncer colorretal.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho não observou associação entre o polimorfismo p.V109G do gene *CDKN1B* e câncer colorretal na amostra estudada.

7. REFERÊNCIAS

- AGARWAL SK, OZAWA A, MATEO CM, MARX SJ. The MEN1 gene and pituitary tumours. **Horm Res.** 71 Suppl v. 2, p. 131-138, 2009.
- ALFRED, G.; KNUDSON, J. R. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.68, p. 820-823, 1971.
- ALKARAIN, A.; SLINGERLAND, J. Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. **Breast cancer res.** v.6, p.13-21, 2004.
- BELLUCO C, ESPOSITO G, BERTORELLE R, et al. Absence of the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} protein predicts poor outcome in patients with stage I-III colorectal cancer. **Ann Surg Oncol.** v. 6, p. 19–25, 1999.
- BESSON A, GURIAN-WEST M, SCHMIDT A, HALL A, ROBERTS JM. p27^{Kip1} modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. **Genes Dev.** v.18, n. 8, p. 862-876, 2004.
- CATZAVELOS, C.; BHATTACHARYA, N.; UNG, Y.C.; WILSON, J.A.; RONCARI, L.; SANDHU, C.; SHAW, P.; YEGER, H.; MORAVA-PROTZNER, I.; KAPUSTA, L.; FRANSSEN, E.; PRITCHARD, K.I.; SLINGERLAND, J.M. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27^{Kip1} protein: prognostic implications in primary breast cancer. **Nat Med.** v. 3, p. 227-230, 1997.
- CENTELLES JJ. General aspects of colorectal cancer. **ISRN Oncol**, v. 23, p. 139-148, 2012.
- CHANG BL, ZHENG SL, ISAACS SD, WILEY KE, TURNER A, LI G, WALSH PC, MEYERS DA, ISAACS WB & XU J. A polymorphism in the CDKN1B gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer. **Cancer Research.** v. 64, p. 1997–1999, 2004.
- CHEN J, AMOS CI, MERRIMAN KW, ET AL. Genetic variants of p21 and p27^{Kip-1} and pancreatic cancer risk in non-Hispanic Whites: A case-control study. **Pancreas.** v. 39, p. 1, 2010.
- CHEN J, KILLARY AM, SEN S, ET AL. Polymorphisms of p21 and p27^{Kip-1} jointly contribute to an earlier age at diagnosis of pan-creatic cancer. **Cancer Lett** v. 272, p.32, 2008.

- CHEN J.J.; CHEN H.C.; KODELL R.L.; CHENG K.F. Assessment of performance of survival prediction models for cancer prognosis. **BMC Medical Research Methodology**, v. 12, p. 102, 2012.
- CHU, I. M.; HENGST, L.; SLINGERLAND, J.M. The Cdk inhibitor p27^{Kip1} in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. **Nature Reviews**. v. 8, p. 253-267, 2008.
- CIAPARRONE M, YAMAMOTO H, YAO Y, SGAMBATO A, CATTORETTI G, TOMITA N, MONDEN T, ROTTERDAM H, Weinstein IB. Localization and expression of p27^{Kip1} in multistage colorectal carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 58, n. 1, p.114-122, 1998.
- CROIX, B.; FLORENES, V. A.; RAK, J. W.; FLANAGAN, M.; BHATTACHARYA, N.; SLINGERLAND, J. M.; KERBEL, R.S. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} on resistance of tumor cells to anticancer agents. **Nat Med**. v. 2, p. 1204, 1996.
- DELLAS A, JUNDT G, SARTORIUS G, SCHNEIDER M, MOCH H. Combined PTEN and p27^{Kip1} protein expression patterns are associated with obesity and prognosis in endometrial carcinomas. **Clin Cancer Res**. v. 15, n. 7, p. 2456-2462, 2009.
- DOKI Y, IMOTO M, HAN EK, SGAMBATO A, WEINSTEIN IB. Increased expression of the P27^{Kip1} protein in human esophageal cancer cell lines that over-express cyclin D1. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 6, p. 1139-1148, 1997.
- DUNCAN TJ, AL-ATTAR A, ROLLAND P, HARPER S, SPENDLOVE I, DURRANT LG. Cytoplasmic p27 expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. **Int J Gynecol Pathol**, v. 29, n. 1, p. 8-18, 2010.
- EDGE SB, BYRD DR, COMPTOM CC. AJCC Cancer Staging Manual. 7a edition: New York; **Springer**, 2010.
- ESPOSITO, V.; BALDI, A.; DE LUCA, A.; GROGER, A.; LODA, M.; GIORDANO, GG. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. **Cancer res**. v. 57, p. 3381-3385, 1997.
- FARLEY J, SMITH LM, DARCY KM, BRADY MF, BELL J, MCGUIRE W, BIRRER MJ. Nuclear P27 expression in benign, borderline (LMP) and invasive tumors of the ovary and its association with prognosis: a gynecologic oncology group study. **Gynecol Oncol**, v. 121, n. 2, p. 395-401, 2011.
- FASCHING PA, GAYTHER S, PEARCE L, SCHILDKRAUTD JM, GOODE E, THIELF F, CHENEVIX-TRENCHG G, CHANG-CLAUDEH J, WANG-GOHRKEI S,

- RAMUSE S, PHAROAHJ P, BERCHUCKK A. Role of genetic polymorphisms and ovarian cancer susceptibility. **Molecular Oncology**. v. 171, p. 181, 2009.
- FEARON E. The sweet secrets of p27^{kip-1} regulation and function in cell migration. **Cell Cycle**;v. 10, p. 3429, 2011.
- FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**. v.61, n.5, p.759-767, 1990.
- FENG WEI, JIN XU, LIN TANG, JIAQING SHAO, YUCAI WANG, LONGBANG CHEN, AND XIAOXIANG GUAN. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**. v. 27, n. 10, p. 665-671, 2012.
- FIGUEIREDO, J.C.; KNIGHT, J.A.; CHO, S.; SAVAS, S.; ONAY, U.V.; BRIOLLAIS, L.; GOODWIN, P.J.; McLAUGHLIN, J.R.; ANDRULIS, I.L.; OZCELIK, H. Polymorphisms cMyc-N11S and p27-V109G and breast cancer risk and prognosis. **Biomed Central Cancer**. v. 7, p. 1-8, 2007.
- GALIZIA G, LIETO E, FERRARACCIO F, et al. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. **Clin Cancer Res**. v. 10, p. 3490–3499, 2004.
- GEORGITSI M, RAITILA A, KARHU A, van der LUIJT RB, AALFS CM, SANE T, VIERIMAA O, MÄKINEN MJ, TUPPURAINEN K, PASCHKE R, GIMM O, KOCH CA, GÜNDOGDU S, LUCASSEN A, TISCHKOWITZ M, IZATT L, AYLWIN S, BANO G, HODGSON S, De MENIS E, LAUNONEN V, VAHTERISTO P, AALTONEN LA. Germline CDKN1B/p27^{Kip1} mutation in multiple endocrine neoplasia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 8, p. 3321-3325, 2007.
- GUO W, CUI YJ, FANG SM, LI Y, WANG N, ZHANG JH. Association of polymorphisms of p21cip1 and p27^{kip-1} genes with susceptibilities of esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma. **Ai Zheng** v. 25, p. 194–199, 2006.
- HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**. v. 144, p. 646, 2011.
- HOOPS, T. C.; TRABER, P. G. Molecular pathogenesis of colorectal cancer. **Hematol Oncol Clin North Am**. v.11, n.4, p.609-633, 1997.
- HUANG, S.; YU, C.; LIU, C.; WU, T.T.; HUANG, C.; WU, M. CDKN1B V109G Polymorphism frequency and prostate cancer risk in Taiwan. **Urologia Internationalis**. v. 81, p. 36-40 and 81:36, 2008.

- IARC. International Agency for Research on Cancer. **GLOBOCAN 2008**, Section of Cancer Information. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/colorectal.asp> Acesso em: 15 de abril de 2013.
- INCA - CÂNCER COLORRETAL. 2014. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 19 de março de 2014.
- ITAMOCHI H, YOSHIDA T, WALKER CL, ET AL. Novel mechanism of reduced proliferation in ovarian clear cell carcinoma cells: Cytoplasmic sequestration of CDK2 by p27. **Gynecol Oncol**; v. 122, p. 641, 2011.
- JESSUP JM, et al. Multivariate analysis of tissue-based prognostic markers in stage II–III colorectal carcinoma. **Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol**. 1997
- KIBEL, A S; SUAREZ, B K; BELANI, J; OH, J; WEBSTER, R; GUO, C; CATALONA, W J; PICUS, J; GOODFELLOW, P J. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. **Cancer Research**. v. 63, p. 2033-2036, 2003.
- KIYOKAWA H, KINEMAN R.D., MANOVA-TODOROVA K.O., SOARES V.C., HOFFMAN E.S., ONO M., KHANAM D., HAYDAY A.C., FROHMAN L.A., KOFF A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent Kinase inhibitor function of p27. **Cell, New York**, v.85, p. 721-735, 1996.
- KRICKA, L. J.; RESTA, CHIARA. Translating genes into health. **Nature Genetics**, v. 45, 2013.
- LAHIRI DK e NURNBERGER JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**. v. 19, p. 5444, 1991.
- LANDA I, MONTERO-CONDE C, MALANGA D, ET AL. Allelic variant at-79 (C>T) in CDKN1B (p27^{kip-1}) confers an increased risk of thyroid cancer and alters mRNA levels. **Endocr Relat Cancer**. v. 17, p.317, 2010.
- LEOPOLDO S, LORENA B, CINZIA A, GABRIELLA DC, ANGELA Luciana B, RENATO C, ANTONIO M, CARLO S, CRISTINA P, STEFANO C, MAURIZIO T, LUIGI R, CESARE B. Two subtypes of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: clinicopathological and genetic features. **Ann Surg Oncol**, v. 15, n. 5, p.1429-1439, 2008
- LI M, LI JY, ZHAO AL, et al. Survival stratification panel of colorectal carcinoma with combined expression of carcinoembryonic antigen, matrix metalloproteinases-2, and p27^{Kip1}. **Dis Colon Rectum**. V.50, p. 1887–1898, 2007

- LI, G.; STURGIS, E.M.; WANG, L.; CHAMBERLAIN, R.M.; SPITZ, M.R.; EL-NAGGAR, A.K.; HONG, W.K.; WEI, Q. Association between the V109G Polymorphism of the p27^{kip-1} gene and the risk and Progression of oral squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**. v.10, p. 3996-4002, 2004.
- LIU DF, et al. p27 cell-cycle inhibitor is inversely correlated with lymph node metastases in right-sided colon cancer. **J Clin Lab Anal**. v. 13, n. 6, p. 291–295, 1999.
- LODA, M.; CUKOR, B.; TAM, S.W.; LAVIN, P.; FIORENTINO, M.; DRAETTA, G.F. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. **Nat. med**. v. 3, p. 231-234, 1997.
- LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **The Journal of cell biology**, v. 196, n. 4, p. 395-406, 2012.
- MANNE U, et al. Altered subcellular localization of suppressin, a novel inhibitor of cell-cycle entry, is an independent prognostic factor in colorectal adenocarcinomas. **Clin Cancer Res**. 2001.
- MANNE U, et al. Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 1997; 74(3):346–358.
- MANNE U, JHALA NC, JONES J, WEISS HL, CHATLA C, MELETH S, SUAREZ-CUERVO C, GRIZZLE WE. Prognostic significance of p27^{kip-1} expression in colorectal adenocarcinomas is associated with tumor stage. **Clin Cancer Res**. v. 10, n. 5, p. 1743-1752, 2004.
- MARKOWITZ S.D., DAWSON D.M., WILLIS J., WILLSON J.K. Focus on colon cancer. **Cancer Cel**, v. 1, p. 233-236, 2002.
- MCKAY JA, DOUGLAS JJ, ROSS VG, et al. Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours. **J Pathol**. v. 196, p. 386–393, 2002.
- MENÉNDEZ S.G., CLARENS D.C.B. Algunos aspectos genéticos, moleculares y clínicos del cáncer colorrectal hereditario no polipoideo. **Revista cubana de investigaciones biomédicas**, v. 22, p. 43-50, 2004.
- MEYER LA, ANDERSON ME, LACOUR RA, SURI A, DANIELS MS, URBAUER DL, et al. Evaluating women with ovarian cancer for BRCA1 and BRCA2 mutations: missed opportunities. **Obstet Gynecol**. v. 115, n. 5, p. 945-952, 2010.
- MIRCHANDANI D, ROSES DF, INGHIRAMI G, ZELENIUCH-JACQUOTTE A, CANGIARELLA J, GUTH A, SAFYAN RA, FORMENTI SC, PAGANO M, MUGGIA

- F. Loss of p27^{Kip1} expression in fully-staged node-negative breast cancer: association with lack of hormone receptors in T1a/b, but not T1c infiltrative ductal carcinoma. **Anticancer Res.** v. 31, n. 12, p. 4401-4405, 2011
- MISKIMINS K.W., WANG G., HAWKINSON M., MISKIMINS R. Control of Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p27 Expression by Cap- Independent Translation. **Molecular and Cellular Biology**, South Dakota, v. 21, n.15, p. 4960-4967, 2001.
- MOLATORE S, KIERMAIER E, JUNG CB, et al. Characterization of a naturally-occurring p27mutation predisposing to multiple endocrine tumors. **Mol Cancer**; v. 9, p. 116. 2012.
- MOLATORE S, MARINONI I, LEE M, et al. A novel germline CDKN1B mutation causing multiple endocrine tumors: Clinical, genetic and functional characterization. **Hum Mutat**; v. 31, p.E1825, 2010.
- MORSON BC, HILL MJ, BUSSEY HJ. A etiology of adenoma-carcinoma sequence in large-bowel. **Lancet.** v. 1, p. 245-247, 1978.
- NAIDU R, HAR YC, TAIB NA. P27 V109G Polymorphism is associated with lymph node metastases but not with in-creased risk of breast cancer. **J Exp Clin Cancer Res**; v. 26, p. 133, 2007.
- NIGG, E. A.; Targets of cyclin-dependent protein kinases. **Curr Opin Cell Biol.** v. 199, p. 187-193, 1993.
- NOGUCHI T, KIKUCHI R, ONO K, TAKENO S, MORIYAMA H, UCHIDA Y. Prognostic significance of p27^{Kip1} and apoptosis in patients with colorectal carcinoma. **Oncol Rep.** v. 10, p. 827–831, 2003.
- OGINO S, SHIMA K, NOSHO K, IRAHARA N, BABA Y, WOLPIN BM, GIOVANNUCCI EL, MEYERHARDT JA, FUCHS CS. A cohort study of p27 localization in colon cancer, body mass index, and patient survival. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 18, n. 6, p. 1849-1858, 2009.
- OKUYAMA, T.; OYA, M.; ISHIKAWA, H. Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. **J Surg Oncol.** v.83, n.1, p.42-47, 2003.
- PALMQVIST R, STENLING R, OBERG A, et al. Prognostic significance of p27(Kip1) expression in colorectal cancer: a clinico-pathological characterization. **J Pathol** ;v. 188, p. 18–23, 1999.

- PASQUALI D, CIRCELLI L, FAGGIANO A, et al. CDKN1B V109G polymorphism a new prognostic factor in sporadic medullary thyroid carcinoma. **Eur J Endocrinol**; v. 164, p. 397, 2011.
- PAYTON M, CHUNG G, YAKOWEC P, et al. Discovery and evaluation of dual CDK1 and CDK2 inhibitors. **Cancer Res**; v. 66, p. 4299, 2006.
- PELLEGATA NS, QUINTANILLA-MARTINEZ L, SIGGELKOW H, SAMSON E, BINK K, HÖFLER H, FEND F, Graw J, ATKINSON MJ. Germ-line mutations in p27^{Kip1} cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 42, p.15558-15563, 2006.
- PELLEGRIN S, MELLOR H. Actin stress fibres. **J Cell Sci**. 120(Pt 20):3491-9, 2007.
- POLYAK, K.; LEE, M. H.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; KOFF, A.; ROBERTS, J. M.; TEMPST, P.; MASSAGUE, J. Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. **Cell**. v. 78, p. 59-66, 1994.
- PRALL F, OSTWALD C, NIZZE H, BARTEN M. Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21, p27, and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 12, n. 2, p. 111-121, 2004.
- ROSSONI, Marssoni Deconto. Fatores prognósticos e recidiva neoplásica em pacientes com adenocarcinoma colorretal estágio I e II (TNM), submetidos a tratamento cirúrgico com intenção curativa: o papel do fenômeno brotamento tumoral avaliado por dois métodos histológicos diferentes. 2012. 77f. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Defesa: Curitiba, 07/12/2012.
- SARLI L, BOTTARELLI L, AZZONI C, et al. Loss of p27 expression and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. **Surg Oncol** 2006;15: 97–106.
- SGAMBATO A, ZHANG YJ, ARBER N, HIBSHOOSH H, DOKI Y, CIAPARRONE M, SANTELLA RM, CITTADINI A, WEINSTEIN IB. Deregulated expression of p27(Kip1) in human breast cancers. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 10, p. 1879-1887, 1997.
- SGAMBATO A, RATTO C, FARAGLIA B, MERICO M, ARDITO R, SCHINZARI G, ROMANO G, CITTADINI AR. Reduced expression and altered subcellular

- localization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in human colon cancer. **Mol Carcinog.** v. 26, n. 3, p. 172-179, 1999.
- SGAMBATO A, CAMERINI A, GENOVESE G, DE LUCA F, VIACAVA P, MIGALDI M, BONINSEGNA A, CECCHI M, SEPICH CA, ROSSI G, ARENA V, CITTADINI A, AMOROSO D. Loss of nuclear p27(kip1) and α -dystroglycan is a frequent event and is a strong predictor of poor outcome in renal cell carcinoma. **Cancer Sci.** v. 101, p. 2080-2086, 2010.
- SHERR, C.J.; ROBERTS, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev.** v.13, p. 1501-1512, 1999.
- SLINGERLAND, J.; PAGANO, M. Regulation of the CDK inhibitor p27 and its deregulation in cancer. **J Cell Physiol.** v. 183, p. 10-17, 2000.
- SPURDLE AB, DEANS AJ, DUFFY D, et al. No evidence that CDKN1B (p27) polymorphisms modify breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Breast Cancer Res Treat;** v. 115, p. 307, 2009.
- STAROSTINA NG, KIPREOS ET. Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. **Trends Cell Biol;** v. 22, p. 33, 2012.
- TENJO T, TOYODA M, OKUDA J, et al. Prognostic significance of p27(kip1) protein expression and spontaneous apoptosis in patients with colorectal adenocarcinomas. **Oncology;** v.58, p. 45–51, 2000.
- TORNILLO L, LUGLI A, ZLOBEC I, et al. Prognostic value of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in mismatch repair-proficient colorectal cancer: a tissue microarray-based approach. **Am J Clin Pathol;** v. 127, p. 114–123, 2007.
- TOYOSHIMA H & HUNTER T. p27^{Kip1}, a novel inhibitor of G1 cyclin- Cdk protein kinase activity, is related to p21. **Cell.** v. 78, p. 67–74, 1994.
- UCHIDA H, SHINOURA N, KITAYAMA J, WATANABE T, NAGAWA H, HAMADA H. 5-Fluorouracil efficiently enhanced apoptosis induced by adenovirus-mediated transfer of caspase-8 in DLD-1 colon cancer cells. **J Gene Med,** v. 5, n. 4, p. 287-299, 2003.
- VAUGHAN, S. et al. **NIH Public Access.** v. 11, n. 10, p. 719-725, 2012.
- VOLGESTEIN B., FEARON E.R., HAMILTON S.R., KERN S.E., PREISINGER A.C., LEPPERT M., NAKAMURA Y., WHITE R., SMITS A.M., BOS J.L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Eng J Med.** v. 319, p. 525-532, 1988.

- WANDER SA, ZHAO D, Slingerland JM. p27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 1, p. 12-18, 2011.
- WATSON NF, DURRANT LG, SCHOLEFIELD JH, et al. Cytoplasmic expression of p27(kip1) is associated with a favourable prognosis in colorectal cancer patients. **World J Gastroenterol**; v. 12, p. 6299–6304, 2006.
- WILLIS RE. Human gene control by vital oncogenes: revisiting a theoretical model and its implications for targeted cancer therapy. **Int. J. Mol. Sci.** v. 13, p. 316-335, 2012.
- WU, Z. et al. MCAM is a novel metastasis marker and regulates spreading, apoptosis and invasion of ovarian cancer cells. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.** v. 33, n. 5, p. 1619-28, out. 2012.
- ZLOBEC I, MINOO P, BAUMHOER D, et al. Multimarker phenotype predicts adverse survival in patients with lymph node-negative colorectal cancer. **Cancer**;v. 112, p. 495–502, 2008.

8. APÊNDICE



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética em Pesquisa
Ciência com Consciência

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0005044/11**

Protocolo CEP Nº **6046**

Título do projeto **Análise da variabilidade genética no gene DPYD codificador da enzima Dihidropirimidina-desidrogenase em pacientes com câncer gastrointestinal submetidos a tratamento com 5-Fluorouracil.**

Grupo
Versão 2

Protocolo CONEP **0076.0.084.000-11**

Pesquisador responsável **Fabio Rueda Fauz**

Instituição **PUCPR-CCBS/PPGCS - Curitiba - PR**

Objetivos

OBJETIVO(S) GERAL(ES)

Avaliar o envolvimento do gene DPYD com a toxicidade apresentada pelo paciente com câncer gastrointestinal em uso do antineoplásico 5-Fluorouracil.

OBJETIVO(S) ESPECÍFICO(S)

- Avaliar a toxicidade ao tratamento com 5-FU em um grupo de 260 pacientes com câncer gastrointestinal, tratados na UOPECCAN (Hospital do Câncer de Cascavel);
- Fazer a coleta de amostras de sangue de 260 pacientes com câncer gastrointestinal que fazem uso do 5-FU.
- Obter amostras de DNA dos voluntários;
- Rastreamento, buscando alterações genéticas através de metodologias como PCR, RFLP e sequenciamento direto do gene DPYD.
- Correlacionar a mutação encontrada com o grau de toxicidade apresentada pelo voluntário.

Comentários e considerações

PARTICIPANTES

Para análise dos voluntários será extraído DNA a partir dos linfócitos do sangue de 260 indivíduos homens e mulheres com diagnóstico de câncer gastrointestinal em tratamento com 5-FU. As amostras serão devidamente regulamentadas e consentidas pelos doadores, tendo estes, lido e assinado o

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Crêterios de inclusão de pacientes: pacientes com diagnóstico confirmado de câncer gastrointestinal e em uso de 5-FU ou com programação de utilização da droga.

Crêterios de exclusão de pacientes: indivíduos que queiram, por qualquer motivo, interromper sua participação no estudo;

INSTRUMENTOS E METODOLOGIA

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa da PUCPR, os pacientes atendidos na UOPECCAN e submetidos ao tratamento com 5-FU serão convidados a participar do estudo. Após a aprovação do comitê de ética e a assinatura do documento de consentimento informado, serão coletadas

amostras de sangue periférico de 260 pacientes. Relatos de toxicidade apresentada ao tratamento com 5-FU serão pesquisados no prontuário médico dos voluntários. Serão analisados prontuários do período de maio/2011 a novembro/2011.

Todos os reagentes e equipamentos necessários a execução do projeto já estão disponíveis no laboratório onde será desenvolvido o trabalho.

Extração de DNA

As amostras serão submetidas à extração do DNA de acordo com as instruções do kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Todos os materiais, reagentes e equipamentos necessários para o desenvolvimento do projeto serão fornecidos pelo

laboratório Alvaro.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Possíveis Riscos/Desconfortos: não existe nenhum risco associado a participação neste estudo, e sim apenas um pequeno desconforto durante o procedimento de coleta do sangue.

Benefícios: A identificação de alterações no gene que codifica a DPD e a toxicidade ao referido tratamento

permitiria definir grupos de doentes com um risco mais elevado de toxicidade antes de se iniciar o tratamento.

Deste modo, a administração da droga nestes doentes poderia ser feita em doses menos elevadas ou, em casos extremos, esta poderia ser substituída por outros protocolos de terapia.

Custeado: (1) Pesquisador, (2) Universidade, (3) Outros 7 2,458.00.

Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados

TCLE em conformidade com a Resolução CNS 196/96.

Conclusões

Aprovado.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais regulamentações a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia 08/06/2011, manifestou-se por considerar o projeto

