



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA**

ARAÍDA DIAS PEREIRA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O CONSUMO ALIMENTAR E A METILAÇÃO DOS GENES
RASSF1A E *HIC1* EM INDIVÍDUOS EM RASTREAMENTO DE CÂNCER
COLORRETAL**

**BRASÍLIA
2017**

ARAÍDA DIAS PEREIRA

ASSOCIAÇÃO ENTRE O CONSUMO ALIMENTAR E A METILAÇÃO DOS GENES
RASSF1A E *HIC1* EM INDIVÍDUOS EM RASTREAMENTO DE CÂNCER
COLORRETAL

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Nutrição Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Kiyomi Ito
Coorientadora: Profa. Dra. Andrea Barretto Motoyama

BRASÍLIA
2017

ARAÍDA DIAS PEREIRA

ASSOCIAÇÃO ENTRE O CONSUMO ALIMENTAR E A METILAÇÃO DOS GENES
RASSF1A E *HIC1* EM INDIVÍDUOS EM RASTREAMENTO DE CÂNCER
COLORRETAL

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Nutrição Humana.

Data de aprovação: _____/_____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marina Kiyomi Ito
Universidade de Brasília - Presidente da Banca

Rosângela Vieira de Andrade
Universidade Católica de Brasília – 2º membro

Diêgo Madureira de Oliveira
Universidade de Brasília – 3º membro

Teresa Helena Macedo da Costa
Universidade de Brasília – 4º membro

Kênia Mara Baiocchi de Carvalho
Universidade de Brasília – (Suplente)

A DEUS, a Jesus e Nossa Senhora de Fátima, sempre presentes em minha vida, dando-me força, discernimento e sabedoria, principalmente nas dificuldades, angústias e alegrias. Aprendi, que esses quatro anos não foram apenas doutorado, mas de vivência e experiência espiritual, indescritíveis em minha vida. Seguirei a missão que sinto ter recebido no Santuário São Francisco de Assis.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido pai, José de Ribamar (*in memoriam*), cuja presença sempre senti ao meu lado, e à mãe mais linda, alegre e animada que Deus poderia me conceder. Vocês me ensinaram que devemos fazer o bem e sermos felizes em qualquer momento de nossas vidas, principalmente se estivermos realizando um sonho, como o doutorado.

À professora Marina K. Ito, pela orientação, confiança e dedicação, imprescindíveis a este trabalho. Gratidão também pelos ensinamentos científicos.

À professora Andréa Motoyama, pela coorientação, amizade e confiança no desenvolvimento deste estudo. Seu apoio foi muito importante para meu crescimento científico.

À professora Teresa Helena da Costa, pela amizade, por seus valiosos ensinamentos e sugestões para elaboração deste trabalho. Muito obrigada!

À Clínica do Aparelho Digestivo, pela oportunidade de realização deste estudo e pelo apoio no atendimento aos participantes. Sem dúvida, o doutorado só foi possível porque a clínica abriu as portas e acolheu este projeto como parte de suas atividades.

Aos amigos mais que especiais Marcos Rossi, Luiz Carlos, Leopoldo e Jônio, pelo apoio incondicional na realização deste sonho, apoio logístico e pelos bons conselhos durante esta jornada.

Aos amores da dindinha: Ana Luiza, Davi, Yuri Matheus e Luna, minhas alegrias em momentos tão difíceis. Vocês se fizeram presentes nesta conquista, ainda que distantes geograficamente.

Ao meu querido tio Luzinan, ou melhor, o meu segundo pai. Amor de pai, é isso que senti nesses anos de doutorado. Gratidão eterna.

À amiga Maria Romana que plantou uma semente e a regou com muito esmero por anos, até chegar este momento. Sem dúvida, este sonho que está se realizando é fruto de seus ensinamentos e incentivos. Grata pela sua amizade.

Às amigas da UFT, Sandra Botelho e Áurea Welter, pelo apoio emocional, logístico e pela amizade nos piores e melhores momentos destes quatro anos de tensão e estresse. Com vocês compartilhei cada lágrima derramada por motivo de tristeza ou alegria.

Aos meus queridos primos e primas: Luciano e Sandra, Luciana Lilian, Luzilda, Marilda, Adriana, Paula Karine e Helvércio, que me deram apoio emocional, logístico, amizade e muito carinho para chegar até aqui.

Às queridíssimas tias: Amância, Maria, Ciana, Luiza, Lia e Joanita, pelo carinho, amor e incentivo sempre presentes e intensificados nestes anos de doutorado.

Ao meu irmão Irair, minha prima e irmã de coração, Régila Kellinne, e ao meu sobrinho amado Gustavo, por me apoiarem e me ajudarem sempre que necessário.

Às amigas Poliana, Vanessa, Sânia, Xarlene, Andréa Figueiredo, Leonora, Daniele Seipel e Emiliana, pela presença constante, mesmo a quilômetros de distância. Vocês foram fundamentais na minha vida.

Aos irmãos da Fraternidade Ordem Franciscana Secular, pelas orações, pelo convívio e aprendizado espiritual.

À amiga e conselheira conquistada nesta trajetória Elemácia, por estar sempre à disposição para ajudar e me confortar nos momentos difíceis.

Aos amigos conquistados em Brasília: Prof. Caio, Alessandra, Larissa, Luciana Carvalho, Sabrina, Nádia, Heloísa, Maína, Babiana, Átala, Marcela de Sá, Laís, Nathália e Nelson, pelos momentos alegres e por sempre me oferecerem um ombro amigo.

Ao Abraão, um amigo maravilhoso que me recebeu e acolheu. Sem dúvida, o impacto da minha chegada a Brasília foi amortecido por seu acolhimento.

Aos bolsistas do PIBIC, Alan e Bruno, pelo apoio e trabalho. Obrigada!

À equipe que me auxiliou nas análises de consumo alimentar. Priscila, Ana Beatriz, Luiz e Thaís, meu muito obrigada.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, pela oportunidade de aprimoramento científico.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, por aceitarem compartilhar seus conhecimentos e contribuir com este estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Tocantins (FAPT), pelo auxílio financeiro para a condução deste trabalho.

Ao Hospital e Maternidade Dom Orione e ao Hospital Regional de Araguaína, em especial às equipes do serviço de endoscopia, por ajudarem na captação de participantes e me auxiliarem nesta pesquisa.

Ao CancerLab e Laboratório de Bioquímica da Nutrição - UnB, por concederem equipamentos, apoio logístico e oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Análisys Laboratório Clínico, pelo apoio logístico e auxílio nesta pesquisa.

Aos participantes deste estudo, pela disponibilidade e pelo comprometimento com a pesquisa. Muito obrigada pela confiança.

“Quando construímos nossa vida num caminho ético, com certeza estabelecemos nossa conduta em princípios que são valiosos, que contribuem para nosso crescimento humano e espiritual. A felicidade vai sendo edificada no conjunto da própria vida e, conseqüentemente, vamos agregando outras pessoas de bem para nossa proximidade...”

Seja feliz hoje, com tudo aquilo que você é, com tudo aquilo que você tem...

Frei Paulo Sérgio, ofm.

RESUMO

Objetivo: O câncer resulta de processos múltiplos que envolvem erros genéticos e epigenéticos cumulativos dos oncogenes e genes supressores de tumor. Estudos identificaram que os genes da *RASSF1A* e *HIC1* estão hipermetilados nos indivíduos com pólipos adenomatosos (lesão pré-maligna) e câncer colorretal (CCR), o que sugere a possibilidade de serem úteis como biomarcadores epigenéticos deste tipo de câncer, em seu estágio inicial. Já está estabelecido que o estilo de vida e os hábitos alimentares inadequados constituem fatores de risco para desenvolvimento do CCR. Assim, este estudo teve o objetivo de avaliar a associação entre o consumo alimentar e a metilação dos marcadores epigenéticos *RASSF1A* e *HIC1* em uma população em rastreamento para CCR.

Método: Estudo transversal, conduzido com 106 indivíduos submetidos ao rastreamento do CCR, distribuídos em cinco grupos de acordo com o diagnóstico colonoscópico e/ou histopatológico: saudável, inflamatório, hiperplásico, adenoma e câncer colorretal. Coletaram-se informações sobre consumo, antropometria, perfil socioeconômico, hábitos de vida, amostra sanguínea e biópsia. Utilizou-se os programas *Nutrition Data System for Research* para análise dos dois recordatórios de 24h e *Multiple Source Method*, para correção da distribuição de consumo de nutrientes e alimentos dos participantes. Realizaram-se exames bioquímicos de glicemia, lipidograma, proteinograma e hemograma. Utilizou-se a reação em cadeia da polimerase metilação específica para analisar o padrão de metilação dos genes *RASSF1A* e *HIC1* nas biópsias. Para análise estatística descritiva, foram aplicados testes paramétricos e não paramétricos e, a fim de verificar os fatores que exerciam influência sobre a metilação dos marcadores epigenéticos, aplicou-se a Regressão Logística Multivariada para os dois genes estudados. Os resultados foram apresentados em percentuais e medianas, com nível de significância $p < 0,050$.

Resultados: Houve diferença significativa entre os grupos para as variáveis álcool ($p=0,027$) e ômega-3 dietético ($p=0,049$), e não houve diferença significativa em relação a variáveis sociodemográficas, indicadores nutricionais, perfil clínico, hábitos e estilo de vida, exames bioquímicos e perfil de consumo energético e nutricional. No que se refere ao padrão de metilação, houve diferença significativa entre os grupos nos genes *RASSF1A* ($p=0,038$) e *HIC1* ($p=0,000$). Os fatores que contribuíram para elevar a chance de metilação do *RASSF1A* foram: consumo de vitamina B6 com *Odds Ratio* (OR) 5,26; Intervalo de Confiança (IC) 1,74-15,91 e metilação do *HIC1* com OR 6,51; IC 1,26-33,59. Já as variáveis que contribuíram para reduzir a chance de metilação do *RASSF1A* foram: álcool com OR 0,31; IC 0,11-0,88 e a % calórico do carboidrato com OR 0,87; IC 0,78-0,98. Para o *HIC1*, a chance de metilação mostrou-se aumentada com a proteína total plasmática e metilação do *RASSF1A*, que apresentaram OR 4,81; IC 1,05-21,97 e OR 15,13; IC 2,99-76,58, respectivamente.

Conclusão: Em indivíduos submetidos ao rastreamento para CCR, a metilação do gene *RASSF1A* apresentou associação com hábitos de vida, tais como consumo de energia proveniente do carboidrato, álcool e vitamina B6, porém no sentido oposto à hipótese do estudo. Não se identificou associação entre a metilação do gene *HIC1* e os componentes do estilo de vida.

Palavras-chave: Câncer colorretal; Consumo alimentar; Metilação de DNA; *RASSF1A*; *HIC1*.

ABSTRACT

Objective: Cancer is the result of multiple processes that involve cumulative genetic and epigenetic errors in the oncogenes and tumor suppressor genes. Studies have identified that the *RASSF1A* and *HIC1* genes are hypermethylated in individuals with adenomatous polyps (pre-malignant lesions) and colorectal cancer (CRC), suggesting the possibility to be useful epigenetic biomarkers for this kind of cancer in its initial state. It's already established that the inadequate lifestyle and eating habits are risk factors for the development of CRC. Thus, this study aimed to evaluate the relationship between food intake and the methylation of the epigenetic markers *RASSF1A* and *HIC1* in a population screening for CRC.

Methods: A cross-sectional study was conducted with 106 individuals submitted to CRC screening and distributed in five groups according to the colonoscopy and/or histopathologic diagnosis: healthy, inflammatory, hyperplastic, adenoid and colorectal cancer. The data collected included: food intake, anthropometry, socioeconomic profile, life style habits, blood sample, and biopsy. The softwares Nutrition Data System for Research, which was used for analysis of the two 24-hour recalls, and Multiple Source Method, that was used to correct for the variability in the estimated intra individual intakes of nutrients and food by the patients, were used. Biochemical determinations of glycemia, lipidogram, proteinogram and hemogram were performed. Methylation-specific polymerase chain reaction was used to analyze the pattern of methylation of the genes *RASSF1A* and *HIC1* in the biopsies. In the descriptive statistical analysis, parametric and nonparametric tests were applied. Multivariate logistic regression of studied genes were performed to evaluate the factors associated with the methylation of the epigenetic markers. The results were presented as percentages and medians, with $p < 0.050$ as significance level.

Results: There was a significant difference among the groups for the variables alcohol intake ($p=0.027$) and dietary omega 3 ($p=0.049$), and there was no significant difference for the following variables: sociodemographic, nutritional indicators, clinical profile, habits and lifestyle, biochemical exams and energetic and nutritional consumption. In relation to the methylation patterns, there were significant differences between groups in the genes *RASSF1A* ($p=0.038$) and *HIC1* ($p=0.000$). Factors that contributed to the increased chance of methylation of the *RASSF1A* were the intake of vitamin B6 with Odds Ratio (OR) 5.26; and Confidence Interval (CI) 1.74-15.91; and methylation of the *HIC1* with OR 6.51; CI 1.26-33.59. The variables that contributed to the decreased chance of methylation of the *RASSF1A* were alcohol with OR 0.31; CI 0.11-0.88 and the caloric percentage of carbohydrate with OR 0.87; CI 0.78-0.98. For the *HIC1*, the chance of methylation was increased with the total plasmatic protein and methylation of the *RASSF1A*, with OR: 4.81; CI 1.05-21.97 and OR 15.13; CI 2.99-76.58, respectively.

Conclusion: In individuals submitted to CRC screening, the methylation of the *RASSF1A* gene showed association with lifestyle, such as the intake of energy from carbohydrates, alcohol and vitamin B6 consumption, but in the opposite results to the hypothesis of the study. No association was seen between the methylation of the *HIC1* gene with lifestyle components.

Keywords: Colorectal cancer; Food consumption; DNA methylation; *RASSF1A*; *HIC1*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A. Pólipo adenomatoso subpendiculado. B. Pólipo adenomatoso pendiculado.....	19
Figura 2 - Alterações morfológicas e moleculares na sequência adenoma-carcinoma...	23
Figura 3 - Visão geral das alterações na metilação do DNA durante a carcinogênese e dos agentes quimiopreventivos do câncer com potencial de inibir a expressão de DNMTs e evitar hipermetilação ou hipometilação aberrante do genoma.....	26
Figura 4 - Via de metilação do DNA.....	27
Figura 5 - Fluxograma de seleção dos indivíduos.	52
Figura 6A - Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene <i>RASSF1A</i> tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%)	58
Figura 6B - Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene <i>HIC1</i> tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Recomendações para vigilância do câncer colorretal de acordo com os achados na primeira colonoscopia.....	22
Tabela 2 - Programação do termociclador para tratamento com bissulfito.....	46
Tabela 3 - Sequência da lavagem do DNA tratado com bissulfito.....	47
Tabela 4 - Iniciadores <i>RASSF1A</i> e <i>HIC1</i> utilizados na reação em cadeia da polimerase.....	48
Tabela 5 - Condições da metilação específica da reação em cadeia da polimerase para o gene <i>RASSF1A</i>	48
Tabela 6 - Condições da metilação específica da reação em cadeia da polimerase para o gene <i>HIC1</i>	48
Tabela 7 - Caracterização sociodemográfica e indicadores nutricionais da população de acordo com o grupo de estudo.	52
Tabela 8 - Caracterização dos hábitos e do estilo de vida da população de acordo com o grupo de estudo.	53
Tabela 9 - Perfil clínico da população de acordo com o grupo de estudo.....	54
Tabela 10 - Perfil dos exames bioquímicos da população de acordo com o grupo de estudo.....	55
Tabela 11 - Perfil do consumo energético e nutricional da população de acordo com o grupo de estudo.....	57
Tabela 12 - Padrão de metilação dos genes <i>RASSF1A</i> e <i>HIC1</i> de acordo com o grupo de estudo.....	58
Tabela 13 - Regressão logística multivariada dos fatores associados com a metilação do gene <i>RASSF1A</i>	60
Tabela 14 - Regressão logística multivariada dos fatores associados com a metilação do gene <i>HIC1</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AICR	<i>American Institute for Cancer Research</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli / Polipose adenomatosa coli</i>
<i>BRAF</i>	Proto-oncogene B-Raf
CBA _s	Componentes Bioativos dos Alimentos
CCR	Câncer Colorretal
CH ₃	Radical metil
C ₂ H ₂	Radical etil
CIMP	Fenótipo de Hipermetilação da Ilha de CpG
5mC	5 metilcitosina
CpG	Citosina que precede guanina
DCC	<i>DCC netrin 1 receptor / Receptor de netrin 1</i>
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucleico</i>
DNMT _s	<i>DNA methyltransferase families / Família de enzimas DNA metiltransferases</i>
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1 / DNA metiltransferases de manutenção</i>
DNMT3A	<i>“De novo” DNA methyltransferase 3A / DNA metiltransferases “de novo”</i>
DNMT3B	<i>“De novo” DNA methyltransferase 3B / DNA metiltransferases “de novo”</i>
EPIC	Investigação Prospectiva Europeia sobre Câncer e Nutrição
IGF-1	Insulin-like growth fator / Fator de crescimento semelhante à insulina
IMC	Índice de Massa Corpórea
IC	Intervalo de Confiança
<i>HIC</i>	Hic1 bodies
<i>HIC1</i>	<i>Hipermethylation in cancer 1 / Hipermetilado no câncer 1</i>
<i>hMLH1</i>	<i>Human mutL Homolog 1</i>
<i>hMSH2</i>	<i>Human mutS homolog 2</i>
<i>KRAS</i>	Proto-oncogene KRAS
MSI	Instabilidade de Microsatélite
MSI-H	Alta Instabilidade de Microsatélite

MSM	<i>Multiple Source Method</i>
MS-PCR	<i>Methylation-specific PCR</i> / Reação em cadeia de polimerase metilação específica
NDSR	<i>Nutrition Data System for Research</i>
NOc	Compostos n-nitrosos
OR	<i>Odds Ratio</i> / Razão de Chance
p53	<i>Tumor protein p53</i> / Proteína p53
Pb	Pares de Base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> / Reação em cadeia da polimerase
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i> / Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinase catalítica subunidade alfa
RAS	<i>RAS-association domain</i> / Domínio de associação Ras
RASSF	<i>RAS-association domain family</i> / Tumor do domínio de associação da família Ras
RASSF1A	<i>Ras association domain-containing protein 1</i> / Membro de família de domínio de associação Ras 1
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucleico
R24h	Recordatório de 24 horas
RR	Risco Relativo
SAM	<i>S-adenosyl-L- methionine</i> / S-adenosilmetionina
TCF	<i>T-cell fator</i> / Fator de transcrição de células T
UnB	Universidade de Brasília
VIF	Fator de Inflação de Variância
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
WCRF	<i>World Cancer Research Fund</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> / Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Epidemiologia do câncer colorretal	18
2.2 Fisiopatogenia do câncer colorretal	18
2.3 Classificação histológica da lesão pré-carcinogênica e adenocarcinomas.....	20
2.3.1 Adenomas	20
2.3.2 Adenocarcinomas	21
2.4 Rastreamento do câncer colorretal	21
2.5 Alterações genéticas no câncer colorretal	23
2.6 Alterações epigenéticas no câncer colorretal	24
2.7 Metilação do gene <i>RASSF1A</i>	27
2.8 Metilação do gene <i>HIC1</i>.....	28
2.9 Câncer colorretal e alimentação.....	29
2.10 Modulação dietética do processo epigenético.....	33
2.11 Instrumentos para avaliação do consumo alimentar	34
2.11.1 Questionário de Frequência Alimentar.....	35
2.11.2 Recordatório de 24 horas.....	35
2.11.3 Método de estimação do consumo alimentar usual – <i>Multiple Source Method</i> (MSM)...	36
3 JUSTIFICATIVA	38
4 OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo geral.....	39
4.2 Objetivos específicos.....	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
5.1 Delineamento do estudo	40
5.2 Aspectos éticos	40
5.3 Plano amostral	40
5.3.1 Critérios de inclusão	40
5.3.2 Critérios de exclusão.....	40
5.4 Variáveis do estudo.....	41
5.4.1 Variável resposta.....	41
5.4.2 Variáveis explicativas.....	41

5.5 Procedimentos	41
5.5.1 Dados sociodemográficos e de estilo de vida.....	42
5.5.2 Consumo alimentar.....	42
5.5.3 Antropometria.....	43
5.5.4 Dados bioquímicos.....	43
5.5.5 Coleta da biópsia.....	43
5.5.6 Extração de DNA.....	44
5.5.7 Quantificação do DNA extraído.....	45
5.5.8 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	45
5.5.9 Tratamento com bissulfito.....	45
5.5.10 Reação em cadeia da polimerase metilação específica.....	47
5.5.11 Eletroforese do produto da reação em cadeia da polimerase metilação específica.....	49
5.6 Análise estatística	49
6 RESULTADOS	51
6.1 População do estudo	51
6.2 Caracterização sociodemográfica e indicadores nutricionais	52
6.3 Padrão de metilação dos genes <i>RASSF1A</i> e <i>HIC1</i>	56
6.4 Associação entre padrão de metilação, consumo alimentar, hábitos de vida e exames bioquímicos	59
7 DISCUSSÃO	62
7.1 Metilação dos genes <i>RASSF1A</i> e <i>HIC1</i>	62
7.2 Fatores associados ao câncer colorretal	65
8 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES	81
ANEXOS	112

1 INTRODUÇÃO

O câncer, atualmente, é a segunda causa de morte no mundo, com 8,2 milhões de óbitos por ano. Os tipos de câncer mais comuns são os de pulmão, mama e colorretal, este último responsável por 694.000 mortes no mundo em 2012 (FERLAY et al., 2015).

É consenso na literatura que os fatores genéticos e ambientais, que incluem atividade física e hábitos alimentares, são determinantes do risco de desenvolvimento do câncer. De acordo com o *World Cancer Research Fund* (2007), as principais causas são fatores ambientais como tabagismo, consumo de álcool, aumento da massa corpórea, sedentarismo, exposição a carcinógenos e dieta (WCRF/AICR, 2007; BOSMAN et al., 2010).

Dentre os fatores associados ao desenvolvimento do câncer colorretal (CCR): história familiar, predisposição genética e idade (HERCEG, 2007).

O câncer resulta de processos múltiplos que envolvem erros genéticos e epigenéticos cumulativos (BOSMAN et al., 2010). O efeito combinado da ativação de oncogenes e inativação de genes supressores do tumor está na base da progressão da doença. Na modulação epigenética do processo carcinogênico, um dos mecanismos diz respeito à metilação do DNA que age silenciando a expressão de um gene (POWERS, 2005). No CCR, como em outros tipos de cânceres, a metilação aberrante nas ilhas CpG das regiões promotoras do gene pode levar ao silenciamento transcricional de genes supressores de tumor, nos vários estágios da tumorigênese. Este achado foi verificado em biópsias de indivíduos com CCR (ZOU et al., 2007; SILVA et al., 2013).

Entretanto, as complexas interações entre fatores ambientais, genéticos e epigenéticos no desenvolvimento do câncer ainda não estão totalmente compreendidas. Na etiologia de tumores malignos, modificações epigenéticas poderiam promover alterações em genes susceptíveis a fatores ambientais. A potencial reversibilidade das alterações epigenéticas sugere que poderiam ser moduladas pela nutrição por meio de nutrientes e compostos bioativos dos alimentos (CBAs) (SUPIC; JAGODIC; MAGIC, 2013). Os genes *RASSF1A* e *HIC1* atuam no ciclo celular e em outros processos regulatórios na célula, e são descritos na literatura como genes supressores de câncer.

Estudos recentes têm focado nas mutações e nos padrões de metilação de diversos genes implicados no desenvolvimento de CCR (CASSINOTTI et al., 2012; HINOUE et al., 2012; SAKAMOTO et al., 2004). Identificar as interações entre as alterações epigenéticas e o consumo alimentar pode auxiliar no estabelecimento de ações direcionadas a modificações do

panorama epidemiológico para prevenção do CCR, sobretudo nas fases iniciais da malignização (SUPIC; JAGODIC; MAGIC, 2013).

Neste contexto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar as possíveis associações entre os componentes do consumo alimentar e as modificações epigenéticas em uma população em rastreamento de câncer colorretal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia do câncer colorretal

O câncer colorretal é o terceiro tipo de tumor maligno mais prevalente em todo o mundo, sendo predominante nos países de alta renda, com aumento gradativo em nações que fizeram transição de economia nos últimos tempos, como Singapura e países do Leste Europeu (WCRF/AICR, 2011). Cerca de 1,4 milhão de casos de câncer colorretal foram registrados no mundo no ano de 2012, o equivalente a cerca de 9,7% do total de cânceres em geral. Considerando o sexo, este é o terceiro e segundo tipo mais prevalente em homens e mulheres, respectivamente (FERLAY et al., 2015).

No Brasil, o carcinoma colorretal é um dos três tumores malignos primários mais frequentes que afetam ambos os sexos (BRASIL, 2015). Nos últimos 15 anos, sua incidência vem aumentando progressivamente (BRETTHAUER, 2010). Para o ano de 2016, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 420.310 casos novos de câncer, excluindo-se o de pele não melanoma, sendo o câncer colorretal responsável por 34.280 novos casos (BRASIL, 2015).

2.2 Fisiopatogenia do câncer colorretal

O câncer é caracterizado pelo crescimento celular desordenado causado por mudanças na informação genética e epigenética das células normais (KIM; LEE; SIDRANSKY, 2010). Padrões aberrantes de expressão gênica são características principais, e as anormalidades genéticas e epigenéticas contribuem para o surgimento desses padrões. (ONG; MORENO; ROSS, 2011). Esse processo provoca alterações na célula, que adquire maior capacidade de proliferação, associadas a outras características importantes da tumorigênese, como inibição da apoptose, crescimento celular desordenado e displasia (KIM; LEE; SIDRANSKY, 2010).

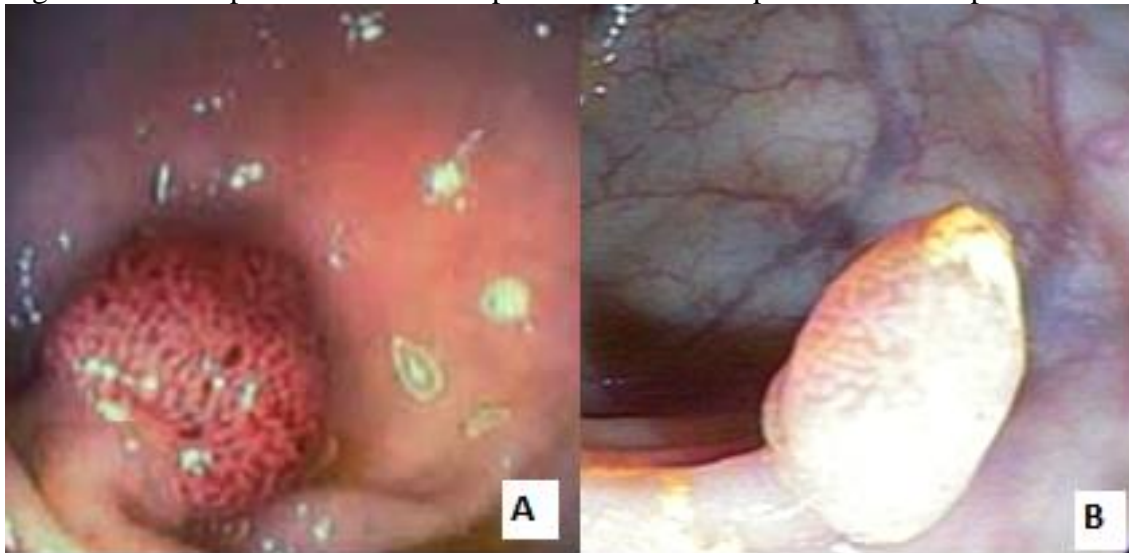
O câncer colorretal é uma doença heterogênea de etiologia complexa resultante de alterações genéticas e epigenéticas que podem atuar sinergicamente e transformar células epiteliais e glandulares em adenocarcinomas (SINHA et al., 2013). Caracteriza-se pela localização no cólon, sigmóide e reto (BOSMAN et al., 2010), podendo ter duas origens: esporádico, que corresponde a 80% das neoplasias colorretais, e hereditário, presente em 10 a 20% dos casos (MORÁN et al., 2010). Este último é subdividido em dois tipos: Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar e CCR hereditário não polipose ou Síndrome de Lynch

(LYNCH; CHAPELLE, 2003). O CCR esporádico acomete indivíduos sem história familiar e hereditária.

O desenvolvimento do CCR esporádico ocorre em várias etapas, com alteração das características histopatológicas (KIM; LEE; SIDRANSKY, 2010). O precursor morfológico da neoplasia epitelial é o Foco de Cripta Aberrante (FCA), evidenciado por dois tipos: característica de hiperplasia com alta frequência de mutações no oncogene RAS e displasia associada à mutação do gene APC (HAMILTON; AALTONEN, 2000). A inativação do complexo formado pelo gene APC e pela proteína β -catenina normalmente inicia o processo de proliferação epitelial na displasia. A associação das alterações moleculares leva a mudanças morfológicas do tecido colorretal, na maioria das vezes caracterizado pelo desenvolvimento de pólipos, que parecem crescer em consequência do rápido rompimento de FCA resultantes de mutação no APC (TURNER, 2016).

Pólipo é um termo amplo usado para designar crescimento tecidual saliente acima da membrana da mucosa intestinal, o qual é facilmente visualizado pelo exame macroscópico ou endoscópico. Os pólipos podem apresentar formas distintas denominadas sésil, subpendiculado e pendiculado (Figura 1) (TURNER, 2016).

Figura 1 - A. Pólipo adenomatoso subpendiculado. B. Pólipo adenomatoso pendiculado.



Fonte: Colonoscopia realizada durante a coleta de dados em 2015.

Histologicamente, os pólipos não neoplásicos podem ter característica inflamatória, hamartomática ou hiperplásica. O pólipo adenomatoso (adenoma) é considerado pré-neoplásico devido ao seu potencial de evoluir para câncer (HAMILTON; AALTONEN, 2000; TURNER, 2016). O adenoma caracteriza-se por uma displasia epitelial e apresenta-se em vários tamanhos

e aspectos. Uma forma de reduzir a incidência do adenocarcinoma colorretal é a remoção desses pólipos (TURNER, 2016).

Admitem-se duas vias patogênicas distintas para desenvolvimento do CCR, denominadas via supressora (também conhecida como sequência adenoma-câncer ou instabilidade de cromossomo ou APC/ β -catenina) e via mutadora (conhecida como instabilidade de microssatélite - MSI) (MORÁN et al., 2010). A primeira ocorre em 80% dos carcinomas esporádicos, e o evento mais precoce é a mutação do gene APC ou alteração na sinalização da β -catenina; na sequência, ocorrem várias etapas moleculares que levam a sucessivas mutações ordenadas de múltiplos genes supressores de tumor e oncogenes, acrescidas de perda da heterozigose de genes que causa crescimento do adenoma. Posteriormente, há aumento da displasia e capacidade invasiva, surgindo, assim, o adenocarcinoma (KIM; LEE; SIDRANSKY, 2010). A neoplasia intraepitelial pode ser de baixo ou alto grau, dependendo da complexidade glandular ou vilosa (HAMILTON; AALTONEN, 2000).

2.3 Classificação histológica da lesão pré-carcinogênica e adenocarcinomas

2.3.1 Adenomas

São lesões benignas circunscritas, compostas por estruturas tubulares e/ou vilosidades mostrando neoplasia intraepitelial. As células epiteliais neoplásicas são imaturas, normalmente aumentadas e com núcleo estratificado (BOSMAN et al., 2010).

Histologicamente, o adenoma é constituído pela proliferação de epitélio com displasia epitelial de diversos graus. Com frequência, apresenta nucléolos grandes, citoplasma eosinófilo e redução do número de células calciformes (TURNER, 2016). As displasias são classificadas em baixo e alto grau, com base no grau de atipia celular e displasia tecidual, sendo as de baixo grau os adenomas com displasias leves ou moderadas, e as de alto grau, adenomas com displasias severas ou carcinomas *in situ* (BOSMAN et al., 2010).

A depender do padrão arquitetural, os adenomas dividem-se em: tubular, tubuloviloso e viloso. O tubular é caracterizado por glândulas com aspecto tubular, justapostas e separadas por escasso estroma, com revestimento de epitélio pseudoestratificado. O viloso é menos frequente e o risco de evoluir para câncer é dez vezes maior que o do adenoma tipo tubular. A superfície apresenta aspecto vilositário, com projeções digitiformes formadas por escasso estroma conjuntivo vascular; ele é revestido por epitélio simples ou pseudoestratificado, com variado

grau de displasia. Já o tubuloviloso é evidenciado pela combinação de ambos os tipos descritos, e o risco de se tornar maligno é proporcional à quantidade de componente viloso (BOSMAN et al., 2010).

A malignização dos adenomas está associada a três fatores independentes: tamanho do pólip, tipo histológico e grau de displasia. O risco se eleva com o aumento do tamanho da lesão (maior que 1 cm), é gradativo, conforme a histologia, e potencializado de acordo com maior grau de displasia (NOGUEIRA, 2006).

2.3.2 Adenocarcinomas

São tumores malignos derivados de células epiteliais e/ou glandulares secretoras. Macroscopicamente, os adenocarcinomas apresentam-se sob três diferentes tipos: polipoide, úlceroinfiltrativo e anular-constritivo. A forma polipóide cresce em direção à luz intestinal sob a forma de couve-flor ou massa fungoide e geralmente consegue atingir grandes dimensões e formas papilomatosas irregulares com tendência a infiltrar a parede. O tipo úlceroinfiltrativo é de ocorrência mais comum, com crescimento em superfície e profundidade, infiltrando a parede, sendo frequentemente estenosante. A lesão apresenta fundo necrótico e bordas elevadas, duras, irregulares e costuma ser pouco diferenciada. O tumor anular-constritivo inicia com massa polipoide ou lesão elevada, limitada à mucosa, e tende a crescer acompanhando a circunferência do intestino. Infiltra a parede de modo circular, com tendência à ulceração. Há ocorrência de estenose em consequência da neoformação conjuntiva excessiva. É especialmente comum no reto e sigmoide (NOGUEIRA, 2006).

2.4 Rastreamento do câncer colorretal

O rastreamento do CCR em indivíduos assintomáticos é importante, pois reduz a incidência e a mortalidade por esta doença (LIEBERMAN et al., 2012).

Para o rastreamento do CCR são indicadas: pesquisa de sangue oculto nas fezes, retossigmoidoscopia e colonoscopia, sendo a última mais sensível e efetiva. A pesquisa de sangue oculto nas fezes é recomendada para indivíduos entre 50 e 75 anos e, caso o resultado seja positivo, realiza-se a colonoscopia (BRASIL, 2010). No caso de o indivíduo relatar CCR em parente de primeiro grau com idade < 60 anos no diagnóstico e sua colonoscopia for normal, o exame de colonoscopia deverá ser repetido em 5 anos. Se a idade do parente próximo diagnosticado com CCR for superior a 60 anos, deve-se realizar o exame de colonoscopia e,

diante de um resultado normal, o exame deverá ser repetido após 10 anos (LIEBERMAN et al., 2012). A colonoscopia requer extensa preparação do intestino, invasão da privacidade do paciente e sedação, sendo um exame de custo elevado.

Dentre as recomendações para vigilância do CCR, estudos demonstraram baixo risco (1,3% a 2,4%) do adenoma avançar para câncer em 5 anos quando a colonoscopia inicial de rastreio for normal (LEUNG; LAU; SUEN, 2009; MILLER; MUKHERJEE; TIAN, 2010). No entanto, alguns indivíduos podem desenvolver o câncer no período de 3 a 5 anos após colonoscopia e polipectomia, uma vez que 17% das lesões ≥ 10 mm não são identificadas na colonoscopia. Além disso, os adenomas podem não ser totalmente removidos pela polipectomia, e o tecido residual pode progredir para a malignidade (LIEBERMAN et al., 2012).

A tabela 1 apresenta as Diretrizes do Colégio Americano de Gastroenterologia para vigilância do CCR, de acordo com os achados da primeira colonoscopia (LIEBERMAN et al., 2012).

Tabela 1 - Recomendações para vigilância do câncer colorretal de acordo com os achados na primeira colonoscopia.

Pólipos achados na 1ª colonoscopia	Recomendação para intervalo de vigilância
Sem pólipo	10 anos
Pequenos (<10 mm) pólipos hiperplásticos no reto ou sigmoide	10 anos
Adenomas tubulares - 1 a 2 pequenos (<10 mm)	5-10 anos
Adenomas tubulares - 3 a 10 unidades	3 anos
Adenomas - > 10 unidades	< 3 anos
Adenomas tubulares ≥ 10 mm – 1 ou mais unidades	3 anos
Adenomas vilosos – 1 ou mais unidades	3 anos
Adenoma com displasia de alto grau	3 anos

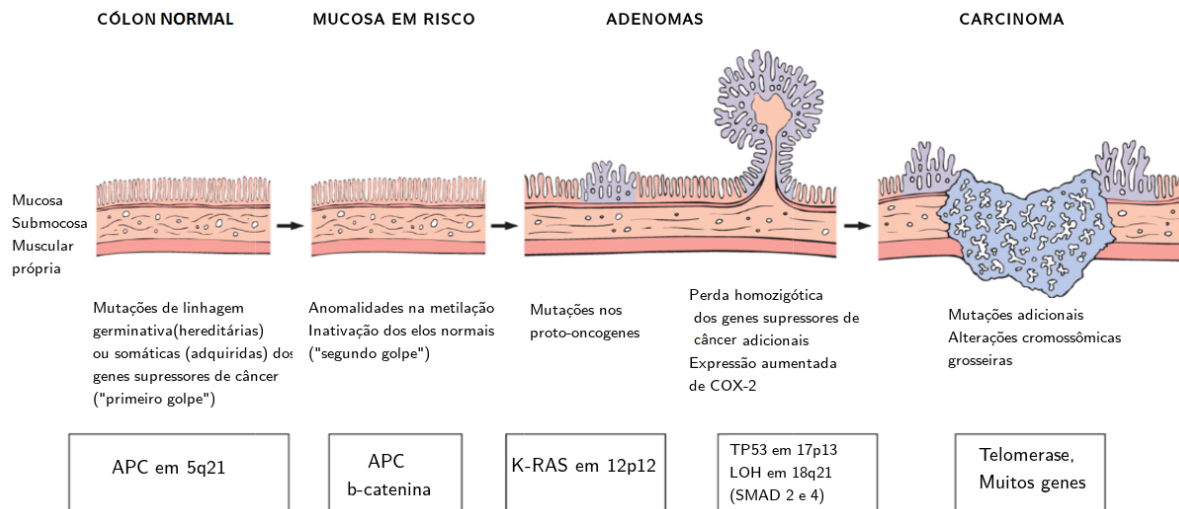
Fonte: Adaptado de Lieberman et al. 2012.

Evidências apontam risco a ser considerado com o aumento da idade para realização da colonoscopia. Assim, o rastreamento não deve ser continuado quando este exceder os benefícios, caso de pacientes com mais de 85 anos. Em indivíduos entre 75 a 85 anos, o risco/benefício deve ser avaliado individualmente, com base nas comorbidades e nos achados prévios da colonoscopia (LIEBERMAN et al., 2012).

2.5 Alterações genéticas no câncer colorretal

Fearon e Vogelstein (1990) propuseram que o carcinoma surge do adenoma preexistente, e que as alterações se correlacionam com eventos genéticos específicos, inclusive alteração na morfologia do tecido colorretal. As características desse modelo envolvem instabilidade cromossomal, caracterizada por mutação ou deleção de alelos nos genes *adenomatous polyposis coli* (*APC*), *tumor protein p53* (*TP53*) e *Deleted Colorectal Cancer* (*DCC*), as quais levam a alterações nas funções das proteínas codificadas por esses genes, além do produto do oncogene *KRAS* (MORÁN et al., 2010) (Figura 2). Pela grande contribuição de genes supressores de tumor (quando mutados), essa via foi denominada “via supressora”.

Figura 2 - Alterações morfológicas e moleculares na sequência adenoma-carcinoma.



Fonte: Adaptado de Turner, 2016.

O gene *APC*, localizado no cromossomo 5q21, codifica a proteína que promove migração e adesão celular por meio de sua ligação a microtúbulos ou β -catenina, a qual regula a via sinalizadora Wnt/ β -catenina, por sua vez, está associada à caderina-E e ambas formam um complexo de adesão celular. Quando o APC se encontra mutado, a β -catenina não é degradada, o que estimula fatores de transcrição nucleares e causa proliferação celular e redução da apoptose (MACDONALD et al., 2009; MORÁN et al., 2010).

O gene *TP53*, situado no cromossomo 17p13.1, é conhecido como o “guardião” do genoma humano porque codifica a proteína p53”, bloqueadora do ciclo celular na fase G1/S e indutora de apoptose. A p53 possui vários mecanismos para efetuar o reparo do DNA ou induzir a apoptose quando a célula é exposta a estresse ambiental. A mutação ou expressão anormal da p53 está presente em 50% dos tumores humanos, e isso ocorre durante a transição de adenoma

para câncer, segundo a hipótese de Fearon e Vogelstein (1990), ou da via supressora (MORÁN et al., 2010).

O gene *DCC*, localizado no 18q21.1, é descrito como gene supressor de tumor. Este desempenha papel na orientação do axônio do sistema nervoso em desenvolvimento e sinalização intracelular, induzindo a ativação da caspase-3 e apoptose. Quando mutado, sua expressão é reduzida em torno de 70%; há também perda de alelo no CCR (MORÁN et al., 2010).

O gene *K-RAS*, situado no cromossomo 12p12, produz a proteína *kras* atuante na transdução de sinais intracelulares, sendo frequentemente ativado na carcinogênese do cólon; encontra-se mutado em 50% dos adenomas maiores que 1 cm e adenocarcinomas (MORÁN et al., 2010). Uma vez que o *RASSF1A* é um dos reguladores do *RAS*, ativá-lo seria suficiente para induzir proliferação celular e consequente iniciação do câncer.

A via mutadora é caracterizada pelo acúmulo de mutações em sequências de microssatélites. Essas sequências são curtas, repetidas e estão ao longo de todo o genoma. Instabilidade de microssatélites é o fenômeno caracterizado por alterações no número de repetições de uma determinada sequência (microssatélites). As mutações germinativas ou alterações epigenéticas em *hMLH1* e *hMSH2* são as causas mais comuns de alta instabilidade de microssatélite (MSI-H) em CCR esporádico (MORÁN et al., 2010). A MSI-H está associada com hipermetilação da região promotora do *hMLH1*, que causa seu silenciamento. Essa é mais tardia e acomete sobretudo mulheres (IMAI; YAMAMOTO, 2008).

A principal característica molecular é o excesso de mutações em sequências de microssatélites em todo o genoma, causado por alterações primárias nos genes de reparo. Os tumores de MSI-H e instabilidade cromossomal têm características clínicas e histopatológicas distintas (MORÁN et al., 2010). Normalmente, o CCR esporádico com MSI-H não apresenta anormalidades citogenéticas e, geralmente, não é aneuploide. Esse tipo de tumor tem baixa frequência, ausência de mutações ou reduzidas perdas alélicas dos genes alterados na via supressora (MORÁN et al., 2010).

2.6 Alterações epigenéticas no câncer colorretal

O termo epigenética é definido como modificações do DNA e das histonas que podem ser herdáveis e não alteram a sequência de bases do DNA (MUN-KAR NG; YU, 2015; OLIVEIRA et al., 2010). Os principais processos epigenéticos são: metilação do DNA,

modificações de histonas, incluindo acetilação e desacetilação, metilação, fosforilação e remodelamento da cromatina (OLIVEIRA et al., 2010; ONG; MORENO; ROSS, 2011).

Constituem mecanismos epigenéticos que levam ao silenciamento de genes: modificação em histonas, hipometilação global do DNA e hipermetilação na região promotora de genes (GOEL; BOLAND, 2012; ONG; MORENO; ROSS, 2011). Na carcinogênese, essas mudanças implicam ganho de função dos oncogenes ou perda da atividade de genes supressores de tumor (MUN-KAR NG; YU, 2015).

As alterações epigenéticas que ocorrem sobre as histonas podem ser: acetilação/desacetilação, metilação e fosforilação, das quais apenas a primeira tem papel totalmente definido, uma vez que a acetilação de histonas modifica a estrutura da cromatina, tornando o DNA menos compactado e, portanto, mais acessível à maquinaria de transcrição. Já a metilação, que pode ser mono, bi ou trimetilação, tem um papel que varia de acordo com o local de ocorrência, podendo ser repressora ou indutora da transcrição gênica. Por exemplo, metilação na lisina 9 da histona 3 causa a formação de heterocromatina, o que impede o acesso da maquinaria de transcrição ao DNA (KARMODIYA et al., 2012; RANDO, 2012).

Alterações nas modificações de histonas na carcinogênese podem induzir a expressão gênica aberrante, promover a instabilidade genômica, prejudicar a reparação do DNA e diminuir a estabilidade do ciclo celular (GOEL; BOLAND, 2012; ONG; MORENO; ROSS, 2011). A terminologia 'histone onco-modifications' descreve modificações pós-traducionais ligadas ao câncer (ONG; MORENO; ROSS, 2011). As modificações de histonas podem ser influenciadas pela metilação da citosina nas ilhas CpG, fenômeno que recruta enzimas que catalisam suas modificações (SUPIC; JAGODIC; MAGIC, 2013).

A hipometilação está presente em diversos tipos de cânceres. Apesar do seu mecanismo ainda não estar elucidado, acredita-se que induza a ativação de oncogenes e a instabilidade cromossômica (SUPIC; JAGODIC; MAGIC, 2013). A perda de metilação do DNA ocorre predominantemente nas sequências de DNA que são muito repetidas, que não contêm gene e que contêm íntrons (EHRlich, 2009; MUN-KAR NG; YU, 2015).

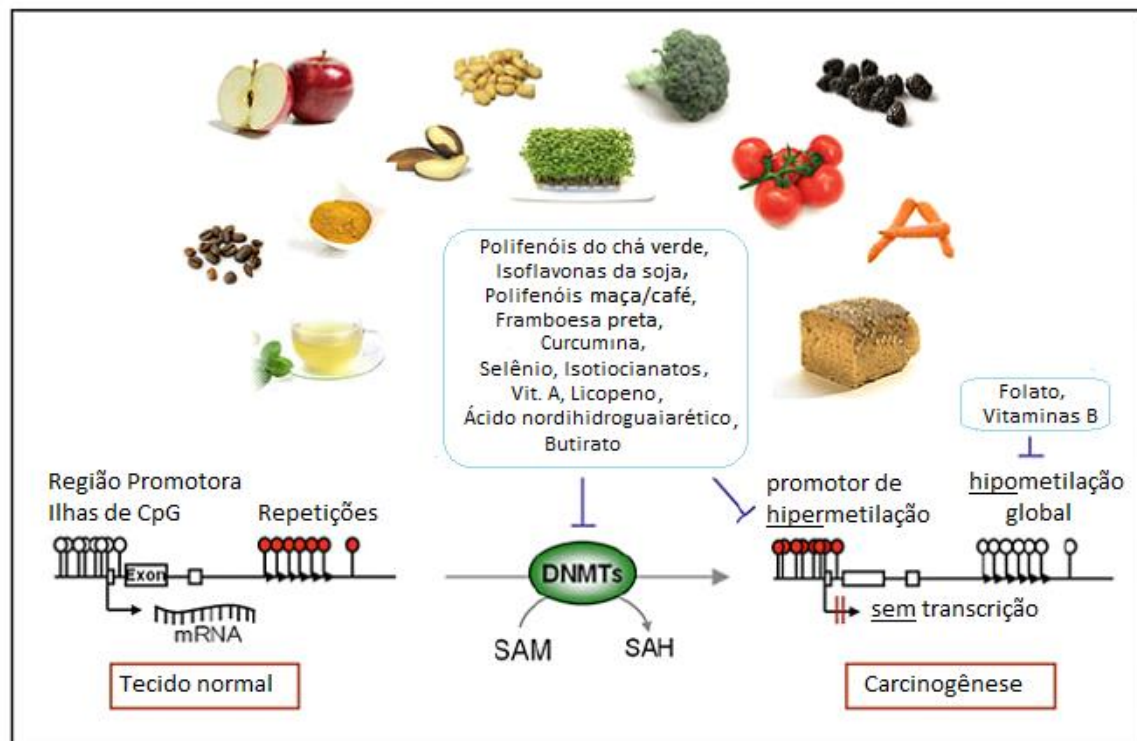
A modificação epigenética mais estudada é a hipermetilação do DNA, encontrada em vários tipos de câncer (ABOUZEID et al., 2011; MUN-KAR NG; YU, 2015); (SUMMERS et al., 2013). Os genes frequentemente submetidos a hipermetilação no câncer estão associados a diversos processos, incluindo reparação de DNA, controle do ciclo celular, apoptose, diferenciação, angiogênese e metástase (ONG; MORENO; ROSS, 2011). A hipermetilação contribui para a carcinogênese pela indução do silenciamento transcricional ou regulação

negativa dos genes supressores de tumor (MUN-KAR NG; YU, 2015). Os genes *RASSF1A* e *HIC1*, objetos desta pesquisa, quando hipermetilados, estão silenciados.

A metilação do DNA é um processo enzimático que ocorre nos dinucleotídeos ou ilhas CpG localizados na região promotora dos genes. O processo de metilação ocorre pela adição covalente de um radical metil (CH_3) ao 5º carbono de um resíduo da base citosina que precede a guanina por uma ligação fosfodiéster, convertendo-a em 5 metilcitosina (5mC) (BIRD, 2002; OLIVEIRA et al., 2010). As DNA metiltransferases (DNMTs) utilizam o radical metil obtido da S-adenosilmetionina (SAM), que é derivado do ciclo da metionina (FOLEY et al., 2009; MCCABE; CAUDILL, 2005). A disponibilidade da SAM é influenciada diretamente pela dieta (Figura 3), por ser constituída de derivados da colina, metionina e metabolismo do folato (ZEISEL, 2009).

Figura 3 - Visão geral das alterações na metilação do DNA durante a carcinogênese e dos agentes quimiopreventivos do câncer com potencial de inibir a expressão de DNMTs e evitar hipermetilação ou hipometilação aberrante do genoma.

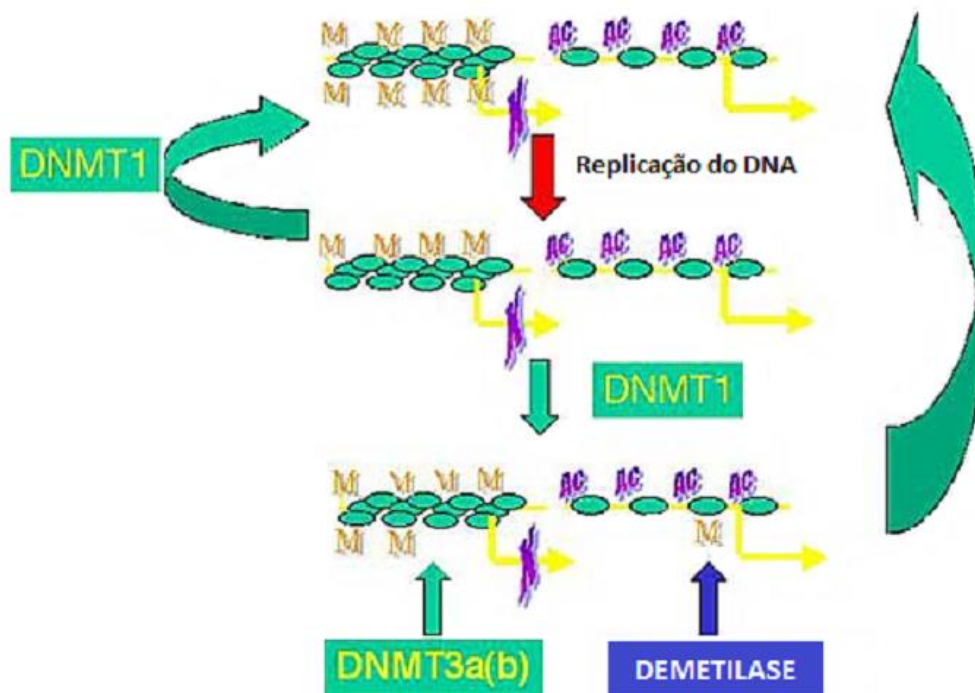
Fonte: Modificado de Gerhauser, 2012.



As enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da metilação do DNA. Dividem-se em duas famílias que apresentam funções distintas: as *de novo* metiltransferases, formadas pelas enzimas DNMT3A e DNMT3B; e a DNMT1, que é DNA metiltransferase de manutenção ((FOLEY et al., 2009; HASHIMOTO;

VERTINO; CHENG, 2010; ONG; MORENO; ROSS, 2011). As *de novo* metiltransferases DNMT3A e DNMT3B estabelecem o padrão inicial de metilação CpG durante a embriogênese, e a DNMT1 é responsável pela manutenção desse padrão durante a replicação do cromossomo (MOORE; LE; FAN, 2013; RONDELET; WOUTERS, 2017) (Figura 4). Estudos mostram que defeitos nas DNMTs, especificamente DNMT3A e DNMT3B, podem causar alterações epigenéticas associadas a transformação e progressão de tumores, por estabelecerem e manterem um fenótipo hipermetilado em células tumorais (*de novo*) (HERMAN; BAYLIN, 2003; JONES; BAYLIN, 2007).

Figura 4 - Via de metilação do DNA.



Fonte: Frontiers in Bioscience.org (2001).

2.7 Metilação do Gene *RASSF1A*

O *RASSF1A* (família do domínio de associação com a Ras isoforma 1A) é um gene supressor de tumor que integra o grupo dos efetores RAS e está envolvido em diversos processos celulares como regulação do ciclo celular, proliferação celular, apoptose (AGATHANGGELOU; COOPER; LATIF, 2005), estabilização de microtúbulos e adesão celular (ABOUZEID et al., 2011).

O gene *RASSF1A* codifica para dois produtos de *splicing* alternativo (*RASSF1A* e *RASSF1C*), dos quais *RASSF1A* é tido como um gene supressor tumoral que atua na fase G1/S

da progressão do ciclo celular. As proteínas denominadas *RAS-association domain family (RASSF)* são efetores com ação supressora da atividade do oncogene RAS (FERNANDES, 2013). O silenciamento gênico como resultado da metilação aberrante do promotor em *RASSF1A* pode ser um evento importante na tumorigênese, sendo reconhecido como um marcador alternativo para desregulação da via do RAS (WEYDEN; ADAMS, 2007).

A metilação do promotor *RASSF1A* resulta no silenciamento transcricional, o que inibe sua função supressora no desenvolvimento de tumor, acarretando desenvolvimento e progressão do CCR (FERNANDES, 2013). A literatura demonstra correlação positiva entre metilação do promotor do gene *RASSF1A* e suscetibilidade ao CCR (FERNANDES, 2013).

Recentemente, estudos têm demonstrado que os genes da família *RASSF* sofrem inativação por metilação, causando silenciamento epigenético e a consequente não associação com a RAS (CASSINOTTI et al., 2012); (WEYDEN; ADAMS, 2007). Esta ausência de associação poderá, por sua vez, ocasionar uma replicação desregulada em qualquer célula. Em adição às já conhecidas mutações nos genes *K-RAS*, *BRAF* e *PIK3CA*, a perda de expressão da *RASSF1A* representa um mecanismo epigenético, que poderia explicar a sinalização aberrante da RAS (FERNANDES, 2013).

Em estudo com população egípcia envolvendo 72 indivíduos submetidos a primeira colonoscopia de rotina, sendo diagnosticados 17 casos de adenoma, 19 de colite ulcerativa e 36 de CCR, observou-se frequência na hipermetilação do gene *RASSF1A* em 47,2% e 5,9% no CCR e adenoma, respectivamente (ABOUZEID, et. al., 2011).

Estudo realizado na Índia com 62 indivíduos, sendo 62 biópsia de tecido tumoral e 62 de mucosa adjacente ao tumor, tendo como objetivo verificar o papel da mutação genética do gene *K-RAS* e alteração epigenética do *RASSF1A* no CCR esporádico. Os resultados demonstraram associação significativa do estágio do tumor com o padrão de metilação *RASSF1A* (SINHA et al., 2013).

2.8 Metilação do Gene *HIC1*

O gene *HIC1* (*Hypermethylated in Cancer 1*), localizado no cromossomo 17p13.3, codifica uma proteína HIC1 que é um repressor transcricional com três domínios funcionais: BTB / POZ N-terminal, terminal-C que contém cinco dedos de zinco de C₂H₂-Krüppel e uma região central (FLEURIEL et al., 2009; ZHENG et al., 2012).

O gene *HIC1* encontra-se amplamente expresso em tecidos normais e codifica um fator de transcrição que contém dedos de zinco e atua na repressão da transcrição. Evidências *in vitro*

sugeriram que o *HIC1* poderia influenciar na transcrição dos receptores de efrina A2 (EphA2) (FOVEAU et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que o *HIC1* forma oligômeros no núcleo, conhecidos como corpúsculos de *HIC* (*hic1 bodies*). Embora não se conheça a exata função desses corpúsculos, sabe-se que o *HIC1* é capaz de se associar a betacatenina, sequestrando-a junto com o fator de transcrição de células T (TCF – *T-cell factor*) para esses corpúsculos. Dessa forma, impede a transcrição de genes regulados por TCF e/ou da via regulada por wnt/betacatenina (VALENTA et al., 2006).

Adicionalmente, a haploinsuficiência da região onde se localiza o *HIC1* foi associada ao aparecimento da síndrome humana de Mieler-Dieker, a qual se caracteriza pela deficiência na formação cerebral em virtude de migração neuronal incompleta. Como a migração dessas células depende, pelo menos em parte, das efrinas, é possível que o *HIC1*, ao mediar a transcrição dessas, contribua para o surgimento da síndrome (VALENTA et al., 2006).

O papel do *HIC1* no câncer foi elucidado parcialmente por modelos murinos, nos quais animais heterozigotos (*HIC*^{+/-}) apresentaram tumores variados em idades mais precoces que os homozigotos do tipo selvagem (wt *HIC*^{+/+}) (FLEURIEL et al., 2009).

A hipermetilação da região do cromossomo deste gene leva à inativação epigenética do *HIC1*, o que permite que células cancerosas alterem sinais de sobrevivência ou fatores transcricionais envolvidos no processo da tumorigênese (ZHENG et al., 2012). Um importante alvo da transcrição desse gene é a regulação do homólogo 1 (SIRT1) desacetilase. Em condições fisiológicas normais, o *HIC1* reprime a transcrição do SIRT1 e inibe a desacetilação do P53. A desacetilação resulta na atenuação da capacidade de ativar/regular a apoptose e/ou proliferação celular, pelo P53. Já em células tumorais, o *HIC1* encontra-se inativado, o que eleva os níveis de SIRT1 e, conseqüentemente, promove a desacetilação do P53 que inibe a sua atividade (ZHENG et al., 2012).

No estudo de genes biomarcadores da metilação do DNA em sangue circulante, observou-se que os genes *RASSF1A* e *HIC1* estavam metilados nos indivíduos com pólipos adenomatosos e CCR, quando comparados com o controle, com 55% e 84% de sensibilidade e 65% e 68% de especificidade, respectivamente (CASSINOTTI et al., 2012).

2.9 Câncer colorretal e alimentação

De acordo com o relatório divulgado pela *World Cancer Research Fund* em conjunto com a *American Institute of Cancer Research*, de revisão sistemática de estudos relacionando itens da alimentação humana e risco para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, há

evidências convincentes de que o consumo de alimentos que contêm fibras (frutas e vegetais) e a prática regular de atividade física protegem contra o CCR. Já o elevado consumo de carne vermelha e processada, bem como de bebidas alcoólicas, e a presença de excesso de gordura corporal e abdominal estão relacionados ao maior risco de CCR (WCRF/AICR, 2007, 2011).

De acordo com o Relatório WCRF/AIRC (2007), por meio de estudo de meta-análise verificou-se elevação em 37% no risco de desenvolver câncer de cólon a cada aumento de 100 g/dia na ingestão de carne vermelha e processada. Já no CCR, o risco mostrou-se aumentado em 29% a cada 100 g/dia de carne vermelha consumida e em 21% para cada 50 g/dia de carne processada.

Ferrucci et al. (2012), em estudo de coorte, relataram associação positiva entre o consumo de carne vermelha grelhada (RR:1,56, IC 1,04-2,36), carne bem cozida (RR:1,59, IC 1,05-2,43) e carne processada (benzopireno) (RR:1,53, IC 1,06-2,20) e o adenoma retal. O consumo excessivo de carne vermelha/carnes processadas (HENDERSON, 2012; WCRF/AICR, 2007) e a ingestão de dieta hipercalórica (SUN et al., 2012) têm sido associados ao maior risco para o desenvolvimento do CCR.

A Investigação Prospectiva Europeia sobre Câncer e Nutrição (EPIC) é uma coorte prospectiva que incluiu mais de 500.000 participantes de dez países europeus. A subcoorte (estudo realizado apenas na Noruega) do EPIC, realizada em 84.500 mulheres norueguesas, encontrou resultados que demonstraram associação positiva entre ingestão maior ou igual a 60 g/dia de carne processada e risco de câncer de cólon proximal, distal e reto na comparação com o consumo deste alimento em quantidade inferior a 15 g/dia (PARR et al., 2013).

Além dos achados para o CCR, recente revisão sistemática e meta-análise revelaram aumento significativo no risco de adenoma associado a tabagismo (RR 2,47, IC 2,12-2,87), consumo de álcool (RR 1,33, IC 1,17-1,52), gordura corporal elevada (RR 1,40, IC 1,22-1,61), ingestão de carne vermelha (RR 1,23, IC 1,07-1,41) e dieta com alto teor de gordura (RR 1,25, IC 1,10-1,41) (BAILIE; LOUGHREY; COLEMAN, 2017).

Compostos como aminas heterocíclicas aromáticas, n-nitrosos (NOc) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que se formam pela cocção de carnes a altas temperaturas são carcinógenos conhecidos (HENDERSON, 2012; WHO, 2003). Quando a carne vermelha é cozida a altas temperaturas, produz aminas aromáticas heterocíclicas, e a combustão incompleta de compostos orgânicos como carvão e madeira produz hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (alimentos defumados) que aumentam o risco de câncer no cólon em indivíduos com predisposição genética (WCRF/AICR, 2011). Além disso, as carnes vermelhas têm alto teor de ferro heme, o que as torna agente de nitrosilação com formação de NOc e faz aumentar a

proliferação de células da mucosa do intestino pela via de peroxidação lipídica. A adição dos conservantes nitrito e nitrato no processamento das carnes é uma forma importante de formação de NOc (BAENA; SALINAS, 2015).

Por outro lado, o consumo de frutas, hortaliças frescas, cereais integrais (HENDERSON, 2012); (TÁRRAGA; ALBERO; RODRÍGUEZ-MONTES, 2014), fibras, carboidrato (SUN et al., 2012) e peixes exerce papel protetor contra o desenvolvimento desta malignidade (WU et al., 2012). A proteção conferida pelo consumo de alimentos integrais se dá, possivelmente, pelo alto teor de fibras, fitatos e outras substâncias quimioprotetoras neles presente (HENDERSON, 2012; SURH, 2003; WCRF/AICR, 2007). A figura 3 permite uma visão geral das alterações de metilação do DNA durante a carcinogênese e dos agentes quimiopreventivos de câncer.

Bradbury; Appleby; Key (2014) resumiram os achados de 27 publicações relacionadas à ingestão de frutas e vegetais (RR 0,86; IC 0,75-1,00) e fibras de cereais integrais (RR 0,83; IC 0,72-0,96) no estudo EPIC. Os resultados indicaram que o consumo combinado desses alimentos estava inversamente associado ao desenvolvimento do CCR. Além disso, a alta ingestão de fibras de cereais foi associada à redução do risco de CCR.

Em meta-análise, Ralston et al. (2014) relataram que o consumo de 525 g/dia de leite não fermentado reduziu em 26% o risco de CCR em homens, e o mesmo efeito não foi observado em mulheres e nem mediante o consumo de queijo e leite fermentado. Em outra meta-análise, Aune et al. (2012) evidenciaram associação não linear entre o consumo de leite e o risco de CCR, com nenhuma associação substancial abaixo de 200 g/dia e com maior redução do risco para CCR nos níveis mais elevados de consumo, ou seja, de 500 a 800 g/dia.

Em relação a alguns nutrientes específicos, destaca-se o cálcio, por atuar em diversas funções celulares, incluindo proliferação e diferenciação celular e apoptose em células intestinais. No entanto, seus efeitos sofrem influência dos níveis de vitamina D corporais (BAENA; SALINAS, 2015). Em revisão de literatura para atualização em CCR, encontrou-se redução de 9% no risco mediante ingestão de 200 g/dia de leite (PERERA; THOMPSON; WISEMAN, 2012).

O selênio é um micronutriente essencial com propriedades anticancerígenas. Em um dos estudos do EPIC, os autores relataram que níveis séricos de selênio mais elevados estavam inversamente associados ao risco de desenvolver carcinoma colorretal, e essa constatação foi mais evidente em mulheres do que em homens (HUGHES et al., 2015). Em meta-análise com 2.136 indivíduos, observou-se menor risco de adenoma colorretal em população com alto nível

de selênio no plasma ou soro sanguíneo em comparação com indivíduos de baixo nível de selênio (OU et al., 2012).

Em meta-análise de estudos de coorte, observou-se que sobrepeso, obesidade, circunferência abdominal e baixa frequência de atividade física estavam relacionados a um maior risco para o desenvolvimento de câncer colorretal (PERERA; THOMPSON; WISEMAN, 2012). Em relação à obesidade, vários processos biológicos estão envolvidos diretamente com o desenvolvimento do câncer, tais como insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), resistência à insulina, citocina pró-inflamatória, interleucina-6 e proteína C reativa. Uma hipótese do mecanismo de ação da gordura corporal na carcinogênese do CCR baseia-se no seu efeito direto sobre os níveis hormonais de insulina, estrógenos e IGF-1, que acarretam redução da apoptose celular e favorecem a carcinogênese (PERERA; THOMPSON; WISEMAN, 2012). A hiperinsulinemia crônica aumenta a biodisponibilidade do IGF-1, estimula a síntese de estrógenos ovarianos e expressão do receptor de hormônio de crescimento. Além disso, inibe a produção hepática de proteínas de ligação ao IGF-1 e, com isso, eleva a biodisponibilidade de estrogênios circulantes e IGF-1 (SLATTERY; FITZPATRICK, 2009). Isso, por sua vez, pode levar ao acúmulo de gordura abdominal e, subsequentemente, ao aumento resistência à insulina, elevando o risco de CCR (WCRF/AICR, 2011).

Por outro lado, a prática de atividade física regular e moderada aumenta o metabolismo basal, melhora a oxigenação dos tecidos, reduz a gordura corporal e a resistência à insulina. Já o sedentarismo, ao contrário, está relacionado com estado de inflamação crônica de baixo grau ou inflamação latente com maiores níveis de estrogênio e insulina circulantes (BAENA; SALINAS, 2015).

Em relação ao consumo de álcool, os estudos de coortes demonstraram associação positiva para o desenvolvimento de adenomas e CCR, uma vez que se verificou aumento do risco entre 16% e 41% para consumo de etanol superior a 30g/dia e 45g/dia, respectivamente (DURKO; MALECKA-PANAS, 2014). O consumo prolongado de álcool reduz a absorção das vitaminas do complexo B (B1, B2, B12 e ácido fólico), o que aumenta a vulnerabilidade das células ao estresse oxidativo e leva a uma maior produção de radicais livres (DURKO; MALECKA-PANAS, 2014).

2.10 Modulação dietética do processo epigenético

A alimentação como fator de risco ou proteção para o câncer ocorre via nutrientes e componentes bioativos dos alimentos (CBAs) que, possivelmente, atuam no mecanismo da modulação epigenética, embora este processo não esteja totalmente elucidado (ONG; MORENO; ROSS, 2011). Uma hipótese é que os CBAs compreendem alil, polifénóis, isotiocianatos, retinóides e flavonóides, os quais apresentam propriedade anticarcinogênica por interferirem nos processos epigenéticos durante a carcinogênese, como hipometilação global do DNA, hipermetilação do promotor do gene supressor de tumor e modificações pós-traducionais de histonas (ONG; MORENO; ROSS, 2011; SUPIC; JAGODIC; MAGIC, 2013).

Os CBAs podem modular importantes mecanismos para prevenção e supressão do câncer, os quais incluem vias de tradução de sinalização, proliferação e diferenciação celular, apoptose, estresse oxidativo, inflamação (ONG; MORENO; ROSS, 2011; SURH, 2003) e ligantes para receptores de fator de transcrição. Os CBAs podem interferir na metilação do DNA e modificações de histonas, afetando a expressão de genes envolvidos no processo de carcinogênese (ONG; MORENO; ROSS, 2011).

No genoma, certos CBAs e nutrientes interferem em diversas redes de sinalização celular por ativação direta ou indireta de fatores de transcrição. Na ativação direta, o nutriente ou CBA se liga diretamente a um fator de transcrição no núcleo e, com isso, essa proteína regulatória é ativada e inicia o processo transcricional. Na ativação indireta, o nutriente ou CBA ativa cascatas de sinalização celular, em que ocorre ativação progressiva de diferentes proteínas com ativação de fatores de transcrição. Esses, quando ativados, se translocam do citoplasma para o núcleo e induzem a transcrição de genes (SURH, 2003).

Os CBAs e nutrientes podem afetar a metilação do DNA de, pelo menos, quatro formas: 1. Fornecendo grupo metil (CH_3); 2. O grupo metil pode interferir na atividade das DNA metiltransferases (DNMT); 3. Desmetilação do DNA e 4. Os padrões de metilação do DNA ativam ou reprimem genes relacionados ao câncer que podem influenciar a resposta da intervenção dietética. (ONG; MORENO; ROSS, 2011).

Em estudo de coorte realizado com 88.651 enfermeiras americanas e 375 casos incidentes de CCR, que avaliou a influência do consumo de álcool, aminoácido metionina, cálcio, carne vermelha, ácido fólico e vitaminas B6 e B12 no padrão de metilação da *CIMP* e *BRAF*, definiu-se *CIMP*-alto ≥ 6 de 8 marcadores metilados. Usando o painel deste estudo, considerou-se *CIMP*-baixo como 0 a 5 de 8 marcadores previamente estabelecidos nesta pesquisa. A pesquisa encontrou associação inversa entre a ingestão de ácido fólico e vitamina

B6 e o risco do CCR. No entanto, não houve diferença significativa quando analisada a influência do folato em função do padrão de metilação da CIMP-baixo/0 com RR 0,73; IC 0,53-1,02. Esta comparação levou em consideração a ingestão inferior a 200 µg/dia e superior a 400 µg/dia de folato, (SCHERNHAMMER et al., 2011).

Adicionalmente, neste mesmo estudo verificou-se a influência das vitaminas B6 e B12 no estado CIMP. O benefício da ingestão da vitamina B6 foi para CIMP baixo/0 com RR 0,77; IC 0,48-1,23, enquanto o risco de tumores com CIMP-alto não foi influenciado pela ingestão da referida vitamina. Em relação à vitamina B12, não houve efeito no risco do CCR em CIMP-baixo/0, com RR 0,99; IC 0,70-1,39 (SCHERNHAMMER et al., 2011).

Assim, diante dos resultados dos estudos apresentados, há evidências convincentes de que alguns nutrientes e CBAs colaboram na proteção para o desenvolvimento do CCR, embora seus mecanismos de ação ainda não estejam esclarecidos. Já o consumo diário de mais de 100g/dia de carne vermelha e 50g/dia de carne processada associado com a baixa ingestão de frutas e verduras e estilo de vida inadequado contribui para a iniciação do CCR (WCRF/AICR, 2007).

2.11 Instrumentos para avaliação do consumo alimentar

A avaliação dietética de população permite obter informações importantes a respeito da frequência e distribuição dos alimentos e nutrientes consumidos (CASTELL; SERRA-MAJEM; RIBAS-BARBA, 2015). Avaliar o consumo alimentar é um desafio, em virtude das dificuldades metodológicas envolvidas na mensuração acurada da ingestão dietética (CRISPIM et al., 2009); (FISBERG et al., 2008). Os instrumentos disponíveis para este tipo de avaliação apresentam erros aleatórios e sistemáticos inerentes aos métodos, e estes se estendem ao indivíduo avaliado e ao avaliador (COSTA; GIGANTE, 2013).

É notório que os principais métodos disponíveis para determinar o consumo de alimentos e nutrientes possuem vieses, intrínsecos aos próprios métodos, tais como a dependência da memória do entrevistado, o erro de estimativa das medidas pelo entrevistado e entrevistador, além de outros, que reduzem a sua confiabilidade (SUBAR et al., 2003).

O Questionário de Frequência Alimentar (QFA) e o Recordatório de 24 horas (R24h) são os principais instrumentos utilizados para coleta de dados dietéticos visando avaliar o consumo alimentar (FISBERG et al., 2008).

2.11.1 Questionário de Frequência Alimentar

O QFA é um instrumento utilizado para o desenvolvimento de estudos epidemiológicos que relacionam o consumo dietético ao risco de doenças crônicas não transmissíveis e outras patologias (CRISPIM et al., 2009; SLATER et al., 2003). Trata-se de um instrumento prático, de baixo custo, que possibilita medir a frequência e a intensidade do consumo, assim como classificar os indivíduos em categorias de consumo, sendo muito utilizado em pesquisas que devem considerar a logística da coleta de dados e os custos (FISBERG, MARCHIONI, COLUCCI, 2009).

Esse instrumento consiste numa lista de alimentos predefinida, devendo o entrevistado relatar a frequência com que consome determinado alimento (número de vezes por ano, mês ou dia). Assim, capta-se a frequência da ingestão de alimentos em um amplo período de tempo, o que é fundamental para estimar a medida de exposição ao consumo dietético e investigar sua associação com o desfecho investigado (FISBERG et al., 2008; SLATER et al., 2003).

As limitações do QFA para medir a ingestão acuradamente decorrem da complexidade da entrevista e baixa precisão no que se refere à quantidade consumida. Além disso, a forma de validação da lista de alimentos do instrumento é complexa (FREEDMAN et al. 2014).

Assim, com vistas a minimizar os erros inerentes ao QFA e melhorar a qualidade dos dados obtidos, é essencial utilizar esse instrumento validado (CRISPIM et al., 2009). A frequência do consumo alimentar pode ser utilizada de duas formas: distinguir consumidores de determinados alimentos daqueles que não os consomem ou os consomem apenas ocasionalmente a curto prazo e como covariável no modelo estatístico (HAUBROCK et al., 2011).

2.11.2 Recordatório de 24 horas

O R24Hh é muito utilizado em pesquisas nutricionais, particularmente em adultos, podendo ser ou não aplicado em combinação a outros instrumentos de avaliação de consumo, tais como registro alimentar e QFA (CASTELL; SERRA-MAJEM; RIBAS-BARBA, 2015).

Trata-se de um instrumento subjetivo e retrospectivo de avaliação da dieta (CASTELL; SERRA-MAJEM; RIBAS-BARBA, 2015), que quantifica e descreve detalhadamente o consumo de bebidas e alimentos no período de referência. A entrevista é realizada considerando a alimentação do dia anterior e utilizando técnica validada cientificamente, a fim de obter

detalhes do horário, tamanho e/ou volume da porção consumida (CONWAY et al. 2003), sendo imprescindível para obtenção de dados fidedignos.

O R24h pode ser autoaplicado, realizado por telefone ou pessoalmente por entrevistador treinado (CASTELL; SERRA-MAJEM; RIBAS-BARBA, 2015; THOMPSON; SUBAR, 2013). É de aplicação rápida e necessita de curto período de recordação do entrevistado (CARROLL et al. 2012). Além disso, permite obter informações sobre o consumo em vários níveis de especificidades e não requer qualquer grau de alfabetização por parte do entrevistado, aspectos que favorecem a avaliação da dieta atual, estimando a ingestão absoluta e relativa de nutrientes e alimentos (FISBERG, MARCHIONI, COLUCCI, 2009).

Uma falha do método ocorre quando não há, no período da análise do R24h, ingestão de alimentos ou grupos de alimentos usualmente consumidos, o que, portanto, não expressa o consumo habitual (HAUBROCK et al., 2011). Nesse sentido, são necessárias repetições do instrumento em dias não consecutivos em pelo menos uma subamostra ou, se possível, na amostra completa.

As informações obtidas por meio deste instrumento são influenciadas pela memória do entrevistado em recordar precisamente os alimentos ou bebidas consumidos e da habilidade do entrevistador em com ele estabelecer uma boa comunicação. Além disso, torna se relevante o entrevistador conhecer os alimentos e costumes locais (FISBERG, MARCHIONI, COLUCCI, 2009).

Freedman et al. (2014) analisaram cinco grandes estudos conduzidos nos EUA em população adulta, com o objetivo de esclarecer as propriedades de medição do QFA e R24h. Os estudos analisados referiam-se à validação de instrumentos de avaliação de consumo e utilizaram biomarcadores como referência (água duplamente marcada e urina 24h), verificando aumento substancial nas correlações quando usadas múltiplas repetições do R24h, em vez de um único recordatório. Além disso, Carroll et al. (2012) relataram que a combinação dos instrumentos é a melhor opção para obter dados de consumo com maior precisão.

2.11.3 Método de estimação do consumo alimentar usual – Multiple Source Method (MSM)

Os métodos de avaliação de consumo alimentar atualmente disponíveis apresentam problemas de validação, precisão e reprodutibilidade. Assim, em busca de uma avaliação mais fidedigna, pesquisadores do EPIC desenvolveram o Multiple Source Method (MSM) (HAUBROCK et al., 2011).

O MSM é um programa estatístico que ajusta a distribuição de consumo eliminando uma parte do erro associado à variabilidade intrínseca do indivíduo. É usado para estimar o consumo habitual, incluindo nutrientes e alimentos consumidos por um grupo de indivíduos ou uma população. O programa permite calcular a ingestão dietética habitual por meio de medidas de curto (R24h ou registro alimentar) e longo prazo (QFA) (HARTTIG et al., 2011). O método baseia-se em duas ou mais medidas de consumo do R24h (HARTTIG et al., 2011) ou registro alimentar. Além disso, é possível adicionar alimentos de uso esporádico com base nos dados do QFA, na idade e no sexo como covariáveis do modelo estatístico, o que fortalece a análise (MSM USER GUIDE, 2011).

Haubrock et al. (2011) aplicaram o MSM para avaliar o consumo de 393 participantes que responderam dois R24h e um QFA. Este estudo demonstrou que o MSM é um aplicativo válido para estimar as distribuições do consumo habitual de alimentos, desde que utilizadas pelo menos duas medições repetidas por participantes.

3 JUSTIFICATIVA

A metilação de genes é um processo constante no funcionamento normal da célula, sobre o qual componentes da dieta, como nutrientes e CBAs, podem interferir direta ou indiretamente na transcrição, reduzindo ou aumentando a expressão de genes-alvo. Já a hipermetilação do DNA é um processo epigenético que, quando atua nos genes supressores de tumor, pode silenciá-los e levar à multiplicação das células de forma desordenada. Os genes *RASSF1A* e *HIC1* são reguladores de vias do ciclo celular relevantes na iniciação do processo tumorigênico.

É consenso que o desequilíbrio na alimentação, como o elevado consumo de carne vermelha associado com a baixa ingestão de frutas, verduras e fibras provenientes de cereais, constitui fator que predispõe o indivíduo ao maior risco de desenvolver CCR. Entretanto, não está claro se o consumo elevado de carne vermelha e processada e de outros nutrientes como fibra alimentar, alto teor de gorduras, vitaminas e minerais poderia estar associado à hipermetilação dos genes supressores de tumor *RASSF1A* e *HIC1*. Assim, o conhecimento da relação do consumo alimentar e a metilação do DNA permitirá definir uma ação mais efetiva de orientação alimentar que vise à prevenção do CCR nas fases de iniciação.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre o consumo alimentar e a metilação dos genes *RASSF1A* e *HIC1* em uma população em rastreamento para câncer colorretal.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar o consumo alimentar e o perfil nutricional de indivíduos submetidos a colonoscopia.
- Determinar o padrão de metilação dos genes *RASSF1A* e *HIC1* em tecidos de biópsia de cólon e reto.
- Avaliar a associação entre metilação dos genes *RASSF1A* e *HIC1* e diagnóstico histopatológico para câncer colorretal, parâmetros bioquímicos, estado nutricional e consumo dietético.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Estudo transversal, observacional e analítico desenvolvido com indivíduos submetidos ao exame de colonoscopia.

5.2 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, em 09 de abril de 2014 (CAAE: 05580514.2.0000.0030).

5.3 Plano amostral

A amostragem foi de conveniência, com captação de participantes na Clínica do Aparelho Digestivo, especializada em colonoscopia, e no Hospital Dom Orione, ambas instituições privadas, e no Hospital Regional de Araguaína, uma instituição pública, todos localizados na cidade de Araguaína, no estado do Tocantins. Foram convidados a participar indivíduos submetidos a colonoscopia, sendo incluídos aqueles que aceitaram participar desta pesquisa e que atendiam aos critérios de inclusão. A captação desses indivíduos ocorreu no período de julho de 2014 a julho de 2015, perfazendo um total de 13 meses.

5.3.1 Critérios de inclusão

Pessoas acima de 40 anos de idade, de ambos os sexos, submetidos ao exame de colonoscopia.

5.3.2 Critérios de exclusão

a) Portadores de síndrome de Lynch; b) portadores de polipose familiar; c) portadores de doença inflamatória intestinal; d) indivíduos com investigação/diagnóstico de câncer em outra localidade do corpo; e) portadores de outras doenças intestinais sem relação com o câncer colorretal; f) pessoas com alguma deficiência física que impedisse a realização

das medidas antropométricas; g) pessoas que não tivessem condições cognitivas de responder às perguntas; h) história de adenoma colorretal; e i) uso de colostomia.

5.4 Variáveis do estudo

Neste momento serão apresentadas as variáveis referentes ao padrão de metilação dos genes supressores de câncer colorretal *RASSF1A* e *HIC1* e as variáveis explicativas deste estudo.

5.4.1 Variável resposta

O padrão de metilação dos genes supressores de câncer colorretal *RASSF1A* e *HIC1* foi definido com base nas variáveis de resposta. Para classificar a amostra em metilada (M) ou não metilada (U), utilizou-se o programa Image J versão 1.50i (ABRAMOFF; MAGALHAES; RAM, 2004). Calculou-se a razão de área do amplificado da amostra com DNA metilado e seu respectivo controle, ambos produtos da MS-PCR em gel de agarose, e, para classificação em M e U, considerou-se a razão amostra/controle $\geq 0,33$ como metilado e $< 0,33$ não metilados.

5.4.2 Variáveis explicativas

As variáveis explicativas do estudo foram: consumo alimentar, antropometria, dados bioquímicos, diagnóstico histopatológico, informações sociodemográficas e o estilo de vida dos participantes.

5.5 Procedimentos

Os indivíduos foram atendidos em consulta nutricional para aplicação de questionários, avaliação antropométrica e bioquímica. Os procedimentos foram realizados a fim de coletar dados sociodemográficos e referentes a estilo de vida, consumo alimentar, antropometria, exames bioquímicos e metilação dos genes *RASSF1A* e *HIC1*. Para o estudo da metilação, fez-se biópsia, além das seguintes análises: extração de DNA, quantificação do DNA extraído, eletroforese de DNA em gel de agarose, tratamento com bissulfito, reação em cadeia da polimerase metilação específica e eletroforese do produto da reação em cadeia da polimerase metilação específica.

5.5.1 Dados sociodemográficos e estilo de vida

Aplicou-se o questionário socioeconômico e de hábitos de vida para obter informações sobre idade, estado civil, escolaridade, etnia, tabagismo, consumo de álcool, uso de suplemento nutricional, prática regular de atividade física, uso de medicamentos, função intestinal e antecedentes pessoais e familiares (Anexos 4 e 6).

5.5.2 Consumo alimentar

O R24h e o QFA foram os instrumentos utilizados para coleta de dados dietéticos (Anexos 3 e 5).

Neste estudo, a fim de avaliar o consumo habitual dos participantes, foram aplicados o QFA validado para uma população da Região Centro-Oeste do Brasil (VASCONCELOS, 2008) e dois R24h, em dias não consecutivos (presencial e telefônico) e intervalo aproximado de 10 dias, de acordo com o preconizado pelo método proposto pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (CONWAY et al., 2003), que estabelece cinco passos para análise da ingestão de alimentos.

Para análise dos dados de consumo, optou-se por utilizar os programas Nutrition Data System for Research (NDSR) e o Multiple Source Method (MSM). O NDSR é o programa de maior precisão e abrangência em análise de nutrientes e grupos de alimentos para fins de pesquisa científica. Foi desenvolvido para análise do R24h e registro alimentar, cardápios e receitas (DUONG, 2014); (HARNACK, 2013). Já o MSM é um método estatístico usado para correção da distribuição de consumo de nutrientes e alimentos, estimando o consumo frequente e esporádico para grupo de indivíduos ou população. Baseia-se em duas ou mais medidas de consumo do 24Rh, com ou sem a inclusão de dados de QFA (HARTTING et al., 2011).

Realizou-se o cálculo nutricional dos recordatórios 24h com auxílio do programa NDSR, versão 2014. Foram analisadas calorias (kcal), percentual calórico do lipídio, percentual calórico da proteína, percentual calórico do carboidrato e os seguintes nutrientes: ferro, fibra alimentar total, fibra solúvel, fibra insolúvel, gordura monoinsaturada, gordura poli-insaturada, gordura saturada, total de ácido graxo ômega 3, ácido fólico, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina A, metionina, selênio, cálcio e zinco.

Além disso, estimou-se a quantidade, em gramas/dia, da ingestão de diferentes tipos de carne vermelha fresca e carnes processadas para cada indivíduo. Inicialmente, os dados do QFA foram utilizados para estimar a frequência do consumo desses tipos de carnes. A variabilidade

intra pessoal dos dados sobre nutrientes, carne vermelha e processada foram ajustados pelo programa MSM.

5.5.3 Antropometria

O peso foi aferido em balança digital, com capacidade para 150 kg e precisão de 100g. A altura foi aferida com estadiômetro de metal, de 200 cm e precisão de 1mm. Os indivíduos foram posicionados em pé, com os braços relaxados e a cabeça no plano horizontal, sendo as medidas aferidas segundo as recomendações de Jellife et al. (1968). Calculou-se o índice de massa corpórea (IMC – kg/m^2) com base no peso atual dividido pela altura ao quadrado, classificando-o de acordo com os pontos de corte estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1995).

A circunferência da cintura foi aferida utilizando uma fita métrica inelástica de 150 cm, colocada no ponto médio entre a crista ilíaca e o rebordo costal inferior, classificada segundo os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008).

5.5.4 Dados bioquímicos

Os indivíduos realizaram exames bioquímicos de glicemia, lipidograma, proteinograma e hemograma. A amostra sanguínea obtida após jejum de 10 horas (8 ml) foi coletada no dia anterior à avaliação nutricional, em tubos *vacutainer* contendo EDTA, por técnico de laboratório habilitado. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas Araguaína-TO, utilizando o método enzimático colorimétrico para triglicérides, colesterol e frações, glicemia e proteínas totais plasmática, albumina e globulina; e citometria de fluxo para hemácia, hemoglobina, hematócrito, leucócito e linfócito, os quais estão automatizados, validados e são de uso rotineiro. Os dados de glicemia, colesterol e frações foram classificados de acordo com o proposto por XAVIER, H. T. et al (2013), e os demais exames conforme os valores de referências da padronização do Laboratório de Análises Clínicas.

5.5.5 Coleta da biópsia

A biópsia foi realizada durante a colonoscopia, utilizando-se pinça para polipectomia ou alça de polipectomia para análise histopatológica e epigenética. Nos casos de suspeita de câncer colorretal, foram coletadas até três amostras de fragmentos de $0,4 \text{ cm}^3$, em diferentes

locais da lesão. Os pólipos coletados foram divididos em duas partes, para as posteriores análises histopatológica e molecular. No grupo sem alteração na mucosa intestinal (controle), coletaram-se amostras a 15 cm da borda anal (ALLY; AL-GHNANIEM; PUFULETE, 2009), as quais foram imediatamente acondicionadas em microtubos com 250 μ L de DNA/RNA *shield* (Zymo Research, Irvine, EUA) e armazenadas a -20°C até que fossem transportadas para o Laboratório de Bioquímica da Nutrição na Universidade de Brasília, onde, então, foram armazenadas a -80°C até a realização das análises moleculares.

5.5.6 Extração de DNA

Para extração de DNA do tecido colorretal, utilizou-se o Kit Purelink Genomic DNA (cat. K1820-01, Invitrogen, Carlsbad, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados 15 a 20mg de amostras de tecido para cada extração. Após pesagem, as amostras foram maceradas com pistilo de plástico em microtubos estéreis e a elas foram adicionados 180 μ L de Purelink Genomic Digestion Buffer, com agitação em vórtex (Lab Danger- IKA, Staufen, Alemanha) por 5 segundos. Na sequência, adicionou-se um total de 20 μ L proteinase K e, após nova agitação, as amostras foram incubadas em banho seco previamente aquecido a 55°C por 4h, com subsequente agitação em vórtex de 25 em 25 minutos, durante esse período.

Após a incubação, o sobrenadante foi clarificado por centrifugação a 17000g (13.300rpm) (Centrífuga Heraeus Fresco 17 centrifuge, Thermo Scientific, Langenselbold, Alemanha) em temperatura ambiente por 3 minutos e, posteriormente, transferido para novo tubo estéril.

Foram adicionados 20 μ L de RNase A ao sobrenadante, com breve agitação em vórtex, seguida de incubação em temperatura ambiente (25°C) por 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se 200 μ L de Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer, com breve agitação e, em seguida, adicionados 200 μ L de etanol (96 a 100%) ao lisado, com nova agitação em vórtex. Após essas etapas, a solução foi transferida para Purelink spin columns (coluna) e centrifugada na velocidade 9600g (10000 rpm) por 1 minuto a 25°C .

Para lavagem do DNA, a coluna foi transferida para outro tubo coletor e foram adicionados 500 μ L do tampão de lavagem 1 (já acrescido de etanol) à coluna que fora centrifugada na velocidade 9600g a 25°C por 1 minuto, seguido de descarte do tubo coletor. Dando continuidade a este processo, colocou-se a coluna em um novo tubo coletor e a ela acrescentou-se 500 μ L do tampão de lavagem 2 (preparado em etanol), seguido por

centrifugação na velocidade de 17000g a 25°C por 3 minutos. Ao final, descartou-se o tubo com o filtrado.

O DNA extraído foi eluído pela adição de 25 µL de água deionizada à coluna montada sobre um novo tubo coletor. O sistema foi centrifugado na velocidade de 17000g por 1 minuto, em temperatura ambiente, por duas vezes, sendo retirada, do eluído resultante, uma alíquota para medidas de concentração e eletroforese. Alíquota e amostras foram imediatamente armazenadas a -80°C até o uso.

5.5.7 Quantificação do DNA extraído

A concentração do DNA extraído (ng/µL) foi determinada em espectrofotômetro Nano Drop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) com 1µL da amostra de DNA, fazendo-se a leitura em varredura. Foram considerados adequados valores da razão das leituras de absorbância a 260nm e 280nm (A260/A280) maiores ou iguais a 1.8.

5.5.8 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A integridade e pureza do DNA foram avaliadas ainda por eletroforese em gel de agarose (Bio-Rad, Hercules, EUA). Alíquota de 200ng de DNA, extraído e corado com 2µL de Bleu/orange loading dry 6X (cat. 1881, Promega, Madison, EUA), foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% com tampão TBE 1X (Tris base, ácido bórico e EDTA) e corada com brometo de etídio. Como padrão, foram utilizados 5µL de marcador de peso molecular de 1 kb DNA Ladder (cat. 382, Omega Bio-Tek, Norcross, EUA). Realizou-se a eletroforese em cuba horizontal (OWL Easycast™ B2- Thermo Scientific, Portsmouth, NH, EUA), com tampão de corrida TBE 1X a 100v/10 minutos e 120v/40 minutos.

O gel foi analisado em fotodocumentador (Transilluminator L-PIX Touch - Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil) sob luz UV, utilizando o software do próprio equipamento para aquisição de imagens.

5.5.9 Tratamento com bissulfito

As amostras de DNA foram tratadas com bissulfito para conversão dos resíduos de citosina não metilado em uracila, com auxílio do *Kit EpiTect Fast DNA Bissulfite* (cat. 59824, Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Em tubo de 200µL,

adicionou-se 1 µg de DNA e água livre de RNase até completar o volume de 20µL e, na sequência, 85µL de solução de bissulfito e 35µL de tampão protetor de DNA. O conteúdo foi homogeneizado por inversão e centrifugado em microcentrífuga por 40 segundos. A reação foi realizada em termociclador (Veriti®96-well Thermal Cycler – Applied Biosystems, Singapura) conforme tabela 2. As amostras e os componentes da reação estavam em temperatura ambiente antes de serem misturados para reação, conforme instruções do fabricante.

Tabela 2 - Programação do termociclador para tratamento com bissulfito

Passo	Tempo	Temperatura
Desnaturação	5 minutos	95°C
Incubação	20 minutos	60°C
Desnaturação	5 minutos	95°C
Incubação	20 minutos	60°C
Manutenção	Infinito	20°C

Após a incubação, fez-se a centrifugação dos tubos em microcentrífuga por 40 segundos e transferiu-se o conteúdo para microtubo 1,5 mL. Foram adicionados 310µL do Buffer BL a cada amostra com agitação (Lab Danger- IKA, Staufen, Alemanha); após, as amostras foram centrifugadas por 30 segundos em microcentrífuga. Logo foram acrescentados 250µL de etanol, e a solução foi transferida para coluna spin MinElute DNA com tubo coletor e centrifugada (Centrífuga 2-16P - Sigma, Osterode am Harz, Alemanha) a velocidade de 20.600 g (15000 rpm) por 1 minuto e 30 segundos, sendo o fluxo filtrado descartado. Em seguida, realizaram-se várias etapas de lavagem do DNA ainda aderido à coluna, em temperatura ambiente, conforme descrito na tabela 3.

Após a etapa de lavagem do DNA, colocou-se a coluna em novo tubo coletor e esta foi centrifugada a uma velocidade 20.600 g por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, a coluna aberta foi incubada em banho seco a 60°C por 2 minutos.

Para eluir o DNA, foram acrescentados 15 µL de buffer EB no centro da coluna, sendo a amostra incubada por 1 minuto, seguida de centrifugação a uma velocidade 13.200 g (12.000 rpm) por 1 minuto e 30 segundos. O DNA tratado foi mantido a -20°C até seu uso em etapas posteriores.

Tabela 3 - Sequência da lavagem do DNA tratado com bissulfito.

Sequência de adição	Componente	Volume (µL)	Incubação (Minuto)	Centrifugação (Valor em g)*	Tempo
1º	Tampão BW	500	-	20.600	1min 30seg
2º	Tampão BD	500	15 min	20.600	1min 30seg
3º	Tampão BW	500	-	20.600	1min 30seg
4º	Tampão BW	500	-	20.600	1min 30seg
5º	Etanol	250	-	20.600	1min 30seg

*Valor 20600g = 15000 rpm com o rotor utilizado

5.5.10 Reação em cadeia da polimerase metilação específica

A reação em cadeia da polimerase metilação específica da (MS-PCR) é uma técnica utilizada para detecção do padrão de metilação das ilhas CpG em fragmentos específicos. A sequência investigada é amplificada em duas reações de PCR para cada amostra de DNA, sendo uma sequência resultante do uso de iniciador específico para detectar DNA metilado e outra específica para detectar a sequência não metilada. Nesta pesquisa, foram usados iniciadores do *RASSF1A* e *HIC1* descritos por Zhang et al. (2013) e Abouzeid et al. (2011), respectivamente.

A reação de MS-PCR foi realizada com volume final de 25µL para ambos os genes, com os componentes: 12,5µL de GoTaq® G2 hot start green mix 2x (cat. M7423, Promega, Madison, EUA), 1 µL a 10 µM de iniciador direto, 1µL a 10 µM de iniciador reverso (Tabela 3), 1µL (66,6 ng) de DNA tratado com por bissulfito e água livre de nucleases (cat. M7423, Promega, Madison, EUA) para completar o volume final de 25µL.

Como controles, foram ainda utilizadas amostras de DNA metilado e não metilado adquiridas comercialmente da Epiect Qiagen (cat. 59655 e 59665, respectivamente, Qiagen, Hilden, Alemanha).

As sequências dos iniciadores são apresentadas na tabela 4, e as condições da MS-PCR nas tabelas 5 e 6, para os genes *RASSF1A* e *HIC1*, respectivamente.

Tabela 4 - Iniciadores *RASSF1A* e *HIC1* utilizados na reação em cadeia da polimerase.

Iniciadores	Estado da metilação	Sequência	Nº pb*
<i>RASSF1A direto</i>	Metilado	GTGTTAACGCGTTGCGTTATC	21
<i>RASSF1A reverso</i>	Metilado	AACCCCGCGAACTAAAAACGA	21
<i>RASSF1A direto</i>	Não metilado	TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	23
<i>RASSF1A reverso</i>	Não metilado	CAAACCCACAACTAAAAACAA	23
<i>HIC1 direto</i>	Metilado	TCGGTTTTCGCGTTTTGTTCGT	22
<i>HIC1 reverso</i>	Metilado	AACCGAAAACCTATCAACCCTCG	22
<i>HIC1 direto</i>	Não metilado	TTGGGTTTGGTTTTTGTGTTTTG	23
<i>HIC1 reverso</i>	Não metilado	CACCCTAACACCACCCTAAC	20

*pb – pares de base

Tabela 5 - Condições da metilação específica da reação em cadeia da polimerase para o gene *RASSF1A*.

Etapas	Descrição	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1	Desnaturação inicial	95°C	2 min	-
2 ^a	Desnaturação	94°C	30 seg	
2b	Anelamento	62°C	30 seg	40
2c	Extensão	72°C	30 seg	
3	Extensão final	72°C	5 min	-
4	Infinito	4°C	∞	-

Tabela 6 - Condições da metilação específica da reação em cadeia da polimerase para o gene *HIC1*.

Etapas	Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1	Desnaturação inicial	95°C	2 min	-
2 ^a	Desnaturação	94°C	30 seg	
2b	Anelamento	63°C	30 seg	40
2c	Extensão	72°C	30 seg	
3	Extensão final	72°C	5 min	-
4	Infinito	4°C	∞	-

5.5.11 Eletroforese do produto da reação em cadeia da polimerase metilação específica

Avaliou-se a presença de amplificação no gene metilado ou não metilado por eletroforese em gel de agarose (*Bio-Rad*, Hercules, EUA) 2,0% em tampão de corrida TBE 1X (Tris base, ácido bórico e EDTA) corado com brometo de etídio a 5 µg/ml. Para análise, utilizou-se alíquota de 12µL do produto de MS-PCR. Usados ainda 2µL de marcador de peso molecular 50 bp DNA Step Ladder (cat. G4521, Promega, Madison, EUA). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal de eletroforese (OWL Easycast™ B2- Thermo Scientific, Portsmouth, NH, EUA), com solução de TBE 1X a 80v/10 minutos e 100v/35 minutos.

Analisou-se o resultado do MS-PCR em fotodocumentador (Transilluminator L-PIX Touch - Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil) sob luz UV, em sistema de captura de imagens.

5.6 Análise estatística

Para analisar as variáveis qualitativas foram utilizadas as frequências absoluta e relativa. Já para as variáveis quantitativas, foram adotadas medidas de tendência central, dispersão e posição. Nas análises descritivas, aplicou-se o Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas, ANOVA nas variáveis normalmente distribuídas e Kruskal-Wallis naquelas que não seguiam a distribuição normal. Os resultados foram apresentados em percentuais e medianas. Para todos os testes, adotou-se nível de significância $p < 0,050$.

A fim de verificar os fatores que pudessem exercer influência sobre a metilação dos marcadores epigenéticos ajustou-se uma regressão logística (AGRESTI; KATERI, 2011), sendo o método Stepwise empregado para seleção das variáveis (EFROYMON, 1960). Inicialmente, fez-se uma análise de regressão logística univariada para cada variável, utilizando o método Forward como critério para entrada das variáveis ao nível de significância de 25% para seleção das variáveis que entraram no modelo da regressão logística multivariada. Para a regressão logística multivariada, optou-se por utilizar o método Backward e adotou-se o nível de 5% de significância. No método Backward, por sua vez, foi retirada a variável de maior *p*-valor, sendo esse procedimento repetido até que restassem no modelo somente as variáveis significativas. Além disso, para verificar se os modelos ajustados estavam adequados, foram calculadas as medidas de qualidade de ajuste Pseudo R² e aplicado o teste de Hosmer-Lemeshow. Utilizou-se o Fator de Inflação de Variância (VIF) para verificar a existência de multicolinearidade nos modelos ajustados. Valores de VIF maiores que 10 foram considerados evidências da presença de multicolinearidade, o que indica a existência de preditores no modelo

muito correlacionados entre si (FOX, 2008). Para a análise de regressão, os grupos “inflamatório” e “hiperplásico” foram reclassificados como um grupo denominado “outros tipos pólipos”, por serem considerados não carcinogênicos.

As análises foram realizadas com auxílio do software estatístico R versão 3.2.4.

8 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo confirmaram parcialmente a hipótese de que a metilação dos genes supressores de câncer *RASSF1A* e *HIC1* se associa ao estilo de vida e a componentes da alimentação em pessoas submetidas ao rastreamento de câncer colorretal.

O consumo de carne vermelha e processada não teve associação com a metilação dos genes *RASSF1A* e *HIC1*.

A metilação do gene *RASSF1A* apresentou associação negativa com parâmetros do estilo de vida, tais como consumo do percentual calórico de carboidratos e álcool, e associação positiva com vitamina B6. Essas associações, no entanto, ocorreram em sentido oposto ao esperado.

Não se identificou associação entre a metilação do gene *HIC1* e os componentes relacionados ao estilo de vida.

Estudos adicionais são necessários para elucidar a relação entre consumo alimentar, estilo de vida e padrão de metilação dos genes supressores de tumor *RASSF1A* e *HIC1*. Sugere-se também a realização de estudo com desenho longitudinal que possa acompanhar os pacientes rastreados para o exame de colonoscopia. Nessa perspectiva, recomenda-se incluir monitoramento alimentar, com realização de recordatórios de 24h, e coletar dados comportamentais que possam contribuir para o melhor entendimento dos fatores determinantes e/ou protetores para o CCR. Além disso, considera-se importante utilizar a técnica de microdissecção na biópsia e técnicas de análises molecular mais precisas, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real.

REFERÊNCIAS

- ABOUZEID, H. E. et al. Promoter Hypermethylation of RASSF1A, MGMT, and HIC-1 Genes in Benign and Malignant Colorectal Tumors. **Tumour Biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 32, n. 5, p. 845–852, out. 2011.
- ABRAMOFF, M. D.; MAGALHAES, P. J.; RAM, S. J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- AGATHANGGELOU, A.; COOPER, W. N.; LATIF, F. Role of the Ras-Association Domain Family 1 Tumor Suppressor Gene in Human Cancers. **Cancer Research**, v. 65, n. 9, p. 3497–3508, 1 maio 2005.
- AGRESTI, A.; E KATERI, M. Categorical Data Analysis. **Springer** Berlin: Heidelberg, 2011.
- ALLY, M. S.; AL-GHNANIEM, R.; PUFULETE, M. The Relationship between Gene-Specific DNA Methylation in Leukocytes and Normal Colorectal Mucosa in Subjects with and without Colorectal Tumors. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 3, p. 922–928, 2009.
- ANGELO, S. N. et al. Dietary risk factors for colorectal câncer in Brazil: a case control study. **Nutrition Journal**, p.15-20, 2016.
- AUNE et al. Dairy Products and Colorectal Cancer Risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Annals of Oncology: official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 23, n. 1, p. 37–45, jan. 2012.
- BAENA, R.; SALINAS, P. Diet and Colorectal Cancer. **Maturitas**, v. 80, n. 3, p. 258–264, mar. 2015.
- BAILIE, L.; LOUGHREY, M. B.; COLEMAN, H. G. Lifestyle Risk Factors for Serrated Colorectal Polyps: a systematic review and meta-analysis. **Gastroenterology**, v. 152, n. 1, p. 92–104, jan. 2017.
- BIRD, A. DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory. **Genes & Development**, v. 16, n. 1, p. 6–21, 1 jan. 2002.
- BOFFETTA, P. Reflections on nutritional câncer epidemiology. **Am. J. Clinical Nutrition**, v.103, p. 3-4, jan. 2016.
- BOSMAN, F. T. et al. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. **WHO - Classification of Tumours of the Digestive System**. 4. ed. Lyons: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2010.
- BRADBURY, K. E.; APPLEBY, P. N.; KEY, T. J. Fruit, Vegetable, and Fiber Intake in Relation to Cancer Risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, 1, p. 394S–8S, jul. 2014. Suppl.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

_____. _____. _____. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

_____. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 2011.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Rastreamento**. Brasília, 2010.

_____. _____. **Vigitel Brasil 2015 Saúde Suplementar**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Agência Nacional de Saúde Suplementar, 2017.

BRETTHAUER, M. Evidence for Colorectal Cancer Screening. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 4, p. 417–425, ago. 2010.

CARR P. R. et al. Associations of red and processed meat with survival after colorectal cancer and differences according to timing of dietary assessment. **Am. J. Clin.** v. 103, p.192-200, 2016.

CARROLL R. J. et al. Taking advantage of the strengths of 2 different dietary assessment instruments to improve intake estimates for nutritional epidemiology. **American Journal of Epidemiology**, v. 175, n. 4, p. 340–347, 24 jan. 2012.

CASSINOTTI, E. et al. DNA Methylation Patterns in Blood of Patients with Colorectal Cancer and Adenomatous Colorectal Polyps. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 5, p. 1153–1157, 1 set. 2012.

CASTELL, G. S.; SERRA-MAJEM, L.; RIBAS-BARBA, L. What and how much do we eat? 24-hour dietary recall method. **Nutritión Hospitalaria.**, v.31, n. 3, p. 46-48, 2015. Supl.

CONWAY, J. M. et al. Effectiveness of the US Department of Agriculture 5-Step Multiple-Pass Method in Assessing Food Intake in Obese and Nonobese Women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 5, p. 1171–1178, maio 2003.

COPPEDÈ, F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: focus on DNA methylation. **Cancer Letters**, v.342, n.2, p. 238-247, Jan. 28 2012.

COSTA, T. H. M. da; GIGANTE, D. P. Facts and Perspectives of the First National Dietary Survey. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 166s–170s, fev. 2013.

CRISPIM, S. P. et al. Relative Validity of a Food Frequency Questionnaire for Use in Adults. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 1, p. 81–95, fev. 2009.

DANIEL, C. R.; McCULLOUGH, M. L.; PATEL, R. C. Dietary intake of omega-6 and omega-3 fatty acids and risk of colorectal cancer in a prospective cohort of U.S. men and women. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.18, n. 2, p. 516-25, 2009.

- DE VOGEL, S. et al. Biomarkers related to one-carbon metabolism as potential risk factors for distal colorectal adenomas. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 20, n. 8, p. 1726-1735, ago. 2011.
- DODD K. W. et al. Statistical methods for estimating usual intake of nutrients and foods: a review of the theory. **J. Am. Diet. Assoc.** v.106, p.1640-1650, 2006.
- DUONG, Huong (Editor). **Nutrition data system for research**. Minnesota: University of Minnesota, 2014.
- DURKO, L.; MALECKA-PANAS, E. Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. **Current Colorectal Cancer Reports**, v. 10, n. 1, p. 45–54, 2014.
- EFROYMON, M. A. Multiple Regression Analysis. **Mathematical methods for digital computers**, v. 1, p. 191-203, 1960.
- EHRlich, M. DNA Hypomethylation in Cancer Cells. **Epigenomics**, v. 1, n. 2, p. 239–259, dez. 2009.
- FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759- 767, 1 jun. 1990.
- FERLAY, J. et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-386, 1 mar. 2015.
- FERNANDES, M. S. et al. Colorectal Cancer and RASSF Family--a Special Emphasis on RASSF1A. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 2, p. 251–258, 15 jan. 2013.
- FERRUCCI, L. M. et al. Meat Consumption and the Risk of Incident Distal Colon and Rectal Adenoma. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 3, p. 608–616, 31 jan. 2012.
- FISBERG, R. M. et al. Food Frequency Questionnaire for Adults from a Population-Based Study. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 3, p. 550–554, jun. 2008.
- FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L.; COLUCCI, A. C. A. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 53, n.5, p.617-624. 2009.
- FLEURIEL, C. et al. HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) Epigenetic Silencing in Tumors. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 1, p. 26–33, jan. 2009.
- FOLEY, D. L. et al. Prospects for Epigenetic Epidemiology. **American Journal of Epidemiology**, v. 169, n. 4, p. 389–400, 15 fev. 2009.
- FOVEAU, B. et al. The receptor tyrosine kinase EphA2 is a direct target gene of hypermethylated in cancer 1 (HIC1). **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 8, p. 5366–5378, 2012.
- FOX, J. **Applied Regression Analysis and Generalized Linear Models: collinearity and its purported remedies**. 2. ed. [s.l.]: Sage Publications; CA, 2008. Cap. 13.

FREEDMAN, L. S. et al. Pooled Results From 5 Validation Studies of Dietary Self-Report Instruments Using Recovery Biomarkers for Energy and Protein Intake. **American Journal of Epidemiology**, v. 180, n. 2, p. 172–188, jun., 2014.

GERHAUSER, C. **Cancer Chemoprevention and Nutri-Epigenetics**: state of the art and future challenges. Topics in Current Chemistry, 2012.

GOEL, A.; BOLAND, C. R. Epigenetics of Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 143, n. 6, p. 1442–1460, dez. 2012.

GYPARAKI, M.-T.; BASDRA, E. K.; PAPAVALASSILIOU, A. G. DNA Methylation Biomarkers as Diagnostic and Prognostic Tools in Colorectal Cancer. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 11, p. 1249–1256, nov. 2013.

HAMILTON, S. R.; AALTONEN, L. A. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. **WHO Pathology and genetics of tumours of the digestive system**. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2000. p. 314.

HARNACK, P. L. Nutrition Data System for Research (NDSR). In: GELLMAN, M. D.; TURNER, J. R. (Ed.). **Encyclopedia of Behavioral Medicine**. [s.l.]: Springer New York, 2013. p. 1348–1350.

HARTTIG, U. et al. The MSM Program: Web-Based Statistics Package for Estimating Usual Dietary Intake Using the Multiple Source Method. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. S87-91, jul. 2011. Suppl 1.

HASHIMOTO, H.; VERTINO, P. M.; CHENG, X. Molecular Coupling of DNA Methylation and Histone Methylation. **Epigenomics**, v. 2, n. 5, p. 657–669, out. 2010.

HAUBROCK, J. et al. Estimating Usual Food Intake Distributions by Using the Multiple Source Method in the EPIC-Potsdam Calibration Study. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 5, p. 914–920, maio 2011.

HENDERSON, A. J. Chemopreventive Properties of Dietary Rice Bran: current status and future prospects. **Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 3, n. 5, p. 643–653, set. 2012.

HERCEG, Z. Epigenetics and Cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. **Mutagenesis**, v. 22, n. 2, p. 91–103, mar. 2007.

HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med.**, 349:2042–54, 2003.

HINOUE, T. et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. **Genome Research**, v.22, n. 2, p. 271-282, fev. 2012.

HODGE, A. M. et al. Dietary and biomarker estimates of fatty acids and risk of colorectal cancer. **Int J Cancer**, v. 137, n. 5, p. 1224-1234, Sep. 2015.

HUGHES, D. J. et al. Selenium Status Is Associated with Colorectal Cancer Risk in the European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition Cohort. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 1149–1161, 1 mar. 2015.

IMAI, K.; YAMAMOTO, H. Carcinogenesis and Microsatellite Instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 4, p. 673–680, abr. 2008.

JELLIFE, D. B. **Evolución Del Estado de Nutrición de la Comunidad**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1968.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The Epigenomics of Cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683–692, fev. 2007.

KARMODIYA K. et al. H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. **BMC Genomics**, v. 13, p. 424, 2012.

KIM, M. S.; LEE, J.; SIDRANSKY, D. DNA Methylation Markers in Colorectal Cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 29, n. 1, p. 181–206, mar. 2010.

LARSSON, S. C.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. Vitamin B6 intake, alcohol consumption, and colorectal cancer: a longitudinal population-based cohort of women. **Gastroenterology**, v. 128, n. 7, p. 1830-1837, jun. 2005.

LEUNG, W. K.; LAU, J. Y. W.; SUEN, B. Y. Repeat-Screening Colonoscopy 5 Years After Normal Baseline-Screening Colonoscopy in Average-Risk Chinese: a prospective study. **The American Journal of Gastroenterol**, v. 104, p. 2028-2034, maio 2009.

LIEBERMAN, D. A. et al. Guidelines for Colonoscopy Surveillance after Screening and Polypectomy: a consensus update by the US multi-society task force on colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 143, n. 3, p. 844–857, set. 2012.

LUO, Y. et al. Differences in DNA methylation signatures reveal multiple pathways of progression from adenoma to colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 147, n. 2, p. 418-429, ago. 2014.

LYNCH, H. T.; DE LA CHAPELLE, A. Hereditary Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 10, p. 919–932, 6 mar. 2003.

MACDONALD et al. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Dev Cell**, v. 17, n. 1, p. 9–26. jul. 2009.

MCCABE, D. C.; CAUDILL, M. A. DNA Methylation, Genomic Silencing, and Links to Nutrition and Cancer. **Nutrition Reviews**, v. 63, n. 6, p. 183–195, jun. 2005. Pt. 1.

MILLER, H.; MUKHERJEE, R.; TIAN, J. Colonoscopy Surveillance After Polypectomy May be Extended Beyond Five Years. **Journal Clin Gastroenterol**, v. 44, n. 8, p. e162-e166, set. 2010.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA Methylation and Its Basic Function. **Neuropsychopharmacology**: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, v. 38, n. 1, p. 23–38, jan. 2013.

MORÁN, A. et al. Differential Colorectal Carcinogenesis: molecular basis and clinical relevance. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 2, n. 3, p. 151–158, 15 mar. 2010.

MSM User Guide. **Multiple Source Method (MSM) For Estimating Usual Dietary Intake From Short-Term Measurement Data**. Efcoval, 2011. p. 40.

NEVES, F. J.; KOIFMAN, R. J.; MATTOS, I. E. Mortalidade por câncer de cólon e reto e consumo alimentar em capitais brasileiras selecionadas. *Rev Bras Epidemiologia*, v. 9, p. 112–120, 2006.

MUN-KAR NG, J.; YU, J. Promoter Hypermethylation of Tumour Suppressor Genes as Potential Biomarkers in Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 2472–2496, 22 jan. 2015.

NOGUEIRA, A. M. M. F. et al. Tubo Digestivo: peritônio. In: BOGLIOLO, L. **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 660–730.

OKUGAWA, Y.; GRADY, W. M.; GOEL, A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. **Gastroenterology**, v. 149, n. 5, p. 1204–1225, out. 2015.

OLIVEIRA, N. F. P. et al. Metilação do DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 493–499, 2010.

OLIVEIRA, C; VELHO, S.; DOMINGO, E. Concomitant RASSF1A hypermethylation and K-RAS/BRAF mutations occur preferentially in MSI sporadic colorectal câncer. **Oncogene**, v.24, p. 7630–7634, 2005.

ONG, T. P.; MORENO, F. S.; ROSS, S. A. Targeting the Epigenome with Bioactive Food Components for Cancer Prevention. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 4, n. 5, p. 275–292, 2011.

OU, Y. et al. Selenium and Colorectal Adenomas Risk: a meta-analysis. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 8, p. 1153–1159, 2012.

PARR, C. L. et al. Meat Intake, Cooking Methods and Risk of Proximal Colon, Distal Colon and Rectal Cancer: the norwegian women and cancer (NOWAC) cohort study. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 5, p. 1153–1163, set. 2013.

PEHLIVAN, S. et al. Gene methylation of SFRP2, P16, DAPK1, HIC1, and MGMT and K-RAS mutations in sporadic colorectal cancer. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 201, p.128–132, 2010.

PERERA, P. S.; THOMPSON, R. L.; WISEMAN, M. J. Recent Evidence for Colorectal Cancer Crevention Through Healthy Food, Nutrition, and Physical Activity: implications for recommendations. **Curr. Nutr. Rep.**, 2012. p. 44–54.

POWERS, H. J. Interaction among Folate, Riboflavin, Genotype, and Cancer, with Reference to Colorectal and Cervical Cancer. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 12, p. 2960S–2966S, dez. 2005. Suppl.

RALSTON, R. A. et al. Colorectal Cancer and Nonfermented Milk, Solid Cheese, and Fermented Milk Consumption: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 9, p. 1167–1179, 2014.

RANDO, O. J. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 22, n. 2, p. 148-155, 2012.

RONDELET, G.; WOUTERS, J. Human DNA (cytosine-5)-methyltransferases: a functional and structural perspective for epigenetic cancer therapy. **Biochimie.**, n 17, 30147-5 p. S0300-9084. 6 jun. 2017.

SAKAMOTO, N. et al. Frequent hypermethylation of RASSF1A in early flat-type colorectal tumors. **Oncogene**, v. 23, p. 8900- 8907, 2004.

SCHERNHAMMER, E. S. et al. Vitamins, Methionine and Alcohol Intake and Risk of Colon Cancer in Relation to BRAF Mutation and CpG Island Methylator Phenotype (CIMP). **Plos One**, v. 6, n. 6, p. 21102, 27 jun. 2011.

SILVA, T. D. et al. DNA Methylation as an Epigenetic Biomarker in Colorectal Cancer. **Oncology Letters**, v. 6, n. 6, p. 1687–1692, dez. 2013.

SINHA, R. et al. Kras Gene Mutation and RASSF1A, FHIT and MGMT Gene Promoter Hypermethylation: indicators of tumor staging and metastasis in adenocarcinomatous sporadic colorectal cancer in indian population. **Plos One**, v. 8, n. 4, 3 abr. 2013.

SLATER, B. et al. Validation of Food Frequency Questionnaires - FFQ: methodological considerations. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 3, p. 200–208, set. 2003.

SLATTERY, M. L. FITZPATRICK, F. A. Convergence of hormones, inflammation, and energy-related factors: a novel pathway of cancer etiology. **Cancer Prev Res**, v. 2, p. 922-930, 2009.

SUBAR, A. F. et al. Addressing Current Criticism Regarding the Value of Self-Report Dietary Data. **J Nutrition**, v. 145, n. 12, p. 2639-2645, dez. 2003.

SUMMERS, T. et al. Serum-Based DNA Methylation Biomarkers in Colorectal Cancer: potential for screening and early detection. **Journal of Cancer**, v. 4, n. 3, p. 210–216, 1 mar. 2013.

SUN, Z. et al. Association of Total Energy Intake and Macronutrient Consumption with Colorectal Cancer Risk: results from a large population-based case-control study in newfoundland and labrador and Ontario, Canada. **Nutrition Journal**, v. 11, p. 18, 26 mar. 2012.

SUPIC, G.; JAGODIC, M.; MAGIC, Z. Epigenetics: a new link between nutrition and cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 6, p. 781–792, 2013.

SURH, Y.-J. Cancer Chemoprevention with Dietary Phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768–780, out. 2003.

TÁRRAGA LÓPEZ, P. J.; ALBERO, J. S.; RODRÍGUEZ-MONTES, J. A. Primary and Secondary Prevention of Colorectal Cancer. *Clinical Medicine Insights. Gastroenterology*, v. 7, p. 33–46, 2014.

THOMPSON, F. E.; SUBAR, A. F. **Dietary Assessment Methodology**. Nutrition in the prevention and treatment of disease. [s.l.]: Elsevier, 2013. p. 5-46.

TURNER, JR. O Trato Gastrointestinal. In: Robbins & Cotran. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. p. 773–843.

VALENTA, T, et al. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. **EMBO J.**, v. 25, n. 11, p. 2326–2337, 2006.

VASCONCELOS, T. F. **Validação e Reprodutibilidade de um Questionário de Frequência Alimentar para Uso em População Adulta do DF, com Ênfase no Lipídio**. 2008. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

WCRF/AICR - World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. **Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective**. Washington DC: AICR, 2007.

_____. _____. _____. **Colorectal Cancer 2011 Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer**. Washington DC: AICR, 2011.

WEYDEN, V. D. L.; ADAMS, D. J. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta**. v. 1776, p. 58-85, set. 2007.

WHO - World Health Organization. **Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation**. Geneva, 2003. p. 160. (Technical Report Series 916).

_____. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry**. Geneva, 1995. p. 452. (Technical Report Series 854).

_____. **Waist Circumference and Waist-Hip Ratio**. Report of a WHO Expert Consultation. Geneva, 2008. p. 47.

WU, S. et al. Fish Consumption and Colorectal Cancer Risk in Humans: a systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 6, p. 551–559, jun. 2012.

XAVIER, H. T. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, supl. 1, 22 p.1-22, out. 2013.

ZEISEL, S. H. Epigenetic MeAUNEisms for Nutrition Determinants of Later Health Outcomes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1488S–1493S, maio 2009.

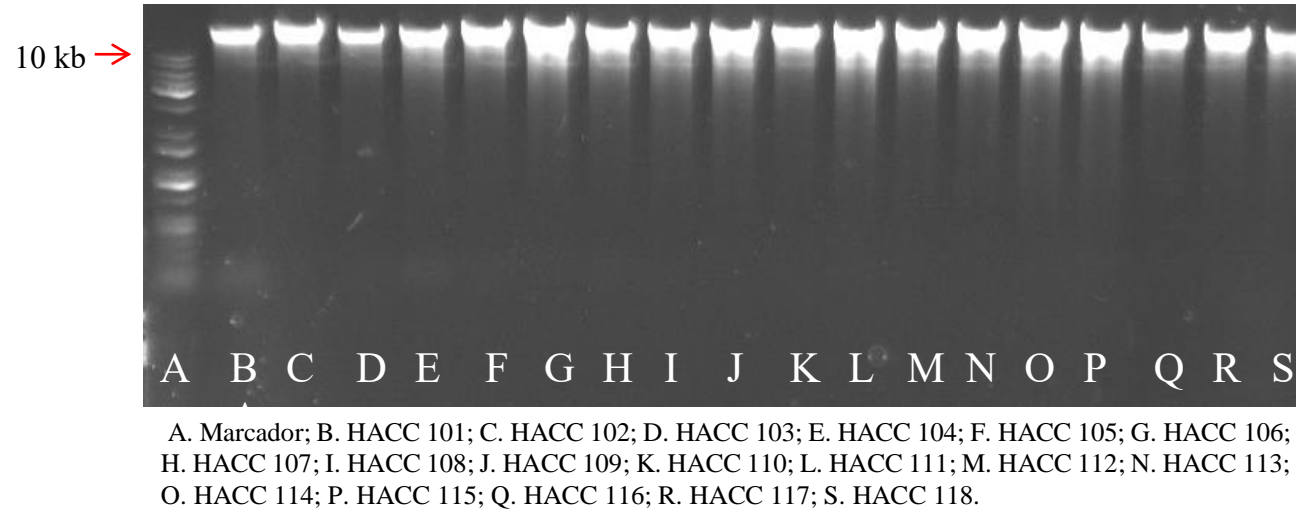
ZHANG, H. et al. Methylation of RASSF1A Gene Promoter Is Regulated by P53 and DAXX. **FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 27, n. 1, p. 232–242, jan. 2013.

ZHENG, J. et al. Signification of Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1) as Tumor Suppressor Gene in Tumor Progression. **Cancer Microenvironment**, v. 5, n. 3, p. 285–293, 13 abr. 2012.

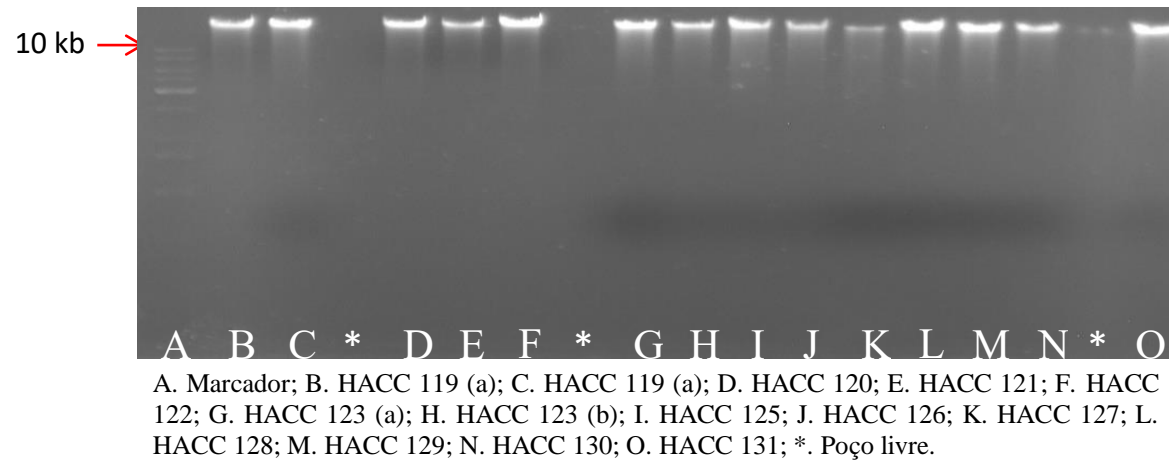
ZOU, H. et al. Highly Methylated Genes in Colorectal Neoplasia: implications for screening. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**: a publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, v. 16, n. 12, p. 2686–2696, dez. 2007.

APÊNDICES

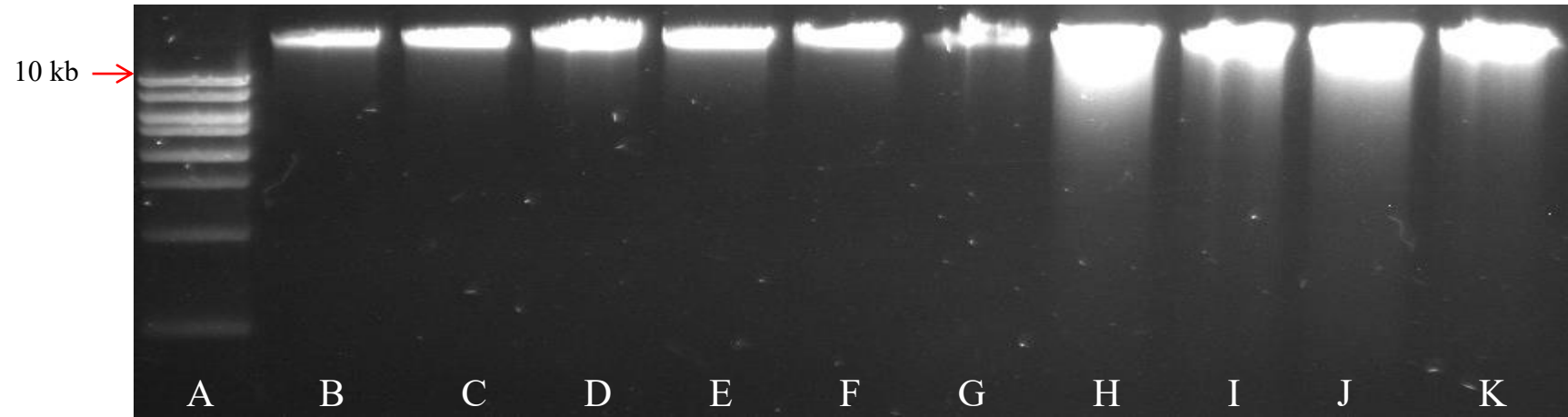
APÊNDICE 1. Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose (0,8%).



APÊNDICE 2. Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose (0,8%).

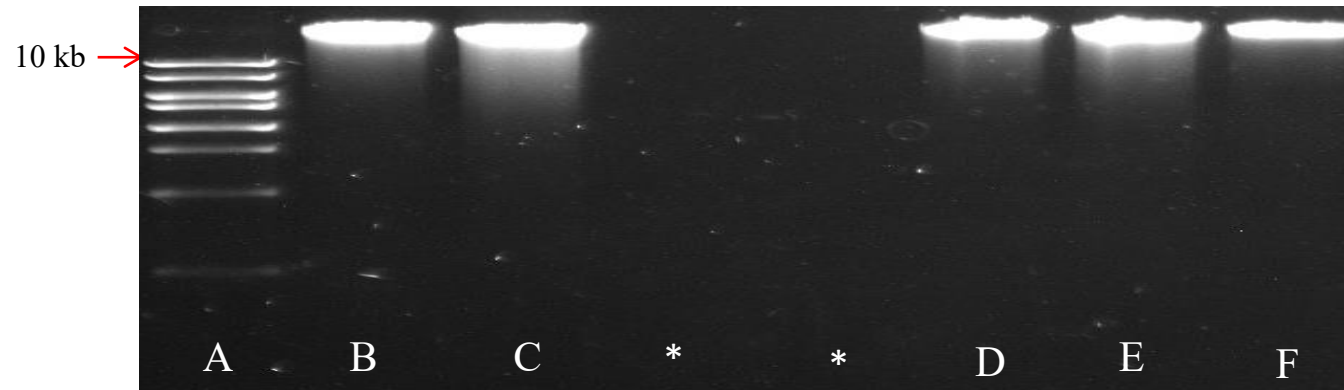


APÊNDICE 3. Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose (0,8%).



A. Marcador; B. HACC 132; C. HACC 133; D. HACC 134; E. HACC 135; F. HACC 136; G. HACC 137 (a); H. HACC 138; I. HACC 139; J. HACC 140; K. HACC 141

APÊNDICE 4. Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose (0,8%).



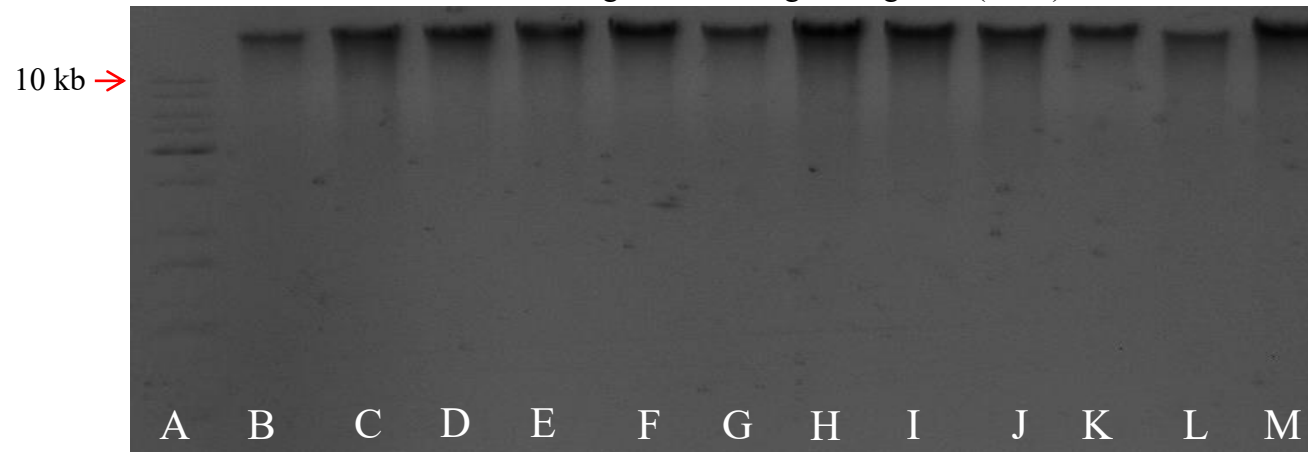
A. Marcador; B. HACC 142; C. HACC 143; D. HACP 244; E. HACP 245; F. HACP 246; *. Poço livre.

APÊNDICE 5. Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose (0,8%).



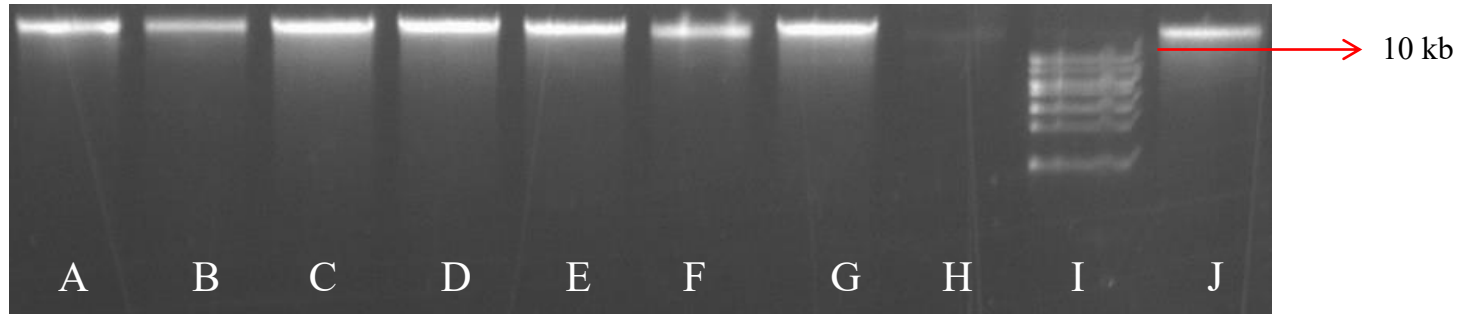
A. Marcador; B. HACC 144; C. HACC 145; D. HACC 146; E. HACC 147; F. HACC 148; G. HACC 149; H. HACC 150; I. HACC 151; J. HACC 152; K. HACC 153; L. HACC 154; M. HACC 155; N. HACC 156; O. HACC 157; *. Poço livre.

APÊNDICE 6. Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose (0,8%).



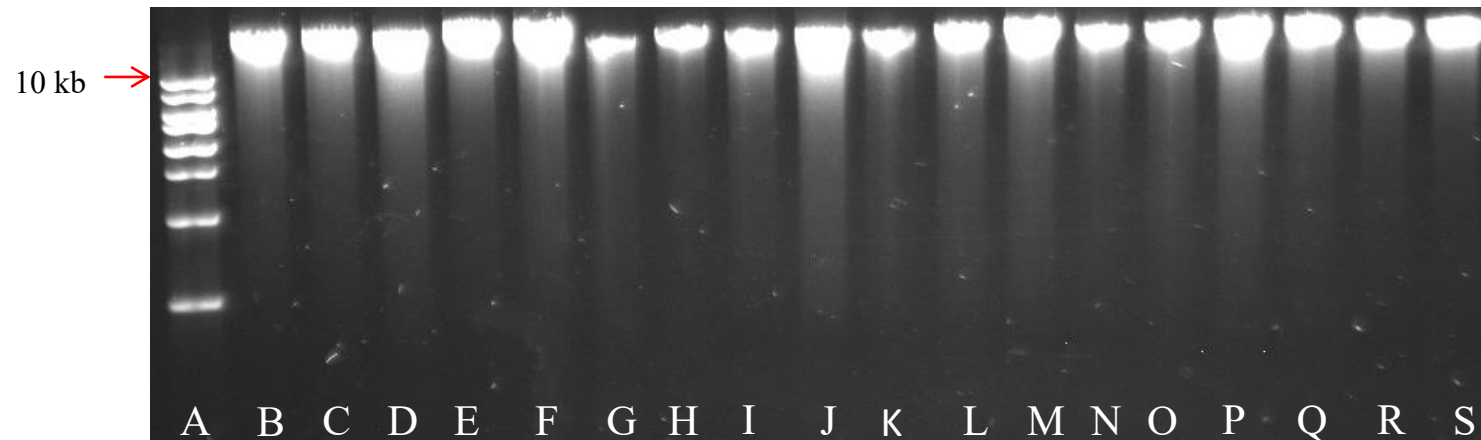
A. Marcador; B. HACP 202; C. HACP 203; D. HACP 205; E. HACP 208; F. HACP 209; G. HACP 214; H. HACP 215; I. HACP 217; J. HACP 218; K. HACP 221; L. HACP 222; M. HACP 224.

APÊNDICE 7. Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose (0,8%).



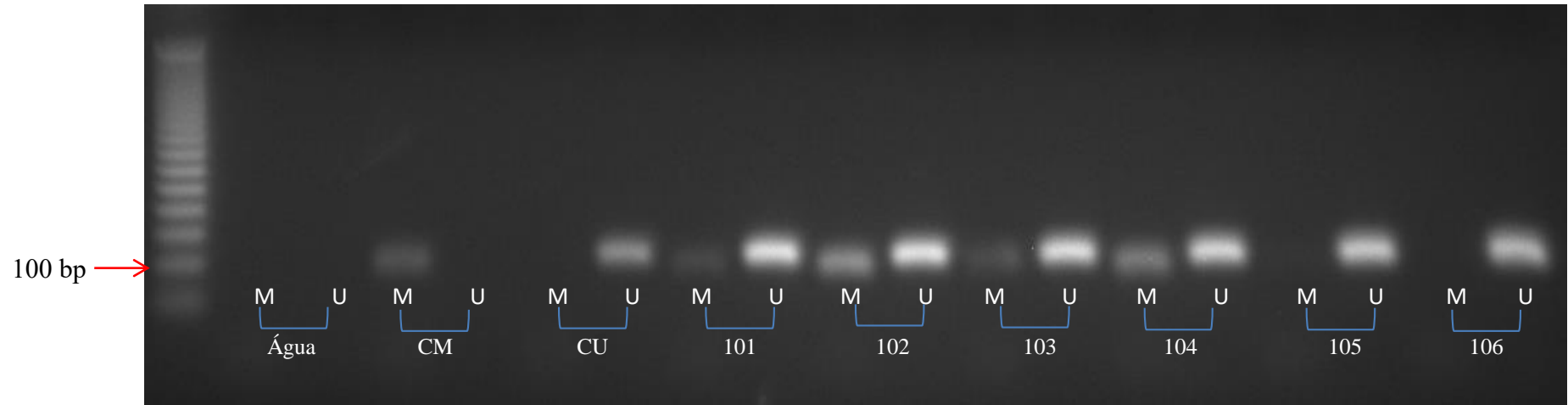
A. HACP 204; B. HACP 206; C. HACP 207; D. HACP 210; E. HACP 211; F. HACP 212; G. HACP 213; H. HACP 216; I. Marcador; J. HACP 219.

APÊNDICE 8. Eletroforese de DNA genômico em gel de agarose (0,8%).



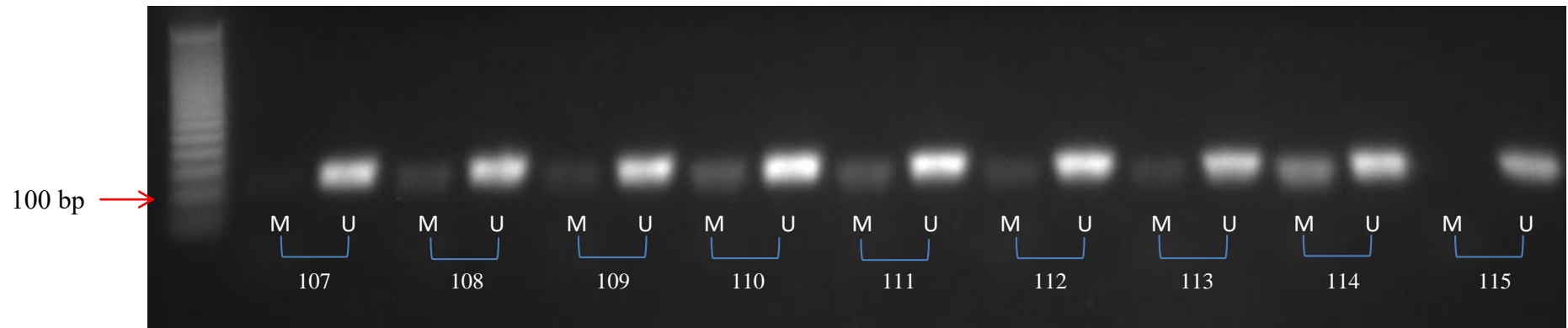
A. Marcador; B. HACP 225; C. HACP 226; D. HACP 227; E. HACP 229; F. HACP 230; G. HACP 231; H. HACP 232; I. HACP 233; J. HACP 234; K. HACP 235; L. HACP 236; M. HACP 237; N. HACP 238; O. HACP 239; P. HACP 240; Q. HACP 241; R. HACP 242; S. HACP 243; *. Poço livre.

(2,0%). APÊNDICE 9. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose



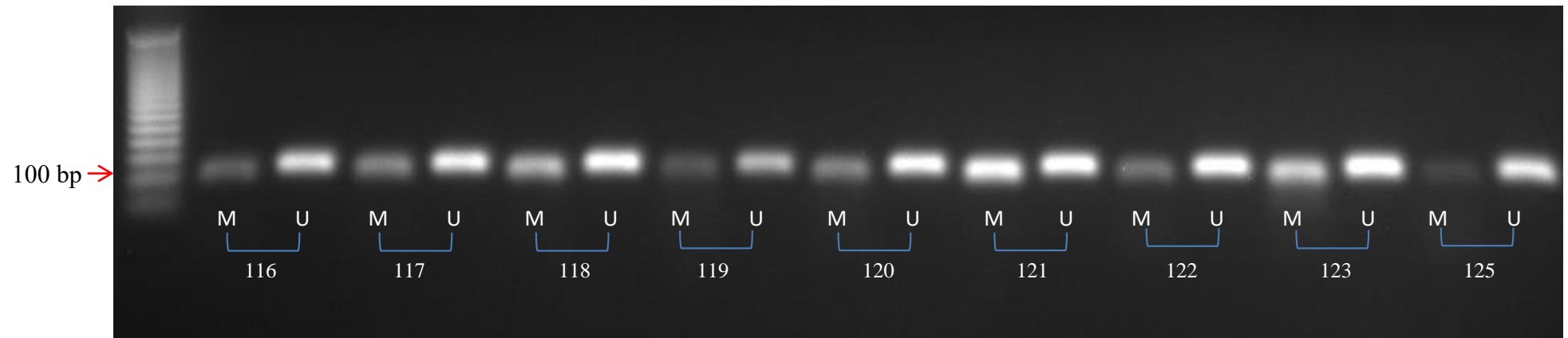
Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 10. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



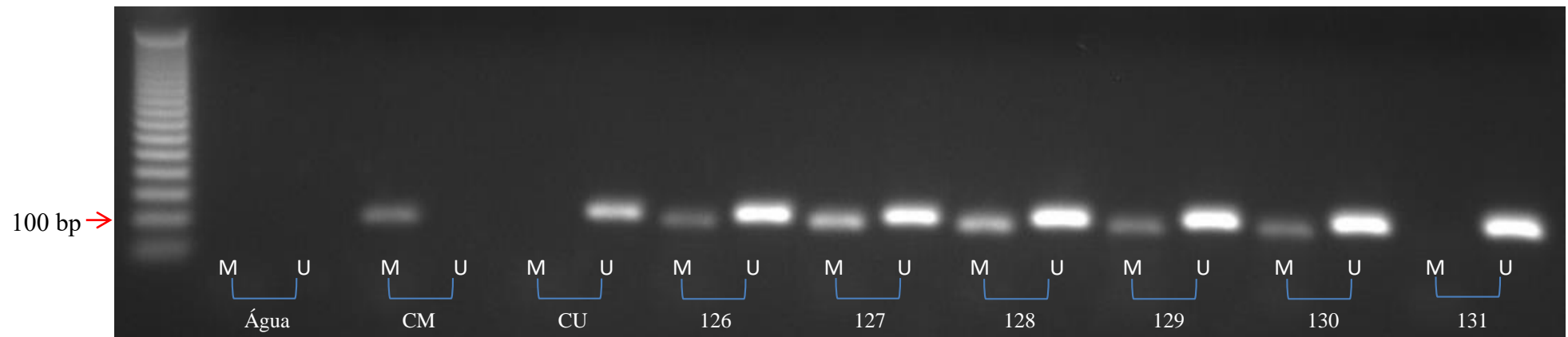
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 11. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



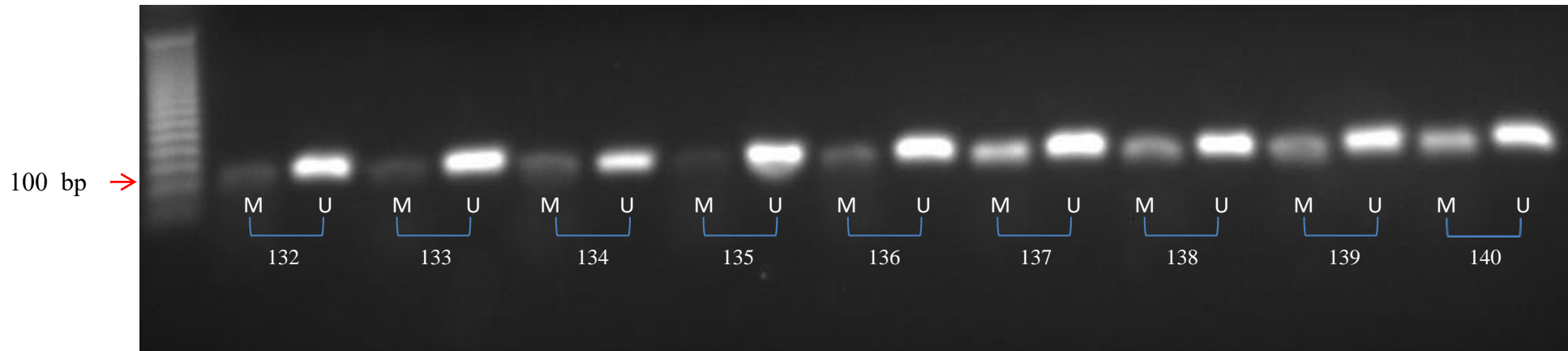
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 12. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



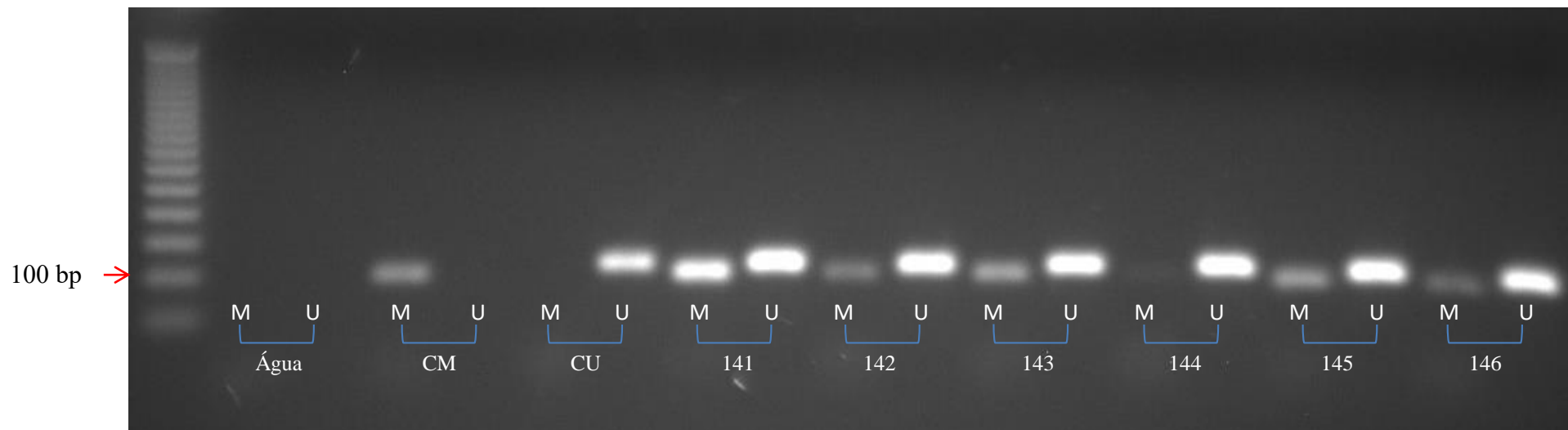
Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 13. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



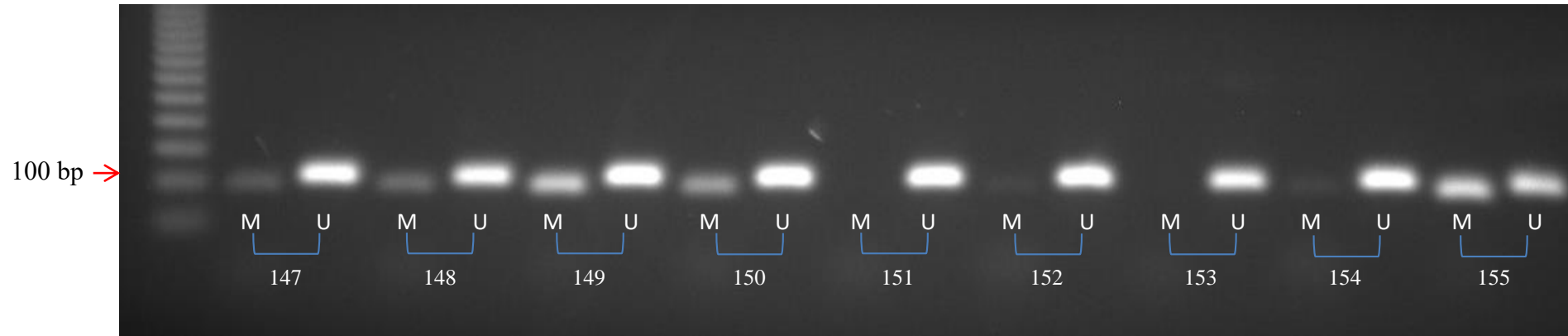
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 14. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



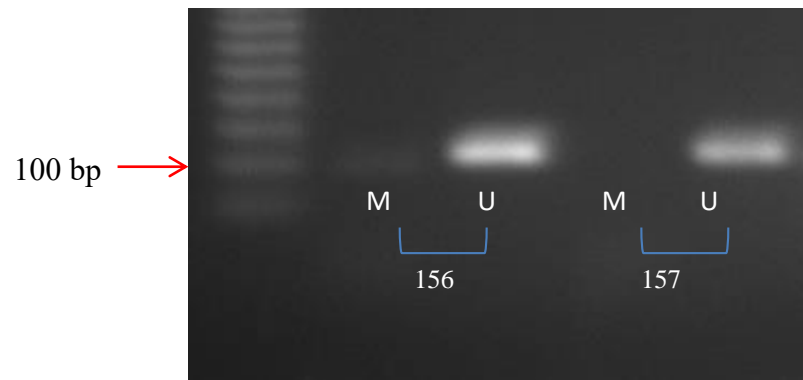
Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 15. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%)



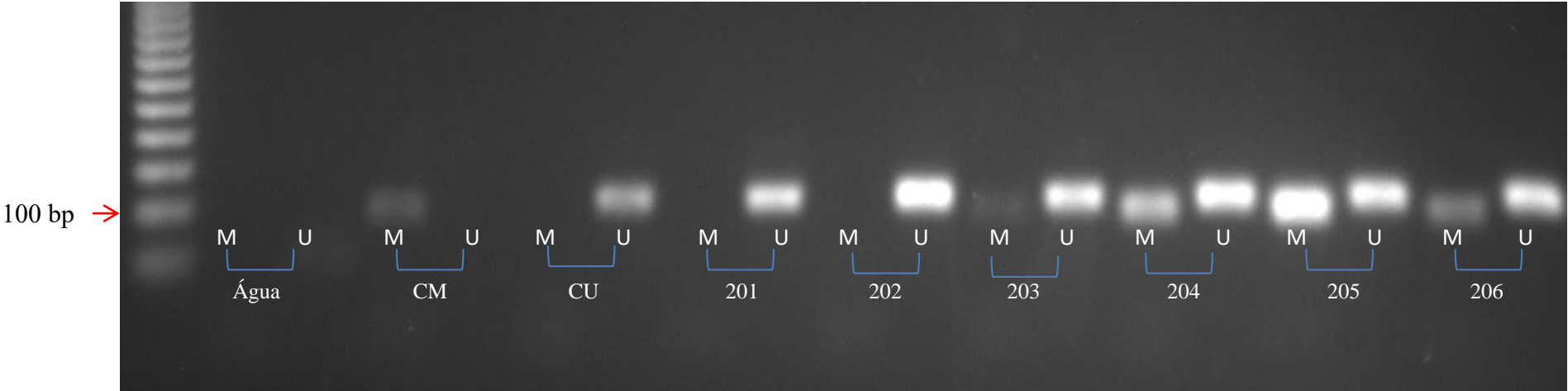
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 16. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2.0%).



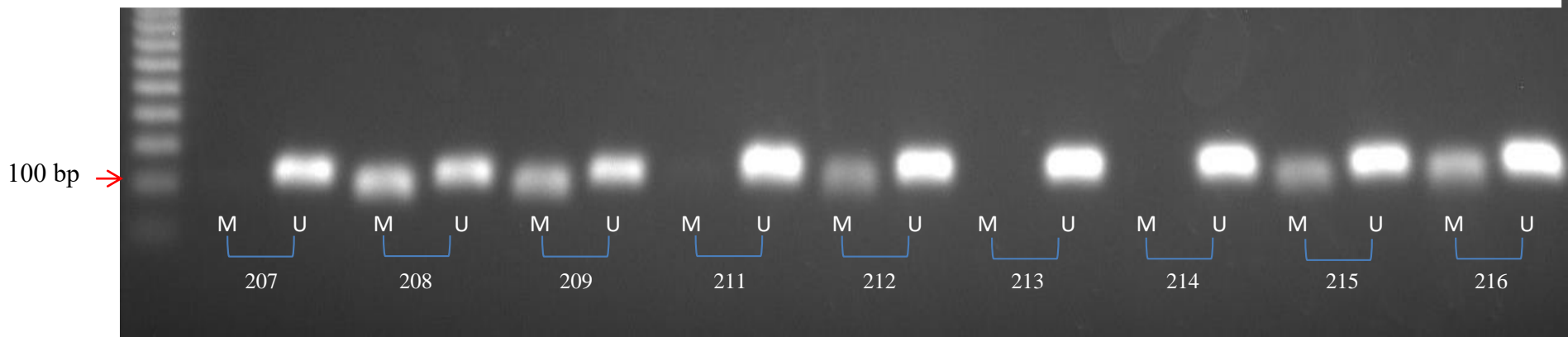
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 17. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).

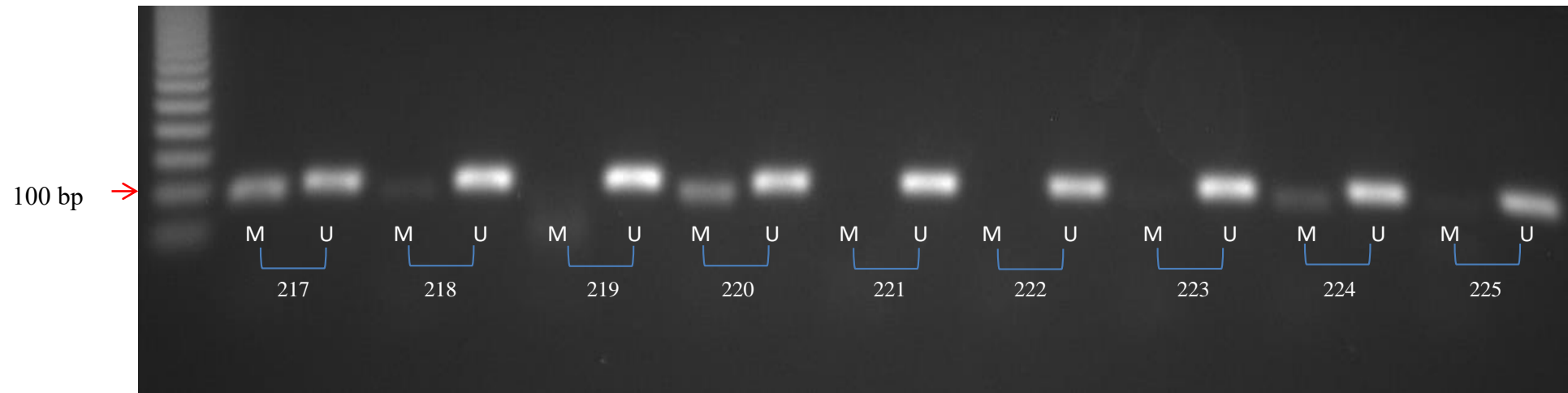


Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

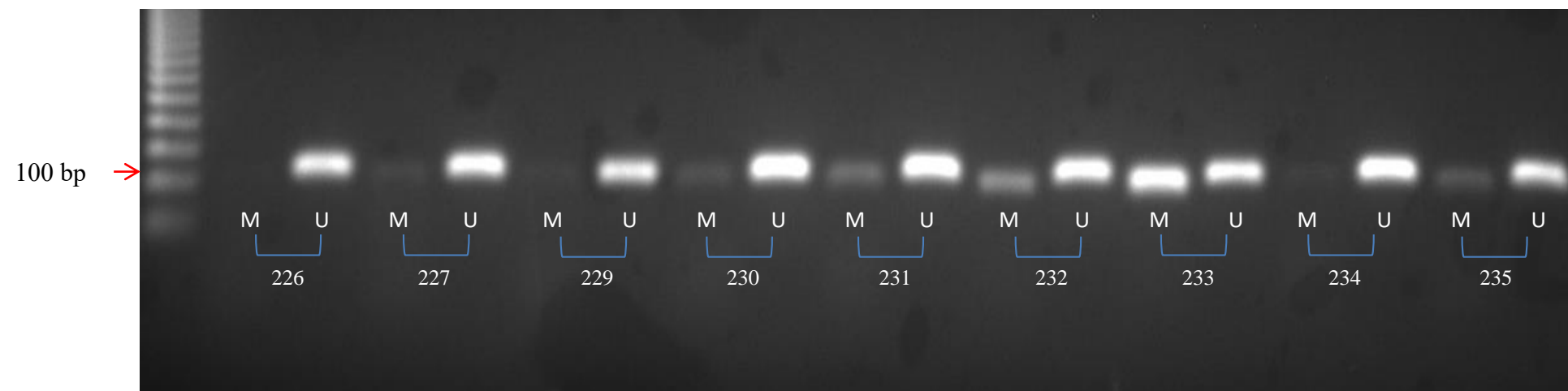
APÊNDICE 18. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

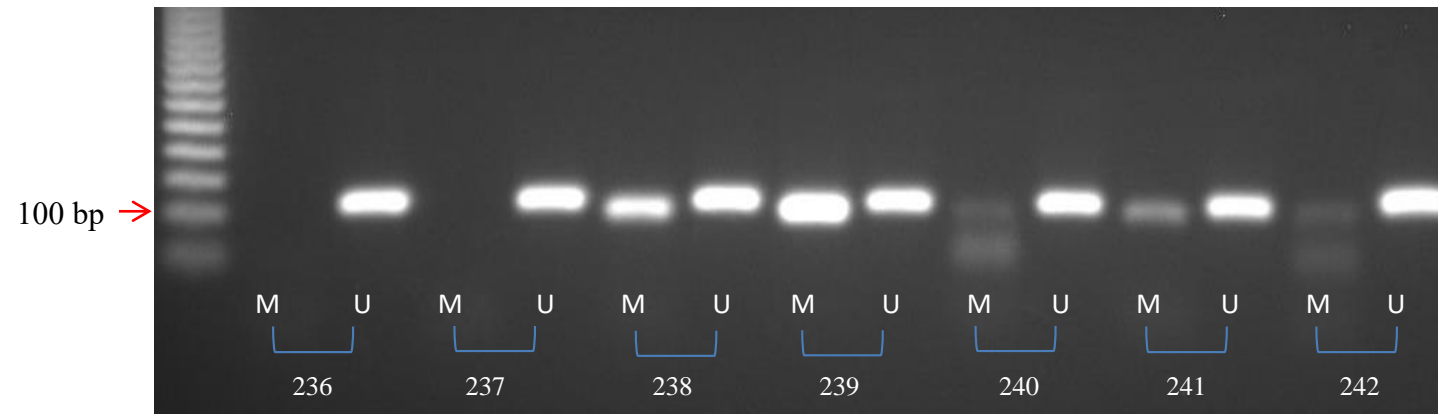
APÊNDICE 19. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).

Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 20. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).

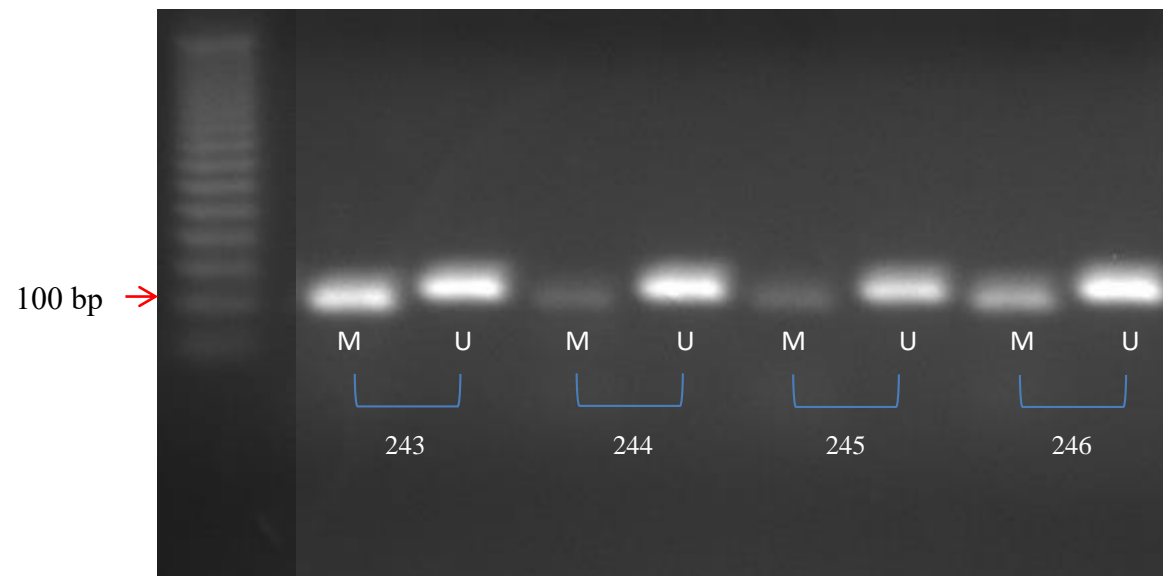
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 21. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



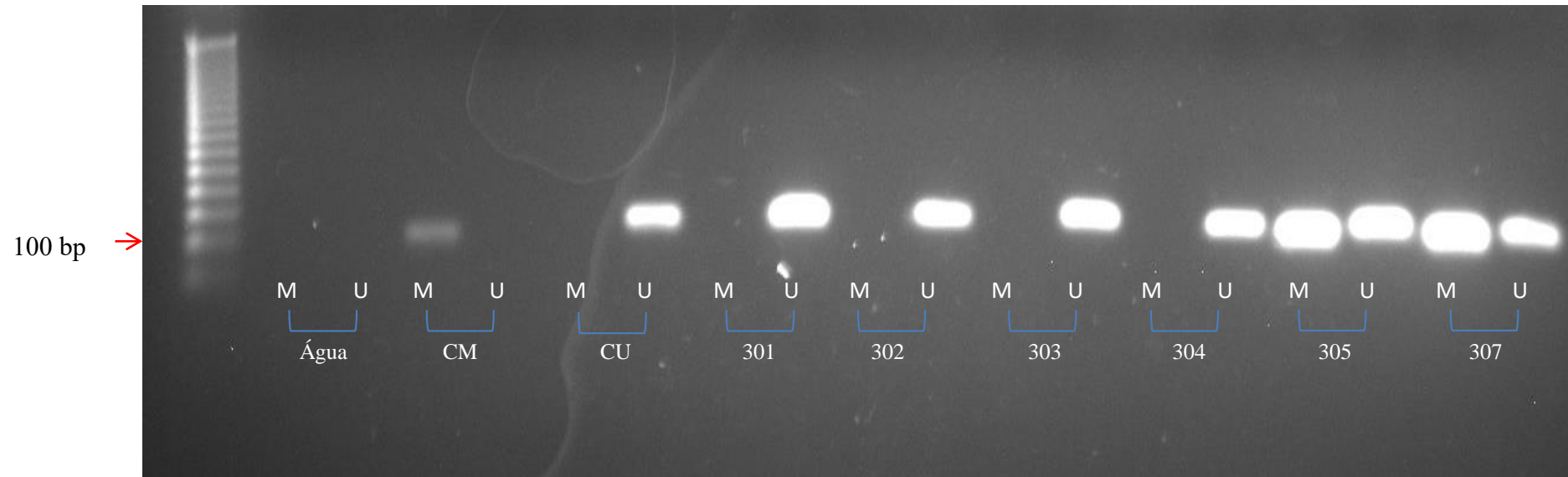
Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 22. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



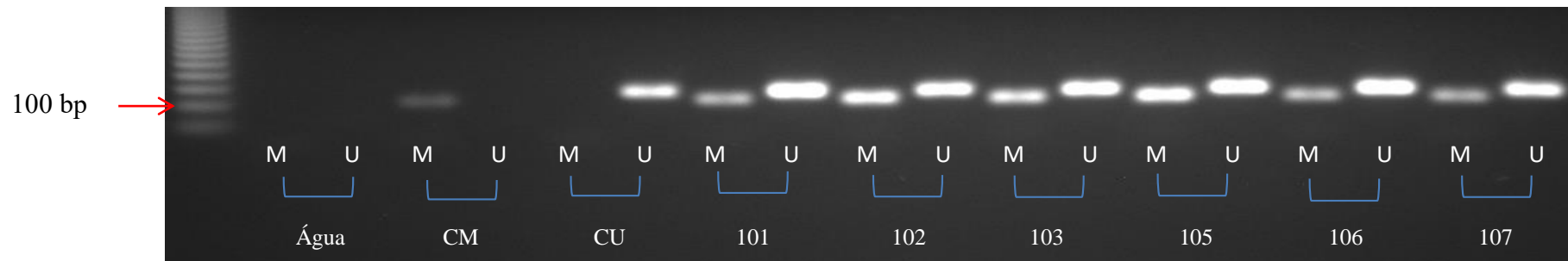
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 23. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *RASSF1A* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



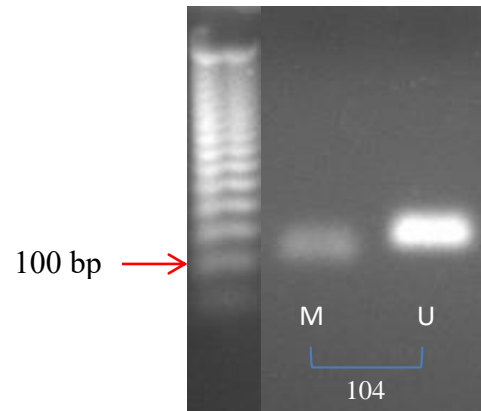
Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 24. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



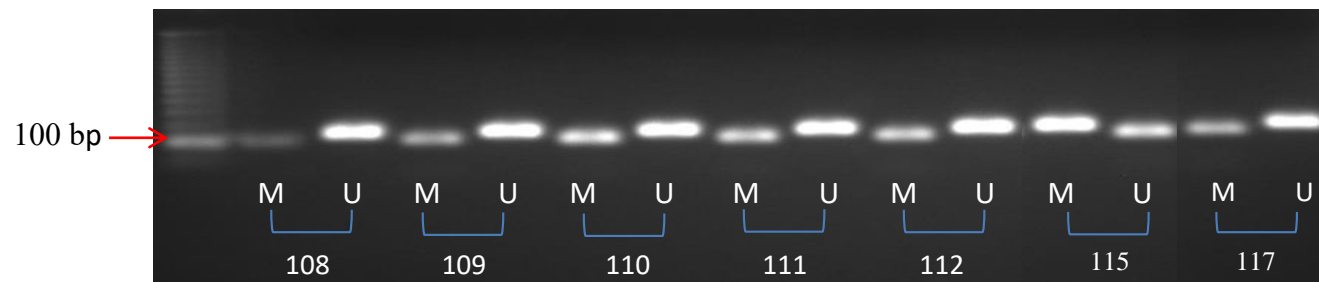
Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 25. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



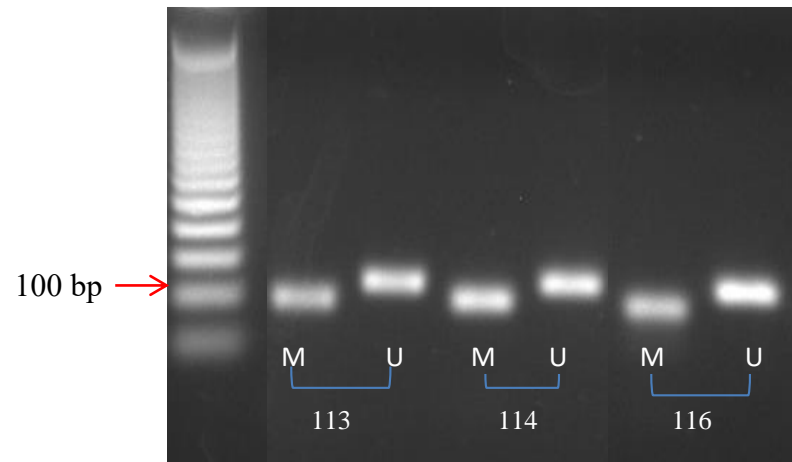
Legenda: M= primer metilado;
U= primer não metilado.

APÊNDICE 26. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 27. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



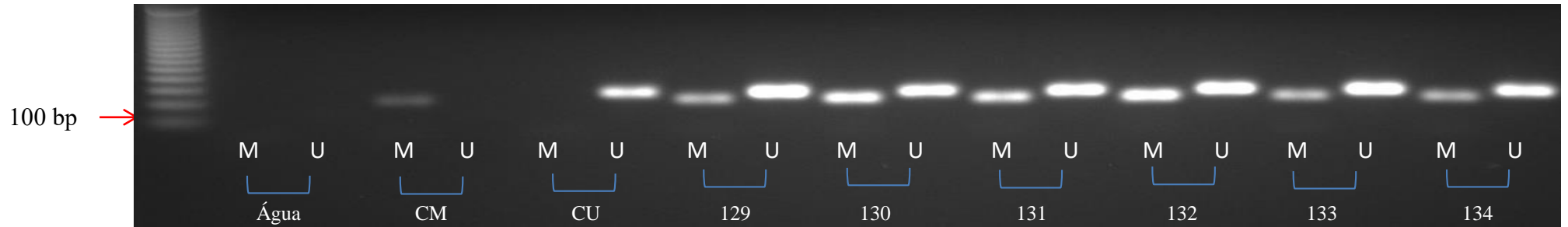
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 28. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



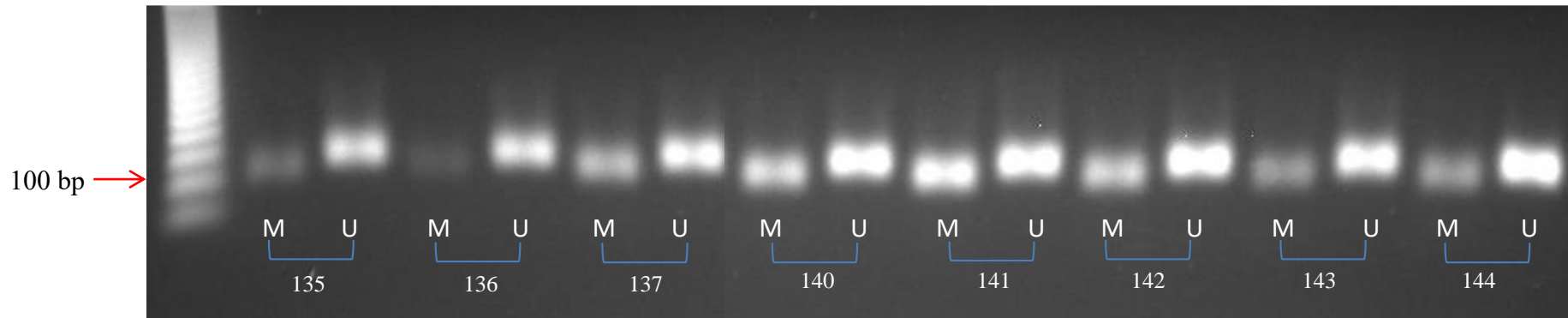
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 29. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



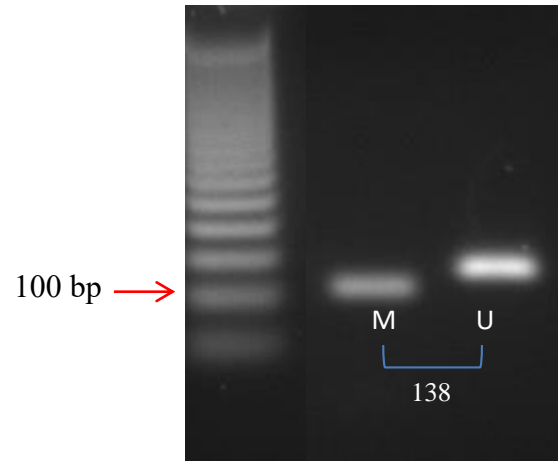
Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 30. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



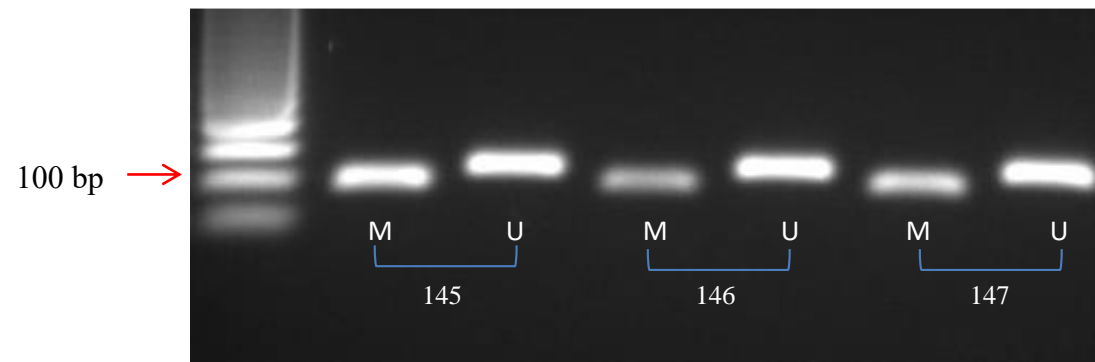
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 31. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



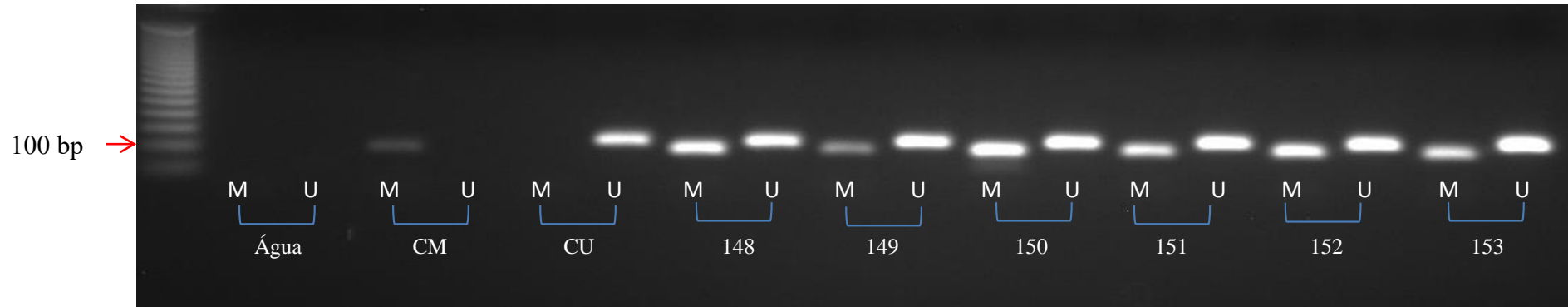
Legenda: M= primer metilado;
U= primer não metilado.

APÊNDICE 32. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



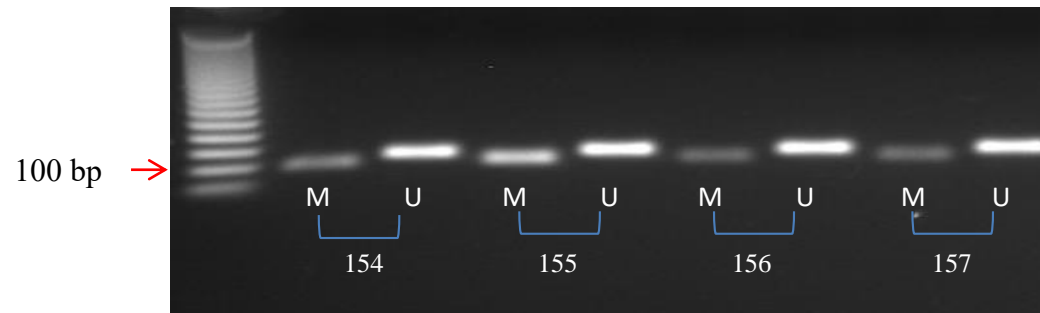
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 33. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



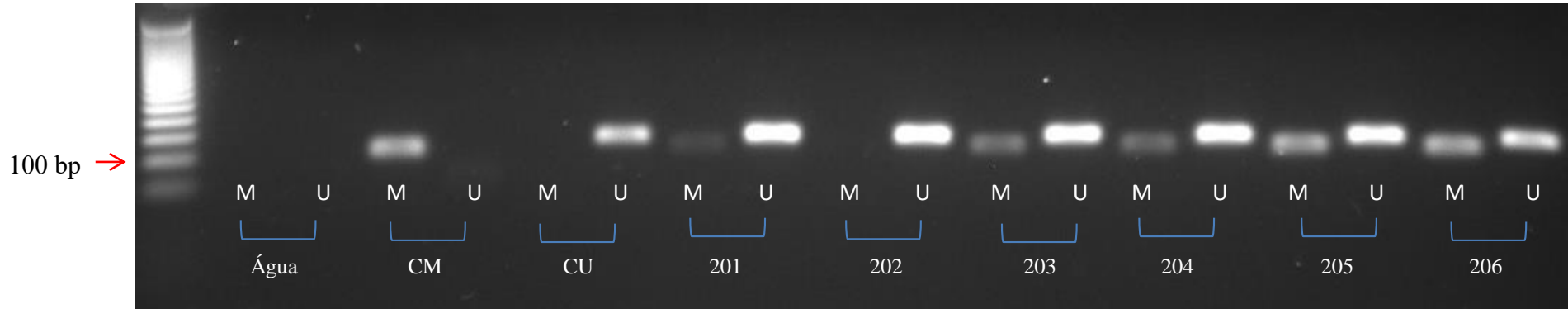
Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 34. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



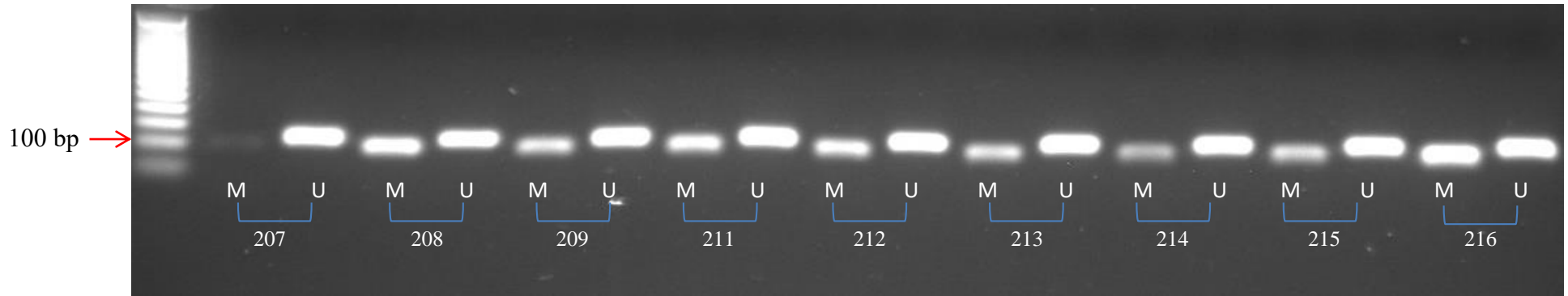
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado

APÊNDICE 35. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HICI* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%)



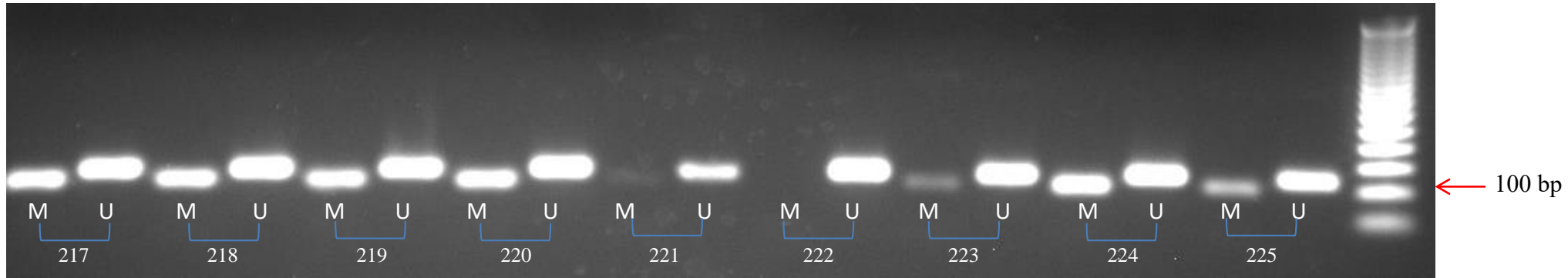
Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 36. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HICI* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



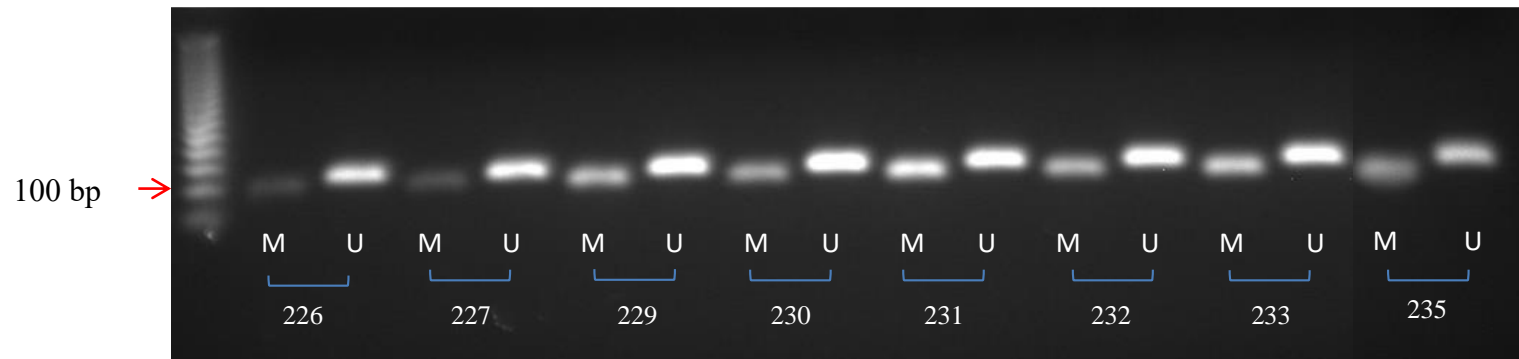
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado

APÊNDICE 37. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



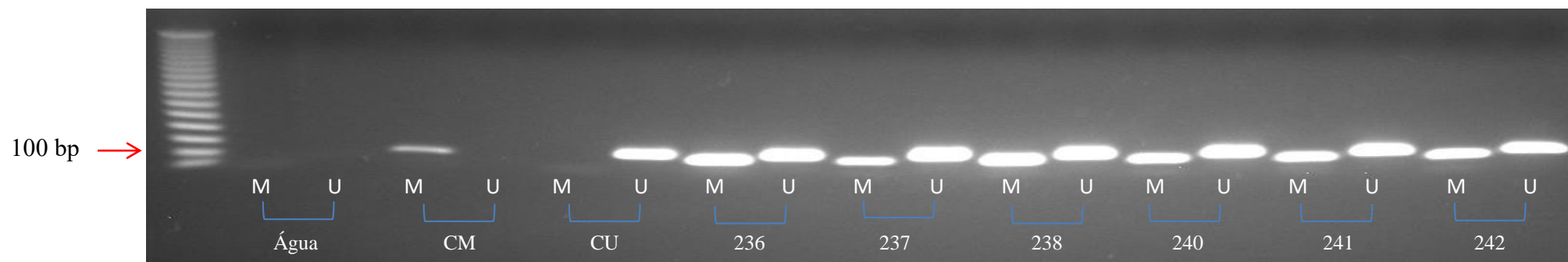
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado

APÊNDICE 38. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



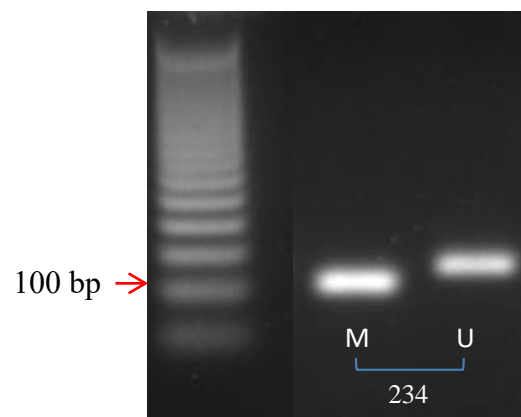
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado

APÊNDICE 39. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



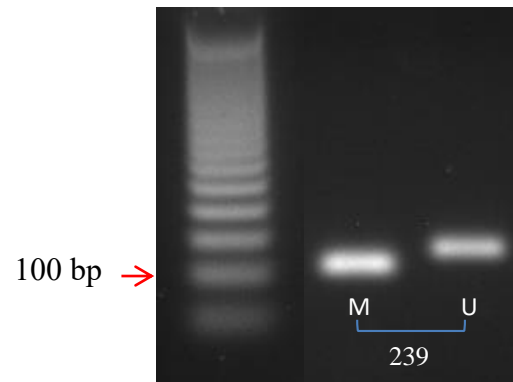
Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 40. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%)



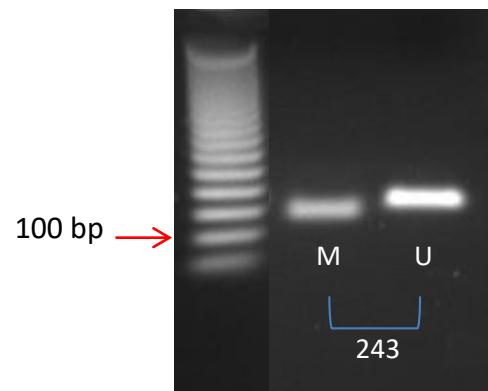
Legenda: M= primer metilado;
U= primer não metilado

APÊNDICE 41. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%)



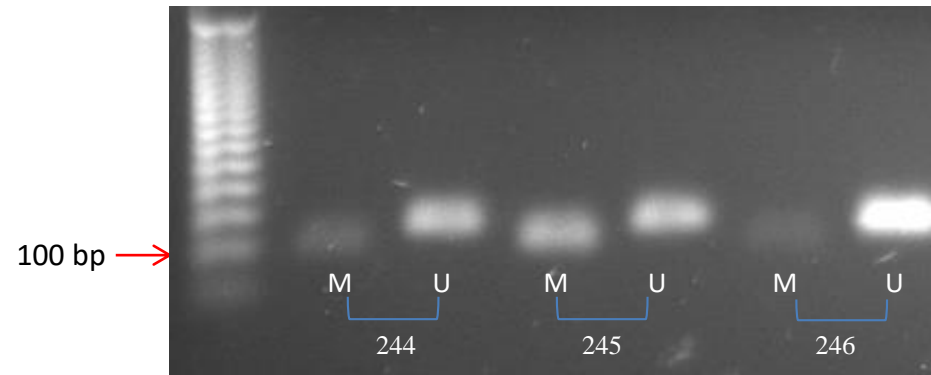
Legenda: M= primer metilado;
U= primer não metilado

APÊNDICE 42. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HIC1* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%)



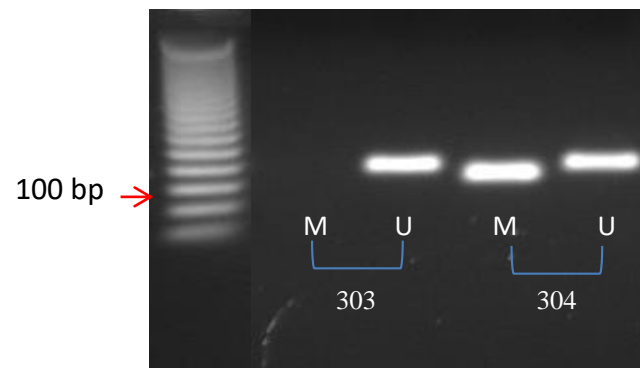
Legenda: M= primer metilado;
U= primer não metilado

APÊNDICE 43. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HICI* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%)



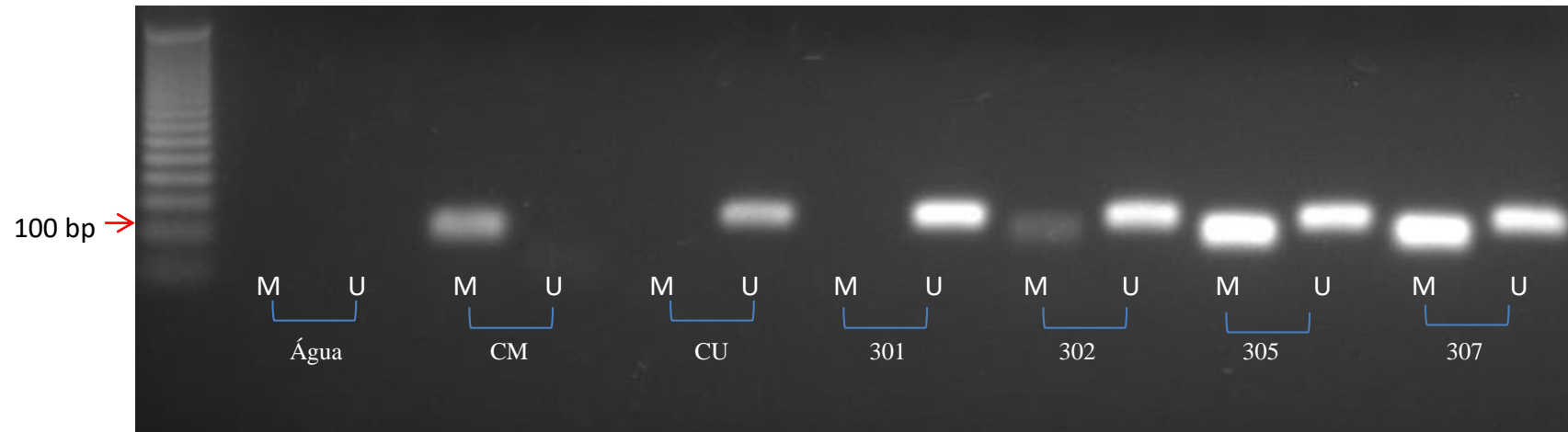
Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado

APÊNDICE 44. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HICI* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%)



Legenda: M= primer metilado; U= primer não metilado

APÊNDICE 45. Eletroforese da reação em cadeia da polimerase do gene *HICI* tratado com bissulfito em gel de agarose (2,0%).



Legenda: CM= controle metilado; CU= controle não metilado; M= primer metilado; U= primer não metilado.

APÊNDICE 46. Regressão logística univariada para *RASSFIA* com base nas variáveis de perfil do consumo energético e nutricional da população.

Variáveis	O.R. ¹	I.C. 95% ²	p-valor
Calorias total	1,00	(1,00; 1,00)	0,436
% calórico do carboidrato	0,90	(0,82; 0,99)	0,036
% calórico da proteína	1,23	(1,04; 1,45)	0,013
% calórico do lipídio	1,01	(0,95; 1,08)	0,705
Gordura saturada	0,99	(0,92; 1,05)	0,664
Gordura monoinsaturada	1,01	(0,95; 1,07)	0,787
Gordura poli-insaturada	0,98	(0,94; 1,03)	0,389
Ômega 3	1,18	(0,83; 1,67)	0,360
Fibra alimentar total	1,03	(0,98; 1,09)	0,264
Fibra solúvel	1,09	(0,95; 1,26)	0,214
Fibra insolúvel	1,05	(0,96; 1,14)	0,301
Cálcio	1,00	(1,00; 1,00)	0,901
Ferro	1,02	(0,93; 1,12)	0,724
Selênio	1,00	(0,99; 1,01)	0,509
Zinco	1,08	(0,96; 1,22)	0,193
Ácido fólico	1,00	(1,00; 1,00)	0,931
Vitamina A	1,00	(1,00; 1,00)	0,377
Vitamina D	0,94	(0,73; 1,21)	0,634
Vitamina C	0,99	(0,98; 1,01)	0,377
Vitamina B ₆	2,40	(1,00; 5,78)	0,050
Vitamina B12	1,10	(0,90; 1,33)	0,352
Metionina aminoácido	1,33	(0,64; 2,77)	0,441
Carne vermelha	1,00	(0,99; 1,01)	0,350
Carne processada	1,01	(0,96; 1,05)	0,802

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% - Intervalo de 95% de confiança.

APÊNDICE 47. Regressão logística univariada para *RASSFIA* com base nas variáveis numéricas idade, IMC e circunferência da cintura.

Variáveis	O.R. ¹	I.C. 95% ²	p-valor
Classificação do IMC ³	Mal nutrido/Eutrófico	-	-
	Sobrepeso/Obesidade	1,31	(0,59; 2,91)
Classificação da Circunferência da cintura	Risco baixo/moderado	-	-
	Risco alto	1,10	(0,49; 2,47)

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% - Intervalo de 95% de confiança;

³Índice de massa corpórea.

APÊNDICE 48. Regressão logística univariada para *RASSF1A* com base nos exames bioquímicos.

Variáveis	O.R. ¹	I.C. 95% ²	p-valor
Hemácia	0,74	(0,34; 1,60)	0,441
Hemoglobina	1,02	(0,95; 1,08)	0,631
Hematócrito	0,93	(0,85; 1,03)	0,159
Leucócito	1,00	(1,00; 1,00)	0,353
Linfócito	1,00	(1,00; 1,00)	0,911
Glicemia	1,02	(1,00; 1,04)	0,130
Colesterol total	1,00	(0,99; 1,01)	0,815
Colesterol HDL	1,00	(0,97; 1,03)	0,956
Colesterol LDL	1,00	(0,99; 1,01)	0,495
Colesterol VLDL	1,00	(0,98; 1,03)	0,693
Triglicerídeos	1,00	(0,99; 1,01)	0,766
Proteínas totais	1,12	(0,65; 1,93)	0,685
Albumina	1,68	(0,64; 4,40)	0,293
Globulina	0,74	(0,36; 1,54)	0,424

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% - Intervalo de 95% de confiança

APÊNDICE 49. Regressão logística univariada para *RASSF1A* com base nas variáveis caracterizadoras.

	Variáveis	O.R. ¹	I.C. 95% ²	p-valor
Sexo	Masculino	-	-	-
	Feminino	0,95	(0,41; 2,20)	0,911
Estado Civil	Sem companheiro	-	-	-
	Com companheiro	0,70	(0,30; 1,65)	0,416
Escolaridade	Estudou até 8 anos	-	-	-
	Estudou mais de 8 anos	0,61	(0,27; 1,38)	0,237
Etnia	Parda	-	-	-
	Outras	0,65	(0,29; 1,45)	0,288

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% - Intervalo de 95% de confiança

APÊNDICE 50. Regressão logística univariada para *RASSFIA* com base nas variáveis dos hábitos de vida.

Variáveis		O.R. ¹	I.C. 95% ²	p-valor
Fumante	Não ³	-	-	-
	Sim	1,15	(0,42; 3,15)	0,788
Consome álcool	Não	-	-	-
	Sim	0,57	(0,25; 1,26)	0,165
Uso de medicamento regular	Não	-	-	-
	Sim	0,65	(0,27; 1,57)	0,344
Suplemento nutricional	Não	-	-	-
	Sim	1,76	(0,72; 4,31)	0,218
Atividade Física	Nenhuma	-	-	-
	Caminhada/Outros	0,96	(0,43; 2,15)	0,926

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% - Intervalo de 95% de confiança;

³Não fumante – Indivíduo que nunca fumou ou que deixou de fumar há mais de 15 anos;

APÊNDICE 51. Regressão logística univariada para *RASSFIA* com base nas variáveis dos hábitos intestinais e antecedentes pessoais e familiares.

Variáveis		O.R. ¹	I.C. 95% ²	p-valor
Ritmo Intestinal	Diária / 2 em 2 dias / 3 em 3 dias	-	-	-
	1 vez por semana	1,64	(0,48; 5,56)	0,427
Consistência das fezes	Normal	-	-	-
	Obstipado/Diarreia	0,66	(0,30; 1,47)	0,306
Antecedentes pessoais e familiares: câncer	Nenhum	-	-	-
	Câncer familiar	1,33	(0,59; 3,01)	0,488
Antecedentes pessoais e familiares: diabetes	Nenhum	-	-	-
	Diabetes familiar	1,47	(0,66; 3,27)	0,340
Antecedentes pessoais e familiares: hipertensão	Nenhum	-	-	-
	Hipertensão familiar	0,32	(0,11; 0,92)	0,035

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% - Intervalo de 95% de confiança

APÊNDICE 52. Regressão logística univariada para *HIC1* com base nas variáveis de perfil do consumo energético e nutricional da população.

Variáveis	O.R. ¹	I.C. 95% ²	p-valor
Calorias total	1,00	(1,00; 1,00)	0,930
% calórico do carboidrato	0,98	(0,86; 1,11)	0,712
% calórico da proteína	1,13	(0,91; 1,40)	0,263
% calórico do lipídio	0,99	(0,91; 1,09)	0,906
Gordura saturada	0,99	(0,91; 1,09)	0,894
Gordura monoinsaturada	1,03	(0,94; 1,13)	0,555
Gordura poli-insaturada	0,98	(0,93; 1,05)	0,592
Ômega 3	1,07	(0,66; 1,75)	0,786
Fibra alimentar total	1,02	(0,94; 1,10)	0,624
Fibra solúvel	1,05	(0,87; 1,28)	0,598
Fibra insolúvel	1,03	(0,91; 1,16)	0,673
Cálcio	1,00	(1,00; 1,00)	0,247
Ferro	1,01	(0,88; 1,15)	0,909
Selênio	1,00	(0,99; 1,02)	0,672
Zinco	1,06	(0,89; 1,25)	0,539
Ácido fólico	1,00	(1,00; 1,00)	0,822
Vitamina A	0,99	(0,97; 1,02)	0,559
Vitamina D	0,90	(0,64; 1,27)	0,556
Vitamina C	1,00	(1,00; 1,00)	0,910
Vitamina B ₆	0,84	(0,29; 2,41)	0,743
Vitamina B12	0,98	(0,77; 1,25)	0,889
Metionina aminoácido	1,25	(0,44; 3,55)	0,682
Carne vermelha	1,01	(0,99; 1,02)	0,270
Carne processada	0,98	(0,93; 1,03)	0,465

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% - Intervalo de 95% de confiança

APÊNDICE 53. Regressão logística univariada para *HIC1* com base nas variáveis numéricas idade, IMC e circunferência da cintura.

Variáveis	O.R	I.C - 95%	Valor-p
Classificação do IMC	Mal nutrido/Eutrófico	-	-
	Sobrepeso/Obesidade	1,88	(0,59; 6,04)
Classificação da Circunferência da cintura	Risco baixo/moderado	-	-
	Risco alto	1,56	(0,50; 4,81)

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% - Intervalo de 95% de confiança

APÊNDICE 54. Regressão logística univariada para *HICl* com base nos exames bioquímicos.

Variáveis	O.R. ¹	I.C. 95% ²	p-valor
Hemácia	1,03	(0,34; 3,08)	0,957
Hemoglobina	1,01	(0,93; 1,09)	0,839
Hematócrito	0,95	(0,84; 1,09)	0,489
Leucócito	1,00	(1,00; 1,00)	0,390
Linfócito	1,00	(1,00; 1,00)	0,369
Glicemia	1,01	(0,98; 1,05)	0,396
Colesterol total	1,01	(1,00; 1,03)	0,144
Colesterol HDL	1,01	(0,97; 1,06)	0,584
Colesterol LDL	1,01	(0,99; 1,02)	0,299
Colesterol VLDL	1,00	(0,97; 1,03)	0,954
Triglicerídeos	1,00	(0,99; 1,01)	0,771
Proteínas totais	4,33	(1,12; 16,76)	0,034
Albumina	2,59	(0,69; 9,64)	0,157
Globulina	1,86	(0,57; 6,04)	0,300

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% - Intervalo de 95% de confiança

APÊNDICE 55. Regressão logística univariada para *HICl* com base nas variáveis caracterizadoras.

Variáveis	O.R. ¹	I.C. 95% ²	p-valor
Sexo	Masculino	-	-
	Feminino	1,48	(0,47; 4,63)
Estado civil	Sem companheiro	-	-
	Com companheiro	0,28	(0,06; 1,35)
Escolaridade	Estudou até 8 anos	-	-
	Estudou mais de 8 anos	2,24	(0,70; 7,20)
Etnia	Parda	-	-
	Outras	1,84	(0,54; 6,30)

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% - Intervalo de 95% de confiança

APÊNDICE 56. Regressão logística univariada para *HICl* com base nas variáveis dos hábitos de vida.

Variáveis	O.R. ¹	I.C. 95% ²	p-valor
Fumante	Não ³	-	-
	Sim	0,89	(0,23; 3,53)
Consome álcool	Não	-	-
	Sim	0,60	(0,19; 1,88)
Uso de medicamento regular	Não	-	-
	Sim	0,83	(0,24; 2,85)
Suplemento nutricional	Não	-	-
	Sim	0,79	(0,24; 2,56)
Atividade Física	Nenhuma	-	-
	Caminhada /Outros	0,94	(0,3; 2,92)

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% ; ³Não fumante - Nunca fumou ou parou de fumar há mais de 15 anos.

APÊNDICE 57. Regressão logística univariada para *HICI* com base nas variáveis dos hábitos intestinais e antecedentes pessoais e familiares.

Variáveis		O.R. ¹	I.C. 95% ²	p-valor
Ritmo Intestinal	Diária / 2 em 2 dias / 3 em 3 dias	-	-	-
	1 vez por semana	0,99	[0,20; 4,93]	0,988
Consistência das fezes	Normal	-	-	-
	Obstipado/Diarreia	0,37	[0,12; 1,20]	0,099
Antecedentes pessoais e familiares: câncer	Nenhum	-	-	-
	Câncer familiar	0,90	[0,28; 2,92]	0,867
Antecedentes pessoais e familiares: diabetes	Nenhum	-	-	-
	Diabetes familiar	2,98	[0,87; 10,18]	0,082
Antecedentes pessoais e familiares: hipertensão	Nenhum	-	-	-
	Hipertensão familiar	0,45	[0,09; 2,14]	0,313

¹O.R.- Odds Ratio ou Razão de Chances; ²I.C. – Intervalo de confiança I.C 95% - Intervalo de 95% de confiança

ANEXOS

ANEXO 1. Aprovação do Comitê de Ética



Universidade de Brasília
 Faculdade de Ciências da Saúde
 Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Título do Projeto: “Estudo da associação do hábito alimentar e expressão dos genes RASSF1A e HIC1 em indivíduos com câncer colorretal”

Pesquisadora Responsável: Araidia Dias Pereira

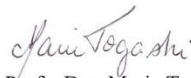
Data de Entrada: 19/02/2014

CAAE: 05580514.2.0000.0030

Com base na Resolução 466/12, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto intitulado “Estudo da associação do hábito alimentar e expressão dos genes RASSF1A e HIC1 em indivíduos com câncer colorretal”, na 2ª reunião ordinária realizada no dia 09 de abril de 2014.

O pesquisador (a) responsável fica, desde já, notificado (a) da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data presente.

Brasília, 13 de maio de 2014.


 Prof. Dra. Marie Togashi
 Coordenador do CEP-FS/UnB

Prof. Dra. Marie Togashi
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa
 com Seres Humanos (CEP/FS) - UnB

ANEXO 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UnB
 UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
 FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO
 BRASÍLIA - DF
 TELEFONE (061) 3107-1947
 E-mail: ceps@unb.br
<http://fs.unb.br/cep/>

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa:
 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO HÁBITO ALIMENTAR E EXPRESSÃO DOS
 GENES *RASSF1A* E *HIC1* EM INDIVÍDUOS COM CÂNCER COLORRETAL.

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS: O câncer colorretal está entre os tipos de câncer mais comuns no Brasil. Atualmente, observa-se o aumento dessa doença, e acredita-se que seu surgimento possa ser favorecido pelo hábito alimentar dos indivíduos. O câncer é o resultado do envelhecimento ou erros no funcionamento do organismo que podem ou não serem decorrentes de falhas genéticas herdadas dos pais. A pesquisa se justifica por tentar associar características como: o peso corporal, a circunferência da cintura, e o índice de massa corpórea – IMC, com o hábito alimentar e câncer colorretal. Para entender e avaliar a relação entre a alimentação e a essa doença estudaremos os genes *RASSF1A* e *HIC1*, que podem estar com a expressão alterada, no tecido intestinal das pessoas com a doença. A retirada de fragmentos pequenos do intestino (biopsia) coletadas durante o exame de colonoscopia permitirão o estudo destes genes. Para a avaliação do estado nutricional será coletada amostra de sangue em jejum (8 ml) para análise de albumina, lipidograma, hemograma e de glicose.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS: As biopsias serão retiradas de 5 (cinco) locais diferentes da lesão ou pólipos e serão fragmentos menores que 0,4 cm³ cada.

Nos casos de tecido intestinal saudável as amostras serão coletadas a 15 cm da borda anal. Não haverá nenhum desconforto além daquele já previsto para o exame de colonoscopia e a picada da agulha para coleta de sangue, que será realizado por profissional de um laboratório especializado em análise clínica. Você receberá consulta de nutricionista que fará uma avaliação nutricional (medidas de peso, altura e circunferência da cintura), aplicará um questionário de frequência alimentar e sócio econômico. A sua participação na pesquisa contribuirá para o melhor entendimento da associação do hábito alimentar e o câncer colorretal.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSINTÊNCIA: A sua participação no estudo não interferirá no seu tratamento. Você seguirá seu tratamento normal. No caso de



UnB
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO
BRASÍLIA - DF
TELEFONE (061) 3107-1947
E-mail: ceps@unb.br
<http://fs.unb.br/cep/>

apresentar alguma alteração nos exames bioquímicos será encaminhado para um médico ou nutricionista para o tratamento adequado do seu problema.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou mudança no procedimento do exame.

A sua identidade será tratada com sigilo. As amostras coletadas serão codificadas, havendo uma única identificação para cada indivíduo, impedindo a troca das amostras. A identidade será estritamente confidencial e não será revelada em qualquer publicação geral ou científica que envolva esses dados. Os arquivos que contêm estas informações serão armazenados de forma segura. Apenas o coordenador principal e demais pesquisadores responsáveis terão acesso aos códigos. Você receberá os resultados de todos os exames bioquímicos. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada pelo pesquisador responsável e outra será entregue a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional, exceto no caso de ressarcimento dos valores gastos com transporte urbano e alimentação para participar da pesquisa quando necessário, sendo necessária a apresentação de recibo para comprovar a despesa. No caso de você sofrer qualquer dano causado pela pesquisa terá o direito de solicitar indenização.

Eu fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A pesquisadora Araújo Dias Pereira e sua orientadora, professora Dra. Marina Kiyomi Ito, certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.



UnB
 UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
 FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO
 BRASÍLIA - DF
 TELEFONE (061) 3107-1947
 E-mail: cepfs@unb.br
<http://fs.unb.br/cep/>

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. Em caso de dúvidas adicionais poderei chamar a pesquisadora Araída Dias Pereira no telefone (63) 3421-1726 e o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade de Brasília no telefone (061) 3107-1947 ou e-mail: cepfsunb@gmail.com

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------

ANEXO 3. Questionário de Frequência Alimentar

PROJETO: A ASSOCIAÇÃO DO HÁBITO ALIMENTAR E METILAÇÃO DOS GENES
RASSF1A E *HIC1* EM INDIVÍDUOS COM CÂNCER COLORRETAL

Questionário de Frequência Alimentar

Data	Local colonoscopia	Código identificação
-------------	---------------------------	-----------------------------

Nome: _____

Entrevistador: _____

→ As questões seguintes relacionam-se ao hábito alimentar usual no **ULTIMO ANO (12 meses)**.

LEGUMINOSAS E OVOS	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	↳ não escrever aqui ↩
Feijão carioca ou preto	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 concha grande (104g)	P M G O O O	— — — —
Feijoada	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 concha cheia (174g)	P M G O O O	— — — —
Ovo de galinha cozido	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 unidade média (52g)	P M G O O O	— — — —
Ovo de galinha frito	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 ovo médio (50g)	P M G O O O	— — — —

LEITE E DERIVADOS	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	↳ não escrever aqui ↩
Leite 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 copo americano (150ml)	P M G O O O	— — — —
Leite 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 copo de requeijão (250ml)	P M G O O O	— — — —
Iogurte de fruta	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 copo americano ou 1 unidade (220ml)	P M G O O O	— — — —
Queijo mussarela	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 e 1/2 fatia finas (15g)	P M G O O O	— — — —
Queijo minas frescal	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 M (40g)	P M G O O O	— — — —
Margarina	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 pontas de faca (6g)	P M G O O O	— — — —
Manteiga	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 pontas de faca (5g)	P M G O O O	— — — —
Requeijão tradicional	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 colher de sobremesa cheia (26g)	P M G O O O	— — — —

CEREAISE TUBÉRCULOS	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	↳ não escrever aqui ↩
Arroz branco cozido com óleo e temperos	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 servir niveladas (180g)	P M G O O O	— — — —
Batata frita	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 e 1/2 colheres de servir (60g)	P M G O O O	— — — —
Batata cozida / Abóbora	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 (60g) / 1 escumadeira rasa (75g)	P M G O O O	— — — —
Batata doce frita	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	18 rodela (267g)	P M G O O O	— — — —
Batata doce cozida	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	5 rodela (175g)	P M G O O O	— — — —
Inhame	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	4 colheres servir (208g)	P M G O O O	— — — —
Mandioca cozida	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	8 pedaços médios (200g)	P M G O O O	— — — —
Cuscuz de milho	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 fatias grandes (220g)	P M G O O O	— — — —
Aveia	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 (29g)	P M G O O O	— — — —
Farofa	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 e 1/2 colher de sopa cheia (25,5g)	P M G O O O	— — — —
Farinha de Mandioca	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	4 colheres de sopa cheias (60g)	P M G O O O	— — — —
Macarrão cozido	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 servir niveladas (112g)	P M G O O O	— — — —

SUCOS	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	↳ não escrever aqui ↩
Suco de fruta natural (polpa e fruta)	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 copo de requeijão (250ml)	P M G O O O	— — — —
Suco de fruta de garrafa ou de caixinha	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 copo de requeijão (250ml)	P M G O O O	— — — —
Suco de fruta em pó	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 copo de requeijão (250ml)	P M G O O O	— — — —

HORTALIÇAS E FRUTAS	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	↳ não escrever aqui ↩
Tomate cru	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 rodela (36g)	P M G O O O	— — — — —
Cenoura cozida	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 e 1/2 colheres de sopa (22g)	P M G O O O	— — — — —
Abacate / Goiaba	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	5 fatias (155g) / 1 unidade grande (138g)	P M G O O O	— — — — —
Banana / Laranja / Maçã / Mamão papaia ou formosa	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	4 unidades médias (172g) / 1 e 1/2 unidade (178g) / 1 unidade grande (170g) / / 1 unidade média (166g) ou 1 fatia média (170g)	P M G O O O	— — — — —

PÃES, BISCOITOS E BOLOS	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	↳ não escrever aqui ↩
Pão francês	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 unidade média (50g)	P M G O O O	— — — — —
Pão de forma / Hambúrguer/ Cachorro-quente	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 fatias / 1 unidade (50g)	P M G O O O	— — — — —
Biscoito cream cracker	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	8 unidades comerciais (40g)	P M G O O O	— — — — —
Biscoito 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	2 unidades (27g)	P M G O O O	— — — — —
Bolo Caseiro	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	4 fatias pequenas (100g)	P M G O O O	— — — — —
Bolo de Padaria	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 fatias grandes (98g)	P M G O O O	— — — — —

CARNESE PEIXES	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	↳ não escrever aqui!↳
Peixe cozido	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	8 postas (318g)	P M G O O O	— — — —
Peixe frito	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	6 filés médios (198 g)	P M G O O O	— — — —
Carne de boi cozida	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	6 colheres de servir rasas (42 cubos) (258g)	P M G O O O	— — — —
Carne moída / Costela de boi	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	4 colheres de sopa cheias / 1 costela média (90 g)	P M G O O O	— — — —
Bife / Carne assada	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 bife médio (84g) / 1 e ½ fatias grossas (88g)	P M G O O O	— — — —
Fígado bovino	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 bife médio (58g)	P M G O O O	— — — —
Lingüiça de porco cozida / frita	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	5 pedaços / 8 pedaços (75g)	P M G O O O	— — — —
Frango COM pele (cozido, assado e frito)	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	Cozido: 2 ped P ou 1 coxa Assado: 1 coxa P e 2 asas Frito: 2 coxas da asa e 1 asa (97g)	P M G O O O	— — — —
Frango SEM pele (cozido, assado e frito)	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	Cozido: 2 ped P ou 1 coxa Assado: 1 coxa P e 2 asas Frito: 2 coxas da asa e 1 asa (61g) 2 bifés médios (140g)	P M G O O O	— — — —
Bife de filé de frango	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 bifés médios (140g)	P M G O O O	— — — —
Salsicha	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	½ unidade (25g)	P M G O O O	— — — —
Mortadela/Presunto/ Apresuntado	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 (15 g)	P M G O O O	— — — —

DIVERSOS	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	↳ não escrever aqui ↳
Cerveja	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 latas (581ml)	P M G O O O	— — — —
Refrigerante comum	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 copos de requeijão (500ml)	P M G O O O	— — — —
Café	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 copo americano (150ml)	P M G O O O	— — — —
Achocolatado em pó	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 colher de sopa cheia (21g)	P M G O O O	— — — —
Azeite	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 colher de sobremesa cheia (2,8ml)	P M G O O O	— — — —
Brigadeiro	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 unidade grande (50g)	P M G O O O	— — — —
Doce de Leite	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 colher de sopa rasa (25g)	P M G O O O	— — — —
Goiabada	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 (60g)	P M G O O O	— — — —
Coxinha (salgadinho)	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	4 unidades (65g)	P M G O O O	— — — —
Pão de queijo	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 unidade média (50g)	P M G O O O	— — — —
Pastel	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 unidade (60g)	P M G O O O	— — — —
Pizza	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 (107,5g)	P M G O O O	— — — —

→ Por favor, liste qualquer outro alimento ou preparação importante que você costuma comer ou beber pelo menos **UMA VEZ POR SEMANA** que não foram citados aqui.

ALIMENTO	FREQUÊNCIA POR SEMANA	QUANTIDADE CONSUMIDA	↳ não escrever aqui ↳	
			COD	CONS
			— — — —	— — — —
			— — — —	— — — —
			— — — —	— — — —
			— — — —	— — — —
			— — — —	— — — —

ANEXO 4. Questionário Sócio Econômico e Avaliação Nutricional

QUESTIONÁRIO SOCIO ECONÔMICO E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

PROJETO: A ASSOCIAÇÃO DO HÁBITO ALIMENTAR E METILAÇÃO DOS
GENES *RASSF1A* E *H1C1* EM INDIVÍDUOS COM CÂNCER COLORRETAL

Data:	Código identificador:
-------	-----------------------

Nome: _____ Sexo F () M ()

Data de Nascimento: ___ / ___ / ___ Idade: _____

Telefone fixo _____ Telefone celular _____

End: _____

Cidade/Estado _____ CEP: _____

Profissão: _____

1. Estado civil	1. Solteiro () 2. Casado () 3. União Estável () 4. Desquitado ou separado judicialmente () 5. Divorciado () 6. Viúvo ()	
2. Anos de estudo	Quantos anos estudou com aprovação? _____ anos e _____ meses Calcular o tempo de estudo no momento da entrevista	
3. Cor/Etnia	Foto de cor /etnia no IBGE (cartão) 1. Preta/negra () 2. Parda () 3. Branca () 4. Indígena () 5. Amarela () 6. Não sabe/não respondeu () 7. Outra () Qual? _____	
4. Avaliação antropométrica	Peso Atual: _____ Peso anterior _____ Altura: _____ Mudança de peso em quanto tempo? _____ Se perdeu peso, foi por quê? Quis perder peso () Perda de peso involuntária () IMC: _____ Classificação: _____ Circunferência da cintura: _____	

5. Tabagismo	Fumante: Não () Sim () Se sim, há quanto tempo?(meses) _____ Número de cigarros que fuma por dia? _____ Já fumou? Não () Sim () Se sim, há quanto tempo parou? (meses) _____	
6. Álcool	O Sr (a) faz uso de bebida que contém álcool? Não () Sim () Qual bebida costuma consumir? _____ Há quanto tempo? _____ Periodicidade? Diária () Uma vez por semana () 2 a 3 vez por semana () 4 ou mais vezes por semana () Esporadicamente () Alcoólatra()	
7. Medicamento regular	Faz uso medicamento? Não () Sim () Se sim, há quanto tempo? _____ Dose? _____ Periodicidade? 1.Diária () 2. Semanal() 3. Mensal () 4.Esporadicamente ()	
8. Suplemento nutricional (não alimentar)	Faz uso de suplemento nutricional? Não () Sim () Se sim, há quanto tempo? _____ Dose? _____ Periodicidade? 1.Diária () 2. Semanal () 3. Mensal () 4.Esporadicamente ()	
9. Atividade física	O Senhor (a) pratica atividade física? Não () Sim () Está relacionada à atividade profissional? Não () Sim () Qual? _____ Qual a frequência? 1x/semana () 2x/semana () 3x/semana () 4x/semana () 5 ou mais x/semana ()	

10. Ritmo intestinal	<p>Ritmo intestinal: diária () 2/2 dias () 3/3 dias () 1x/semana () Mais que uma semana () OBS: _____</p> <hr/> <p>Consistência das fezes:</p> <p>1. Tipo 1 - Carços duros e separados, como nozes () 2. Tipo 2 - Forma de salsicha, mas granuloso () 3. Tipo 3 - Como uma salsicha, mas com fissuras em sua superfície () 4. Tipo 4 - Como uma salsicha ou serpente, suave e macio () 5. Tipo 5 - Bolhas suaves com bordas nítidas () 6. Tipo 6 - Peças fofas com bordas em pedaços () 7. Tipo 7- Aquoso, sem partes sólidas, inteiramente líquido ()</p> <p>Houve alteração no funcionamento intestinal nos últimos meses? Não () Sim () Qual alteração? _____ Frequência se alternância de consistência (diarreia/obstipação): _____</p>	
11. Antecedentes pessoais e familiar	<p>() Câncer familiar _____ () Diabetes _____ () Colesterol _____ () Triglicerídeos _____ () Hipertensão _____ () Outras: _____</p>	
12. Resultado dos exames	<p>Hm: _____ Hg: _____ Ht: _____ Leu: _____ Linf: _____ Glicemia: _____ Col Total: _____ HDL: _____ LDL: _____ VLDL: _____ Trig: _____ Ptn totais: _____ Alb: _____ Glo: _____</p>	

<p>1. Consumo alimentar</p>	<p>- Quantas refeições faz por dia? 2 () 3 () 4 () 5 () 6 () 7 ()</p> <p>Onde come? _____</p> <p>Quem cozinha? _____</p> <p>Quantas pessoas almoçam/jantam diariamente? _____</p> <p>- Em relação ao preparo das carnes: Assada () Cozida () Frita /Grelhada ()</p> <p>- O Sr. (a) consome alimentos integrais (arroz, linhaça, gergelim, chia, aveia)? Não () Sim () Qual _____</p> <p>Diário: _____ porções/dia</p> <p>Semanal: _____ porções/semana Outro: _____</p> <p>Qual o óleo utilizado para cocção: _____</p> <p>Quantidade de óleo consumido por mês: _____ frascos</p> <p>Quantos copos americano de água bebe por dia? _____</p>
------------------------------------	---

ANEXO 6. Escala de Bristol – Consistência das fezes

