



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ENZO FABRICIO RIBEIRO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DOS GENES *MUTYH* E *OGG1* EM
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO**

**CAMPINAS
2017**

ENZO FABRICIO RIBEIRO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TECIDUAL DOS GENES *MUTYH* E *OGG1* EM
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de doutor

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

Coorientador: Prof. Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO ENZO FABRICIO RIBEIRO NASCIMENTO
E ORIENTADO PELO PROF. DR. CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

R354a Ribeiro Nascimento, Enzo Fabrício, 1975-
Avaliação da expressão tecidual dos genes *MUTYH* e *OGG1* em pacientes portadores de câncer colorretal esporádico / Enzo Fabrício Ribeiro Nascimento. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Carlos Augusto Real Martinez.
Coorientador: Claudio Saddy Rodrigues Coy.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Câncer colorretal. 2. Reparo do DNA. 3. Estresse oxidativo. 4. DNA glicosilases. I. Martinez, Carlos Augusto Real, 1954-. II. Coy, Claudio Saddy Rodrigues. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Tissue expression of the genes *MUTYH* and *OGG1* in patients with sporadic colorectal cancer

Palavras-chave em inglês:

Colorectal cancer

DNA repair

Oxidative stress

DNA glycosylases

Área de concentração: Cirurgia

Titulação: Doutor em Cirurgia

Banca examinadora:

Carlos Augusto Real Martinez

Flavia Balbo Piazzon

João Jose Fagundes

Murillo de Oliveira Antunes

Everton Cazzo

Data de defesa: 14-11-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ENZO FABRICIO RIBEIRO NASCIMENTO

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ

COORDENADOR: PROF. DR. CLAUDIO SADDY RODRIGUES COY

MEMBROS:

1. PROF. DR. CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ

2. PROF. DR. FLAVIA BALBO PIAZZON

3. PROF. DR. JOÃO JOSE FAGUNDES

4. PROF. DR. MURILLO DE OLIVEIRA ANTUNES

5. PROF. DR. EVERTON CAZZO

Programa de Pós-Graduação em [PROGRAMA] da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA [14/11/2017]

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar tudo possível.

Aos orientadores, Prof. Claudio Saddy Rodrigues Coy e Prof. Carlos Augusto Real Martinez, pela oportunidade, paciência, confiança e por partilhar algo tão valioso quanto o saber.

A minha esposa, amiga e companheira Flavia, pelo grande incentivo, motivação, ajuda em todos os sentidos para a conclusão deste projeto e pela compreensão nos momentos de ausência.

A minha filha Anita, que soube dividir meu colo com o computador, mantendo sempre o sorriso e o brilho no olhar, me dando forças para ir em frente.

A meus pais José e Sônia, pela excelente educação e valores transmitidos ao longo de toda a vida.

A toda a minha família; tenho certeza de que sempre torceram e rezaram por mim, pelo meu trabalho e pelas minhas vitórias.

Ao Dr. Marcelo Lima Ribeiro e à Dra. Juliana Carvalho, pela cooperação: análise genética, materiais, equipamentos e laboratório, que foram tão importantes para as pesquisas.

À Dra. Daniela Oliveira Magro, pelo auxílio com estatísticas.

Aos amigos e colegas de trabalho, que souberam entender e me ajudar nos períodos de ausência.

Aos meus residentes, que me auxiliaram na coleta de dados, nas opiniões sobre a dissertação e no atendimento dos pacientes.

Aos alunos da iniciação científica, pelo auxílio da coleta e armazenamento das amostras.

Aos pacientes que, em nome da ciência e da possibilidade de ajudar em pesquisas que possam trazer informações importantes ao progresso científico, cederam informações e material necessário para o desenvolvimento de nosso estudo.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum em homens (746 mil casos, 10,0% do total) e o segundo em mulheres (614 mil casos, 9,2% do total) no mundo, de acordo com dados de 2015. A mortalidade é consideravelmente baixa (694 mil casos, 8,5% do total), com um maior índice de óbitos (52%) em regiões menos desenvolvidas, refletindo um pior prognóstico nessas áreas.

O CCR na forma esporádica representa aproximadamente 80% dos casos, e as síndromes hereditárias são responsáveis por cerca de 5% a 20% dos casos.

Dentre as diferentes formas polipoides e hereditárias, podemos destacar a polipose associada a mutações no gene *MUTYH* (PAM), síndrome caracterizada pelo CCR hereditário, com transmissão autossômica e recessiva, e com mecanismos carcinogênicos diferentes da polipose adenomatosa (PAF), polipose adenomatosa familiar atenuada (PAFA) e câncer colorretal hereditário não polipoide (HNPCC).

Os genes *MUTYH* e *OGG1* compõem o sistema BER (*base excision repair*), para reparo de lesões no DNA, e estão envolvidos diretamente no processo de carcinogênese. A avaliação da expressão desses genes em portadores de CCR esporádico em uma população com grande miscigenação ganha importância à medida que o conhecimento dos mecanismos carcinogênicos poderia auxiliar na detecção precoce e melhorar o resultado no tratamento.

Dentre os objetivos do presente estudo, o principal foi a avaliação da expressão tecidual dos genes *MUTYH* e *OGG1* no tecido normal e neoplásico em portadores de CCR esporádico, além de comparar os níveis da expressão tecidual dos dois genes, *MUTYH* e *OGG1*, aos aspectos anatomopatológicos e epidemiológicos nos portadores dessa neoplasia.

Foram avaliados 49 indivíduos com diagnóstico de CCR, submetidos a cirurgia colorretal com intenção curativa, após estadiamento clínico seguindo orientações de diretrizes recomendadas pelas AJCC/UICC Guidelines. Os fragmentos da mucosa normal e da borda proximal tumoral foram coletados e preparados para extração do RNA, síntese de DNA e análise quantitativa por PCR em tempo real.

A amostra apresentou predomínio de sexo feminino, representando 53% dos casos. A variação etária ficou entre 28 e 87 anos, com média de 65,8 anos e desvio-padrão de ($\pm 11,3$). A localização predominante ocorreu na transição retossigmoideana, representando 33,3% dos casos. Considerando-se o estadiamento, observou-se que 61% dos casos apresentavam-se em estádios mais avançados (III e IV) e 39%, nos estádios I e II.

Em relação às demais variáveis, o tipo histológico predominante foi adenocarcinoma (96%), com grau de diferenciação moderadamente diferenciado (79,6%) e aspecto macroscópico ulcerovegetante (57,1%). Quanto à profundidade de lesão, a maioria dos pacientes apresentou invasão até serosa (67,3%); ausência de invasões angiolinfáticas e perineurais representou 55% da amostra; número de linfonodos ressecados acima de 12 (79,6%); número de linfonodos comprometidos em até 3 (53%); índice de linfonodos comprometidos acima de 20% (46,9%); e tamanho da lesão entre 2,1 cm e 5 cm (54,3%).

A análise dos dados relacionados à expressão tecidual dos genes estudados demonstrou diminuição significativa na expressão dos genes *MUTYH* e *OGG1* nos tecidos tumorais, quando comparada aos tecidos normais. Também observamos diminuição importante da expressão tecidual desses genes em pacientes em estádios mais avançados, como nos graus III e IV.

Palavras chave : Cancer colorretal. Genes. Reparo do DNA. Extresse Oxidativo. DNA Glicosilases.

ABSTRACT

TISSUE EXPRESSION OF THE GENES *MUTYH* AND *OGG1* IN PATIENTS WITH SPORADIC COLORECTAL CANCER

The colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in men (746,000 cases, 10.0% of the total) and the second in women (614,000 cases, 9.2% of the total) worldwide, type of neoplasm in relation to incidence and the fourth on mortality rates in the world, according to data from 2015. The CRC in the sporadic form represents approximately 80% of the cases and the hereditary syndromes are responsible for approximately 5% to 20% of cases related to inheritance. Among the different forms polypoid hereditary and can highlight the polyposis associated with mutations in the gene *MUTYH* (MAP), syndrome characterized by CCR hereditary, with autosomal recessive and, with carcinogenic mechanisms different from adenomatous polyposis (FAP), adenomatous polyposis attenuated family (PAF) and colorectal cancer heredity does not polypoid lesion, Lynch Syndrome.

The genes *MUTYH* and *OGG1* compose the system BER (base excision repair), for repair of lesions in the DNA, and are directly involved in the process of carcinogenesis. The evaluation of the expression of these genes in patients with CCR sporadic in a population with great miscegenation gains importance as the knowledge of the mechanisms carcinogenics could assist in early detection and improve the outcome in treatment.

Among the objectives of the present study, the principal was evaluating the expression of tissue genes *MUTYH* and *OGG1* in normal tissue and neoplastic in patients with sporadic CCR, in addition to compare the levels of expression of tissue genes *MUTYH* and *OGG1* to anatomo-pathological and epidemiological studies in patients of this neoplasm.

We evaluated 49 individuals diagnosed with CCR, undergoing colorectal surgery with curative intent, after clinical staging, following guidelines of guidelines recommended by AJCC/UICC Guidelines. The fragments of normal mucosa and the proximal border of tumor were collected and prepared for RNA extraction, DNA synthesis and quantitative analysis of the PCR in real time.

The sample was represented by 49 patients with a predominance of females representing 53% of the cases. The variation group represented between 28 to 87 years, with an average of 65.8 years and a standard deviation of (± 11.3). The predominant location occurred in the rettosigmoid transition, representing 33.3% of the cases. Considering the staging, it was observed that 61% of the cases presented in more advanced stages (III and IV) and 39% in stages I and II.

In relation to other variables, the predominant histologic type was adenocarcinoma (96%), degree of differentiation moderately differentiated (79.6%), macroscopic vegetans ulcer (57.1%), as to the depth of injury, most of the patients presented invasion until serum (67.3%), absence of invasions angiolymphatic perineural and represented 55% of the sample, the number of lymph nodes resected above 12 (79.6%), number of lymph nodes involved in up to 3 (53%), index of lymph nodes involved above 20% (46.9%) and lesion size between 2.1 cm and 5 cm (54.3%).

Our analysis of data related to the expression of tissue genes studied showed a significant decrease in the expression of genes *MUTYH* and *OGG1* in tumor tissues, when compared to normal tissues, we also observed a significant decrease of tissue expression of these genes in patients in more advanced stages, such as grade III and IV.

Key words: Colorectal Cancer. Genes. DNA Repair. Oxidative Stress. DNA Glycosylases

ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo proposto por Fearon/Vogelstein (Adaptado) (18).	19
Figura 2 – Representação esquemática da via Wnt/ β -catenina. Eisenmann, 2005 (Adaptado) (53).....	28
Figura 3 – Adenomas serrilhados.	33
Figura 4 – Demonstração da atuação dos sistemas de reparo de quebra da fita dupla Recombinação homóloga (HR) e recombinação não homóloga (NHEJ), Lopez-Contreras, 2012 (Adaptado) (136).....	43
Figura 5 – Esquema que demonstra ação da Rad-51/BRCA2 durante a reparação de quebra da fita dupla. Vasileva, 2005 (Adaptado) (140).	44
Figura 6 – Representação da atuação das proteínas de reparo e vias de atuação. Velic & Masson, 2015 (Adaptado) (143).....	46
Figura 7 – Estrutura molecular da proteína DNA-glicosilase específica para remoção da adenina traduzida a partir do gene <i>MUTYH</i> . Venesio, 2004 (Adaptado) (167).....	51
Figura 8 – Mutações identificadas em doentes portadores de PAM que apresentavam mutações em ambos os alelos, com sua localização aproximada no gene <i>MUTYH</i> . Sampson, 2003 (Adaptado) (152).....	54
Figura 9 – Frequência relativa de mutações no gene <i>MUTYH</i> em doentes com PAM descritos na literatura Sampson et al., 2003 (Adaptado) et al.) (152).	55
Figura 10-A – Produto de colectomia total em doente com 39 anos portador de PAM, mostrando a presença de pólipos adenomatosos comprometendo toda a extensão do cólon.....	57
Figura 10-B – Fotografia do mesmo paciente que demonstra pólipos adenomatosos sincrônicos.....	57
Figura 11 – Representação da estrutura molecular da 8-oxoguanina glicosilase (Jawahar Swaminathan e colaboradores. European Bioinformatics Institute. Domínio público).....	60
Figura 12 – A exposição do DNA aos RLO leva à incorporação de um radical hidroxila no carbono 8 da molécula da guanina, formando a 8-oxo-dG (O) . Kasai, 1983 (Adapatado) (198).....	63
Figura 13 – Representação da estrutura molecular da 8-oxoguanina glicosilase (Jawahar Swaminathan e colaboradores. European Bioinformatics Institute. Domínio público. M David S et al. (Adaptado) (199).	64

TABELAS

Tabela 1 – Primers usados para PCR em tempo real	69
Tabela 2 – Variáveis avaliadas	71
Tabela 3 – Expressão do gene <i>MUTYH</i> de acordo com as características das amostras entre os tecidos normal e tumoral.....	74
Tabela 4 – Expressão do gene <i>OGG1</i> de acordo com as características das amostras entre os tecidos normal e tumoral.....	75

GRÁFICO

Gráfico 1 – Variação de faixa etária	72
--	----

ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU – 5-fluorouracil	HNPCC – Câncer colorretal hereditário não associado à polipose
8-oxo-G – 8-oxo-guanina glicosilase	HR – Recombinação homóloga
AJCC – American Joint Committee on Cancer	HUSF – Hospital Universitário São Francisco
APC – <i>Adenomatous polyposis coli</i>	IGF-2 – <i>Insulin-like growth factor 2</i>
ATM – Ataxia telangiectasia mutado	INCA – Instituto Nacional do Câncer
BCL-2 – <i>B-cell lymphoma 2</i>	KRAS – <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
BER – <i>Base excision repair</i>	LEF – Fator potencializador linfoide
BIR – Replicação <i>break</i> induzida	LOH – Perda de heterozigosidade
BLM – <i>Bloom helicase</i>	LYN – <i>proto-oncogene, Src family tyrosine kinase</i>
BRAF – Proto-oncogene, <i>serine/threonine kinase</i>	MET – <i>proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
CACNA1G – <i>Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 g</i>	MLH – <i>MutL homolog</i>
CCR – Câncer colorretal	MMC – Mutado em câncer colorretal
cDNAs – Complementar DNA (sequência complementar de DNA)	MMP-1 – <i>Matrix metalloproteinase-1</i>
ChIP – <i>Interacting protein</i>	MMR – <i>Mismatch repair</i>
CHRPE – <i>Congenital hypertrophy of retinal pigment epithelium</i>	MPG – <i>Glicosilase N-metilpurina-DNA</i>
CIMP – <i>CpG island methylator phenotype</i>	MRE11 – <i>MRE11 homolog, double strand break repair nuclease</i>
CIN – Instabilidade cromossômica	MSH – <i>MutS homolog</i>
CpG – Citosina-guanina com fosfato	MSI – Instabilidade de microssatélites
CtBP – C-terminal de ligação proteína	MTH1 – <i>MSN three homolg</i>
DDC – Deletado em câncer colorretal	MYC – <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
DNA – <i>Desoxiribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)	NBS1 – <i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
DSBR – Reparo de quebra de fita dupla	NEIL1 – <i>Nei like DNA glycosylase 1</i>
E2F4 – <i>E2F transcription factor 4</i>	NER – <i>Nucleotide excision repair</i>
ERCC1 – <i>ERCC excision repair 1</i>	NEUROG1 – <i>Neurogenin 1</i>
ERCC2 – <i>ERCC excision repair 2</i>	NHEJ – Recombinação não homóloga
GC/TA – Guanina-citosina/timina-adenina	NHL1 – <i>Nth like DNA glycosylase 1</i>
GSK3 – Glicogênio sintase quinase 3	NTH1 – <i>Endonuclease III-like 1</i>
H2AFZ – <i>H2A histone family member Z</i>	

OGG1 – *8-oxoguanine DNA glycosylase*

OR – *Odds ratio*

PAF – Polipose adenomatosa familiar

PAFA – Polipose adenomatosa familiar atenuada

PAM – Polipose associada a mutações ao gene *MUTYH*

PCNA – *Proliferating cell nuclear antigen*

PCR – *Polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PK – *Protein kinase*

PMS2 – *Post meiotic segregation increased 2*

PTEN – *Phosphatase and tensin homolog*

RAD50 – *RAD50 double strand break repair protein*

RAP1B – *RAS oncogene family*

RLN – Radicais livres de nitrogênio

RLO – Radicais livres de oxigênio

RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RNA m – *Ribonucleic acid messenger* (ácido ribonucleico mensageiro)

RPA – Replicação proteína A

RUNX2 – *Runt related transcription factor 2*

RUNX3 – *Runt related transcription factor 3*

SAME – Serviço de arquivo médico estatístico

SC – Síndrome Cockayne

SDSA – Síntese dependente da cadeia de recozimento

SNPs – *Single nucleotide polymorphisms* (polimorfismos de nucleotídeo único)

SOCS1 – *Suppressor of cytokine signaling 1*

SSA – Recozimento de cadeia simples

TBX19 – *T-box transcription factor 19*

TCF – Fator de células T

TGF- β – Fator de crescimento β

UICC – Union for International Cancer Control

UNG – Glicosilase de DNA uracil

UV – Ultravioleta

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

XP – Xeroderma pigmentoso

XRCC4 – *X-ray repair cross completing 4*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 CÂNCER COLORRETAL	22
2.1.1 Carcinogênese.....	24
2.1.2 Sistemas de reparo de DNA	34
2.1.3 Gene <i>MUTYH</i>	50
2.1.4 Carcinogênese nos portadores de mutação no <i>MUTYH</i>	52
2.2 ASPECTOS CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS	56
2.2.1 Gene <i>OGG1</i>	60
2.2.2 Ação dos radicais livres de oxigênio (RLO)	62
3. OBJETIVOS	65
3.1 OBJETIVO GERAL	65
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
4. METODOLOGIA.....	66
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	66
4.2 CASUÍSTICA	66
4.3 COLETA DE MATERIAL	67
4.4 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE C-DNA	67
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE EXPRESSÃO POR RNA EM TEMPO REAL	67
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
5. RESULTADOS.....	70
5.1 ARTIGO: “EXPRESSÃO TECIDUAL DOS GENES <i>MUTYH</i> E <i>OGG1</i> EM DOENTES COM CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO”	70
5.2 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS	70
5.2.1 Sexo	71
5.2.2 Faixa etária	71
5.2.3 Estadiamento	72
5.2.4 Localização	72
5.2.5 Tipo histológico	72
5.2.6 Aspecto macroscópico.....	73
5.2.7 Grau de diferenciação	73
5.2.8 Profundidade de infiltração da lesão	73
5.2.9 Invasão angiolinfática e neural	73
5.2.10 Número de linfonodos ressecados.....	73
5.2.11 Número de linfonodos comprometidos	73
5.2.12 Razão de comprometimento linfonodal	74
5.2.13 Tamanho da lesão	74
5.2.14 Distância da margem tumoral	74
5.3 EXPRESSÃO DO <i>MUTYH</i>	74
5.4 EXPRESSÃO DO <i>OGG1</i>	75
6. DISCUSSÃO.....	77

7. CONCLUSÃO	80
7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
9. ANEXOS	95
ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO	95
ANEXO 2 – ORIGINAL ARTICLE	96
ANEXO 3 – PARECERES DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	101

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum em homens (746 mil casos, 10,0% do total) e o segundo mais frequente em mulheres (614 mil casos, 9,2% do total) em todo o mundo. Quase 55% dos casos ocorrem em países mais desenvolvidos. A mortalidade é consideravelmente mais baixa (694 mil, 8,5% do total de casos) nos países desenvolvidos, com maior frequência de óbitos (52%) em regiões menos desenvolvidas do mundo, refletindo pior prognóstico quando o diagnóstico é realizado tardiamente (1).

Ocupa posição de grande importância, e medidas de prevenção – sejam elas em âmbito individual ou coletivo, associadas ao fato de que os índices (GLOBOCAN 2012) de mortalidade diminuem gradativamente à medida que o diagnóstico é realizado precocemente – poderiam melhorar os índices de sobrevivência, pois o CCR apresenta bom prognóstico se diagnosticado em estágios iniciais (2).

O desenvolvimento de várias formas comuns de câncer é resultado da interação de fatores endógenos e ambientais, sendo um dos mais relevantes a dieta. Entre outros fatores de risco estão a história familiar de CCR, a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino e a idade (3).

Outras formas ligadas ao CCR são representadas pelas síndromes hereditárias, responsáveis por cerca de 20% dos casos de CCR ligados à herança (4)(5).

Dentre as síndromes hereditárias destacamos a polipose adenomatosa familiar (PAF), causada por mutações no gene supressor de tumor *APC* (*adenomatous polyposis coli*), e o câncer colorretal hereditário não associado à polipose (*hereditary non-polyposis colorectal cancer* – HNPCC), ou síndrome de Lynch (6)(7)(8).

Apresentando também grande importância, a polipose adenomatosa familiar atenuada (PAFA) é uma variante de polipose na qual ocorre a formação de menor número de pólipos adenomatosos em cólon e reto, representando um grupo heterogêneo de portadores de PAF (9)(10).

Podemos também destacar a polipose associada a mutações no gene *MUTYH* (PAM), síndrome caracterizada pelo CCR hereditário, com transmissão autossômica recessiva, descrita como doença que apresenta mecanismos carcinogênicos diferentes de PAF, PAFA e HNPCC (11)(12).

São descritas também outras variantes da PAF, como a síndrome de Gardner e a doença de Turcot, bem como outras síndromes hereditárias relacionadas ao CCR (polipose juvenil, doença de Peutz-Jeghers, e síndromes de Cowden, Muir-Torre, Bannayan-Riley-Ruvalcaba e Cronkhite-Canada); porém, PAF e HNPCC continuam a responder pela maioria dos casos dos cânceres hereditários (13).

Conhecer os mecanismos pelos quais o câncer se desenvolve, os fatores de risco e de proteção, e a maneira pela qual ele irá manifestar-se, colabora para o desenvolvimento de métodos diagnósticos, visando a detecção precoce e melhorando resultados dos tratamentos a serem realizados ratifica a importância desse conhecimento.

Quanto à fisiopatologia do CCR, descreve-se que ele se inicia por uma alteração da mucosa colônica normal, que sofre transições no nível genético ou epigenético, ocasionando neoplasia intraepitelial, com consequente crescimento de lesões adenomatosas (Figura 1), podendo progredir para câncer invasivo (14)(15)(16)(17).

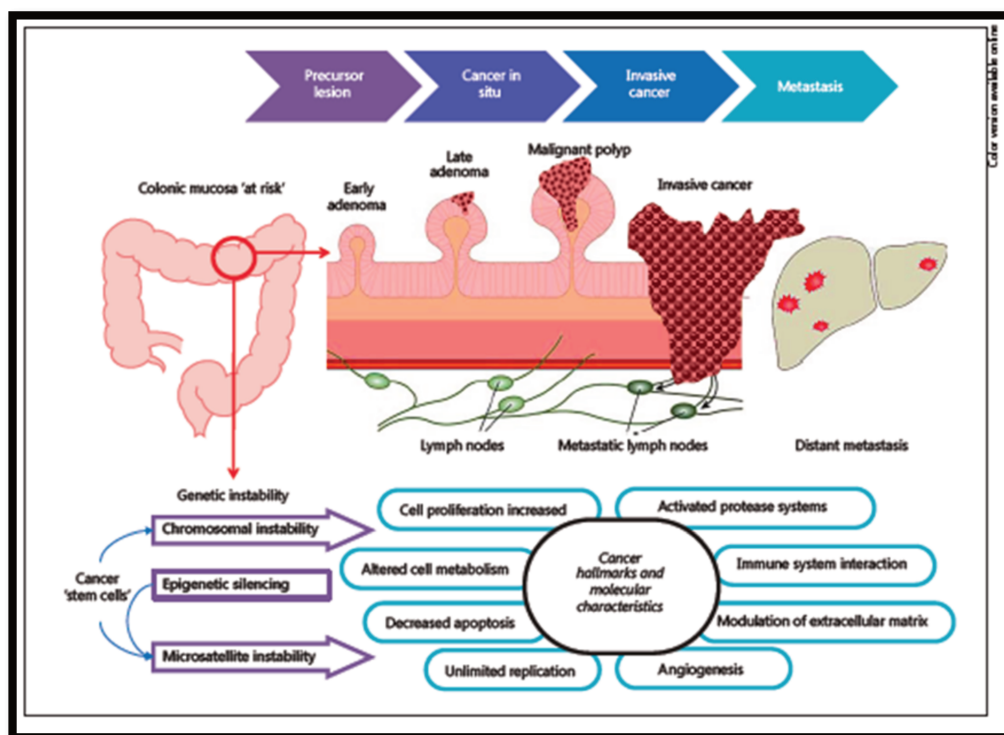


Figura 1 – Modelo proposto por Fearon/Vogelstein (Adaptado) (18).

Esse modelo proposto (18) é conhecido por sequência adenoma-carcinoma, que relaciona alterações genéticas e suas consequências aos diferentes estágios de desenvolvimento do tumor colorretal (19).

A instabilidade genômica vem sendo reconhecida como parte integral e importante nesse processo da carcinogênese por três distintas vias moleculares, que podem aparecer como evento único em determinadas situações ou ocorrerem de forma associada (20):

- a) instabilidade cromossômica (CIN);
- b) instabilidade de microssatélites (MSI);
- c) via CIMP (*CpG island methylator phenotype* – fenótipos de ilhas CpG metiladas).

Com o avanço das pesquisas na área da biologia molecular, foi possível identificar mecanismos importantes envolvidas na carcinogênese: tanto os proto-oncogenes, que, quando ativados, precipitam o processo formador do câncer,

quanto os supressores, que controlam o crescimento neoplásico e fazem parte do processo de manutenção da estabilidade genômica.

Os genes responsáveis pelos sistemas de reparo de DNA têm importância fundamental na carcinogênese, pois corrigem possíveis danos causados por agentes exógenos e endógenos ao DNA, evitando o aparecimento de mutações, e falhas de expressão e da manutenção da estabilidade gênica.

Dentre os mecanismos de reparo disponíveis, o reparo por excisão de bases (BER) remove bases oxidadas ou quimicamente modificadas; o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) realiza o reparo através da excisão de nucleotídeos, reparando os dímeros da pirimidina; o reparo de mau pareamento (MMR) corrige erros de pareamento que ocorrem durante a replicação de DNA; o reparo de quebra de fita dupla (DSBR) desempenha papel fundamental em várias etapas do ciclo celular (21).

O gene *MUTYH* localiza-se no braço curto do cromossomo 1, 1p32.1–p34.3. É formado por 15 íntrons e 16 éxons, e codifica uma proteína denominada DNA-glicosilase, específica para correção de bases erroneamente pareadas em oposição à 8-oxo-dG. O gene faz parte, juntamente com os genes *OGG1* (8-oxoguanine DNA glycosylase) e *MTH1*, de uma das vias que formam o sistema BER. Esse complexo sistema de reparo apresenta como função primordial a correção de mutações provocadas pelo estresse oxidativo ao DNA durante o metabolismo anaeróbico da célula (22).

Cada uma das três enzimas traduzidas a partir dos três genes que compõem essa via do sistema BER apresenta funções específicas na proteção contra os efeitos mutagênicos da 8-oxo-dG, que é formada pelo dano oxidativo. A proteína traduzida pelo gene *OGG1* remove o complexo formado entre pareamento 8-oxo-dG:C na dupla fita do DNA (23). A proteína traduzida pelo *MUTYH*, a adenina DNA-glicosilase, retira a base adenina erroneamente pareada com a 8-oxo-dG e não reparada durante a replicação (24). A enzima traduzida pelo gene *MTH1* (8-oxo-dGTPase) impede que ocorra a inserção de novas moléculas de 8-oxo-dG no DNA recém corrigido (25).

O gene *OGG1*, localizado no braço curto do cromossomo 3, região 3p26.2, codifica duas formas de proteína *hogg1*, proteína que resulta de uma ligação alternativo simples do RNA-mensageiro e a alfa-*hogg1* de localização nuclear (26).

A *ogg1* compõe um grupo da glicosilases que reconhece e excisa bases 8-oxaguanina formadas pela exposição aos radicais livres de oxigênio. A presença dessa base no DNA resulta em transversões GC/TA; e a diminuição ou ausência de expressão desse gene resultaria na falta de reparo das transversões, aumentando o risco ao desenvolvimento de câncer de pulmão, cabeça e pescoço, além de estudos recentes também demonstrarem o aumento da incidência do CCR (27). O papel da *ogg1* no reparo de DNA exposto aos radicais livres das reações intracelulares vem ganhando cada vez mais projeção, com publicações recentes demonstrando a associação com o CCR (28)(29).

Em estudo realizado em Taiwan, por Lai, que avaliou 727 pacientes, descreveu-se a relação dos níveis de expressão do *OGG1* na população estudada portadora de câncer colorretal (30).

Su et al. também descreveram a presença de polimorfismos detectados no *OGG1* relacionados ao aumento de risco de CCR em indivíduos caucasianos e asiáticos, destacando a importância do adequado funcionamento desse gene (31).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer colorretal

O CCR ocupa posição importante em relação aos índices de mortalidade no mundo, correspondendo à terceira neoplasia mais frequente (1). Ele apresenta bom prognóstico se diagnosticado em estágios iniciais, com sobrevida média global de 5 anos, em torno de 55% em países desenvolvidos e 40% em países em desenvolvimento (2).

Corresponde à terceira causa de morte decorrente de neoplasia entre homens e à segunda entre mulheres nos Estados Unidos; estimativas apontam cerca de 140 mil casos novos em 2016 e cerca de 50 mil mortes ocasionadas pela doença (32).

Na Europa, em 2012, o número de casos ficou em torno 3,5 milhões. O câncer colorretal ocupa a segunda posição em relação à prevalência, ficando atrás somente do câncer de próstata no sexo masculino e do câncer de mama no sexo feminino (33).

A incidência e a mortalidade variam entre as diferentes regiões do planeta, sendo que a incidência é maior nos países com maior índice de desenvolvimento, e a mortalidade, maior em regiões com médio e baixo índices de desenvolvimento (1).

Tem se observado mudança no padrão da incidência do CCR em países nos quais o risco era considerado baixo, como Japão e outras nações asiáticas, com tendência a aumento no número de casos dessa neoplasia. Por outro lado, em países sabidamente com alto risco, a incidência vem apresentando estabilidade ou até mesmo declínio em suas taxas, como é o caso de países da Europa Ocidental, do Norte Europeu e da América do Norte, além da Austrália.

No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (Inca), o CCR ocupa a terceira posição em incidência, com aproximadamente 34 mil casos estimados em 2016, sendo 16.660 homens e 17.620 mulheres, e o número total de

mortes, de 15.411 (7.387 homens e 8.024 mulheres). As taxas de sobrevivência permanecem em torno de 55% em 5 anos (34).

Relatos demonstram que entre 15% e 20% dos casos apresentam relação com componente hereditário (35), e a maior parte (70% a 80%) deles ocorrem de forma esporádica, em pacientes sem fatores genéticos identificados para o risco.

O desenvolvimento das várias formas de câncer é resultado da interação de fatores endógenos e ambientais, sendo um dos mais relevantes a dieta. Para o CCR, os fatores protetores mais importantes são atividade física e consumo de alimentos que contenham fibra dietética de origem vegetal, tais como frutas, hortaliças (legumes e verduras) e cereais integrais (36). Por outro lado, são fatores de risco para esse tipo de câncer: carne vermelha, carnes processadas e embutidos (como mortadela, presunto, salsicha, linguiça), bebidas alcoólicas, tabagismo, excesso de gordura corporal e abdominal (37).

Outros fatores de risco são história familiar de câncer colorretal, predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino e idade, sendo que tanto a incidência quanto a mortalidade aumentam com a idade (3). Outras formas menos frequentes de CCR são representadas por síndromes hereditárias, em torno de 5% a 15% dos casos (4). As síndromes hereditárias cursam com alta predisposição para o desenvolvimento do CCR e, habitualmente, apresentam-se sob a forma de entidades clínicas distintas, sendo as mais prevalentes a polipose adenomatosa familiar (PAF), causada por mutações no gene supressor de tumor *APC* (*adenomatous polyposis coli*), e o câncer colorretal hereditário não associado à polipose (*hereditary non-polyposis colorectal cancer* – HNPCC), ou síndrome de Lynch, gerado por mutações, em mais de 80% dos casos, localizadas nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*, que compõem um dos sistemas de reparo do DNA (*mismatch repair* – MMR) (6)(8).

Ambas as condições são doenças genéticas de herança autossômica dominante, acompanhadas por história familiar na qual o desenvolvimento do CCR ocorre em faixa etária mais precoce da vida, quando comparada ao câncer colorretal esporádico. Nessas duas formas hereditárias, a possibilidade de se identificar a mutação genética causal eleva-se para em torno de 70% a 90% dos casos (38)(39).

Podemos também destacar a ocorrência da polipose adenomatosa familiar atenuada (PAFA), forma atenuada de polipose na qual ocorre a formação de número menor de pólipos adenomatosos no cólon e reto (10-100 pólipos), representando um grupo heterogêneo e ainda mal caracterizado de portadores de PAF (9)(10).

Outra forma de polipose descrita é representada pela polipose associada a mutações no gene *MUTYH* (PAM). Esta síndrome é caracterizada pelo aparecimento de CCR associado à transmissão autossômica recessiva, sendo descrita como doença que apresenta mecanismos carcinogênicos diferentes da PAF, da PAFA e do HNPCC (11)(40).

São descritas também outras poliposes variantes da PAF, como a síndrome de Gardner e a doença de Turcot, bem como outras síndromes hereditárias relacionadas ao CCR: polipose juvenil, doença de Peutz-Jeghers, síndromes de Cowden, Muir-Torre, Bannayan-Riley-Ruvalcaba e Cronkhite-Canada. Porém, a PAF e o HNPCC continuam a responder pela maioria dos casos dos cânceres hereditários (13).

2.1.1 Carcinogênese

A carcinogênese é um processo que envolve múltiplas variáveis genéticas e epigenéticas, demonstrando natureza heterogênea, e ligando-se a vários fatores e a múltiplas etapas durante seu desenvolvimento – entre elas, iniciação, promoção e progressão ao câncer. Envolve ainda o equilíbrio entre genes pró-tumorais (proto-oncogenes) e genes supressores tumorais, os primeiros atuando de forma a iniciar o processo neoplásico, e os supressores controlando e impedindo a proliferação neoplásica.

O CCR é iniciado por alterações da mucosa colônica normal, que sofre transições em níveis genético ou epigenético, ocasionando o aparecimento da neoplasia intraepitelial, com consequente crescimento de lesões adenomatosas (ver Figura 1), podendo progredir para o câncer invasivo.

Esse modelo classicamente proposto é conhecido pela sequência adenoma-carcinoma, que relaciona alterações genéticas e suas consequências aos diferentes estágios de desenvolvimento do tumor colorretal (19).

Em contraste a alguns modelos menos atuais que se referem ao mecanismo do CCR (14)(15)(16), a carcinogênese hoje é reconhecida por estar relacionada a uma grande heterogeneidade, sendo atribuída a fatores que, ao longo do tempo e devido a novas descobertas e recentes pesquisas, vêm se tornando cada vez mais complexos (41).

O primeiro e principal modelo dessa nova etapa nas pesquisas sobre a carcinogênese foi proposto por Fearon e Vogelstein (18), e envolve três importantes fatores:

- 1) CCR seria decorrente do resultado da ativação de proto-oncogenes ou da inativação de genes supressores;
- 2) mutação de pelo menos 4 a 5 diferentes genes, requeridos e responsáveis pela ocorrência dos tumores;
- 3) acúmulo de alterações genéticas responsáveis pela determinação biológica do comportamento tumoral.

Com o crescente aprimoramento dos estudos de bases moleculares, novas vias estão sendo pesquisadas e relatadas. Alguns autores descreveram as vias carcinogênicas na forma clássica (adenoma-carcinoma), que envolve mutação no gene *APC*, perda de heterozigosidade (LOH) e instabilidade cromossômica (CIN); a via alternativa, porém, envolve mutação no *K-RAS* e também no *APC*; e a via denominada serrilhada, descrita mais recentemente, deriva da metilação CpG e de mutações no *BRAF*, além de instabilidades de microssatélites (MSI) tardias.

Desde a descrição do modelo clássico apresentado por Vogelstein, importantes avanços foram realizados em relação à natureza molecular do CCR.

Décadas após a descrição deste primeiro modelo, novas descobertas avançaram em relação às alterações moleculares no CCR, a primeira sendo a instabilidade de microssatélites, causada por defeitos nos genes de reparo através do mecanismo MMR, com importante papel no CCR hereditário, mas que também é descrito em cerca de 15% dos CCR esporádicos. Posteriormente, seguiu-se o descobrimento do papel da epigenética, em especial na hipermetilação das ilhas CpG, atuando na supressão da função gênica, que é denominada *concordant methylation of the CpG island methylator phenotype* (CIMP) (41).

Atualmente, a instabilidade genômica vem sendo reconhecida como parte integral nesse processo de carcinogênese por três distintas vias moleculares, citadas a seguir, que podem aparecer como um evento único em determinadas situações ou ocorrer de forma associada (20):

- a) instabilidade cromossômica (CIN);
- b) instabilidade de microssatélites (MSI)
- c) via CIMP (fenótipos de ilhas CpG metiladas).

2.1.1.1 Instabilidade cromossômica

A instabilidade cromossômica (CIN) é a causa mais comum de instabilidade genômica em CCR e responsável por grande parte das formas de CCR esporádicos. Caracteriza-se por ampliações ou deleções de regiões cromossômicas que abrigam estes genes ou componentes do processo de carcinogênese colorretal. CIN resulta de defeitos de segregação cromossômica com subsequente aneuploidia, disfunção dos telômeros ou defeitos nos mecanismos de resposta aos danos do DNA (42). A consequência é um desequilíbrio no número de cromossomos (aneuploidia), ampliações genômicas (alteração no número de cópias gênicas) cromossômicas e elevada frequência de homozigose (LOH) (42).

Ampliações extensas (maiores que a metade de um braço) têm sido frequentemente identificadas nos cromossomos 7, 8q, 13q, 20 e X, e deleções extensas são encontradas nos cromossomos 1, 4, 5, 8p, 14q, 15q, 17p, 18, 20p e 22q. Essas deleções ou duplicações cromossômicas podem envolver regiões que contêm importantes genes com papel na carcinogênese, por exemplo, *VEGF*, *MYC*, *MET*, *LYN*, *PTEN* e outros (43). As alterações genéticas únicas mais frequentes são as mutações nos genes *APC* e *KRAS*. O *KRAS* é proto-oncogene que se encontra mutado em 30% a 60% dos CCR e nos adenomas (44)(45)(46).

Propõe-se que a ativação do *KRAS* possa desempenhar papel importante na transição do adenoma para carcinoma pela ativação de alvos, entre eles, *BCL-2*, *H2AFZ*, *RAP1B*, *TBX19*, *E2F4* e *MMP1* (44). O produto do gene *KRAS* é uma proteína de 21 kDa ligada à membrana celular e envolvida na transdução de sinal, ativada em resposta a sinais extracelulares. A proteína mutada é bloqueada sob a forma ativa, e isso prejudica a atividade da GTP-ase, provocando hidrólise da GTP

em GDP. A maioria das mutações descritas são encontradas nos códons 12 e 13 do éxon 1 (46).

A ativação do *KRAS* afeta múltiplas funções celulares, que controlam crescimento celular, diferenciação, sobrevivência, apoptose, citoesqueleto, organização, motilidade celular, proliferação e inflamação (42).

2.1.1.1.1 Perda de alelo em 5q

A perda dessa região do cromossomo 5q foi relatada em 20% a 50% dos cânceres colorretais esporádicos (47). Dois importantes genes estão localizados no braço longo do cromossomo 5; esses genes são representados pelo *APC* e o *MCC*. Mutações somáticas no *APC* estão presentes em 60% a 80% dos CCR, assim como em grande porcentagem de lesões precursoras de adenomas colorretais, indicando que a mutação *APC* é evento precoce no processo de carcinogênese do câncer colorretal (48).

O gene *APC* foi descrito como o *gatekeeper* de proliferação celular no cólon, pertencendo à via *Wnt/wingless*. A proteína APC forma um complexo com β -catenina, axina e a enzima glicogênio síntese quinase 3 (GSK3) (49).

É necessária a perda de alelos para que ocorra a perda da função do *APC* (50). A via *Wnt* desempenha papel central na renovação epitelial intestinal (51). A APC liga-se à β -catenina e induz a sua degradação, atuando assim como regulador negativo na ação da β -catenina (52). A perda da função APC (por meio de mutações, LOH e metilação) resulta no acúmulo citoplásmico de β -catenina, conduzindo a translocação nuclear e a ligação de β -catenina com o fator de células T (TCF)/fator potencializador linfóide (LEF). Um esquema simplificado da via de *Wnt*/ β -catenina é ilustrado na Figura 2.

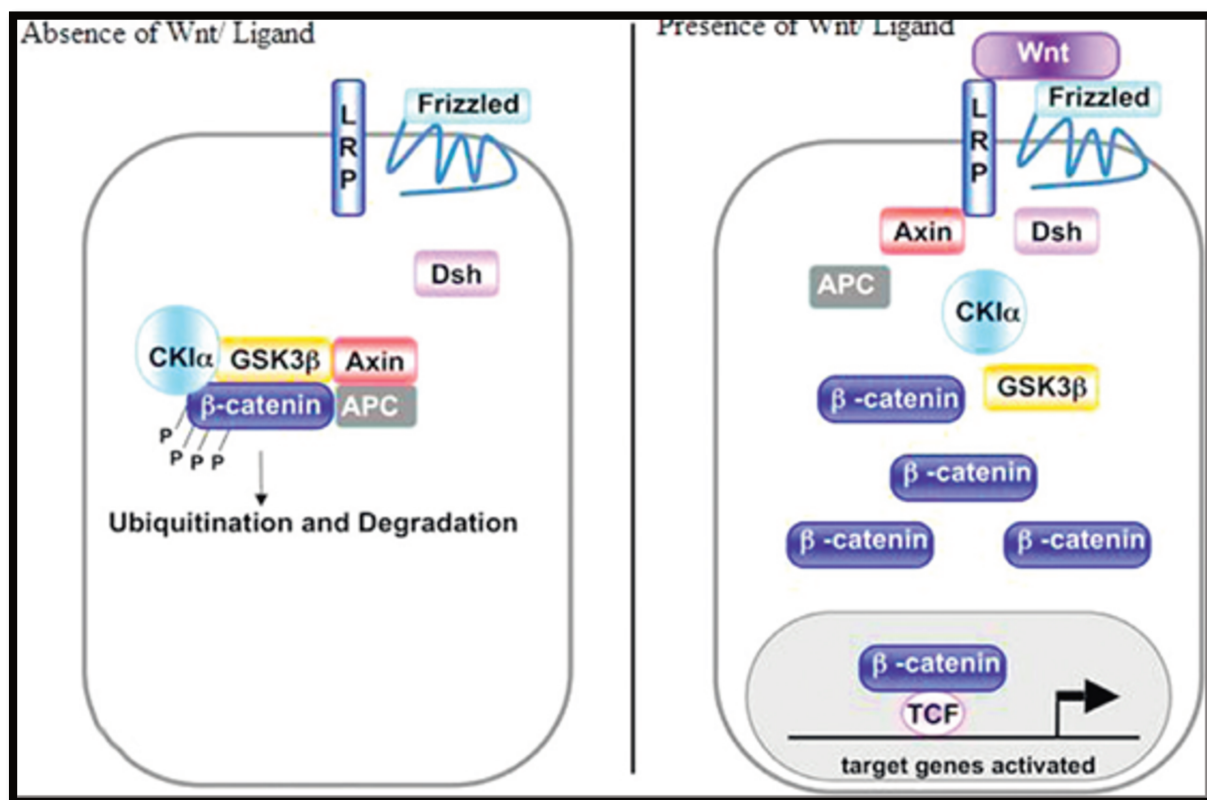


Figura 2 – Representação esquemática da via Wnt/β-catenina. Eisenmann, 2005 (Adaptado) (53).

A ligação do Wnt a um complexo de Frizzled/LRP-5/6 conduz à estabilização da β-catenina hipofosforilada, que interage com as proteínas TCF/LEF no núcleo para ativar a transcrição. Os complexos CK1α, GSK3β, APC e Axin atuam como reguladores negativos, e todos os outros componentes agem positivamente (53).

Os genes alvo Wnt afetam várias funções celulares, entre elas, reguladores da progressão do ciclo celular (c-myc e ciclina D1), proliferação celular, angiogênese e apoptose (52). Portanto, sugere-se que a via Wnt é importante tanto para a iniciação quanto para a progressão do CCR. Ela representa uma “via comum final”, tal como outras vias de sinalização convergem e interagem com essa via (54). A perda da função APC não é o único gatilho para a ativação da via Wnt; entre as rotas alternativas estão a ativação de mutações β-catenina, que a torna resistente à degradação (menos de 5% de todos os CCR), e mutações no *AXIN1* e no *AXIN2*, que são importantes para vias de carcinogênese colorretal descritas por Al-Sohaily et al. (47).

O gene *MCC* está localizado em 5q21 e encontra-se comumente silenciado nos CCR através da via de metilação (55)(56).

O *MCC* foi identificado como um dos genes moduladores na carcinogênese em modelos experimentais em ratos (57), e sua proteína correspondente é responsável pela regulação do ciclo celular, induzindo o controle do ciclo celular em resposta ao dano do DNA. (58). Em adição a essa informação, recente estudo sugere que o *MMC* também pode inibir o sinal Wnt/ β -catenina, independentemente do sinal de transdução do gene *APC* (55).

2.1.1.1.2 Perda de alelo em 17p

A perda do alelo em 17p é relatada em 75% dos CCR, mas não em adenomas, sugerindo que a perda desse segmento que contém o gene *TP53*, supressor tumoral, é ocorrência tardia no processo da geração tumoral (52).

No CCR, a perda do alelo 17p é comumente associada a mutações no *TP53* no segundo alelo, e isso pode mediar a transição do adenoma para carcinoma (61).

O *TP53* é fator de transcrição com atividade supressora tumoral, que se liga a uma sequência específica de DNA e ativa certo número de genes envolvidos na parada do ciclo celular, apoptose, senescência, autofagia e o metabolismo celular. Além disso, ele tem número de transcrições que independe da atividade celular, importante para a manutenção da estabilidade genômica.

O *TP53* também facilita a adaptação celular em resposta aos diferentes tipos de estresse celular, entre eles, danos do DNA por mutagênicos, estímulos oncogênicos, hipóxia e erosão telomérica (62).

2.1.1.1.3 Perda de heterozigosidade no alelo em 18q

A LOH no 18q é detectada em 50% a 70% dos CCR; trata-se de marcador de mau prognóstico descrito nos estágios II e III (63)(64).

2.1.1.2 Instabilidade de microssatélites (MSI)

Microssatélites são pequenas sequências de repetições de nucleotídeos espalhados ao longo do genoma e propensos a erros durante a replicação, devido a

sua ocorrência de forma repetitiva. O sistema de reparo do DNA (MMR) reconhece a incompatibilidade de pares de base que ocorrem durante replicação de DNA e faz a correção. A instabilidade de microssatélites é reflexo da incapacidade do sistema de MMR para corrigir esses erros, sendo reconhecido por mutações *frameshift* nas repetições de microssatélites.

A descoberta da MSI no ano de 1993, pela sua ligação com HNPCC, e a subsequente clonagem de genes *MMR* levaram ao reconhecimento da MSI como via alternativa na carcinogênese colorretal. Mutações germinativas no sistema de genes *MMR* resultam na síndrome de Lynch, enquanto a mutação somática ou a hipermetilação resulta no silenciamento de genes responsáveis por *MMR*, ocasionando cerca de 15% do CCR esporádico e menos de 5% (56) quando ligado a fatores hereditários.

Em casos esporádicos, a maioria das MSI comumente resultam do silenciamento epigenético do *MLH1*, e, em tumores esporádicos, da metilação de ilhas de CpG. Os membros do sistema de *MMR* identificados incluem os genes *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *MLH3*, *MSH3*, *PMS1* e *Exo1* (65)(52).

Tumores com MSI têm características fenotípicas distintas, entre elas, predileção ao cólon direito, lesões extensas e múltiplas, com baixo grau de diferenciação, ou presença de células tumorais do tipo mucinoso. Mostram também número mais elevado de linfonodos, bem como menor frequência de metástases a distância (66)(67)(68), sendo associados a um prognóstico específico em comparação aos tumores com microssatélites estáveis (66)(69). A explicação para essa ocorrência é especulativa, mas é provável que seja decorrente da melhor resposta imune do hospedeiro ao tumor (70)(71).

O fato de um CCR apresentar uma ou mais das características acima deve chamar a atenção do clínico a uma possível associação com a síndrome de Lynch, pois seria importante identificá-la ou descartá-la. No entanto, uma vez que essas características não são exclusivas do CCR com MSI, a análise de MSI através de estudo imuno-histoquímico da expressão das proteínas do sistema de reparo do DNA, que está ausente quando genes desse sistema são defeituosos, deve ser realizada antes do estudo genético (72).

A importância da identificação dessas alterações é relevante, pois, embora com resultados ainda contraditórios em relação ao valor preditivo, alguns dados indicam que a ausência da MSI pode auxiliar a prever a resposta ao 5-fluorouracil e determinar a capacidade de resposta a outras drogas utilizadas para o tratamento do CCR (41)(73).

2.1.1.3 Via CIMP

Ilhas CpG são regiões do DNA que correspondem a aproximadamente 40% das regiões promotoras genéticas em mamíferos. Essas regiões contêm elevados níveis de pares citosina-guanina com fosfato, por isso o uso da forma abreviada (“p” em CpG).

Os locais de CpG não metiladas permitem que as funções dos genes sejam expressas, daí a metilação das ilhas CpG serem responsáveis pela supressão, inibição ou inativação da função de alguns genes (74)(75).

Essas alterações epigenéticas referem-se a mudanças na expressão ou função do gene, sem alterações na sequência do DNA. Nos seres humanos, alterações epigenéticas são geralmente causadas por metilação do DNA ou modificações nas histonas (76).

A metilação do DNA ocorre comumente no 5'-CG-3' (CpG) dinucleotídeo. Esse processo resulta na supressão da função genética, portanto, proporciona mecanismo alternativo para a perda da função supressora de tumores de genes anticarcinogênicos (76). Entre os genes mais comumente envolvidos no processo da perda de função por hipermetilação do DNA estão *APC*, *MCC*, *MLH1*, *MGMT* e vários outros. Um exemplo clássico de hipermetilação é o silenciamento do gene *MLH1* em carcinomas esporádicos por MSI alta (77). Fatores ambientais, entre eles, tabagismo e idade avançada, têm sido correlacionados também ao aumento da metilação (77)(78). CIMP (*CpG island methylator phenotype* – fenótipos de ilhas CpG metiladas) refere-se à presença de hipermetilação concomitante de múltiplos genes.

Cinco genes têm sido utilizados para caracterizar a via CIMP: *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* e *SOCS1*. A positividade dessa via é confirmada por meio da identificação de pelo menos três dos genes alterados.

A via CIMP está presente em cerca de 15% a 20% dos tumores esporádicos e apresenta algumas particularidades, por exemplo, ocorrência mais frequente em mulheres, em pacientes com idade mais avançada e em localização proximal (cólon direito). Patologicamente, esses tumores apresentam uma baixa diferenciação, com presença de células mucinosas ou em anel de sinete, também apresentando instabilidade de microssatélite e mutação no *BRAF* (79).

Esses pacientes, em geral, não são beneficiados com uso de 5-fluorouracil no tratamento adjuvante (80).

As lesões neoplásicas precursoras comumente são adenomas que podem apresentar-se como pólipos hiperplásicos, adenomatosos, serrilhados e planos, por isso, essa via também é chamada de “via serrilhada”, apresentando características diferenciadas em relação à apresentação e não raro distintas da via clássica adenoma-carcinoma, cursando com lesões comumente planas ou minimamente elevadas, com forte predileção pelo ceco e cólon ascendente, associadas a mutações no *BRAF* e também com extensa exposição à metilação do DNA (81)(82)(83).

Os adenomas serrilhados (Figura 3) são, portanto, de grande utilidade à vigilância; e técnicas endoscópicas específicas são frequentemente necessárias para minimizar o risco de perda e de transformação maligna dessas lesões (41).

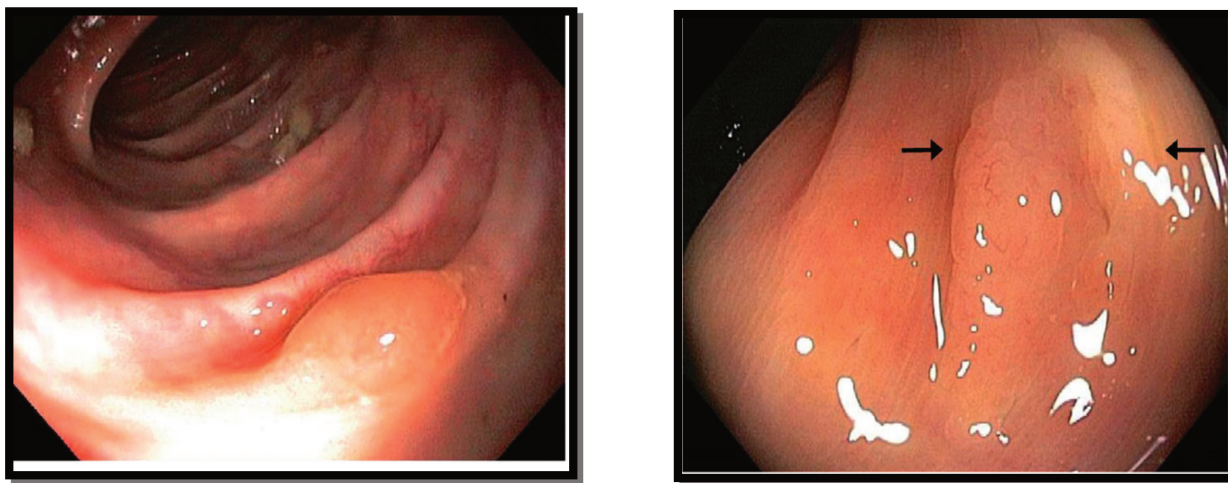


Figura 3 – Adenomas serrilhados.
Imagem cedida pelo Serviço de Endoscopia do Hospital Universitário São Francisco.

Para a maior parte dos CCR que se originam dessa via, o mecanismo que parece iniciar o processo é a mutação no *BRAF*, que resulta na inibição da apoptose nas células do epitélio colônico. A partir desse evento, essas lesões podem dar origem a pólipos sésseis hiperplásicos ou serrilhados. Essas lesões são altamente propensas a metilação da CpG em regiões promotoras para múltiplos genes, e, portanto, esse processo induziria o silenciamento epigenético e inativação dos genes que são, em princípio, selecionados aleatoriamente (81).

O *MLH1* é o mais comum dos genes envolvidos nos casos de CCR esporádicos associados à instabilidade, evento que, aparentemente, ocorre de modo tardio ao processo de adição das mutações, com rápida progressão tumoral (75).

Os avanços na compreensão de carcinogênese colorretal têm cada vez mais incrementos em comparação à formulação original da chamada sequência adenoma-carcinoma, trazendo aos pacientes uma individualização para cada CCR, pela possibilidade de confirmação de vários perfis fenotípicos responsáveis pela doença, não só do ponto de vista clínico ou histopatológico, mas também do ponto de vista prognóstico e terapêutico. Essa progressão complexa exige o desenvolvimento de gestão clínica da doença pela identificação de novos alvos de terapia mais específicos, bem como determina os marcadores, identificando possíveis comportamentos diferentes na mesma condição. Agora podemos trilhar

caminhos em busca do momento em que o tratamento individualizado poderá ser definido com base em perfis moleculares específicos, o que talvez não ocorra em futuro tão distante em larga escala e disponível a toda população.(75).

2.1.2 Sistemas de reparo de DNA

Os sistemas de reparo de DNA têm papel fundamental na estabilidade genômica, pois desempenham a função de manter o funcionamento da produção proteica e evitar o surgimento de mutações. Os mecanismos de reparo estão em permanente monitoramento cromossômico, corrigindo possíveis danos causados pelos diferentes agentes nocivos endógenos ou exógenos.

Agentes que danificam o DNA são comuns e incluem fatores ambientais, agentes físicos e químicos, como radiação ionizante, luz ultravioleta e numerosos compostos eletrofílicos, por exemplo, os produtos gerados de reações químicas intracelulares. Os danos ao DNA endógeno ocorrem mais comumente de três formas: hidrolítica, oxidativa e por alquilação. Tais danos são inevitáveis, pois surgem como produtos naturais da instabilidade intrínseca do ácido nucleico ou como produtos de reações intracelulares produzidas naturalmente e também dos metabólitos, ou seja, espécies reativas de oxigênio (RLO) ou de nitrogênio (RLN) e espécies de moléculas alcilantes (84).

Apesar de décadas de pesquisa, medir a frequência da ocorrência de lesões do DNA no genoma continua a ser difícil tarefa, como evidenciado pela vasta gama de níveis de danos reportados no DNA endógeno. Esse esforço é ainda mais desafiador devido à variabilidade de ambientes celulares e de tecidos, e do efeito do tempo nessas reações. Embora haja limitações para se ter uma avaliação precisa dessas lesões reacionais, estima-se que mais de 50 mil lesões endógenas sejam geradas no genoma humano por dia (85)(86).

Portanto, mecanismos de reparo eficientes são de extrema importância e agem de modo a monitorar e corrigir os possíveis erros gerados das diversas formas descritas.

Os principais mecanismos associados ao reparo do DNA são apresentados a seguir:

- a) reparo por excisão de bases (BER);
- b) reparo por excisão de nucleotídeos (NER);
- c) reparo de mau pareamento (MMR);
- d) reparo de quebra de fita dupla (DSBR).

2.1.2.1 Reparo por excisão de bases (BER)

O reparo por excisão de bases pode ser considerado como o mecanismo de linha de frente para lidar de diferentes maneiras com os danos ocasionados ao DNA endógeno, que podem ocasionar desde resultados mutagênicos menos complexos até morte celular.

Essa via de reparo envolve várias proteínas, tais como glicosilases, endonucleases, polimerases e ligases, que removem as modificações causadas ao DNA e restauram o genoma a seu estado original.

O DNA é constantemente exposto a fatores exógenos (ambientais) e endógenos, os chamados agentes danosos ao DNA, que são gerados pelo próprio desenvolvimento das atividades normais celulares.

Os danos externos são gerados por exposição a agentes químicos, radiação, e a fatores endógenos originários de fenômenos químicos intracelulares, fenômenos espontâneos naturais e decomposição (85). Isso pode ser influenciado pelo estilo de vida, por exposições a determinadas práticas e agentes, e ao estresse.

As consequências da persistência dos danos no DNA podem desencadear variações que vão desde mutagênese e carcinogênese até ativação de processos que levariam à morte celular e doenças degenerativas (87)(88). Portanto, o reparo de dano do DNA é crucial e importante processo biológico celular para a manutenção dos organismos vivos.

O sistema BER é o principal mecanismo envolvido no reparo das alterações endógenas dos danos do DNA. As enzimas do sistema BER reconhecem os danos presentes nas bases que formam o DNA, e catalisam e realizam a excisão e a substituição do nucleotídeo danificado.

O reparo é iniciado pela ação de enzimas DNA-glicosilases específicas que reconhecem a base danificada do DNA (89). A enzima cliva a ligação N-glicosídica que liga a base do DNA à estrutura açúcar-fosfato, criando o denominado sítio abásico (90).

As glicosilases podem atuar de forma mono ou bifuncional. As DNA-glicosilases monofuncionais – glicosilase de DNA uracil (UNG) e glicosilase N-metilpurina-DNA (MPG) – só possuem atividades glicosilase. As DNA-glicosilases bifuncionais, tais como DNA 8-oxoguanina glicosilase (*OGG1*), mut Y homólogo (*MUTYH*), M e NEIL1, exibem tanto a atividade glicosilase como atividade intrínseca da 3"AP ligase.

Seguindo-se ao aparecimento de um sítio do DNA sem base (sítio abásico), este é processado por uma endonuclease AP (APE1-nos humanos), que cliva a ligação 5' fosfodiéster para um sítio AP, gerando assim quebra de DNA fita simples que contém um resíduo hidroxila no fosfato 3" terminal e uma desoxirribose na extremidade 5'.

Esse arranjo permite que a DNA polimerase incorpore um novo nucleotídeo para que, posteriormente, ocorra a ligação da DNA-ligase ao complexo da porção terminal (90).

Dentre as lesões no DNA causadas por alterações nas bases, a 8-oxo-dG é uma das mais abundantes e bem caracterizadas em relação a seu papel prestado ao mecanismo de reparo (91). Estima-se que cerca de 180 guaninas são oxidadas para 8-oxo-dG por genoma do mamífero, por dia (85)(92).

A 8-oxo-dG é potente lesão pré-mutagênica, pois pode emparelhar com a adenina (bem como com a citosina) do DNA durante o processo de replicação e causar mutações do tipo transversão G: C para T: A (93)(94).

O DNA que contém 8-oxo-dG também pode dar origem a transcrição de RNA mutante (95), pois o resultado dessa produção pela 8-oxo-dG errônea dá origem a RNAm aberrantes gerados durante a transcrição, podendo levar à produção de proteínas mutantes – um indício de que a transcrição errada pode dar

origem a alterações fenotípicas com potencial para alterar o destino e a função celulares (96).

A desaminação é outra reação espontânea potencialmente prejudicial, pois produz uracila, guanosina e xantosina da citosina, adenina e guanina, respectivamente. Lesões em bases uracila e guanosina, que podem emparelhar com adenina e citosina, respectivamente, podem levar a C: G para T: A e A: T para G: C, mutações de transição. Estima-se por análise de LC-MS/MS que os níveis de resíduos endógenos de uracila e guanosina no DNA nuclear sejam semelhantes aos níveis de 8-oxo-dG nas células humanas (97)(98), sugerindo que as bases desaminadas representam ameaça mutagênica comparável à da 8-oxo-dG.

Além do potencial mutagênico, as modificações de bases têm a capacidade de impedir ou bloquear a progressão do DNA ou da RNA polimerase e, portanto, ativar respostas que desencadeiem morte celular. O sistema BER opera durante todas as fases do ciclo celular desempenhando suas funções tanto em células que estão em processo de divisão celular quanto em células que não estão (88).

A *ogg1* é a principal enzima responsável pela remoção da lesão da base mutagênica 8-oxo-dG. O modelo OGG1 primeiramente descrito por Klungland et al. em ratos (99) relatou acúmulo de 8-oxo-dG no genoma nuclear associado a uma correspondente taxa de mutação elevada e espontânea. No entanto, os autores descobriram que nenhum dos animais cursou com nenhum fenótipo visível, não apresentando aumento na formação de tumores.

O gene 8-oxiguanina DNA-glicosilase (*OGG1*) é responsável por reconhecer e cisar as bases 8-oxiguanina formadas pela exposição delas aos RLO, culminando em transversões GC/TA (100). Logo, indivíduos que não expressam ou expressam de maneira inadequada ou reduzida a enzima OGG1 não estão aptos a reparar essas transversões, aumentando assim as mutações e, consequentemente, propiciando o aparecimento de alguns tipos de câncer, como de pulmão, cabeça e pescoço (101). Isso também se mostrou presente em tecidos tumorais de pacientes portadores de CCR quando comparados às amostras de tecido normais (27).

Apesar da importância já documentada e estabelecida dessa via de reparo na manutenção da integridade do genoma, são descritas apenas algumas doenças genéticas hereditárias associadas a defeitos de funcionamento na via BER clássica.

Esses distúrbios na via de reparo podem envolver a predisposição para o CCR (102) e defeitos imunológicos (uracil DNA-glicosilase UNG e síndrome hiper-IgM V) (103), além de predispor também a anormalidades neurológicas. Estudos demonstraram que mesmo reduções sutis na capacidade de funcionamento do sistema BER apresentam-se associadas a maior risco às doenças descritas (104). Existem evidências emergentes da associação de defeitos na via BER a aumento da suscetibilidade a ocorrência de acidente vascular cerebral e complicações induzidas presumivelmente por estresse oxidativo agudo (105) (106) (107).

A relação entre CCR e sistema de reparo BER já foi descrita, e a presença de polimorfismos detectados no *OGG1* cursam com aumento de risco a ocorrência de CCR em indivíduos caucasianos e asiáticos (31). A perda da função do gene *MUTYH*, importante componente do sistema de reparo, pode resultar no aumento de mutações em oncogenes ou genes supressores de tumores, devido ao acúmulo de 8-oxo-dG, promovendo assim aumento da carcinogênese.

Além disso, alterações germinativas do *MUTYH* relacionaram-se ainda a maior suscetibilidade das populações europeias para ocorrência de múltiplos adenomas e também de polipose (108).

2.1.2.2 Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

Esse reparo ocorre quando a remoção da base defeituosa é efetuada através de incisão endonucleolítica nos dois lados da lesão, com liberação dos nucleotídeos, seguida pelo preenchimento da região por ação da DNA-polimerase. O processo de NER consiste em cinco etapas:

- 1) reconhecimento da lesão por um complexo multienzimático;
- 2) incisão da fita anormal em ambos os lados da lesão;
- 3) excisão do segmento que contém a lesão;

- 4) síntese de um novo segmento de DNA utilizando a fita não danificada como molde, por ação da DNA-polimerase;
- 5) ligação/restauração da molécula de DNA por ação da enzima DNA-ligase.

O sistema NER tem a capacidade de reparar grande diversidade de bases. Nesse processo, as ligações fosfodiéster 3' e 5' são hidrolisadas por enzimas chamadas exonucleases, nas quais um oligonucleotídeo curto contendo o nucleotídeo erroneamente posicionado realiza a excisão deste, e a lacuna resultante é preenchida pela ação da polimerase (109).

O NER é capaz de reparar grandes lesões que distorcem a hélice do DNA, causadas por raios ultravioleta e agentes mutagênicos químicos, os quais cruzam a base purínica adjacente e formam alterações intracadeias.

O modelo proposto para o sistema de NER em mamíferos envolve a ação de proteínas, relacionadas a doenças principalmente xerodermas pigmentares (XPB, XPD e XPA), envolvidas na detecção da lesão, de maneira que as duas primeiras percorram a hélice e a segunda reconheça a lesão. Após encontrar a lesão, o DNA do local do dano é desnaturado, e as endonucleases XPF e XPG fazem a dupla incisão na cadeia.

O oligonucleotídeo que contém a lesão é removido pelas DNA-polimerases γ e ϵ , e pelos seus cofatores, PCNA e RF-C, que também são responsáveis pelo passo seguinte: ressíntese do DNA utilizando a fita não danificada como molde e ligação da extremidade 5' da região recém-sintetizada à sequência original, pela DNA-ligase (110) (111).

Defeitos no NER são geneticamente ligados a grupos de doenças autossômicas recessivas humanas: xeroderma pigmentoso (XP), síndrome Cockayne (CS) e uma forma fotossensitiva de tricotiodistrofia. Cada uma dessas desordens é caracterizada por extrema sensibilidade à radiação ultravioleta (UV) e, em alguns casos, disfunções neurológicas também podem estar presentes (112) (113).

Estudos têm demonstrado que vários genes do sistema NER aumentam sua expressão após indução de dano ao DNA (114) e em pacientes com câncer colorretal (115).

2.1.2.3 Reparo de bases mal pareadas (MMR)

A via *mismatch repair system* (MMR), ou reparo de mau pareamento, é um dos principais mecanismos de reparação celular para correção de incompatibilidades entre ligações base-base e de reparação de inserções ou deleções formadas durante a replicação do DNA (116), antes que o dano possa se tornar permanente ou repetido em ciclos celulares futuros. O sistema DNA MMR é composto por dois complexos proteicos:

- 1) proteínas mutS, que realizam as substituições de bases em pequenos segmentos incompatíveis, incluindo os genes *MSH2* (mutS homolog 2), *MSH3* (mutS homolog 3) e *MSH6* (mutS homolog 6);
- 2) proteínas mutL, que realizam substituições de bases em segmentos tanto curtos quanto nos maiores, nas quais a incompatibilidade está presente, sendo representadas pelos genes *MLH1* (mutL homolog 1), *PMS1* (*post meiotic segregation increased 1*), *PMS2* (*post meiotic segregation increased 2*) e *MLH3* (mutL homolog 3) (116)(117).

Esse sistema percorre o DNA recém-sintetizado à procura de pares de bases mal pareadas e remove os segmentos de fita simples que contêm nucleotídeos incorretos. Isso permite que a DNA-polimerase insira a base correta na lacuna formada.

Existe um sinal específico que direciona o sistema de excisão do erro exclusivamente para a fita recém-sintetizada: o reconhecimento de sequências GATC próximas ao erro. GATC metiladas indicam a fita parental, enquanto a ausência de metilação nas sequências caracteriza a fita recém-sintetizada (118).

Deficiências em MMR podem aumentar as taxas de mutação celular em até mil vezes (119). Defeitos envolvidos no MMR em geral estão associados à instabilidade de microssatélites (MSI).

Os microssatélites são descritos como unidades de um a quatro nucleotídeos, repetidas em sequência dentro do genoma, e o deslizamento da DNA-polimerase durante a replicação seria responsável pelas alterações de aproximadamente 15% a 20% dos cânceres colorretais com deficiência hereditária ou esporádica de um componente do sistema MMR, sendo mais comumente *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* (65)(120)(121). A inativação esporádica do MMR é determinada pela inativação do *MLH1* em aproximadamente 95% dos casos, sendo mais frequentemente associada à presença de hipermetilação (122).

A deficiência herdada no MMR (síndrome de Lynch) é responsável por cerca de 2% a 4 % dos cânceres de cólon. Ocorre em função de mutação germinativa no *MLH1* ou no *MSH2* em aproximadamente 90% dos casos, e no *MSH6* em quase 10% deles (123).

Tumores que apresentam deficiência no MMR são caracteristicamente de localização mais proximal, tendo histologia mucinosa com infiltração linfocitária tumoral presente (124)(125).

Testes para avaliação da perda de função das proteínas do MMR por imuno-histoquímica e avaliação nos níveis de instabilidade de microssatélites em geral são concordantes, ou seja, a presença de altos níveis de instabilidade de microssatélite cursava com alta perda de função nas proteínas MMR, e baixos níveis de instabilidade demonstravam sistema MMR proficiente (126).

A determinação das alterações no MMR é importante também para a sugestão de tratamentos, pois pode ocorrer resposta diferente aos tratamentos adjuvantes, principalmente no estágio II, em pacientes portadores de MMR. Alguns estudos de meta-análises e conjuntos de dados combinados já publicados sugerem que pacientes com câncer de cólon no estágio II com MMR deficiente não se beneficiariam da monoterapia adjuvante com agente 5-FU ou terapia com capecitabina (69)(127)(128)(129).

2.1.2.4 Reparo de quebra de fita dupla (DSBR)

As quebras nas duas fitas de uma mesma molécula de DNA representam uma das mais deletérias lesões do DNA e ocorrem nas células em diversas

circunstâncias, constituindo uma das principais ameaças à integridade do genoma (130)(131).

Estima-se que ocorram aproximadamente 10^5 lesões espontâneas de DNA por dia, e dessas lesões aproximadamente 10 ocorrem devido à quebra da fita dupla do DNA (132)(133)(134).

Lesões dessa natureza, se não reparadas, podem causar, além de morte celular, uma série de alterações, entre elas, mutações que podem desencadear doenças neoplásicas, desregulação nos ciclos celulares, apoptose e grande variedade de alterações genéticas, tais como deleções, LOH, translocações e perdas cromossômicas, sendo várias dessas alterações relacionadas ao desenvolvimento do câncer (133)(134). Grande variedade de agentes exógenos, incluindo a radiação ionizante e um número considerável de quimioterápicos ou agentes infecciosos, pode ser responsável pela ocorrência dessas quebras, bem como também agentes endógenos, por exemplo, a exposição aos radicais livres de oxigênio e o estresse mecânico em ação nos cromossomos (135).

O reparo de quebra de fita dupla pode ser dividido em duas principais vias, apresentadas a seguir.

2.1.2.4.1 Recombinação homóloga (HR) e recombinação não homóloga (NHEJ)

As recombinações homóloga (HR) e não homóloga são apresentadas na Figura 4.

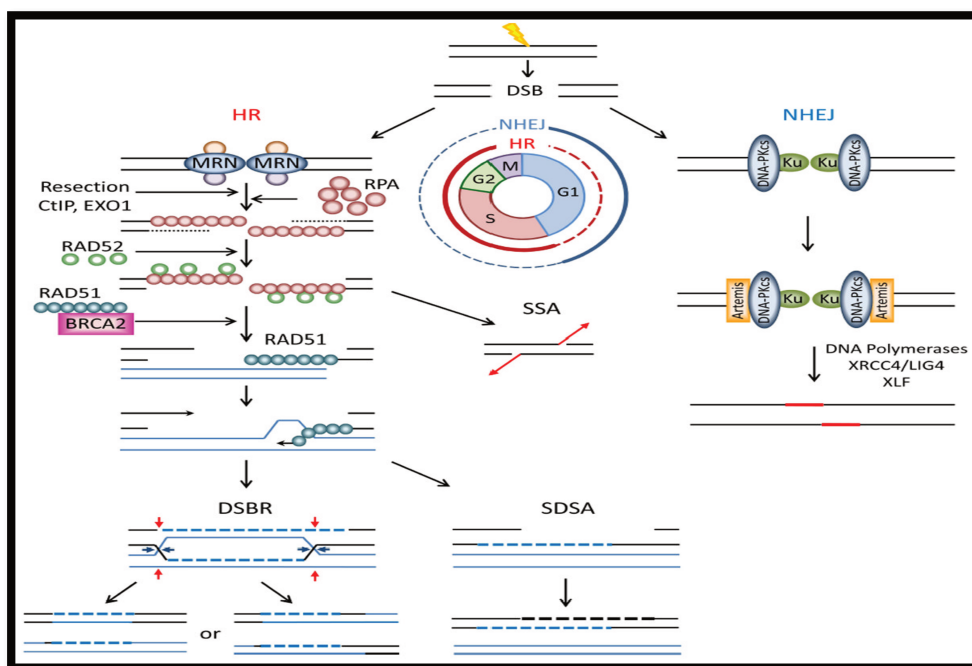


Figura 4 – Demonstração da atuação dos sistemas de reparo de quebra da fita dupla Recombinação homóloga (HR) e recombinação não homóloga (NHEJ), Lopez-Contreras, 2012 (Adaptado) (136).

Várias doenças têm sido relatadas com base em deficiências nos mecanismos HR e NHEJ, e os pacientes podem cursar exibindo defeitos neurológicos, imunológicos e de desenvolvimento, assim como sensibilidade à radiação e predisposição ao câncer (137)(138).

2.1.2.4.2 Reparo por união de extremidades homólogas (HR)

Esse mecanismo de reparo tem ação durante as fases S e G2 do ciclo celular e, através dele, o cromossomo homólogo àquele lesado faz uma cópia da sequência de nucleotídeos perdida com quebra da dupla fita e transfere a sequência para o sítio de quebra no cromossomo lesado. Esse cromossomo lesado, então, tem sua sequência original restaurada, e a ação emprega uma das cromátides irmãs intactas como modelo para intercâmbio de informações e manutenção da fidelidade e da reparação (Figura 5) (139).

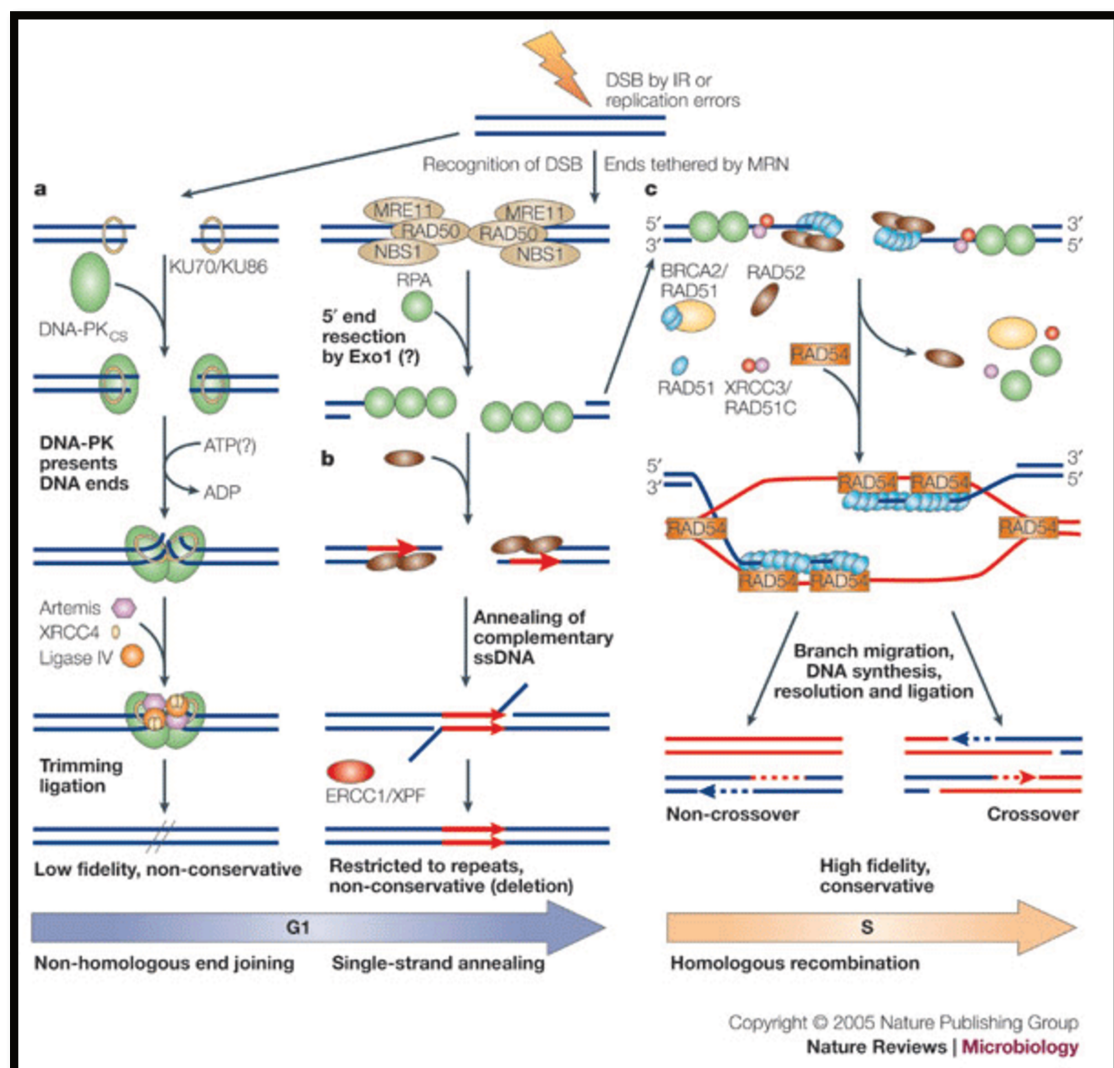


Figura 5 – Esquema que demonstra ação da Rad-51/BRCA2 durante a reparação de quebra da fita dupla. Vasileva, 2005 (Adaptado) (140).

2.1.2.5 Reparo por união de extremidades não homólogas (NHEJ)

O principal mecanismo de reparação das quebras de fitas duplas é chamado união de extremidades não homólogas. Nesse mecanismo, as extremidades de uma molécula de DNA, apesar de terem perdido alguns nucleotídeos por degradação espontânea, são justapostas para recombinarem. O mesmo complexo enzimático realiza o processo de ligação entre as duas extremidades. Dessa forma, a sequência original de DNA acaba sendo alterada.

As proteínas Ku 70 e Ku 80 são subunidades reguladoras das funções da ligação do DNA a DNA-PK, compostas por uma subunidade catalítica de 470 kDA (DNA-PKcs) (141).

As proteínas Ku iniciam o processo de reparo nas fitas duplas induzindo a fragmentação do DNA por meio da ativação da DNA-PK , depois da ligação das quebras da fita dupla.

A fosforilação da Ku pela DNA-PK controla toda a sua função, desde localização até a capacidade de ligação ao DNA (142). A Ku também se mostra em participação na proteção ao estresse oxidativo.

Um importante passo no reparo NHEJ é a ligação das proteínas Ku 70/80 às extremidades livres do DNA, seguindo o recrutamento da subunidade catalítica da DNA-PKcs, que, em uma cascata de fosforilação, regula as proteínas responsáveis pelo processo de ligação das duplas fitas quebradas (141).

Ambos, NHEJ e HR, são necessários para a reparação da dupla quebra da fita do DNA. A fase do ciclo celular e a extremidade de ressecção final são os principais fatores responsáveis pela escolha das vias de reparo.

O próprio ciclo celular é um dos principais fatores entre todos os mecanismos reguladores. HR está ativo em estágios pós-replicação da fase S devido à disponibilidade do modelo homólogo na proximidade ou geração de replicação associada à terminação da DSB, que são reparados exclusivamente por HR (Figura 6) (143)(144).

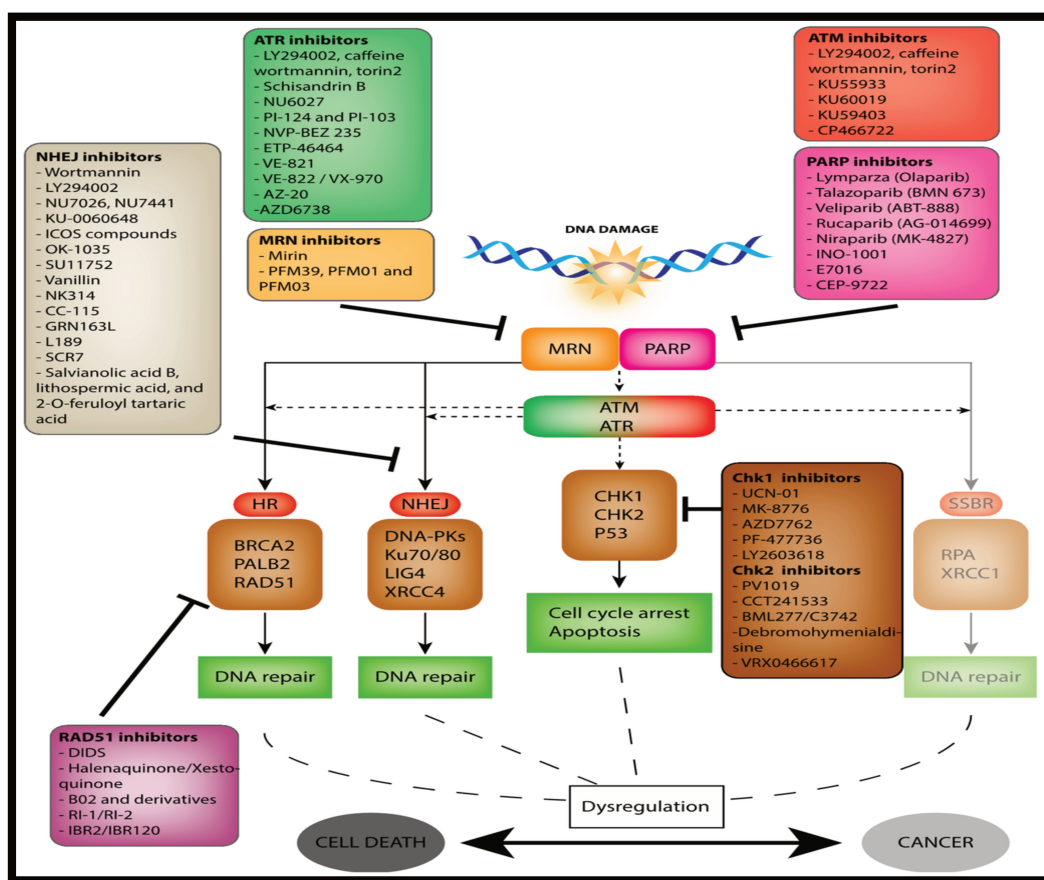


Figura 6 – Representação da atuação das proteínas de reparo e vias de atuação. Velic & Masson, 2015 (Adaptado) (143).

Estudos de sequenciamento do gene *APC* nos portadores de PAF e, principalmente, nos doentes com fenótipo de PAFA mostraram que apenas em 20% a 30% dos casos sequenciados encontravam-se mutações germinativas no gene (147)(148)(149).

Em alguns doentes com fenótipo indistinguível dos portadores de PAFA que foram submetidos ao sequenciamento completo de todo gene não era possível localizar nenhum indício de mutações germinativas no gene *APC*. Os baixos índices de detecção de mutações do gene *APC* nesse grupo de doentes levantou a possibilidade de que outras vias carcinogênicas pudessem ser responsabilizadas por esse fenótipo mais atenuado (148).

A partir dessas evidências, houve interesse crescente em estudar a participação de outros genes no desenvolvimento dessas formas atenuadas de PAF.

O sequenciamento do gene *APC* em alguns desses pacientes revelou a existência de sucessivos erros de pareamento de bases, principalmente transversoão do tipo guanina-citosina para timina-adenina (G-C→T: A), que, em geral, surgem devido a estresse oxidativo ao DNA nuclear provocado por radicais livres de oxigênio (RLO) (102).

A maior parte desses erros é corrigida por proteínas de reparo do sistema BER do DNA. Esses achados levantaram a possibilidade de que algum dos genes envolvidos nessa via de reparo do DNA pudesse estar alterado. O sequenciamento dos genes *OGG1*, *MUTYH* e *MTH1*, componentes de uma das vias do sistema BER, mostrou que muitos desses doentes apresentavam mutações herdadas em ambos os alelos do gene *MUTYH*, importante componente do sistema de reparo de bases. Nesses indivíduos, apesar de se identificarem mutações do gene *MUTYH*, não se encontrava nenhum tipo de mutação herdada no gene *APC* (150)(151).

Muitos doentes não apresentavam herança familiar nem transmissão vertical da mutação com características semelhantes às encontradas nos portadores de PAF, PAFA ou HNPCC, em que o modelo de herança é dominante, afetando gerações sucessivas. Quando foi estudado o heredograma familiar desses doentes, constatou-se que essa nova síndrome relacionada ao CCR hereditário apresentava transmissão da mutação às gerações futuras de forma autossômica recessiva (150)(152).

Essa apresentação de CCR hereditário associada a mutações do gene *MUTYH*, com transmissão autossômica recessiva, passou a ser conhecida como polipose associada a mutações do gene *MUTYH* (PAM) e descrita como doença que apresenta mecanismos carcinogênicos diferentes da PAF, da PAFA e do HNPCC.

A possibilidade de uma nova via carcinogênica para o desenvolvimento de CCR em portadores de formas atenuadas de PAF foi descrita em 2002 (153), em uma família britânica (que foi denominada Família N) na qual três de sete irmãos apresentavam CCR e pólipos adenomatosos no cólon com distribuição fenotípica semelhante à que ocorria nos portadores de PAFA. Esses doentes não apresentavam herança familiar semelhante à dos portadores de PAF ou PAFA.

Confirmando esses achados, ao realizarem o sequenciamento do gene *APC*, os autores não identificaram mutações habitualmente relacionadas à PAF. Entretanto, observaram que, no tecido tumoral, o gene *APC* apresentava sucessivos erros de pareamento de bases, em particular erros de troca do tipo guanina-citosina para timina-adenina (G-C → T : A). Constataram também que esses erros somáticos de pareamento de bases no gene *APC* ocorriam principalmente em códons que apresentassem a sequência de nucleotídeos GAA (guanina-adenina-adenina). Nesses locais, em vez dos nucleotídeos GAA, ocorria transversão das bases para TAA (timina-adenina-adenina). Essa sequência de bases encontra-se, em geral, associada à formação de um códon que determina a interrupção da tradução da proteína a ser codificada por determinado gene (*stop codon*) (154).

Esse padrão de erro adquirido de pareamento de bases ocorre quando existem mutações em genes responsáveis pelo sistema BER de reparo do DNA. Tais achados sugeriram a existência de mutação herdada não no gene *APC*, mas em algum gene responsável pelo sistema de reparo relacionado à excisão da base guanina oxidada, a 8-oxo-7,8-di-hidroxil-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG). A 8-oxo-dG é formada pela exposição da guanina aos RLO, constantemente produzidos durante a respiração celular. Como se trata de uma base oxidada com potencial capacidade de induzir erros de pareamento, deve ser rapidamente removida pelos sistemas de reparo do DNA.

Diante dessas evidências, autores suspeitaram de que talvez os portadores pudessem apresentar mutações herdadas nos genes *OGG1*, *MUTYH* ou *MTH*, componentes de uma das vias de reparo do DNA do sistema BER (10). Após sequenciamento do gene *MUTYH* (homólogo ao gene *mutY* da *Escherichia coli*, que apresenta a mesma função), verificaram que os três irmãos apresentavam mutação germinativa em ambos os alelos do gene *MUTYH*, que tem como função transcrever a proteína DNA-glicosilase. A DNA-glicosilase é considerada a principal proteína responsável pela excisão da base adenina erroneamente pareada com 8-oxo-dG, formada pela exposição do DNA aos RLO. Os autores constataram que os três irmãos da Família N apresentavam duas mutações no gene *MUTYH*, nos nucleotídeos 494 e 1.145, que traduziam uma proteína com dois aminoácidos erroneamente incorporados a sua molécula (p.Tyr165Cys e p.Gly382Asp). Essa

mutação ficou conhecida como Y165C e G382D, e, ainda hoje, representa a principal mutação encontrada nos doentes portadores da PAM, sendo responsável por mais de 80% de todas as mutações descritas no gene *MUTYH* (150).

Estudos subsequentes confirmaram a maior prevalência desse tipo de mutação, acrescentando novas mutações aos diferentes códons do gene *MUTYH* (7)(155)(156)(157).

Os resultados encontrados confirmaram as suspeitas (150) de que alguns doentes, previamente diagnosticados como portadores de PAFA e até mesmo com formas mais brandas de PAF, e que não apresentavam mutações herdadas no gene *APC*, na realidade possuíam mutações no gene *MUTYH* (148)(149)(158).

Demonstrou-se que a ocorrência de mutações em ambos os alelos do gene *MUTYH* podia ser identificada em aproximadamente 20% a 30% dos doentes que apresentavam entre 15 e 100 adenomas colorretais (150)(153).

Todavia, restava ainda explicar os motivos pelos quais a transmissão dessa nova forma de síndrome associada ao CCR hereditário apresentava padrão de transmissão recessiva. Apesar de vários estudos confirmarem que os doentes com mutações em ambos os alelos do gene *MUTYH* possuíam risco aumentado de câncer colorretal, existiam dúvidas sobre se os portadores de mutações herdadas em apenas um dos alelos do gene também apresentavam maior possibilidade de desenvolverem pólipos e, em consequência, câncer colorretal (108).

Como a transmissão da doença não se dava de modo semelhante ao que acontece nos doentes com PAF e PAFA, existia a preocupação de que grande número de parentes de portadores da mutação em um único alelo do gene, e ainda assintomáticos, pudessem desenvolver pólipos ou câncer colorretal. Essa possibilidade teria implicações diretas no rastreamento e seguimento desses familiares.

A apresentação de resultados de um estudo multicêntrico (159)(160) e de um importante estudo caso-controle realizado com doentes pertencentes ao registro de polipose no Canadá confirmaram que o risco de desenvolvimento de câncer colorretal nos portadores de mutação em apenas um alelo não era muito elevado,

porém estaria presente. Um dos estudos verificou que mutações em ambos os alelos, e principalmente as do tipo Y165C e G382D, encontram-se fortemente relacionadas a maior risco de câncer colorretal.

Quando esse padrão de mutação comprometia apenas um alelo do gene, também se relacionava a maior risco de câncer colorretal (161)(162).

Os resultados mostraram ainda que doentes com CCR associado a mutações do gene *MUTYH*, com mutação em um ou nos dois alelos, tinham maior número de descendentes de primeiro e segundo graus com CCR, e que, nos portadores de câncer colorretal com mutações do *MUTYH*, existia maior número de indivíduos heterozigotos para as mutações Y165C e G382D, quando comparados à população normal, confirmando que a presença desses dois tipos de mutação poderiam estar associados a variantes fenotípicas do câncer colorretal (150).

Com o objetivo de calcular o risco de desenvolvimento de câncer colorretal nos portadores de mutação em um alelo único, somaram seus resultados aos de outros estudos (161).

No total, estudaram 38 doentes heterozigotos para a mutação Y165C e 67 para a mutação G382D. Constataram risco de 2,1 (I.C. 95% = 1,0 a 4,4) para os que apresentavam mutação Y165C, e de 1,4 (I.C. 95% = 0,8 a 2,4) para os portadores da mutação G382D; finalmente, concluindo, os indivíduos portadores de mutações em apenas um dos alelos do gene apresentam risco aumentado para câncer colorretal, e maior possibilidade de terem parentes de primeiro e segundo graus com câncer colorretal. Esses achados assumem grande importância em propostas para o aconselhamento genético desses familiares.

2.1.3 Gene *MUTYH*

O gene *MUTYH* localiza-se no cromossomo 1, na região 1p32.1–p34-3. É formado por 15 íntrons e 16 éxons constituídos de 1.608 (GenBank: U63329.1) ou 1.641 (GenBank: NM_012222.1) pares de base. Alguns autores julgam que a abreviatura ideal para a nomenclatura do gene seria MYH para descrever os indivíduos portadores de PAM poderia causar confusões, uma vez que essa abreviatura habitualmente se refere ao gene que transcreve a cadeia pesada da

proteína miosina (163). Todavia, pelo uso consagrado na literatura, a abreviatura *MUTYH* passou a ser adotada de modo universal.

O gene *MUTYH* codifica uma proteína denominada DNA-glicosilase, específica para correção de bases (Figura 7) erroneamente pareadas em oposição à 8-oxo-dG. O gene faz parte, junto com os genes *OGG1* e *MTH1*, de uma das vias que formam o sistema BER de reparo do DNA por excisão de bases. Esse complexo sistema de reparo apresenta como função primordial corrigir mutações provocadas por estresse oxidativo ao DNA durante o metabolismo anaeróbico da célula (22).

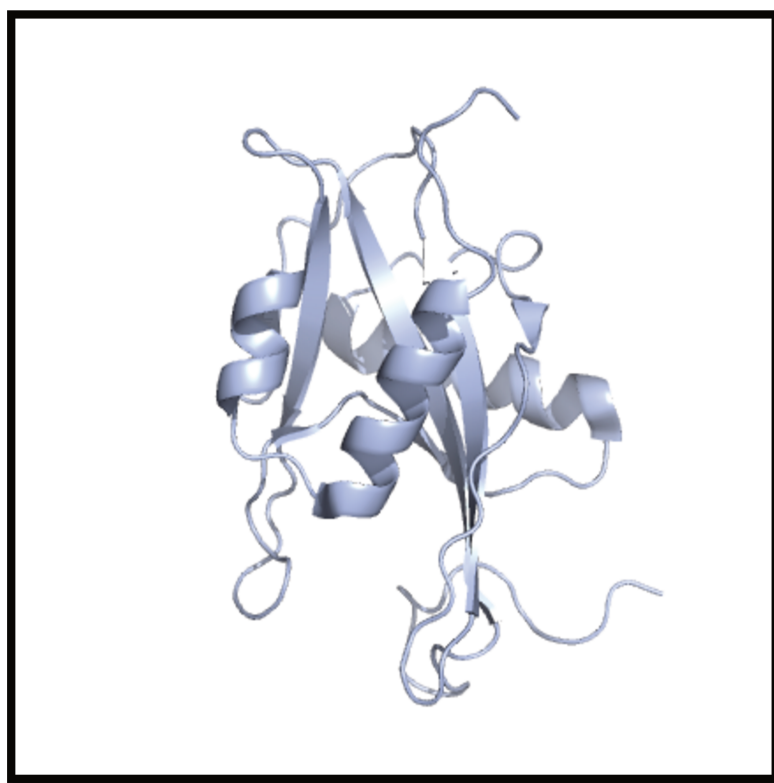


Figura 7 – Estrutura molecular da proteína DNA-glicosilase específica para remoção da adenina traduzida a partir do gene *MUTYH*. Venesio, 2004 (Adaptado) (167).

Cada uma das três enzimas traduzidas a partir dos três genes que compõem essa via do sistema BER apresenta funções específicas na proteção contra os efeitos mutagênicos da 8-oxo-dG, formada pelo dano oxidativo. A proteína traduzida pelo gene *OGG1* remove o complexo formado entre pareamento 8-oxo-dG:C na dupla fita do DNA (23). A proteína traduzida pelo *MUTYH*, a adenina DNA-glicosilase, retira a base adenina erroneamente pareada com 8-oxo-dG e não reparada durante a replicação (24). A enzima traduzida pelo gene *MTH1* (uma 8-

oxo-dGTPase) impede que ocorra a inserção de novas moléculas de 8-oxo-dG no DNA recém-corrigido (25).

2.1.4 Carcinogênese nos portadores de mutação no *MUTYH*

Durante o processo de replicação do DNA, a base guanina normalmente pareia-se com a molécula de citosina (G:C). Contudo, caso ocorra a formação da 8-oxo-dG por mecanismo conhecido como transversão de bases, vai se parear de forma errônea com uma molécula de adenina (G:C $\rightarrow$ T:A). Na eventualidade de não haver correção por meio das proteínas de reparo do DNA do sistema BER no local onde ocorreu a inserção da 8-oxo-dG, poderá haver mutação do tipo C:G $\rightarrow$ T:A, com a consequente tradução de uma proteína defeituosa. Caso a proteína mutante se encontre relacionada aos mecanismos de controle do ciclo celular, tal como o gene *APC*, que é um importante gene supressor tumoral, a célula poderá ganhar autonomia proliferativa, formando um clone de células mutantes com capacidade de divisão celular descontrolada. O consequente desequilíbrio do ciclo celular, com favorecimento da proliferação em detrimento à apoptose, poderia se constituir na explicação molecular para o início de formação dos pólipos adenomatosos nos portadores de PAM.

As bases nitrogenadas do DNA estão sempre expostas à ação nociva dos RLO. Assim sendo, encontram-se permanentemente vulneráveis a erros de pareamento durante sua replicação. Para que esses erros de pareamento não ocasionem aparecimento de mutações, as bases oxidadas devem ser prontamente removidas pelos diferentes sistemas de reparo do organismo. As bases oxidadas pela ação dos RLO são corrigidas pelo mecanismo de reparo por excisão de bases BER, conhecido por atuar, em particular, nos erros de pareamento decorrentes da ação dos RLO. O mecanismo molecular do BER inicia-se pelo reconhecimento e pela excisão de bases danificadas pelas DNA-glicosilases, com ou sem atividade 3'-AP-liase associada. A excisão da base resulta em um sítio abásico, apurínico ou apirimidínico, reconhecido por outro grupo de enzimas, as AP-endonucleases, que fazem a incisão na extremidade 3' ou 5' do sítio AP, gerando uma lacuna. Essa lacuna é então preenchida pela base correta e ligada por polimerização à sequência correta de nucleotídeos do DNA. No sistema BER, as enzimas responsáveis por

esse processo são traduzidas pelas células a partir da expressão dos genes *OGG1*, *MUTYH* e *MTH1*.

O sistema composto pelos genes *OGG1*, *MUTYH* e *MTH1* tem papel importantíssimo no reparo das transversões decorrentes da formação de 8-oxo-dG por estresse oxidativo. Quando o sistema BER encontra-se ineficiente, como ocorre na PAM, em que existe uma mutação herdada no *MUTYH*, que é componente do sistema, a remoção da 8-oxo-dG erroneamente incorporada não ocorre de forma eficaz, tornando nulo o sistema de reparo. Como consequência, poderá haver o aparecimento de mutações em diferentes genes com tradução de proteínas defeituosas. Na PAM, uma forte evidência que corrobora essa via carcinogênica é a grande quantidade de erros de pareamento nos genes *APC* e *KRAS* associados. Estudos identificaram vários códons dos genes que apresentavam a sequência de nucleotídeos TAA (timina-adenina-adenina), no lugar da sequência GAA (guanina-adenina-adenina). Essa mutação no gene *APC*, ocasionada por uma mutação do sistema BER, forma um *stop codon*, traduzindo, em decorrência, uma proteína encurtada ou interrompida.

Geralmente, as mutações no gene *MUTYH* são do tipo *erros de pareamento*, em que há substituição de um nucleotídeo, o que faz com que o códon resultante codifique um aminoácido a menos (164)(165).

As consequências desse tipo de mutação pontual podem variar segundo a intensidade com que afetam a funcionalidade da proteína traduzida. As duas mutações herdadas mais comuns que acometem o gene *MUTYH* (Y165C e G382D) ocorrem por esse tipo de mutação (166). Entretanto, alguns autores encontraram mutações do tipo *frameshift* em portadores de PAM (167). Nesse tipo de mutação, existe a alteração completa da leitura dos três nucleotídeos que formam um códon, resultando também na formação de um *stop codon* a jusante da mutação, com consequente interrupção da tradução proteica.

Na PAM, esse tipo de mutação no gene *MUTYH* (1103delC) que produz a parada da tradução da proteína já foi descrito anteriormente.

Estudo que analisou os principais tipos de mutações encontradas nos portadores de PAM também encontrou mutações do tipo inserção/deleção *in frame* e

splice site (troca do nucleotídeo G por T na posição de consenso do sítio canônico de *splicing*) (163). A Figura 8 mostra os locais no gene *MUTYH* onde foram encontradas as principais mutações descritas na literatura, enquanto a Figura 9, a frequência das principais mutações em ambos os alelos do gene *MUTYH* em doentes portadores de PAM.

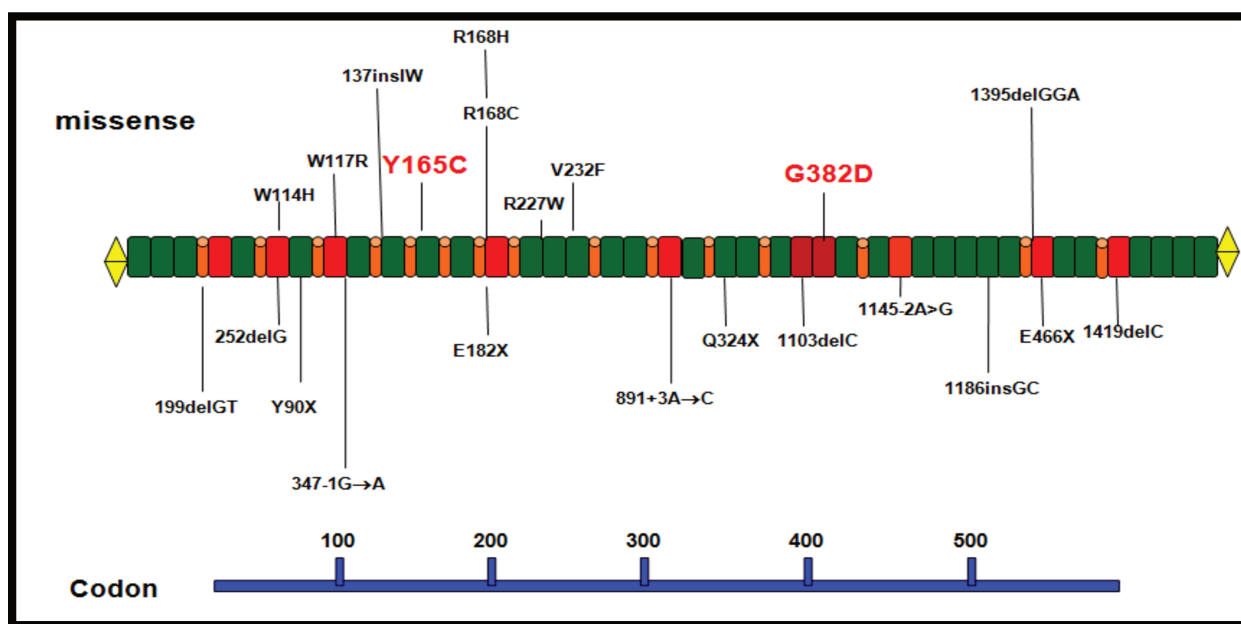


Figura 8 – Mutações identificadas em doentes portadores de PAM que apresentavam mutações em ambos os alelos, com sua localização aproximada no gene *MUTYH*. Sampson, 2003 (Adaptado) (152).

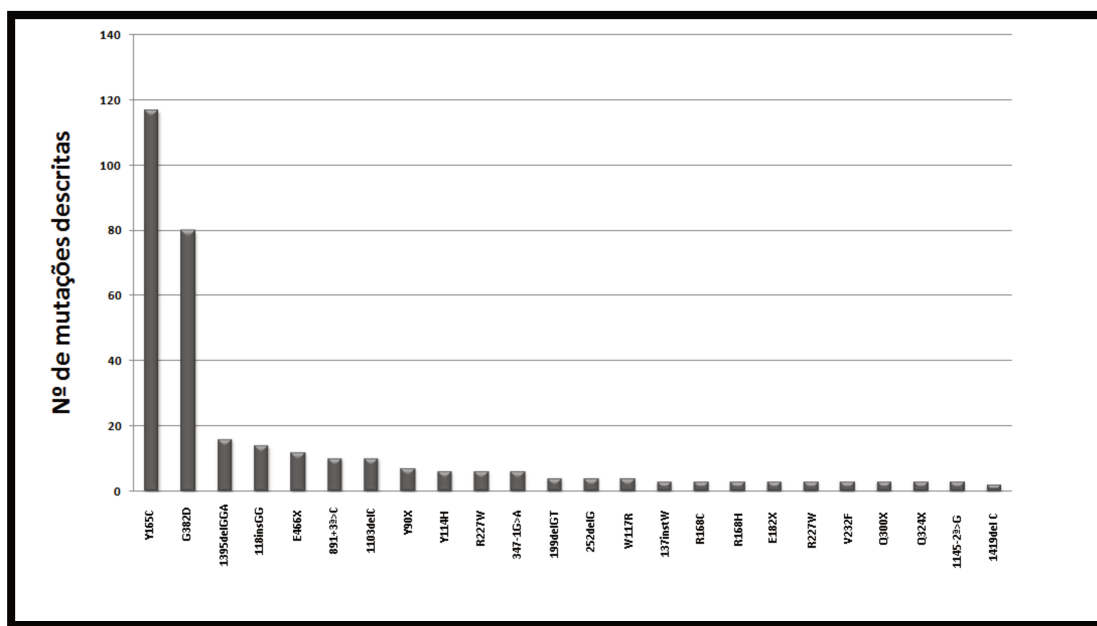


Figura 9 – Frequência relativa de mutações no gene *MUTYH* em doentes com PAM descritos na literatura Sampson et al., 2003 (Adaptado et al.) (152).

O conhecimento desse padrão de distribuição das mutações no gene *MUTYH* é de extrema importância com relação ao rastreamento dos casos de PAM. Embora possam ocorrer variações no local da mutação, a maioria dos doentes (cerca de 70%) com CCR associados à PAM apresenta mutação do tipo Y165C e G382D (168). Em 93% dos doentes que apresentam mutações em ambos os alelos do gene *MUTYH*, pelo menos um desses códons nos quais as mutações incidem com maior frequência (*hotspots*) encontra-se mutado. Como esses códons se localizam nos éxons 7 e 13 do gene *MUTYH*, respectivamente, o rastreamento das mutações associadas ao gene *MUTYH* deve começar por esses éxons (167).

Outro aspecto que também deve ser considerado na pesquisa do sítio da mutação no gene *MUTYH* é a etnia do doente. Estudos demonstraram que a etnia e localização geográfica parecem estar relacionados a maior ou menor prevalência de certos tipos de mutações (169)(170).

Os defeitos no gene *MUTYH* com mutações *missense* Y165C e G382D são mais frequentes em pacientes com ascendência europeia, representando 53% e 32%, respectivamente, enquanto mutações *nonsense* tipo E466X e Y90X prevalecem entre indianos e paquistaneses (171)(172). Populações de italianos

carregam a mutação por deleção de três pares de bases no éxon 14 (1395delGGA) (173).

Com melhor conhecimento da PAM, uma série de novas mutações vêm sendo descritas. Estudo realizado em doentes italianos encontrou sete novos tipos de mutação relacionadas à PAM (170).

2.2 Aspectos clínicos e anatomopatológicos

Ainda existem informações limitadas com relação aos principais aspectos da PAM relacionados a manifestações clínicas, alterações histopatológicas e moleculares, relação entre genótipo e fenótipo da doença, risco de desenvolvimento de câncer colorretal em familiares, melhor forma de acompanhamento desses doentes e, principalmente, quanto às diretrizes no tocante ao rastreamento da mutação e ao aconselhamento genético dos portadores da mutação (174).

A literatura demonstra, na maioria dos estudos, que a faixa etária média dos pacientes que recebem o diagnóstico de PAM e que apresentam mais de 100 pólipos adenomatosos no cólon é de 45 anos. Trata-se de indivíduos pertencentes a uma faixa etária mais velha, quando comparados aos doentes que apresentam as formas clássicas de PAF (175)(176).

Em 2003, Sampson (159), ao analisar 25 doentes, e Sieber (108), 14 doentes portadores de mutações em ambos os alelos do gene *MUTYH*, verificaram que a média de idade no diagnóstico da PAM era de 46 e 51,3 anos, respectivamente. Outro estudo com uma casuística considerável, que analisou as mutações do gene *MUTYH* em 4.084 indivíduos, sendo 2.239 portadores de CCR e 1.845 indivíduos sadios, mostrou que 1 em cada 50 doentes com menos de 40 anos diagnosticados com CCR, e 1 em cada 150 doentes com menos de 55 anos, eram portadores de mutações em ambos os alelos do gene *MUTYH* (177).

Estudo realizado que avaliou 36 portadores de CCR que apresentavam mutação no gene *MUTYH* (sendo 14 com mutações em ambos os alelos e 22 em apenas um alelo) mostrou que a média de idade para o diagnóstico de PAM nos doentes que apresentavam de 10 a 100 pólipos era de 51 e 59 anos,

respectivamente – duas décadas mais tarde do que acontece com os doentes com formas clássicas da PAF. Esses resultados sugerem que o doente homozigoto para mutação desenvolve CCR em uma faixa etária mais precoce, quando comparado com a população normal, na qual a idade média para o desenvolvimento de CCR é de 62 anos. Embora o surgimento dos pólipos colônicos aconteça mais tardiamente nos portadores de PAM, quando comparados aos doentes com as formas clássicas de PAF, ele pode se dar em uma faixa etária que se superpõe à dos doentes portadores de mutações no gene *APC* que determinam o fenótipo típico de PAFA.

A PAM representa 10% a 47% dos casos de PAFA não associada a mutações do gene *APC*, e porção ainda menor dos casos de PAF com fenótipo clássico, mas também negativos para mutação do gene *APC* (178).

Geralmente, os portadores de PAM apresentam entre 15 e 100 pólipos adenomatosos no cólon (Figura 10-A e 10-B). Ocasionalmente, encontram-se doentes que apresentam mais de 100 pólipos distribuídos no cólon, entretanto, a possibilidade de PAM em doentes com mais de 1.000 adenomas colorretais sincrônicos é mais rara.

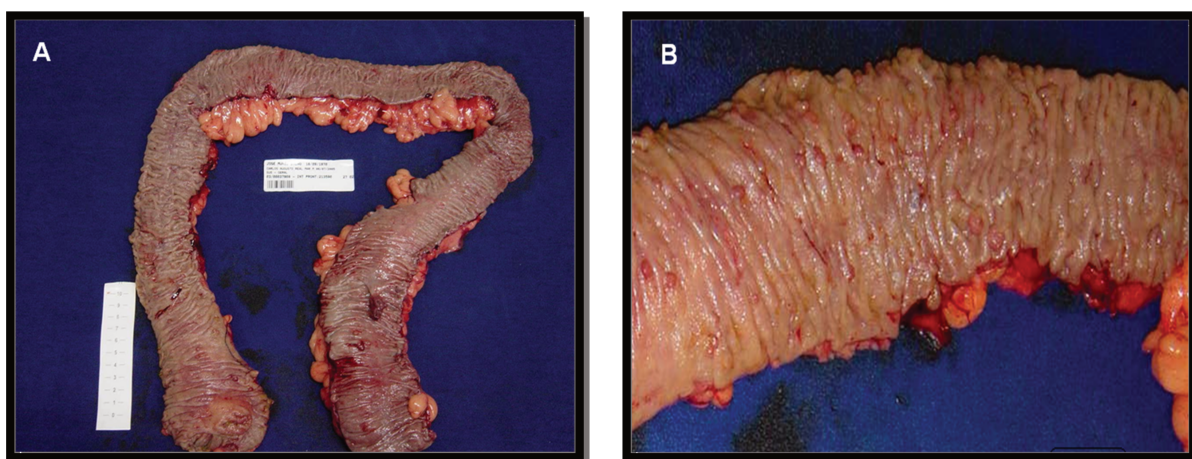


Figura 10-A – Produto de colectomia total em doente com 39 anos portador de PAM, mostrando a presença de pólipos adenomatosos comprometendo toda a extensão do cólon.

Figura 10-B – Fotografia do mesmo paciente que demonstra pólipos adenomatosos sincrônicos.

Acervo pessoal Dr. Carlos A. R. Martinez.

Atualmente, aceita-se que a presença de pólipos duodenais, à semelhança do que ocorre na PAF e na PAFA, também faça parte do fenótipo da PAM (179). Outras manifestações extracólicas comuns nos portadores de PAF (hipertrofia congênita do epitélio pigmentado da retina, osteomas de mandíbula, tumores desmoides, cistos epidermóides) são achados raros nos portadores de PAM. Em estudo que avaliou 329 doentes portadores de PAF, em que não foi possível encontrar a mutação no gene *APC* após sequenciamento completo, 55 doentes eram portadores de mutação do gene *MUTYH*, e o número de pólipos colônicos variava entre 20 e poucas centenas, porém apenas 1 doente apresentava mais de 1.000 pólipos.

Em 40% dos doentes, os pólipos localizavam-se no cólon proximal, enquanto em apenas 3% os pólipos tinham localização distal. Os demais estudos não encontraram distribuição preferencial em um segmento cólico específico. Portadores de mutação do tipo c1105delC caracteristicamente apresentam mais possibilidade de cursarem com formação de número mais elevado de pólipos no cólon, sugerindo que possa existir relação entre genótipo e fenótipo da doença. Estudo realizado em 2005 constatou que 20% dos doentes com mutação bialélica apresentavam entre 15 e 100 adenomas no cólon, enquanto 15% apresentavam mais de 100. Os autores não identificaram doentes com mutações em ambos os alelos do gene que possuíssem menos de 15 adenomas no cólon. Todavia, cabe destacar que 50% dos doentes estudados já apresentavam CCR quando do diagnóstico da doença, mostrando a importância do diagnóstico precoce da PAM.

Da mesma forma, são raros os artigos que compararam os achados histológicos em doentes com PAM com mutação em um ou em ambos os alelos do gene *MUTYH*. Quando se dividem os portadores da mutação entre os que apresentam a mutação em um ou em ambos os alelos do gene *MUTYH*, verifica-se que os que apresentam mutação em apenas um alelo têm mais tendência a desenvolver adenomas serrateis, o que não ocorre nos doentes que possuem a mutação em ambos os alelos (180).

Quando se consideram as neoplasias malignas nesses estudos, o adenocarcinoma de padrão tubular foi o tipo histológico mais encontrado (50% dos casos), seguido pelos padrões papilar (22,8%) e cribiforme (17,5%). A análise dos

padrões histológicos categorizando os tumores segundo o padrão típico dos adenocarcinomas (tubular, cribriforme ou papilar) ou padrão de instabilidade de microssatélites (MSI), em carcinomas mucinosos, em células de anel de sinete ou indiferenciados, mostrou que os tumores originários de doentes com mutação em ambos os alelos do gene apresentam o padrão típico dos adenocarcinomas, comparado com 80% dos heterozigotos e 63% dos portadores de CCR esporádico. O padrão histológico característico de tumores com MSI foi encontrado em 8% dos doentes com mutação em um alelo e em 37% dos portadores de CCR esporádico. Esses achados confirmam que a via carcinogênica dos portadores de PAM, apesar de envolver o sistema de reparo do DNA, é diferente em doentes com HNPCC quando se considera o tipo histológico do tumor.

Quanto ao tamanho e padrão de distribuição dos pólipos e tumores no cólon, os achados são controversos. Enquanto alguns autores não encontraram diferenças em relação ao tamanho e à localização dos pólipos, outros mostraram que, à semelhança do que ocorre com a PAFA, a distribuição dos adenomas é mais frequente no cólon proximal.

A presença de adenomas sincrônicos em doentes que apresentam a mutação em ambos os alelos do gene *MUTYH* é de 64%. A comparação de doentes com mutação do gene *MUTYH* em um ou ambos os alelos demonstra que existe maior tendência à formação de pólipos sincrônicos nos doentes com mutação nos dois alelos quando considerados os heterozigotos e a população geral. Quanto ao tipo histológico dos pólipos encontrados nos portadores de mutação em ambos os alelos, o padrão é variado, descrevendo-se adenomas tubulares, adenomas tubulovilosos, adenomas serráteis, pólipos hiperplásicos e pólipos com padrão misto. Cabe destacar que 25% dos doentes com a mutação em ambos os alelos podem não apresentar pólipos.

Com relação ao grau histológico do CCR, a maior parte dos doentes com mutação nos dois alelos do gene apresenta carcinomas bem diferenciados, enquanto 16% dos doentes com mutação em apenas um alelo têm neoplasias pouco diferenciadas. Não foram identificadas diferenças quanto ao grau de invasão do tumor na parede cólica, entretanto, os portadores de mutação dos dois alelos do gene apresentam menor grau de invasão linfonodal quando comparados aos

doentes com CCR esporádico. A pesquisa de MSI mostrou menor positividade nos doentes com mutações dos dois alelos do gene quando comparados aos heterozigotos ou com portadores de CCR esporádico, sendo 18%, 29% e 25%, respectivamente.

À semelhança da PAF e da PAFA, já se descreveu a possibilidade de manifestações extraintestinais em doentes com PAM. Dentre elas, merecem destaque os pólipos duodenais, adenocarcinoma de duodeno, adenoma de glândulas sebáceas, CHRPE, pilomatricomas e o câncer gástrico de aparecimento precoce. Existem relatos que mostram um fenótipo mais grave da doença, inclusive com formação de pólipos duodenais, quando uma mutação do tipo *frameshift* ocorria na região 1103delC. É possível, assim como ocorre na PAF, que exista relação entre o local da mutação no gene *MUTYH* e a expressão fenotípica das manifestações extraintestinais da doença, mas, seguramente, de maneira menos evidente do que acontece com os portadores de PAF ou PAFA.

2.2.1 Gene *OGG1*

O gene *OGG1* codifica a proteína *ogg1* DNA-glicosilase AP-liase, que excisa a 8-OH-dG (8-oxoguanina glicosilase), um subproduto de base mutagênica que ocorre como resultado da exposição aos RLO a partir do DNA; portanto, essa é uma das mais importantes enzimas de atuação no reparo ao dano no DNA (Figura 11) (181).

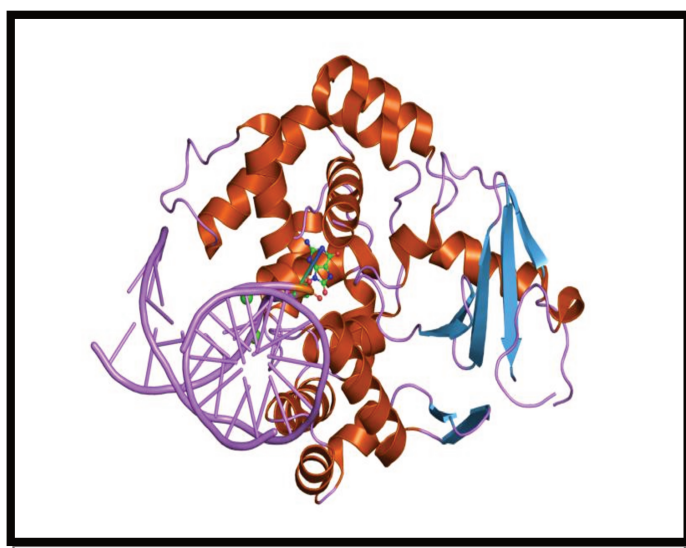


Figura 11 – Representação da estrutura molecular da 8-oxoguanina glicosilase (Jawahar Swaminathan e colaboradores. European Bioinformatics Institute. Domínio público).

Em células humanas, o *OGG1* está localizado no cromossomo 3p25.2 e codifica duas formas proteicas que resultam de um *splicing* alternativo de um RNA-mensageiro único: a alfa h ogg1, proteína de localização nuclear, e a beta h ogg1, de localização mitocondrial. Publicações têm sido relatadas para o estudo do papel biológico do *OGG1* em células de mamíferos, por se tratar de importante gene relacionado aos mecanismos de reparos de danos e que, possivelmente, teria papel na prevenção do câncer.

Estudos de sequenciamento de DNA que avaliam alterações na função do *OGG1* em células tumorais de humanos apontam para a presença da 8-OH-dG como fonte endógena de mutações em eucarióticos e seu provável envolvimento no processo da carcinogênese (182).

Polimorfismos já identificados e pesquisados em relação ao *OGG1*, por exemplo, o 1245C>G, resultante da substituição da serina por cisteína no códon 326 (181), associados a estudos moleculares e epidemiológicos de caso-controle, também sugerem que o alelo h*OGG1* Cys326 está associado a maior risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer (183)(184).

Kim et al. investigaram o efeito do *OGG1* sobre o risco de CCR na população coreana, tendo descoberto que o polimorfismo *OGG1* Ser326Cys não alterou o total OR (*odds ratio*) para CCR de forma geral. No entanto, análise de subgrupos revelou tendência para o aumento da incidência em fumantes e relacionada ao consumo de carne (185).

Dois outros polimorfismos descritos, *OGG1* SNPs, 11657A/G e Arg154His 56053615 (RS), localizados na região a jusante, também têm sido associados ao risco de câncer (186).

Outra rara variante descrita por Cheadle e colaboradores no *OGG1* Gly308Glu (c.923G>A, rs113561019, G308E), segundo os autores, também estaria relacionada ao aumento do risco de CCR, porém em amplo estudo europeu publicado em 2014, realizado em resposta a esses achados (28), não se encontrou correlação com esse tipo de alteração no *OGG1* e aumento de risco para CCR. Sendo assim, mostra-se importante a realização de maior número de pesquisas,

principalmente em populações com etnias distintas, para obtenção de maior quantidade de dados (187)(188).

2.2.2 Ação dos radicais livres de oxigênio (RLO)

A expressão radical livre refere-se a átomo ou molécula que contenha número ímpar de elétrons na última camada eletrônica (189).

Adotou-se a denominação RLO porque a maioria dos radicais livres é gerada a partir do metabolismo celular da molécula de oxigênio. Os RLO são constantemente formados durante a respiração celular. Contudo, quando sua produção é excessiva, tornam-se nocivos às células, danificando proteínas, membranas, organelas e principalmente bases nitrogenadas do DNA (190)(191). As células possuem defesas naturais antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, que atuam contra essa toxicidade, mantendo o equilíbrio entre a produção e a neutralização dos RLO (192). Todavia, em certas condições, quer pela diminuição do sistema antioxidante do organismo, quer pelo aumento exagerado na produção dos RLO, ocorre desequilíbrio, determinando o aparecimento do fenômeno conhecido como estresse oxidativo (193). Já se demonstrou que a capacidade dos sistemas antioxidantes da mucosa do cólon é relativamente deficiente quando comparada à de outros órgãos e tecidos, tornando-a particularmente vulnerável à ação dos RLO, que ocorre de forma mais frequente e intensa quando também comparada à de outros órgãos e tecidos.

Os RLO vêm sendo implicados como fator etiopatogênico de diversas enfermidades que acometem o homem. No adulto, o estresse oxidativo encontra-se relacionado às moléstias cardiovasculares e doenças inflamatórias intestinais (193)(194). A avaliação do papel representado pelos RLO nas etapas iniciais da carcinogênese humana vem mostrando que eles ocasionam processo inflamatório crônico à mucosa cólica por modificarem o metabolismo celular, oxidarem proteínas intracelulares e provocarem dano oxidativo às bases nitrogenadas do DNA (195). O estresse desencadeado pelos RLO provoca instabilidade em vários cromossomos humanos, facilitando o desenvolvimento de mutações em diferentes genes que controlam o ciclo celular e os sistemas de reparo (101).

Os RLO são moléculas formadas a partir da adição ou perda de elétrons em um átomo neutro, fazendo com que em sua órbita externa existam elétrons desemparelhados, o que torna a molécula bastante reativa (196). Normalmente, os RLO são produzidos a partir do metabolismo celular, da atividade bacteriana sobre substratos alimentares e, principalmente, pela agressão inflamatória à mucosa cólica. De todos os RLO produzidos durante o metabolismo, os que apresentam maior potencial agressivo para as células da mucosa intestinal são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e a hidroxila ($OH^{\cdot}$). Como apresentam intensa reatividade com moléculas que possuem alta densidade de elétrons em sua estrutura química, por exemplo, as bases nitrogenadas do DNA reagem com elas, formando bases anômalas oxidadas (Figura 12) (197).

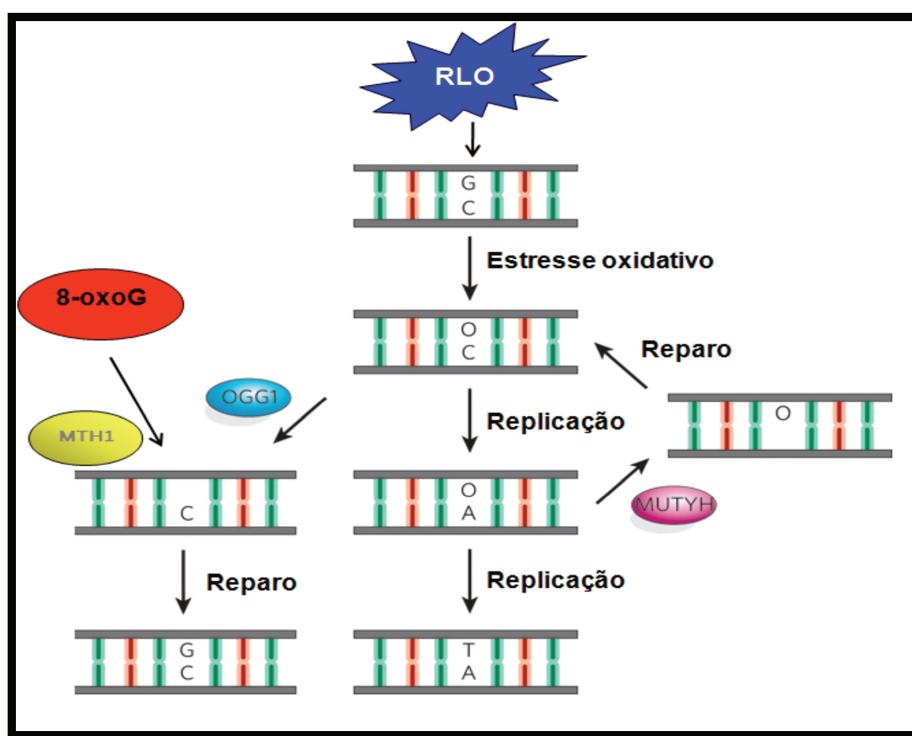


Figura 12 – A exposição do DNA aos RLO leva à incorporação de um radical hidroxila no carbono 8 da molécula da guanina, formando a 8-oxo-dG (O) . Kasai, 1983 (Adaptado) (198).

Dentre os mecanismos mais estudados entre os danos oxidativos ao DNA encontra-se a oxidação da base guanina, na qual ocorre a incorporação de RLO no carbono 8 da molécula da guanina, formando a 8-OH-dG, ou a 8-oxo-dG (198).

A incorporação de uma molécula de oxigênio no DNA causa transversões do tipo $G \rightarrow T$, como ilustrado na via central da Figura 13. As proteínas sintetizadas a partir dos genes *OGG1*, *MUTYH* e *MTH1*, componentes do sistema BER, estão envolvidas no mecanismo de remoção de bases do DNA onde houve a transversão. A OGG1 remove a 8-oxo-dG do pareamento anômalo (8-oxo-dG:C). A proteína MUTYH remove a molécula de adenina do pareamento 8-oxo-dG:A no DNA. A proteína MTH1 tem como função prevenir a incorporação da molécula 8-oxo-dG no DNA recém-corrigido, permitindo a inserção da molécula de citosina. As etapas denominadas reparo sumarizam a ação de endonucleases, deoxirribofosfatase liases, DNA-polimerases e DNA-ligases.

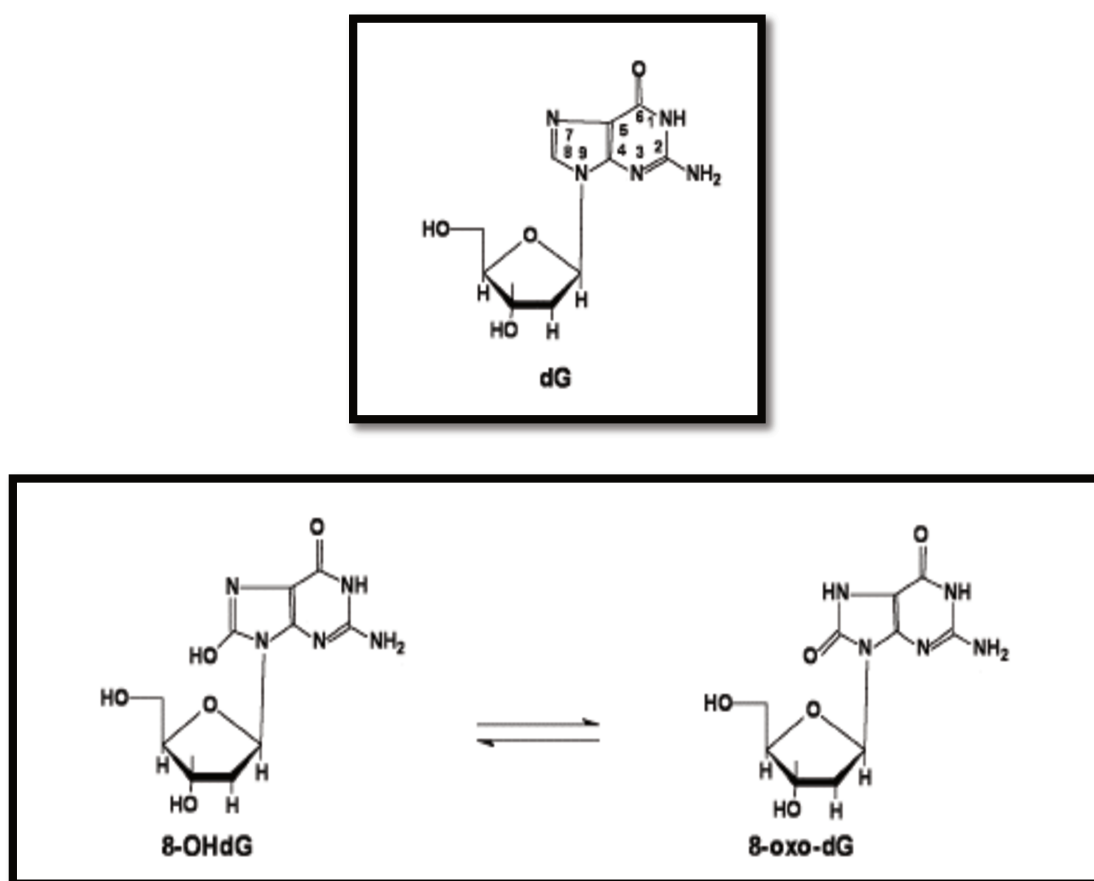


Figura 13 – Representação da estrutura molecular da 8-oxo-dG (Jawahar Swaminathan e colaboradores. European Bioinformatics Institute. Domínio público. M David S et al. (Adaptado) (199).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão tecidual dos genes *MUTYH* e *OGG1* nos tecidos normal e neoplásico em portadores de câncer colorretal esporádico.

3.2 Objetivos específicos

Comparar os níveis de expressão tecidual dos genes *MUTYH* e *OGG1* aos aspectos anatomopatológicos e epidemiológicos em portadores de câncer colorretal.

4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Francisco (Projeto N°:CAAE: 0430.0.142.146-11). Todos os pacientes que forneceram material biológico para pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, tendo sido informados de todas as etapas experimentais envolvidas no presente estudo.

4.2 Casuística

Foi realizado estudo transversal e observacional que avaliou 49 indivíduos com adenocarcinoma de cólon e reto superior submetidos a cirurgia colorretal com intenção curativa, pela mesma equipe cirúrgica, entre janeiro de 2010 e dezembro de 2013. Os eleitos para avaliação no estudo foram submetidos a estadiamento clínico, avaliação laboratorial e exames de imagem, seguindo orientações das diretrizes recomendadas pelas AJCC/UICC Guidelines.

O diagnóstico confirmatório da neoplasia colorretal foi estabelecido após avaliação por patologistas experientes e especialistas em neoplasia do aparelho digestivo pertencentes ao corpo clínico do Hospital Universitário São Francisco.

Foram excluídos do estudo pacientes suspeitos de pertencerem a famílias com diagnóstico de CCR hereditário (PAF e HNPCC); pacientes com câncer colorretal associado a doença inflamatória intestinal; pacientes submetidos a cirurgia em caráter de urgência; e pacientes com câncer de reto médio e inferior submetidos à terapia neoadjuvante com irradiação, menores de 18 anos e doentes pertencentes a grupos vulneráveis. Os dados epidemiológicos e clínico-patológicos foram obtidos pela avaliação dos prontuários médicos, sendo depois transcritos e planilhados.

Os dados histopatológicos, tais como tipo do tumor, localização, grau de diferenciação, profundidade de invasão de parede intestinal, presença de invasão angiolinfática e perineural, tamanho da lesão, característica macroscópica, distância da margem distal, número de linfonodos ressecados, número de linfonodos

comprometidos, índice de linfonodos comprometidos (de 10% em 10%) e estadiamento, foram as variáveis consideradas e avaliadas para o presente estudo.

4.3 Coleta de material

Imediatamente após a remoção do espécime cirúrgico, foram colhidos três fragmentos obtidos da mucosa normal do cólon, em uma distância de pelo menos 10 cm a partir do bordo proximal do tumor. Do mesmo modo, três outros fragmentos foram coletados a partir da borda da lesão tumoral. Os fragmentos removidos foram identificados individualmente e armazenados em Eppendorf contendo solução de Rna Later. As biópsias foram recolhidas, e rapidamente congeladas e armazenadas a -80°C até o momento do seu processamento.

4.4 Extração de RNA e síntese de c-DNA

O RNA total foi isolado utilizando-se o RNeasy *tissue kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), seguindo rigorosamente o protocolo do fabricante. A pureza e o rendimento de RNA total isolado foram avaliados, medindo-se a densidade óptica com utilização do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

O c-DNA de cadeia simples foi sintetizado a partir do RNA utilizando-se o *kit* de alta capacidade de arquivo de c-DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo as recomendações de uso do fabricante.

4.5 Quantificação de expressão por RNA em tempo real

A análise da expressão dos genes *OGG1* e *MUTYH*, e do gene constitutivo 18 S, foi feita por análise quantitativa do PCR utilizando-se um sistema de PCR de 7500 em tempo real (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados com o software Primer 3 (disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. Acesso em: 25 ago. 2017).

A reação de PCR em tempo real foi realizada usando-se o Platinum SYBR GREEN qPCRSupermix UDG (Invitrogen, Foster City, CA, EUA), seguindo especificações do fabricante.

Preparo da solução: obtenção de 50 μ L após mistura dos componentes abaixo:

- 25 μ L Sybr Green® PCR quantitativa SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, EUA);
- 15 μ L de cada *primer* (Tabela 1);
- 10 μ L de ADNc (50 ng).

Ciclos do PCR em tempo real

Repetição da reação com um tratamento preliminar com UDG durante 2 min a 50 °C e desnaturação durante 2 min a 95 °C, seguida por 45 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 s.

Hibridação a 60 °C durante 15 s e extensão do *primer* a 72 °C durante 30 s. Esse passo foi sucedido por uma análise de ponto de fusão dos produtos de amplificação de cadeia dupla constituída por 40 ciclos de decréscimos de 1 °C (15 s cada), iniciando-se a 95 °C.

A primeira derivada dessa trama, dF/dt , equivale à taxa de variação da fluorescência na reação. Alteração significativa na fluorescência ocorre no ponto dos produtos de PCR de cadeia dupla de fusão. A trama do dF/dt em função da temperatura mostra mudanças como picos distintos.

As reações foram corridas em triplicata, e as amostras normalizadas usando-se o gene-controle constitutivo. A expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

Tabela 1 – *Primers* usados para PCR em tempo real

Gene	Sequência (5' – 3')
<i>MUTYH</i>	CGGTAACTACCCAATGCCTCAAC TTCTCGACTAACAGCATTTCCAA
<i>OGG1</i>	CCTGTGGGGACCTTATGCT CCTTTGGAACCCTTTCTGC
<i>18S</i>	CGCGGTTCTATTTTGTTGGT CGGTCCAAGAATTTACCTC

4.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias, desvio-padrão, mínimo e máximo.

Para análise das variáveis categóricas, empregou-se o teste qui-quadrado.

A significância estatística dos dados provenientes das análises da expressão gênica foi determinada por teste *t* pareado. Valores *p* menores que 0,05 indicaram significância estatística. O programa utilizado para análise dos dados foi o SPSS 16.0. (SPSS Inc., EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Artigo: “Expressão tecidual dos genes *MUTYH* e *OGG1* em doentes com câncer colorretal esporádico”

ANEXO 2 – Tissue expression of the genes *MUTYH* e *OGG1* in patients with sporadic colorectal cancer. *ABCD - Brazilian Archives of Digestive Surgery*, 14 mar. 2017.

5.2 Descrição dos resultados

Análise de aspectos clínico-epidemiológicos.

As variáveis analisadas no presente estudo foram: sexo, idade, localização do tumor, tipo histológico, aspecto macroscópico, grau de diferenciação, profundidade de infiltração da lesão, invasão angiolinfática e neural, estadiamento TNM, número de linfonodos ressecados, número de linfonodos comprometidos, razão de comprometimento linfonodal, tamanho da lesão e distância da margem tumoral. A Tabela 2 apresenta as variáveis analisadas.

Tabela 2 – Variáveis avaliadas

Características	Número de pacientes (%)
Gênero	
Masculino	23/49 (47%)
Feminino	26/49 (53%)
Faixa etária	
41-51 anos	5/49 (10%)
52-62 anos	9/49 (19%)
> 63 anos	35/49 (71%)
Localização	
Cólon	17/49 (35%)
Reto	32/49 (65%)
Tamanho do tumor	
≤ 3 cm	23/49 (47%)
> 3 cm	26/49 (53%)
Tipo histológico	
Usual	47/49 (96%)
Mucoprodutor	2/49 (4%)
Grau de diferenciação	
Bem	5/49 (10%)
Moderadamente	38/49 (78%)
Pouco	6/49 (12%)
Profundidade da invasão da parede	
T1 - T2	38/49 (78%)
T3 - T4	11/49 (22%)
Número de linfonodos ressecados	
≤12	10/49 (55%)
>12	39/49 (65%)
Número de linfonodos comprometidos	
N0	29/49 (59%)
N1-N2	20/49 (41%)
Razão de comprometimento linfonodal	
0 - ≤ 10%	24/49 (49%)
> 11% - ≤ 20%	7/49 (14%)
> 21%	18/49 (37%)
Invasão angiolinfática	
Sim	17/49 (35%)
Não	32/49 (65%)
Invasão perineural	
Sim	27/49 (55%)
Não	22/49 (45%)
Estádio TNM	
I e II	19/49 (39%)
III e IV	30/49 (61%)

5.2.1 Sexo

Em relação à distribuição dos pacientes quanto ao sexo, em um total de 49 pacientes, 47% (23/49) eram do sexo masculino e 53% (26/49), do feminino. Não foi observada significância relacionada à distribuição por gênero.

5.2.2 Faixa etária

A faixa etária variou entre 28 e 87 anos, com uma média de 65,8 anos ($\pm 11,3$) (Gráfico 1).

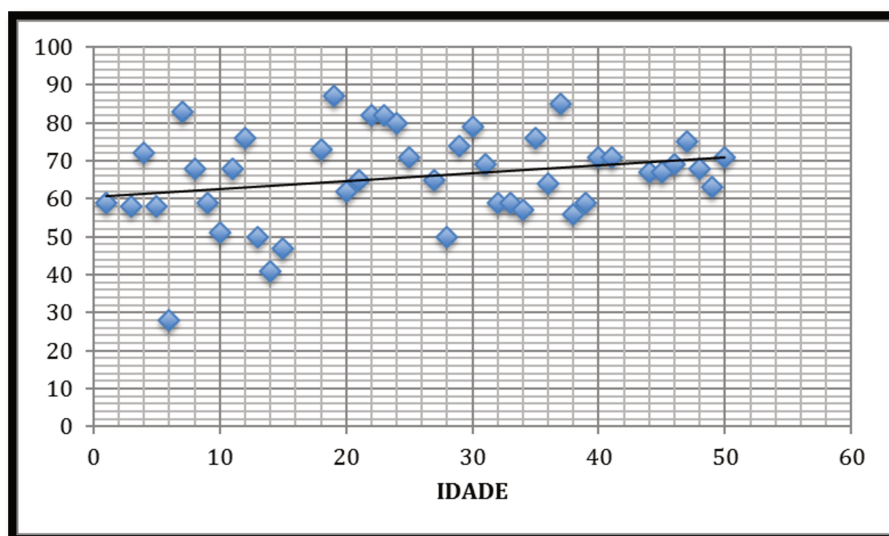


Gráfico 1 – Variação de faixa etária

5.2.3 Estadiamento

Em relação ao estágio TNM, observou-se que 61% (30/49) dos casos se apresentavam em fase mais avançada: estádios III e IV. Apenas 39% (19/49) dos casos apresentavam-se nos estádios I e II.

5.2.4 Localização

Considerando a localização anatômica predominante, 35% (17/49) dos tumores estavam localizados em topografia de retossigmoide.

Nos tumores localizados no cólon, foi observado que 35% (6/17) estavam presentes em homens e 65% (11/17) em mulheres.

No que se refere aos tumores localizados no reto, 53% (16/30) estavam presentes em pacientes do sexo masculino e 47% (14/30), em pacientes do sexo feminino.

5.2.5 Tipo histológico

O tipo histológico amplamente predominante na população estudada foi representado pelo adenocarcinoma, totalizando 96% (47) do total dos 49 pacientes.

5.2.6 Aspecto macroscópico

Em relação ao aspecto macroscópico dos tumores avaliados, 57,1% (28/49) apresentavam lesões do tipo ulcerovegetante; o segundo tipo mais comum foi representado pelas lesões ulceroinfiltrativas (30,6%) (15); e, finalmente, as lesões vegetantes representaram 12,2% (6).

5.2.7 Grau de diferenciação

A maioria dos tumores encontrava-se com grau de diferenciação moderado (79,3%) (39/49).

5.2.8 Profundidade de infiltração da lesão

Dentre as lesões tumorais analisadas, 67,3% (33/49) apresentavam invasão até a camada serosa.

5.2.9 Invasão angiolinfática e neural

Acometimentos angiolinfático e perineural coexistiram na mesma proporção de doentes, sendo que a presença da invasão ocorreu em 44,9% (22/49), enquanto a ausência de invasão esteve presente na maioria dos pacientes, representando o total de 55,1% (27 doentes).

5.2.10 Número de linfonodos ressecados

Em relação ao número de linfonodos ressecados, presentes no espécime cirúrgico, 80% (39/49) dos pacientes tiveram número de ressecção maior que 12 linfonodos; somente 20% (10 pacientes) tiveram número abaixo do mínimo recomendado para ressecção.

5.2.11 Número de linfonodos comprometidos

O comprometimento linfonodal acima de 3 linfonodos na análise da peça cirúrgica esteve presente em 47% (23/49) dos pacientes, e em número menor que 3 em 53% (26 pacientes) dos espécimes avaliados.

5.2.12 Razão de comprometimento linfonodal

O índice de linfonodos comprometidos em relação ao número total de linfonodos ressecados apresentou-se em percentagem maior que 20% em quase metade dos casos (23/49), e somente em 44% (22/49) a razão de comprometimento não ultrapassou 10%.

5.2.13 Tamanho da lesão

A extensa maioria das lesões, 61% (30/49), encontrava-se com dimensões entre 2,1 cm e 5,0 cm; 29% (14/49) apresentavam tamanho maior que 5 cm; e 10% (5/49) dos tumores tinham tamanho abaixo de 2,1 cm.

5.2.14 Distância da margem tumoral

Todos os doentes apresentavam-se com margem tumoral acima de 2 cm, que é, atualmente, recomendado pelas entidades para o tratamento do CCR.

5.3 Expressão do *MUTYH*

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que houve diminuição significativa na expressão do *MUTYH* em tecidos tumorais quando comparada aos tecidos normais. Quanto à localização anatômica, não foi observada diferença entre os sítios avaliados. Em pacientes com algum grau de invasão tumoral, observou-se diminuição significativa da expressão do gene *MUTYH*. Avaliando o grau de diferenciação tumoral, os pacientes com graus mais avançados (III e IV) também mostraram significativa diminuição de expressão tecidual.

Tabela 3 – Expressão do gene *MUTYH* de acordo com as características das amostras entre os tecidos normal e tumoral

Características		<i>MUTYH</i>
Fold “induction”	Tumor/normal	0,49 ± 0,02
	Cólon	0,69 ± 0,34
Localização	Reto	0,50 ± 0,10
	Sim	0,30 ± 0,09*
Invasão	Não	0,89 ± 0,11
	I e II	0,78 ± 0,20
Classificação TNM	III e IV	0,33 ± 0,07*

* p < 0,05 quando comparado entre as características.

5.4 Expressão do *OGG1*

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que houve diminuição significativa na expressão do *OGG1* em tecidos tumorais quando comparada aos tecidos normais.

Tabela 4 – Expressão do gene *OGG1* de acordo com as características das amostras entre os tecidos normal e tumoral

Características		<i>OGG1</i>
Fold “induction”	Tumor/normal	$0,28 \pm 0,09^{\ddagger}$
	Reto	$0,17 \pm 0,02^{*\ddagger}$
Localização	Cólon	$0,31 \pm 0,07$
	Sim	$0,24 \pm 0,04$
Invasão	Não	$0,29 \pm 0,09$
	I e II	$0,49 \pm 0,12$
Classificação TNM	III e IV	$0,16 \pm 0,08^{*\ddagger}$

* $p < 0,05$ quando comparado entre as características; $\ddagger$ $p < 0,05$ quando comparado ao tecido normal.

Quanto à localização anatômica, foi observada diferença entre os sítios avaliados, sendo mais significativa a diminuição da expressão no reto. Os pacientes com estádios mais avançados (graus III e IV) também mostraram diminuição importante da expressão tecidual de *OGG1*. Nos critérios de avaliação de invasão, não houve diferença significativa na expressão do gene. Em relação à análise isolada das variáveis estudadas, os achados mostraram que houve resultados com redução de expressão semelhante em ambos os genes, e as variáveis avaliadas que evidenciaram essa diminuição da expressão foram idade, com predomínio em pacientes acima de 65 anos; o tipo histológico, sendo representado pelo adenocarcinoma; grau de diferenciação moderado; localização retossigmoideana; e comprometimento até a camada muscular.

A presença de invasões angiolinfática e perineural não demonstrou relação com a diminuição da expressão dos genes, assim como o número de linfonodos comprometidos e o índice de comprometimento linfonodal, que não apresentaram diferenças significantes. Tamanho da lesão e aspecto macroscópico também se apresentaram como fatores relacionados à diminuição de expressão,

sendo tumores com dimensões entre 2,1 cm e 5,0 cm com maior significância, bem como tumores ulceroinfiltrativos.

Tumores no estágio III também apresentaram maior significância na diminuição de expressão em ambos os genes.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a maioria dos pacientes, quando diagnosticados, já se apresenta em estágios avançados da doença.

A localização mais frequente encontrada foi colón distal, com faixa etária prevalente após a quinta década; porém encontramos na casuística pacientes jovens, sem histórico familiar, demonstrando a ocorrência da doença em grupos distintos, a princípio assintomáticos, ressaltando assim a importância da necessidade de métodos diagnósticos não invasivos e a investigação em grupos específicos que possibilitem detecção precoce.

Existem poucos trabalhos na literatura a respeito da expressão tecidual desses genes em populações específicas.

Em estudo detalhado sobre *MUTYH* em populações sauditas, comparando-as a outras populações, destaca-se a existência de diferenças étnicas entre variantes *MUTYH*, confirmando assim o papel patogênico de algumas mutações ligadas ao CCR (200).

Kim et al. analisaram pacientes de população asiática e encontraram polimorfismos de *OGG1* em pacientes com CCR familiar, em pacientes normais e em pacientes portadores de CCR esporádico (185).

Kuno et al., em estudo para a avaliação de mutações no *MUTYH* em pacientes com CCR esporádico, encontraram relação da perda alélica no *MUTYH* associada a ocorrência de CCR em cólon distal. Avaliaram e confrontaram as principais mutações no *MUTYH* de pacientes suecos com pacientes caucasianos, sem encontrar dados significativos em relação à presença de mutações associadas aos cânceres familiares. Os autores sugerem que mutações *MUTYH* não são importante fator causal no câncer colorretal familiar associado a pequeno número de pólipos (201)(202).

Mutações germinativas no gene *MUTYH* parecem ser menos heterogêneas, e suas frequências mostram-se marcadas por diferenças étnicas (152).

Estudo realizado na Tunísia em 2007 não encontrou nenhuma dessas mutações em estado de homozigose ou heterozigose, em ambos os tecidos, normais e tumorais. Esses resultados mostram que as duas mutações frequentes na PAM Y165C e na G382D não ocorrem no CCR esporádico, mas descrevem que o gene *MUTYH* pode ser sujeito à inativação somática no CCR esporádico (203).

Fleischmann et al. concluíram que mutações germinativas no *MUTYH* conferem suscetibilidade ao câncer colorretal (204).

Está descrito também que mutações bialélicas são raras, permitindo apenas especulações sobre sua relevância biológica em população com CCR esporádico, e ressaltando a importância de estudos sistemáticos em populações distintas para avaliar adequadamente o verdadeiro significado da perda de função *MUTYH* na carcinogênese colorretal (205).

Em amplo estudo realizado em população alemã, que levou em consideração até mesmo o local de nascimento dos indivíduos estudados, para exclusão de possíveis alterações étnicas, concluiu-se que mutações em genes de reparo de DNA estudadas até o presente raramente têm associação ao CCR, e seus efeitos parecem relacionar-se a populações específicas. Há necessidade de um maior número de experimentos sistemáticos em larga escala com variantes comuns, presentes em todas as variações de populações.

Trabalho japonês que avaliou o papel do estresse oxidativo associado a adenocarcinoma gástrico e à atuação dos genes *MUTYH*, *MTH1* e *OGG1* em um total de 90 pacientes concluiu que o acúmulo de estresse oxidativo é associado a menor atuação do mecanismo de reparo por excisão de base, por consequente diminuição na expressão tecidual destes genes (206).

Em outro trabalho realizado no Japão que comparou a expressão gênica tecidual de pacientes portadores de neoplasia prostática em tecidos tumorais e tecidos normais, e avaliou um total de 383 indivíduos, concluiu-se que o nível de expressão do gene *MUTYH* foi significativamente menor nos portadores de adenocarcinoma da próstata, em comparação aos tecidos prostáticos não cancerosos (207).

Trabalho semelhante ao presente estudo, também realizado no Brasil e recém-publicado, com 70 pacientes, avaliou genes do sistema MMR (*MLH1* e *MSH2*) e do sistema BER (*MPG*, *OGG1* e *PARP1*), comparando níveis de expressão tecidual tanto para amostras tumorais quanto para tecidos normais. A conclusão apresentada é que genes do sistema BER são regulados positivamente na maioria dos CCR esporádicos, representados por aumentos nas expressões *MPG*, *OGG1*, *APE1*, *PARP1* e *XRCC1*. Também foi relatada a associação entre esses níveis de expressão de reparo individual e características de desfecho precárias em tumores colorretais. No entanto, quando analisada a via BER como um todo para cada caso de CCR individual, não houve níveis consistentes de coexpressão para as proteínas componentes do BER, indicando desequilíbrio ou desregulamentação nesse mecanismo de reparo (208).

7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados na casuística deste trabalho demonstraram alterações significativas na comparação entre a expressão tecidual de amostras de tecidos normal e tumorais, com significância nos estágios III e IV.

7.1 Considerações finais

A literatura ainda se apresenta escassa e controversa em relação ao papel das alterações na expressão dos genes *MUTYH* e *OGG1* com o aumento da incidência de câncer colorretal.

Estudos da avaliação da expressão dos genes *MUTYH* e *OGG1* em portadores de CCR permitirão identificar, em determinados grupos de doentes, possíveis mutações nesses importantes genes de reparo, relacionando-as ao desenvolvimento da forma esporádica de CCR. O presente estudo poderá contribuir para determinação de qual perda de função de determinados genes que atuam nos mesmos mecanismos de reparo de dano do DNA poderá estar relacionada ao aumento da incidência do CCR em diferentes amostras populacionais, corroborando dados já encontrados em alguns países nos quais a avaliação já foi realizada.

A identificação e a avaliação desses indivíduos nos quais ocorreu perda da função gênica poderão ser importantes nas propostas de aconselhamento genético, na instituição de protocolos de seguimento e diagnóstico precoce, semelhantes aos adotados para outras formas de CCR hereditário, podendo auxiliar no reconhecimento de casos que não se encaixam nas síndromes mais comuns de predisposição ao câncer colorretal, contribuindo dessa maneira para o diagnóstico precoce e o desenvolvimento de métodos marcadores não invasivos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*. 2015; 136: E359–E386.
2. GLOBOCAN 2012. [Online]. Estimated Câncer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Lyon; 2013 [cited 2016 novembro 3]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
3. Oddone E, Modonesi C, Gatta G. Occupational exposures and colorectal cancers: A quantitative overview of epidemiological evidence. 2014.
4. Jackson-Thompson J, Ahmed F, German RR, Lai SM, Friedman C. Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998-2001. *Cancer*. 2006 set 1: p. 1103-11.
5. Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello FM. Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening. *Surg Clin North Am*. 2015 October; 95(5): 1067-1080
6. Wallis YL, Morton DG, McKeown CM, Macdonald F. Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition. *J Med Genet*. 1999: p. 14-20.
7. Van der Lijdt RB, Meera Khan P, Vansen HF et al. Germline mutations in the 3' part of APC exon 15 do not result in truncated proteins and are associated with attenuated adenomatous polyposis coli. *Hum Genet*. 1996: p. 727-34.
8. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999: p. 1453-6.
9. Ibrahim A, Barnes DR, Dunlop J, Barrowdale D, Antoniou AC, Berg JN. Attenuated familial adenomatous polyposis manifests as autosomal dominant late-onset colorectal cancer. *Eur J Hum Genet*. 2014 Nov: p. 1330-3.
10. Torrezan GT, Silva FCD, Santos EM, Krepschi AC, Achatz MI, Aguiar SJ et al. Mutational spectrum of the APC and MUTYH genes and genotype-phenotype correlations in Brazilian FAP, AFAP, and MAP patients. *Hum Mol Genet*. 2001; p. 721-33.
11. Poulsen ML, Bisgaard ML. MUTYH Associated Polyposis (MAP). *Curr Genomics*. 2008 Sep: p. 420-35.
12. Borrás E, Taggart M, Lynch MP, Villar E. Establishing a diagnostic road map for MUTYH-associated polyposis. *Clin Cancer Res*. 2014 Mar 1: p. 1061-3.
13. Shussman N, Wexner SD. Colorectal polyps and polyposis syndromes. Review. Weston, FL, USA: Cleveland Clinic Florida, Department of Colorectal Surgery; 2014.

14. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 1997: p. 623-27.
15. Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2001: p. 818-22.
16. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996: p. 159-170.
17. Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, De Lau W, Oving I, Hurlstone A et al. The β -catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 2002 oct 18: p. 241-50.
18. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 jun 1: p. 759-67.
19. Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Säll T, Mitelman F, Nilbert M. Dissecting karyotypic patterns in colorectal tumors: two distinct but overlapping pathways in the adenoma-carcinoma transition. *Cancer Res*. 2002 oct 15: p. 5939-46.
20. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res*. 2003: p. 1608-14.
21. Shin A, Lee KM, B. A, Park CG, Noh DK, Park DY et al. Genotype-phenotype relationship between DNA repair gene genetic polymorphisms and DNA repair capacity. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2008: p. 501-505.
22. Spirio L, Olschwang S, Groden J et al. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell*. 1993: p. 951-7.
23. Roldan-Arjona T WYCKea. Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997: p. 8016-20.
24. Slupska MM, Baikalov C, Luther WM, Chiang JH, Wei YF, Miller JH. Cloning and sequencing a human homolog (hMUTYH) of the Escherichia coli MUTY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol*. 1996: p. 3885-92.
25. Sakumi K, Furuichi M, Tsuzuki T et al. Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxodGTP, a mutagenic substrate for DNA-synthesis. *J Biol Chem*. 1994: p. 23524-30.
26. Boiteux S, Radicella JP. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2000 May 1: p. 1-8.
27. Slysokova J, Korenkova V, Collins AR, Prochazka P, Vodickova L, Svec J et al. Functional, genetic, and epigenetic aspects of base and nucleotide excision repair in colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2012 Nov 1: p. 5878-87.

28. Smith CG, West H, Harris R, Idziaszczyk S, Maughan TS, Kaplan R et al. Role of the oxidative DNA damage repair gene OGG1 in colorectal tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2013 aug 21: p. 1249-53.
29. Dziaman T. PARP-1 expression is increased in colon adenoma and carcinoma and correlates with OGG1. *PLOS-ONE.* 2014 dec 19; 9(12): e115558.
30. Lai CY. Association between polymorphisms of APE1 and OGG1 and risk of colorectal cancer in Taiwan. *World J Gastroenterol.* 2016 mar 28: p. 3372-80.
31. Su Y, Xu A, Zhu J. The effect of oxoguanine glycosylase 1 rs1052133 polymorphism on colorectal cancer risk in Caucasian population. *Tumour Biol.* 2014: p. 513-7.
32. American Cancer Society. American Cancer Society. [Online]. 2015 [cited 2016 Nov 03 [Atlanta GA]. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document>. Acesso em: 25 ago 2017.
33. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013: p. 1374-1403.
34. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Instituto Nacional de Câncer (Brasil). [Online]. 2016 [cited 2016 nov. 1 [Estimativa 2016]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID2>. Acesso em: 25 ago. 2017.
35. Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ, Cannon-Albright LA. Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach. *Gastroenterology.* 2010 mar; 138(3): 877-85;
36. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. World Cancer Research Fund international. [Online]. 2007 [cited 2016 Mar 21 [Washington DC: AIRC; 2007.]. Disponível em: <http://www.wcrf.org>. Acesso em: 25 ago. 2017
37. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer.* 2009 jul 1: p. 171-80.
38. Campos FG. Surgical treatment of familial adenomatous polyposis: Dilemmas and current recommendations. *World J Gastroenterol.* 2014 nov 28: p. 16620-29.
39. Leoz ML, Balaguer F, Ocaña T, Moreira L, Carbala S. The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet.* 2015: p. 95-107.
40. Borrás E, W TM, Lynch PM, E V. Establishing a diagnostic road map for MUTYH-associated polyposis. *Clin Cancer Res.* 2014 mar 1: p. 1061-3.
41. Hagland HR, Berg M, Jolma IW, Carlsen A, Soreide K. Molecular Pathways and Cellular Metabolism in Colorectal Cancer. *Dig Surg.* 2013: p. 12-25.

42. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010: p. 2059-72.
43. Sheffer M, Bacolod MD, Zuk O et al. Association of survival and disease progression with chromosomal instability: a genomic exploration of colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad.* 2009: p. 7131-6.
44. Wang JY, Wang YH, Jao SW et al. Molecular mechanisms underlying the tumorigenesis of colorectal adenomas: correlation to activated KRAS oncogene. *Oncol. Rep.* 2006 : p. 1245-52.
45. Pajkos G, Kiss I, Sandor J, Ember I, Kishazi P. The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of KRAS oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2000: p. 1695-701.
46. Brink M, Goeij AFPMd, Weijnenberg MP et al. KRAS oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*. 2003: p. 703-10.
47. Al-Sohaily S, Biakin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012 aug 21: p. 1423-31.
48. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992: p. 235-7.
49. Kolligs FT, Bommer G, Goke B. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*. 2002: p. 131-44.
50. Bellacosa A. Genetic hits and mutation rate in colorectal tumorigenesis: versatility of Knudson's theory and implications for cancer prevention. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003: p. 382-8.
51. Fevr T, Robine S, Louvard D, Huelsken J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27: 7551-9.
52. Behrens J. The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 2005: p. 672-5.
53. Eisenmann D. Wnt Signaling. *WormBook*. 2005 jun 25.
54. Segditsas S TI. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 2006; 25: 7531-7.
55. Fukuyama R, Niculaita R, NKP et al. Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses beta-catenin-dependent transcription. *Oncogene*. 2008: p. 6044-55.
56. Kohonen-Corish MRJ, Siggelkow ND, Susanto J et al. Promoter methylation of the mutated in colorectal cancer gene is a frequent early event in colorectal cancer. *Oncogene* 2007; 26: 4435-41.
57. Starr TK, Allaei R, Silverstein KA, et al. A transposon-based genetic screen in mice identifies genes altered in colorectal cancer. *Science*. 2009: p. 1747-50.

58. Pangon L, Sigglekow ND, Larance M et al. The "Mutated in Colorectal Cancer" protein is a novel target of the UV-induced DNA damage checkpoint. *Genes Cancer* 2010. 2010: p. 917-26.
59. Chughtai SA, Crundwell MC, Cruickshank NR et al. Two novel regions of interstitial deletion on chromosome 8p in colorectal cancer. *Oncogene*. 1999: p. 657-65.
60. Macartney-Coxson DP, Hood KA, Shi HJ et al. Metastatic susceptibility locus, an 8p hot-spot for tumour progression disrupted in colorectal liver metastases: 13 candidate genes examined at the DNA, mRNA and protein level. *BMC Câncer*. 2008: p. 187.
61. Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2002: p. 101-28.
62. Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor TP53. *Nature* 2009. 2009: p. 1127-30.
63. Lanza G MMGRa. Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int. J. Cancer*. 1998: p. 390-5.
64. Wang W, Wang GQ, Sun XW et al. Prognostic values of chromosome 18q microsatellite alterations in stage II colonic carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2010: p. 6026-34.
65. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010: p. 2073-87.
66. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2012: p. 1506-12.
67. Søreide K, Janssen EA, Soiland H, Korner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2006: p. 395-406.
68. Søreide K, Nedreb BS, Sreide JA, Slewa A, Krner H. Lymph node harvest in colon cancer: Influence of microsatellite instability and proximal tumor location. *World J Surg*. 2009: p. 2695-2703.
69. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer*. 2010: p. 2788-2798.
70. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006: p. 1960-64.
71. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005: p. 2654-66.
72. Rua KAP, Peña CMM. Bases moleculares del cáncer colorrectal. *Iatreia*. 2012 apr-jun: p. 137-148.

73. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Schischmanoff O, Perret GY, Morere JF. Microsatellite instability does not predict the efficacy of chemotherapy in metastatic colorectal cancer. A systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res.* 2009: p. 1615-1620.
74. Green RA, Wollman R, Kaplan KB. APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Mol Biol Cell.* 2005: p. 4609-4622.
75. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: towards an individualized management? *Rev Esp Enferm Dig.* 2011 jan 10: p. 29-35.
76. Wong JJL, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut.* 2007: p. 140-8.
77. Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Cancer Biol.* 1999: p. 349-57.
78. Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C et al. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006: p. 1731-8.
79. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 2006: p. 787-93.
80. Jover R, Nguyen TP, Perez-Carbonell L et al. 5-Fluorouracil adjuvant chemotherapy does not increase survival in patients with CpG island methylator phenotype colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2011: p. 1174-81.
81. Ogino S, Cantor M, Kawasaki T et al. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut.* 2005: p. 1000-1006.
82. Samowitz W, Albertsen H, Herrick J et al. Evaluation of a large, population- based sample supports a CpG island methylator phenotype (CIMP) in colon cancer. *Gastroenterology.* 2005: p. 837-45.
83. Bustamante-Balén M, Bernet L, Cano R et al. Assessing the reproducibility of the microscopic diagnosis of sessile serrated adenoma of the colon. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009: p. 258-64.
84. De Bont R. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004; 19: 169-185.
85. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993: p. 709-715.
86. Brennerman BM, Illuzzi JL, Wilson-III DM. Base excision repair capacity in informing healthspan. *Carcinogenesis.* 2014: p. 2643-2652.
87. Bjelland S et al. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat. Res.* 2003; 531: 37-80.

88. Wilson DM III BV. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*. 2007: p. 544-559.
89. Krokan HE et al. Base excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013: p. a012583.
90. Dianov GL, Hübscher U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic Acids Res.* 2013 apr 1: p. 3483-90.
91. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med.* 2002: p. 1102-1115.
92. Ohno M, Miura T, Furuichi M, Tominaga Y, Tsuchimoto D, Sakumi K et al. A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in the human genome. *Genome Res.* 2006: p. 567-575.
93. Maki H, Sekiguchi M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature.* 1. 1992: p. 273-275.
94. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxo-dG. *Nature.* 1991: p. 431-434.
95. Bregeon D, Doetsch PW. Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development. *Nat Rev Cancer.* 2011: p. 218-227.
96. Bregeon D, Peignon PA, Sarasin A. Transcriptional mutagenesis induced by 8-oxoguanine in mammalian cells. *PLoS Genet.* 2009.
97. Taghizadeh K, McFaline JL, Pang B, Sullivan M, Dong M, Plummer E et al. Quantification of DNA damage products resulting from deamination oxidation and reaction with products of lipid peroxidation by liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2008: p. 1287-1298.
98. Dong M, Dedon PC. Relatively small increases in the steady-state levels of nucleobase deamination products in DNA from human TK6 cells exposed to toxic levels of nitric oxide. *Chem Res Toxicol.* 2006: p. 50-57.
99. Klungland A et al. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *USA*, 96, 13300-13305. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1999: p. 13300-13305.
100. Cheng Y, Ren X, Gowda A, Shan Y, Zhang L, Yuan YS et al. Interaction of Sirt3 with OGG1 contributes to repair of mitochondrial DNA and protects from apoptotic cell death under oxidative stress. *Cell Death Dis.* 2013 jul: p. e731.
101. Paz-Elizur T, Sevilya Z, Leitner-Dagan Y, Elinger D, Roisman L, Livneh Z. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Lett.* 2008 jul 18: p. 60-72.
102. Cheadle JPR, Sampson J. MUTYH-associated polyposis-from defect in base excision repair to clinical genetic testing. *DNA Repair (Amst)*. 2007: p. 274-279.

103. Imai K, Slupphaug G, Lee WI, Revy P, Nonoyama S, Catalan N et al. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol*. 2003: p. 1023-1028.
104. Demple BS, Sung J. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 2005; 4: 1442-1449.
105. McNeill DR, Lin PC, Miller MG, Pistell P, Souza-Pinto NC, Fishbein KW et al. XRCC1 haploinsufficiency in mice has little effect on aging, but adversely modifies exposure-dependent susceptibility. *Nucleic Acids Res*. 2011: p. 7992-8004.
106. Liu D, Croteau DL, Souza-Pinto N, Pitta M, Tian J, Wu C et al. Evidence that OGG1 glycosylase protects neurons against oxidative DNA damage and cell death under ischemic conditions. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011: p. 680-692.
107. Endres M, Biniszkiwicz D, Sobol RW, Harms C, Ahmadi M, Lipski A et al. Increased postischemic brain injury in mice deficient in uracil-DNA glycosylase. *J Clin Invest*. 2004: p. 1711-1721.
108. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinimann K, Fidalgo P, Phillips RK et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MUTYH. *N Engl J Med*. 2003: p. 791-9.
109. Nospikel T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci*. 2009 mar: p. 994-1009.
110. Shuck SC, Short EA, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair, from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res*. 2008: p. 64-72.
111. Barakat KH, Jordheim LP, Perez-Pineiro R, Wishart D, Dumontet C, Tuszynski JA et al. Virtual screening and biological evaluation of inhibitors targeting the XPA-ERCC1 interaction. *PLoS ONE*. 2012: p. e51329.
112. Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks BP, Tamura D, DiGiovanna JJ. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience*. 2007: p. 1388-1396.
113. Diderich K, Alanazi M, Hoeijmakers JH. Premature aging and cancer in nucleotide excision repair disorders. *DNA Repair (Amst)*. 2011: p. 772-780.
114. Murakami T, Fujimoto M, Ohtsuki M, Nakagawa H. Expression profiling of cancer-related genes in human keratinocytes following non-lethal ultraviolet B irradiation. *J Dermatol Sci*. 2001 oct: p. 121-9.
115. Yu J, Mallon MA, Zhang W, Freimuch RR, Marsh S, Watson MA et al. DNA repair pathway profiling and microsatellite instability in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 sep 1: p. 5104-11.
116. Martin SA, Lord CJ, Ashworth A. Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway. *Clin. Cancer Res*. 2010: p. 5107-5113.

117. Funck A, Santos JC, Silva-Fernandes IJ, Rabenhorst SH, Martinez CA, Ribeiro ML. Effect of MLH1-93G>A on gene expression in patients with colorectal cancer. *Med Oncol*. 2014 aug 13: p. 160.
118. Alberts B (ed.), Roberts K, DB, Lewis J, Raff M, Johnson A. *Biologia Molecular da Célula*. 5. ed. Porto Alegre: Garland Science; 1983.
119. Li G. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. 2008: p. 85-98.
120. Hampel H, L FW, Martin E et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008: p. 5783-88.
121. Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl Cancer Inst*. 2004: p. 261-268.
122. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res*. 1998: p. 3455-3460.
123. Lynch HT, De la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003: p. 919-932.
124. Kakar S, Aksoy S, Burgart LJ, Smyrk TC. Mucinous carcinoma of the colon: correlation of loss of mismatch repair enzymes with clinicopathologic features and survival. *Mod Pathol*. 2004: p. 696-700.
125. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993: p. 816-819.
126. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol*. 2002: p. 1043-1048.
127. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003: p. 247-257.
128. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010: p. 3219-3226.
129. Des Guez G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret GY, MJF, Uzzan B. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009: p. 1890-1896.
130. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009: p. 1071-78.
131. O'Driscoll M, Gennery AR, Seidel J, Concannon P, Jeggo PA. An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair (Amst)*. 2004: p. 1227-1235.

132. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 2010: p. 181-211.
133. Stratton M. Exploring the genomes of cancer cells : proggres and promisse. *Science.* 2011: p. 1553-58.
134. Lagerwerf S, Vrouwe MG, Overmeer RM, Fousteri MI, Mullenders LH. DNA damage response and transcription. *DNA Repair.* 2011: p. 743-750.
135. Nijik A, Woodbine L, Marchetti C, Lambe T, Liu C, Cornall R. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature.* 2007: p. 686-690.
136. Lopez-Contreras A, Fernandez-Capetillo O. Signalling DNA Damage. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology.* 2012.
137. Difilippantonio MJ, Petersen S, Johnson R, Jasin M, Kanaar R, Ried T et al. Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. *J Exp Med.* 2002: p. 469-80.
138. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001: p. 366-374.
139. Wyman C, Ristic D, Kanaar R. Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair (Amst).* 2004: p. 827-33.
140. Vasileva A, Jessberger R. Major pathways of DNA double-strand break repair. *Nature Reviews Microbiology.* 2005 nov: p. 837-847.
141. Dynan WS, Yoo S. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 1998: p. 1551-1559.
142. Song JY, Lim JW, Kim H, Kim KH. Role of NF-kappaB and DNA repair protein Ku on apoptosis in pancreatic acinar cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 dec: p. 259-63.
143. Velic D, Couturier AM, Ferreira MT, Rodrigue A, Poirier GG, Fleury F et al. DNA Damage Signalling and Repair Inhibitors: The Long-Sought-After Achilles' Heel of Cancer. *Biomolecules.* 2015: p. 3204-3259.
144. Tomimatsu N, Mukherjee B, Catherine HM, Ilcheva M, Vanessa CC, Louise HJ et al. Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice. *Nat Commun.* 2014 apr 7: p. 3561.
145. Zimmermann M, De Lange T. 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol.* 2014 feb: p. 108-17.
146. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 2012 jan 18: p. 287-94.
147. Nugent KP, Phillips RK, Hodgson SV et al. Phenotypic expression in familial adenomatous polyposis: partial prediction by mutation analysis. *Gut.* 1994: p. 1622-3.
148. Friedl W, Caspari R, Sengteller M et al. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut.* 2001: p. 515-21.

149. Albuquerque C, Cravo M, Cruz C. Genetic characterization of patients with multiple colonic polyps. *J Med Genet.* 2002: p. 297-302.
150. Jones S, Emmerson P, Maynard J et al. Biallelic germline mutations in MUTYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum Mol Genet.* 2002: p. 2961-7.
151. Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H et al. MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer.* 2006: p. 807-14.
152. Sampson JR, Dolwani S, Jones S et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MUTYH. *Lancet.* 2003: p. 39-41.
153. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT et al. Inherited variants of MUTYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet.* 2002 feb: p. 227-32.
154. Kambara T, Whitehall VL, Spring KJ, Barker MA, Arnold S, Wynter CV et al. Role of inherited defects of MUTYH in the development of sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004 May: p. 1-9.
155. Giardiello FM, Brensinger JD, Luce MC et al. Phenotypic expression of disease in families that have mutations in the 5' region of the adenomatous polyposis coli gene. *Ann Intern Med.* 1997: p. 514-19.
156. Brensinger JD, Laken SJ, Luce MC et al. Variable phenotype of familial adenomatous polyposis in pedigrees with 3' mutations in the APC gene. *Gut.* 1998: p. 548-52.
157. Soravia C, Berk T, Madlensky L et al. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet.* 1998: p. 1290-301.
158. Vasen HF, Tops CM et al. APC mutation in the alternatively spliced region of exon 9 associated with late onset familial adenomatous polyposis. *Hum Genet.* 1995: p. 705-10.
159. Sampson JR, Dolwani S, Jones S et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MUTYH. *Lancet.* 2003: p. 39-41.
160. Jenkins MA, Croitoru ME, Monga N et al. Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MUTYH mutations: a population-based case-family study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006: p. 312-14.
161. Halford SE, Rowan AJ, Lipton L et al. Germline mutations but not somatic changes at the MUTYH locus contribute to the pathogenesis of unselected colorectal cancers. *Am J Pathol.* 2003: p. 145-8.
162. Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A et al. Proportion and phenotype of MUTYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol.* 2003: p. 827-32.
163. Sampson JR, Jones S, Dolwani S, Cheadle JP. MutYH (MUTYH) and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans.* 2005: p. 679-83.

164. Missense Polymorphisms in the Adenomatous Polyposis Coli Gene and Colorectal Cancer Risk. *Dis Colon Rectum*. 2008 oct: p. 1467-1474.
165. Yang L et al. Role of MUTYH Polymorphisms in Sporadic Colorectal Cancer in China: A Case-control, Population-based Study. 2013: p. 6403-6409.
166. Mão de Ferro S, Lage P, Suspiro A et al. Polipose associada ao MUTYH. Fenótipo grave na homozigotia para a mutação 1103delC. *Acta Med Port*. 2007: p. 243-7.
167. Venesio T, Molatore S, Cattano F, Arrigoni A, Risio M, Ranzani GN. High frequency of MUTYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterol*. 2004: p. 1681-1685.
168. Peterlongo P, Mitra N, Chuai S, Kirchhoff T, Palmer C, Huang H et al. Colorectal cancer risk in individuals with biallelic or monoallelic mutations of MUTYH. *Int J Cancer*. 2005 Apr 10: p. 505-7.
169. Ellis C. Colonic adenomatous polyposis syndromes: clinical management. *Clin Colon Rectal Surg*. 2008: p. 256-62.
170. Aceto G, Curia MC, Veschi S et al. Mutations of APC and MUTYH in unrelated Italian patients with adenomatous polyposis coli. *Hum Mutat*. 2005: p. 394-91.
171. Cheadle JP, Sampson JR. Exposing the MYtH about base excision repair and human inherited disease. *Hum Mol Genet*. 2003: p. 159-65.
172. Alhopuro P, Parker AR, Lehtonen R et al. A novel functionally deficient MUTYH variant in individuals with colorectal adenomatous polyposis. *Hum Mut*. 2005: p. 393.
173. Gismondi V, Meta M, Bonelli L, Radice P, Sala P, Bertario L et al. Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MUTYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer*. 2004: p. 680-684.
174. Cleary SP, Cotterchio M, Jenkins MA, Kim H, Bristow R, Green R et al. Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study. *Gastroenterology*. 2009 Apr: p. 1251-60.
175. O'Shea AM, Clearly SP, Croitoru MA et al. Pathological features of colorectal carcinomas in MUTYH-associated polyposis. *Histopathology*. 2008: p. 194-94.
176. Grover S, Kastrinos F, Steyerberg EW, Cook EF, Dewanwala A, Burbidge LA et al. Prevalence and Phenotypes of APC and MUTYH Mutations in Patients with Multiple Colorectal Adenomas. *JAMA*. 2012 aug 1: p. 485-492.
177. Bouguen G, Manfredi S, Blayau M et al. Colorectal adenomatous polyposis associated with MUTYH mutations: genotype and phenotype characteristics. *Dis Colon Rectum*. 2007: p. 1612-7.
178. Lefevre JH, Rodrigue CM, Mourra N, Bennis M, Flejou JF, Parc R et al. Implication of MUTYH in Colorectal Polyposis. *Parc Ann Surg*. 2006 dec: p. 874-880.
179. Buecher B. Polyposes adénomateuses et mutations MUTYH. *Gastroenterol Clin Biol*. 2007: p. 775-8.

180. Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R et al. Germline susceptibility to colorectal cancer due to Base-Excision Repair genes defects. *Am J Hum Genet.* 2005: p. 112-9.
181. Park HW, Kim IJ, Kang HC, Jang SG, Ahn SA, Lee JS et al. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism is not associated with colorectal cancer risk. *J Epidemiol.* 2007: p. 156-160.
182. Karahalil B, Bohr VA, Wilson III DM. Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. *Hum Exp Toxicol.* 2012 oct: p. 981-1005.
183. Hung RJ, Brennan P, Canzian F, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J et al. Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2005: p. 567-576.
184. Kohno T, Kunitoh H, Toyama K, Yamamoto S, Kuchiba A, Saito D et al. Association of the OGG1-326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk. *Cancer Sci.* 2006: p. 724-728.
185. Kim JI, Park YJ, Kim KH, Song BJ, Lee MS et al. hOGG1 Ser326Cys polymorphism modifies the significance of the environmental risk factor for colon cancer. *World J Gastroenterol.* 2003: p. 956-960.
186. Xu J, Zheng SL, Turner A, Isaacs SD, Wiley K, Hawkins GA et al. Associations between hOGG1 sequence variants and prostate cancer susceptibility. *Cancer Res.* 2002 apr 15: p. 2253-7.
187. Smith CG, West H, Harris R, Idziaszczyk S, Maughan TS, Kaplan R et al. Role of the Oxidative DNA Damage Repair Gene OGG1 in Colorectal Tumorigenesis. *JNCI: Jnl of National Cancer Institute.* 2013: p. 1249-53.
188. Kinnersley B, Buch S, Castellví-Bel S, Farrington SM, Forsti A, Hampe J et al. Re: Role of the Oxidative DNA Damage Repair Gene OGG1 in Colorectal Tumorigenesis. *JNCI: Jnl of National Cancer Institute.* 2013: doi 10.1093.
189. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000: p. 136-47.
190. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad Biol Med.* 2000: p. 222-30.
191. Ribeiro ML, Priolli DG, Miranda DDC, P AD, Pedrazzoli Júnior J, Martinez CAR. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2008: p. 267-72.
192. Martinez CAR, L RM, Gambero A, Miranda DDC, Pereira JA, Nadal SR. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. *Acta Cir. Bras.* 2010: p. 387-95.
193. Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animals models. *Carcinogenesis.* 2003: p. 353-62.

194. Ames B, Shigenaga M, Hagen T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci*. 1993: p. 7915-22.
195. Ribeiro ML, Priolli DG, Miranda DDC, Arçari DP, Pedrazzoli Júnior J, Martinez CAR. Avaliação do dano oxidativo ao DNA de células normais e neoplásicas da mucosa cólica de doentes com câncer colorretal. *Rev Bras Coloproct*. 2007: p. 391-402.
196. Pilcher J. Free radicals. *Neonatal Netw*. 2002: p. 21-33.
197. Battacharya PK, Barton JK. Influence of intervening mismatches on long range guanine oxidation in DNA duplexes. *J Am Chem Soc*. 2001: p. 8649-56.
198. Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1983: p. 165-7.
199. David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*. 2007 jun 21; 447(7147): 941-50.
200. Shinwari J, Alamari A, Alanzi M, All Tassan N. Screening for variants in the MUTYH gene in Saudis. *Open Journal of Genetics*. 2011: p. 70-77.
201. Kuno T, Matsubara N, Tsuda S, Yamagishi D, Ikeuchi H, Noda M et al. Alterations of the base excision repair gene MUTYH in sporadic colorectal cancer. *ONCOLOGY REPORTS*. 2012: p. 473-480.
202. Zou H, Qing L, Xia W, Liu Y, Xi W, Wang D. Association between the OGG1 Ser326Cys polymorphism and cancer risk: evidence from 152 case-control studies. *J Cancer*. 2016: p. 1273-1280.
203. Bougatef K, Marrakchi R, Kourda N, Lahely YB, Jileni SBB, Khil HKE et al. Somatic Mutation of MutYH in Tunisian Patients With Sporadic Colorectal Câncer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2007: p. 372-374.
204. Fleischmann C, Peto J, Cheadle J, Shah B, Sampson J, Houlston RS. Comprehensive analysis of the contribution of germline MUTYH variation to early-onset colorectal cancer Authors. *International Journal of Cancer*. 2004: p. 554-558.
205. Colebatch A, Hitchins M, Williams R, Meagher A, Hawkins N, Ward R. The role of MUTYH and microsatellite instability in the development of sporadic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2006: p. 1239-1243.
206. Kohno Y, Yamamoto H, Hirahashi M. et. Al. Reduced MUTYH, MTH1, and OGG1 expression and TP53 mutation in diffuse-type adenocarcinoma of gastric cardia. *Human Pathology*. 2016; 52: 145-152.
207. Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y. et al. Reduced Expression of the DNA Glycosylase Gene MUTYH Is Associated With an Increased Number of Somatic Mutations via a Reduction in the DNA Repair Capacity in Prostate Adenocarcinoma. *Molecular Carcinogenesis*. 2017; 56: 781-788.
208. Leguisamo NM, Gloria HC, Kalil AN et al. Base excision repair imbalance in colorectal cancer has prognostic value and modulates response to chemotherapy. Leguisamo [acesso em: 31 jan. 2017]. Disponível em: www.impactjournals.com/oncotarget.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Termo de consentimento informado

Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

Eu, _____, RG _____, declaro que, de livre e espontânea vontade, permito que os dados coletados referente à patologia por mim apresentada durante o período no qual procurei o atendimento médico sejam utilizados para fins exclusivamente acadêmicos.

O(a) assinante está ciente de que:

i – O objetivo deste estudo é: AVALIAR A EXPRESSÃO TECIDUAL DOS GENES *MUTYH* E *OGG1* NOS PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO.

ii – Os dados pessoais do paciente de maneira alguma serão expostos, sendo que o caso será apresentado em total anonimato.

iii – A participação neste estudo não acarretará nenhum benefício ou malefício terapêutico.

iv – Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido relato de caso.

v – Poderá contatar o Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade São Francisco a qualquer momento, caso haja dúvidas em relação ao relato de caso, no telefone: (11) 2490-1130.

Bragança Paulista, _____ de _____ de 2010.

Nome do Paciente: _____

Assinatura: _____

Responsável pelo estudo: Dr. Enzo Fabrício Ribeiro Nascimento

Assinatura: _____

Anexo 2 – Original article

ABCD DV/1292

ABCD Arq Bras Cir Dig
2017;30(2):98-102
DOI: /10.1590/0102-6720201700020005

Original Article

TISSUE EXPRESSION OF THE GENES MUTYH AND OGG1 IN PATIENTS WITH SPORADIC COLORECTAL CANCER

Expressão tecidual dos genes MUTYH e OGG1 em doentes com câncer colorretal esporádico

Enzo Fabrício Ribeiro **NASCIMENTO**¹, Marcelo Lima **RIBEIRO**², Daniela Oliveira **MAGRO**³, Juliana **CARVALHO**⁴, Danilo Toshio **KANNO**², Carlos Augusto Real **MARTINEZ**^{2,3}, Cláudio Saddy Rodrigues **COY**³.

From the ¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP; ³Departamento de Cirurgia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP; ⁴Centro Integrado de Assistência à Saúde da Mulher, Universidade Estadual de Campinas, (1) Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas (FCM-UNICAMP), Postgraduate Program in Surgery Sciences, Campinas, SP; ²São Francisco University, Post-Graduation Program in Health Sciences, Bragança Paulista, SP; ³Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas, Department of Surgery, Campinas, SP; ⁴State University of Campinas, Integrated Center for Women's Health Care, Campinas, SP, Brazil.

HEADINGS - Colorectal cancer. Genes. DNA repair. Oxidative stress. DNA Glycosylases.

Correspondence:

Enzo Fabrício do Nascimento
E-mail: enzonascimento@uol.com.br

Financial source: none
Conflicts of interest: none

Received for publication: 12/12/2016
Accepted for publication: 14/03/2017

DESCRIPTORES - Câncer colorretal. Genes. Reparo do DNA. Estresse Oxidativo. DNA Glicosilases.

ABSTRACT - Background: MUTYH and OGG1 genes have importance in the base excision repair systems of oxidized DNA bases. Modification of the tissue expression of these genes is related to the increased risk of developing colorectal cancer. **Aim:** To evaluate the tissue expression of MUTYH and OGG1 comparing normal and neoplastic tissues of patients with sporadic colorectal cancer and to correlate it with clinical and histopathological variables. **Method:** MUTYH and OGG1 tissue expression was quantified by RT-PCR in patients with colorectal cancer and the values were compared in normal and neoplastic tissues. MUTYH and OGG1 expression was measured and normalized to the constitutive 18S gene. The level of expression of both genes was correlated with the variables: age, gender, tumor location, size of the tumor, histological type, degree of cell differentiation, invasion depth in the intestinal wall, angiolymphatic infiltration, lymph node involvement and TNM staging. **Results:** Was found downregulation of both genes in neoplastic when compared to normal tissue. There was downregulation of the MUTYH in larger tumors and in patients with angiolymphatic invasion. Tumors with more advanced TNM stages (III and IV) presented downregulation of both genes when compared to those with earlier stages (I and II). **Conclusion:** The MUTYH and OGG1 genes present downregulation in the more advanced stages of colorectal cancer.

RESUMO - Racional: Os genes MUTYH e OGG1 possuem importância nos sistemas de reparo por excisão de bases oxidadas do DNA. Modificação na expressão tecidual desses genes encontra-se relacionada ao maior risco do desenvolvimento do câncer colorretal. **Objetivo:** Avaliar a expressão tecidual dos genes MUTYH e OGG1 comparando tecidos normais e neoplásicos de portadores de câncer colorretal esporádico e correlacioná-la com variáveis clínicas e histopatológicas. **Método:** Avaliou-se por PCR, em tempo real, a expressão tecidual dos genes MUTYH e OGG1 em 49 portadores de câncer colorretal comparando tecidos normais e neoplásicos. A expressão dos genes MUTYH e OGG1 foi quantificada e normalizada com o gene constitutivo 18S. A intensidade de expressão de ambos os genes foi correlacionada as variáveis: idade, gênero, localização do tumor, tamanho do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação celular, profundidade de invasão na parede intestinal, invasão angiolinfática, linfonodos comprometidos e estadiamento TNM. **Resultados:** Encontrou-se menor expressão de ambos os genes no tecido neoplásico quando comparado ao tecido normal. Houve menor expressão do gene MUTYH nos tumores com maiores dimensões e nos doentes que apresentavam invasão angiolinfática. Tumores com estádios mais avançados (III e IV) apresentavam expressão menor de ambos os genes quando comparados àqueles com estádios mais precoces (I e II). **Conclusão:** Os genes MUTYH e OGG1 apresentam menor expressão tecidual nos estádios mais avançados do câncer colorretal.

INTRODUCTION

According to recent epidemiological inquiry, colorectal cancer (CRC) occurred in 2015, 1.4 million people worldwide being the third type of most common malignant neoplasm among men and the second among women⁹. The National Institute of Cancer (INCA) estimates that for the biennium 2016-2017 In Brazil, depending on the geographical region considered, the CRC can affect of 3.35 to 28,15/100,000 inhabitants among men and 2.09 to 29,13/100,000 inhabitants among women¹³. With the increase in life expectancy, the phenomena of globalisation at greater exposure to carcinogenic agents and, especially, the change of dietary habits it is expected that the CRC has increasing importance in the profile of mortality from cancer throughout the world considerably increasing the economic and social costs^{19,23}.

Genetic studies have shown development of sporadic CRC is an evolutionary process that involves a series of sequential mutations or modifications in the expression of genes

 This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

related to cell cycle²¹. It is already well established that the development of the CRC from the normal mucosa, is mediated by a sequence of mutations of genes controllers of cell cycle (the proliferation, differentiation, apoptosis and DNA repair)^{8,30}. Mutations in these genes can confer additional advantages for growth of tumor tissue in relation to normal tissue¹⁹.

Although the initial phenomena of colorectal carcinogenesis are still a reason for constant research, it has been demonstrated that DNA damage caused by reactive oxygen species (ROS) is related to the development of CRC^{34,27,31,20,4}. The ROS are produced in large quantities in chronic inflammatory processes affecting the intestinal epithelium. These radicals induce persistent damage to DNA and, if they are not readily inhibited by antioxidant systems can cause mutations related to the development of the CRC¹⁶. One of the mechanisms of DNA damage to more well-studied relates to the oxidation of the base fertilization guanine, forming the 8-oxoguanine (8-oxoG). The 8-oxoG is a highly oxidized mutagenic capable of causing transversions of CC→TA tapes of DNA allowing, if not repaired, the appearance of mutations. When these mutations compromise tumor suppressor genes or oncogenes may arise a clone of cells with proliferative autonomy and uncontrolled growth, changes inherent to the neoplastic cells³¹.

It is already well established that the oxidation of bases of DNA allows for the development of the CRC and that removal of these databases oxidized is vital to avoid the appearance of mutations²⁶. A chronic imbalance between the mechanisms of damage and DNA repair increases the risk of genomic instability and, therefore, it is important to understand the mechanisms by which the repair systems that remove the oxidized bases of DNA present in the genome. For both, living organisms have specific genes to correct the errors of matching caused by oxidative stress. The system of excision of bases (BER) is the primary way to repair DNA responsible for correction of oxidized bases, having a fundamental role in preserving the integrity of the DNA submitted to the deleterious action of ROS^{28,24}. Among all the genes involved in repairing and removing the 8-oxoG, genes MUTHY and OGG1, components of the system BER, have a prominent role. These genes encode DNA-glicosilases which has the function of removing the oxidized bases paired erroneously, ensuring the maintenance of the integrity of the tapes of DNA. Recent studies suggest that patients with CRC have lower expression of genes OGG1 and muthy in tissue cancer when compared to normal tissues suggesting that these systems operate without a disability³³. However, the correlation between the level of tissue expression and clinical variables and histopathological were still little studied³³. The objective of this study was to evaluate the tissue expression of genes MUTHY and OGG1 in normal tissue and neoplastic patients with CRC sporadic and correlate it to the main clinical and histopathological.

METHOD

This study was submitted to and approved by the Research Ethics Committee at the Universidade São Francisco in Bragança Paulista (Project No. 0235.0.142.000-07). All patients who have provided biological material for the present study signed an informed consent form agreeing to participate in all stages, and were informed of the purpose of the research.

Casuistry

Were studied prospectively 49 patients being 26 (53%) women with an average age of 65.8±11.3 years, suffering from adenocarcinoma of the colon and rectum, surgery with curative intent. Were excluded by means of criteria of clinical and endoscopic patients suspected of hereditary CRC (adenomatous polyposis familial syndrome and Lynch), sick undergoing treatment neoadjuvant chemoradiation

therapy, patients with CRC associated with inflammatory bowel disease, less than 18 years, sick submitted to surgical treatment in urgent circumstances, and those who refused to participate in the study. The patients selected for the study were submitted to clinical staging, laboratory and imaging examinations in accordance with the guidelines recommended by the American Society of Colorectal Surgeons⁵.

Sample collection

Immediately after the removal of the surgical specimen were collected fragments of tissue obtained from the mucosa normal colic (at least 10 cm from the proximal margin of the lesion), and the periphery of the neoplastic lesion. After collection, the fragments were identified with the record of the patient name, date and place of where they had been collected. The fragments were placed in tubes suitable for storage in ultra-cooling and immediately stored at -80° C until the time of processing. The data, epidemiological, clinical and pathological findings were obtained from medical records. Histopathological data such as location of the tumor, macroscopic aspect of the tumor, lesion size, histological type, degree of cellular differentiation, depth of invasion in the intestinal wall, presence of lymphatic invasion or perineural, number of lymph nodes resected, number of lymph nodes involved, reason of lymph nodes involved and staging TNM were extracted from the histopathological report prepared by a single pathologist with expertise in colorectal neoplasia. The staging of tumors followed the TNM Classification according to the 6th edition proposed by the UICC (International Union of Cancer Control). All the sick were treated at the outpatient clinic of a colorectal neoplasia of Hospital Universitário São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brazil, by the same professional.

Extraction of RNA and RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction)

Total RNA was isolated using the kit of tissue RNeasy (Qiagen). The purity was assessed using the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The single strand of cDNA was synthesized from RNA using the kit for high capacity storage of cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's protocol.

Quantitative PCR was performed using a system of 7500 real time PCR (Applied Biosystems) using the numbers of cycles limit determined by the software RQ Study (Applied Biosystems). The reactions were racing in triplicate, and the numbers of cycle threshold were considered by the average. The mixture of the reaction containing a total of e 50µl It was prepared as follows: 25 µl SYBR Green™, PCR SuperMix UDG (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, EUA), 10 mM for each primer (Table 1), e 1 µl de cDNA (100 ng). The first cycle was performed with a preliminary treatment with UDG for 2 min at 50° C and denaturation by more 2 min to 95° C, followed by 45 cycles of denaturation at 95° C for 15s, annealing at 60° C for 15 s and extension of the primer at 72° C during 15 s. This step was followed by an analysis of melting points of amplification products of dual tape consisting of 40 cycles of 1° C decreased (15 s each) starting at 95° C. The first derivative of this map, dF/dT, represents the rate of change of fluorescence in the reaction. A significant change in the fluorescence occurs at the point of fusion of free dual chain found in the PCR. A map of dF/dT as a function of temperature shows these changes as distinct peaks.

The expression of genes MUTHY and OGG1 expression was measured and normalized for the gene incorporation 18S, which showed a constant expression in all samples tested. The expression on was calculated according to the formula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. And the results were expressed as mean of expression of the gene ±EP

TABLE 1- Primers used for RT-PCR (attachment)

Gene	Sequence (5'-3')
18S	CGCGTTCTATTGTGGT CGGTCCAAGATTCACCTC
MUTYH	CCTGTGGGACCTTATGCT CCTTTGGAACCTTCTGCT
OGG1	CCTGTGGGACCTTATGCT CCTTTGGAACCTTCTGCT

Statistical analysis

Were performed using statistical software version 13.0 SPSS (SPSS, Chicago, IL). The values found for the expression of the genes in the normal tissues and in the considered variables were identified by descriptive statistics and expressed as the average expression of the gene with its respective standard error. The comparison of the gene expression between the normal and neoscopic tissues, as well as between the proposed variables was performed using the parametric Mann-Whitney test. Values of $p \leq 0.05$ were significant values obtained in the comparison between normal and neoplastic tissues were identified with a cross (*), while the values obtained comparing the stratifications between the clinical and histopathological variables with an asterisk (*).

RESULTS

Population of patients

Table 2 shows the distribution of the sample in relation to the variables considered in the study.

TABLE 2 - Relationship of the variables studied

Characteristics	Number of Patients (%)
Genre	
Male	23/49 (47%)
Female	26/49 (53%)
Age	
41-51 years	5/49 (10%)
52-62 years	9/49 (19%)
>63 years	35/49 (71%)
Location	
Colon	17/49 (35%)
Rectum	32/49 (65%)
Tumor size	
≤ 3 cm	14/30 (47%)
> 3 cm	16/30 (53%)
Histological type	
Usual	47/49 (96%)
Mucoproduitor	2/49 (4%)
Degree of cell differentiation	
Good	5/49 (10%)
Moderately	38/40 (78%)
Little	6/49 (12%)
Degree of invasion of the intestinal wall	
T1 - T2	38/49 (78%)
T3 -T4	11/49 (22%)
Resected lymph nodes	
≤12	27/49 (55%)
> 12	32/49(65%)
compromised lymph nodes	
N0	29/49 (59%)
N1-N2	20/49 (41%)
Reason for compromised lymph nodes	
0 - ≤ 10%	24/49 (49%)
> 11% - ≤ 20%	7/49 (14%)
> 21%	18/49 (37%)
Angiolymphatic invasion	
Yes	17/49 (35%)
No	32/49 (65%)
Perineural Invasion	
Yes	27/49 (55%)
No	22/49 (45%)
Staging TNM	
I and II	19/49 (39%)
III and IV	30/49 (61%)

Table 3 shows the expression of genes MUTYH and OGG1 with respect to the characteristics of the studied samples, as well as between the normal tissue and neoplastic, considering only the variables where there was a statistically significant difference in one of the genes.

TABLE 3 - Gene expression OGG1 and MUTH according to the characteristics of the sample

Characteristic	OGG1	Gene	
		MUTYH	
Fold induction	Tumor/Normal	0.28 ± 0.12 ⁺	0.41±0.02 ⁺
Location	Cólon	1.09 ± 0.38	0.69 ± 0.34
	Reto	0.48 ± 0.02*	0.50 ± 0.10
Tumor size	≤ 3cm	0.21±0.05	0.36±0.08*
	> 3cm	0.22±0.05	0.13±0.02
Angiolymphatic invasion	Sim	0.24 ± 0.04	0.30 ± 0.09*
	Não	0.29 ± 0.09	0.89 ± 0.11
TNM (Stadium)	I – II	0.49 ± 0.12	0.78 ± 0.20
	III - IV	0.16 ± 0.08*	0.33 ± 0.07*

⁺ = $p < 0.05$ When compared to normal tissue; ** $p < 0.05$ When comparing the characteristics

DISCUSSION

The human genome is particularly vulnerable to oxidative stress. The ROS in the cells of the mucosa colic are formed as products of the normal aerobic metabolism or as a result of exposure of the cells to ionizing radiation, chemicals, ischemia, inflammation acute and chronic or, even, for the simple modification in the supply of energy substrate to normal colonocytes represented by short-chain fatty acids^{20,12}. As they are electrophilic molecules with the ability highly reactive, ROS attack substances with high electron density such as the nitrogenous bases that make up DNA³. These radicals can cause breakage single or double quote in the tapes of the DNA or oxidize their nitrogenous bases allowing for the development of errors of matching and, consequently, the development of mutations^{7,2}. When we consider the environmental factors related to the development of the CRC, studies have shown that oxidative stress is one of the main mechanisms responsible for the appearance of mutations related to the development of the disease^{6,2}. It has been demonstrated that the chronic inflammation and continuously in the intestinal mucosa, as occurs in the intestinal inflammatory diseases, increasing the production of ROS, increases the possibility of developing of CRC³¹. Further strengthens this possibility the results of studies showing that the levels of oxidative stress in the neoplastic tissue of patients with CRC is significantly higher when compared to the normal tissue^{26,27}.

The oxidative damage most often caused in the DNA by exposure to the RLO is the formation of 8-oxoG. The neoplastic tissue of patients with CRC has on average two times more 8-oxoG when compared to normal mucous¹⁷.

In order to correct the errors of matching caused by 8-oxoG and prevent the emergence of mutations, the body has different systems of DNA repair. The system BER is the main responsible for excision of oxidized bases²². The genes MUTYH, OGG1, MTH1, NEIL1, APEX1, PARP1, LIG3, MGP e NTHL1 are the main components of the system BER.

The genes MUTYH It is located on the short arm of chromosome 1 (1p32-34) and has 16 exons. Encodes a DNA-ung formed by 535 amino acids with a molecular weight of 39 kD, called MUTHY ung that operates in the DNA-glycosylase repair by excision of bases. During DNA duplication, the adenine base was usually matched to thymine (A-T), while guanine matched with the cytosine (C-G). During normal cellular aerobic metabolism or in situations that cause the increase of ROS production, the oxidation of guanine can occur to 8-oxoG. This oxidized base matched quickly and erroneously with adenine

instead of cytosine. MUTY-glycosylase acts by removing from the DNA strand adenine bases poorly coupled with 8-oxoG. The enzyme corrects this error so that the development of mutations by type G:C>T:A which can lead to tumor formation if they compromise cell cycle controlling genes. The importance of mutations in the MUTYH gene in colorectal carcinogenesis was highlighted by the Al-Tassan et al. In 2002, where the authors demonstrated for the first time, individuals from the same family who presented biallelic germline mutations in the MUTYH gene and who had recessive forms of familial adenomatous polyposis (FAP), associated with the development of colorectal adenomas presenting progression to CRC in age when compared to the classic forms of FAP¹. When analyzing the neoplastic tissues of these patients they found a high index of transversions of the type G:C>T:A in commonly mutated genes in the CRC (APC e K-RAS). Later, other authors confirmed these findings showing that mutations in the MUTYH gene, reducing the effectiveness of the BER system, predisposes to the appearance of CRC^{1,14,15}.

The OGG1 gene is located on the short arm of the chromosome 3 (3p25.3). It consists of 12 exons and encodes the enzyme 8-oxoguanine glycosylase. It is estimated that the enzyme contains 424 amino acids in its molecule and molecular weight of 47kD²⁵. It was demonstrated that the gene OGG1 has an essential role in repairing BER correcting transversions G:C>T:A. The enzyme transcribed, promotes the hydroxylation of connections glicosílicas formed between the 8-oxoG and the fraction of sugar from the basis of fertilization, removing the molecule of 8-oxoG and forming a site apurinic on tape of DNA that after the excision is subsequently filled with the correct fertilization. By its fundamental role in the system BER, mutation and polymorphisms in the gene OGG1 are considered events that increase the susceptibility to various forms of cancer. Studies have shown that reducing the activity of the gene could contribute to the development of CRC³².

A considerable number of hereditary CRC shows genetic or epigenetic genes defects on the system repair. The possibility that also occur changes in the system BER in the CRC sporadically is a plausible hypothesis. So, the research profile of expression of genes of the system BER related to correction of oxidized bases comparing normal tissue and neoplastic, can improve the understanding of the role of these genes in patients with sporadic CRC³². Previous studies have demonstrated that there is less efficiency of the system BER in patients with CRC when compared to healthy volunteers^{15,33}. However, the mutations of the MUTYH gene and OGG1 in patients with sporadic CRC are not frequent and are influenced by the ethnic group studied^{14,15,33}. Thus, in order to evaluate the mutations in these genes it is necessary to study a large contingent of patients belonging, if possible, the same ethnicity. A study evaluating the importance of mutations in the MUTYH to examine their prevalence in polish ethnicity found that among 1042 patients only 0.4% of the patients had a mutation biallelic associated with the development of adenomas and CRC¹⁵. Other authors by analyzing the contribution of mutations in germ MUTYH in the development of the CRC have evaluated 358 patients were not selected¹⁰. They found two patients (0.6%) with germ mutations biallelics and eight (2.2%) monoallelics mutations in the gene MUTYH. Patients with biallelic mutation had multiple adenomas, but not adenomatous polyposis profuse and, in both cases, the tumors were located in the distal colon. These results suggest that mutations biallelics of gene despite increasing the formation of adenomas and, consequently, the chance of developing cancer is likely to represent less than 3% of cases of sporadic CRC¹⁰.

This study evaluated the expression of tissue several genes of the system BER and the ability to repair DNA of these genes by comparing normal tissue and neoplastic and correlating them with clinical variables and pathological³². The authors found that the expression of tissue gene OGG1 was significantly lower in tissues, neoplastic while the gene MUTYH

showed no significant differences. They found that, to relate the expression of genes OGG1 and MUTYH when gender, age, location of the tumor histological grade stadiums of the TNM classification (I+II+X+II+IV) found no significant differences³². In Brazil, only one study evaluated the behavior of the gene OGG1 in patients with sporadic CRC²⁹. Using samples from the same population of patients the authors found a lower expression of OGG1 in tumoral tissue²⁹. With regard to location of the tumor identified lower gene expression only in patients with cancer of the rectum and in tumors with more advanced stages²⁹.

In the present study we found similar results. When evaluating the expression of OGG1 we found reduced expression in tumor tissue, similar to the studies previously cited^{32,29}. We also found a reduction in the tissue expression of the gene in patients with tumors located in the rectum and in patients classified in more advanced stages of the disease. With respect to expression of the gene MUTYH, despite being lower in neoplastic tissue, we found no statistically significant differences (p=0.06). It is possible that these values could present significant differences if they were included a larger number of patients. When you relate gene expression MUTYH with variables selected for the present study found that there was less expression of the gene in tumors that had diameter greater than 3 cm, in presenting angiolymphatic invasion and those classified in the more advanced stages (T3-T4) of the TNM classification. These findings suggest that the lower expression in these patients may contribute to the worse prognosis of the disease, since it is related to variables that confer a worse prognosis of the disease.

When we consider the results of the present study, and having science that there is a higher degree of oxidative stress in tissues neoplastic, it is possible that the lower expression of genes OGG1 and MUTYH in tumor tissue, as well as in the variables related to a worse prognosis of the disease, may occur due to the accumulation epigenetic mutations or hypermethylation in these genes by reducing their capacity to repair and favoring the development of a phenotype more aggressive as shown above¹¹. The hypermethylation of the promoter region of genes that make up the system BER has been found in a variety of tumors (thyroid, bladder, ovaries, the brain as well as in the CRC)¹⁸.

Considering that genes OGG1, MUTYH, PARP-1 and XRCC1 are part of the same repair system (BER) it is possible that the presence of polymorphisms in these genes may interfere with their tissue expression. Recent study evaluating the influence of the APE1 T2197G polymorphism (asp148Glu) showed that this alteration interferes in the expression of the genes of the BER system when comparing normal and neoplastic tissues. The results found in the present study not only confirm previous results but also reinforce the importance of repair integrity by excision of bases in the etiopathogenesis and progression of sporadic CRC.

CONCLUSION

The MUTYH and OGG1 genes present downregulation in the more advanced stages of colorectal cancer.

REFERENCES

1. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet.* 2002;30(2):227-32.
2. Ames BN, Shinegawa MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(17):7915-22.
3. Battacharya PK, Barton JK. Influence of intervening mismatches on long range guanine oxidation in DNA duplexes. *J Am Chem Soc.* 2001;123(36):8649-56.
4. Boiteux S, Radicella P. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2000;377(1):1-8.

ORIGINAL ARTICLE

5. Chang GJ, Kaiser AM, Mills S, Rafferty JF, Bui WD, on behalf of Standards Practice Task Force of American Society of Colon and Rectal Surgeons. *Dis Colon Rectum*. 2012; 55(8):831-43.
6. Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:915-48.
7. Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biol Med*. 1991;10(3-4):225-42.
8. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
9. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136(5): 359-86.
10. Fleischmann C, Peto J, Cheadle J, Shah B, Sampson J, Houlston RS. Comprehensive analysis of the contribution of germline MYH variation to early-onset colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2004;109(4): 554-8.
11. Gao D, Herman JG, Guo M. The clinical value of aberrant epigenetic changes of DNA damage repair genes in human cancer. *Oncotarget*. 2016;7(24):37331-46.
12. Hwang BJ, Shi G, Lu AL. Mammalian MutY homolog (MYH or MUTHYH) protects cells from oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2014; 13:10-21.
13. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2016. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID2>. Acesso em: 18 out. 2016.
14. Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, et al. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum Mol Genet*. 2002;11(23):2961-7.
15. Kabzinski J, Mucha B, Cuchra M, Markiewicz L, Przybyłowska K, Dzik A, et al. Efficiency of base excision repair of oxidative DNA damage and its impact on the risk of colorectal cancer in the Polish population. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 3125989.
16. Kidane D, Chae WJ, Czochor J, Eckert KA, Glazer PM, Bothwell AL, et al. Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014; 49(2):116-39.
17. Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M, Slupphaug G. Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett*. 2000; 476(1-2):73-77.
18. Lahtz C, Pfeifer GP. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J Mol Cell Biol*. 2011; 3(1): 51-8.
19. Malheiros APR, Teixeira MG, Habr-Gama A, Alcântara PSM. Resultados do tratamento cirúrgico do câncer colorretal em doentes de idade até 64 anos e de 65 anos ou mais. *Rev. bras Coloproct*. 2005; 25:128-36.
20. Martinez CA, Ribeiro ML, Gambero A, Miranda DD, Pereira JA, Nadal SR. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. *Acta Cir Bras*. 2010;25(5):387-95.
21. Martinez CAR, Cordeiro AT, Priolli DG, Miranda DDC, Bartchewsky Junior W, Margarido NF, et al. Avaliação da expressão tecidual do gene de reparo MLH1 e dos níveis de dno oxidativo ao DNA em doentes com câncer colorretal. *Rev. bras. colo-proct*. 2009;29(3):303-13.
22. Mol CD, Parikh SS, Putnam CD, Lo TP, Tainer JA. DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1999; 28:101-28.
23. Nahas, SC, et al. Prognostic factors of surgically-treated patients with cancer of the right colon: a ten years' experience of a single university institution. *ABCD, arq. bras. cir. dig.*, 2015; 28(1):3-7. ISSN 0102-6720.
24. Peterson CL, Cote J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev*. 2004; 18(6): 602-16.
25. Radicella JP, Dherin C, Desmaze C, Fox MS, Boiteux S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 1997; 94(15): 8010-15.
26. Ribeiro ML, Priolli DG, Miranda DCC, Arçari DP, Pedrazzoli Júnior J, Martinez CAR. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2008;7(4):267-72.
27. Ribeiro ML, Priolli DG, Miranda DDC, Paiva DA, Pedrazzoli Júnior J, Martinez CAR. Avaliação do dano oxidativo ao DNA de células normais e neoplásicas da mucosa cólica de doentes com câncer colorretal. *Rev bras. colo-proctol*. 2007; 27(4):391-402.
28. Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. DNA repair in mammalian cells: base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(6):981-3.
29. Santos JC, Funck A, Silva-Fernandes IJL, Rabenhorst AHB, Martinez CAR, Ribeiro ML. Effect of APE1 T2197G (Asp148Glu) polymorphism on APE1, XRCC1, PARP1 and OGG1 expression in patients with colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2014; 15:17333-17343.
30. Schumutte C, Yang AS, Nguyen TT, Beart RW, Jones PA. Mechanisms for the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 1996;56(10):2375-81.
31. Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in human and animals models. *Carcinogenesis*. 2003;24(3):353-62.
32. Slysokva J, Korenkova V, Collins AR, Prochazka P, Vodickova L, Svec J, et al. Functional genetic and epigenetic aspects of base nucleotide excision repair in colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5878-87.
33. Slysokva J, Naccarati A, Pardini B, Polakova V, Vodickova L, Smerhovský Z, et al. Differences in nucleotide excision repair capacity between newly diagnosed colorectal cancer patients and healthy controls. *Mutagenesis*. 2012; 27(4):225-32.
34. Wheeler JM. Epigenetics, mismatch repair and colorectal cancer. *Ann R Col Surg Eng*. 2005;87(1):15-20.
35. Zou H, Li Qing, Xia W, Liu Y, Xi W, Wang D. Association between the OGG1 Ser326Cys polymorphism and cancer risk: evidence from 152 case-control studies. *J Cancer*. 2016; 7(10):1273-1280.

Anexo 3 – Pareceres do Comitê de Ética e Pesquisa

ARTIGO

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 27 de Março de 2008.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: - AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO E PROTEÍNAS DE REPARO DO DNA DE CÉLULAS NORMAIS E NEOPLÁSTICAS DA MUCOSA CÓLICA DE DOENTES COM CANCER COLORRETAL.

Autor(es): Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez, Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro, acadêmica Adriana Teixeira Cordeiro.

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo CAAE: 0235.0.142.000-07 (Este nº. deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, em reunião ordinária em 27/03/2008, analisou *as pendências* do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: *APPROVADO*

Atenciosamente,


Marcelo Lima Ribeiro
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 212 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1625
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cjra D'Ans CEP 13045-270 (19) 3779-3303
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933

TESE

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 20 de Outubro de 2011

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Avaliação da expressão tecidual do gene MYH em pacientes portadores de câncer colorretal esporádico.

Curso: Medicina

Grupo: II

Autor (es): Prof. Claudio Saddy Rodrigues Coy; Prof. Carlos Augusto Real Martinez; Enzo Fabricio Ribeiro Nascimento

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo CAAE: 0430.0.142.146-11

Prezado (a) (s) Pesquisador (a) (s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião extraordinária dia **20/10/2011** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Atenciosamente,

Marcelo Lima Ribeiro
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - USF
Universidade São Francisco

Ao término do desenvolvimento do estudo o (a) pesquisador (a) responsável deverá enviar ao CEP-USF o relatório consolidado de conclusão do mesmo.

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA	Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS	Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Ars CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA	Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO	Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036