

Alexandre Funck

AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO
AO DNA EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL

Bragança Paulista, SP

2014

Alexandre Funck

AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO
AO DNA EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL

ORIENTADOR

PROF. DR. MARCELO L RIBEIRO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista, SP

2014

WI 529 Funck, Alexandre.
F977a Avaliação do padrão de expressão de genes de reparo ao DNA
em pacientes com câncer colorretal / Alexandre Funck -- Bragança
Paulista, 2014.
62 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São
Francisco.

Orientação de: Marcelo Lima Ribeiro.

1. Neoplasias colorretais. 2. Reparo do DNA.
3. Polimorfismo. I. Ribeiro, Marcelo Lima. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

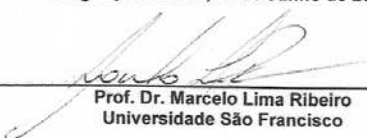
Diretoria Acadêmica de Pós Graduação
Programa de Pós-Graduação Stricto-Sensu
Mestrado em Ciências da Saúde
Credenciado pela CAPES
Portaria Ministerial nº 2.000
DOU 21/12/06 -Seção I - p.35-36



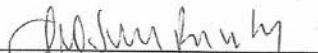
Ata de Arguição Final da Tese do Aluno
Alexandre Funck

Aos vinte e sete dias do mês de junho do ano de dois mil e quatorze, às quatorze horas, nas dependências da Universidade São Francisco, reuniu-se a Comissão da Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, para avaliação da tese intitulada "*Avaliação do padrão de expressão de genes de reparo ao DNA em pacientes com câncer colorretal*", apresentada pelo aluno, **Alexandre Funck** mestre em Ciências da Saúde, pela Universidade São Francisco, que concluiu os créditos exigidos para a obtenção do Grau de "Doutor em Ciências da Saúde" segundo os registros constantes na Secretaria de Campus de Bragança Paulista. Os trabalhos foram instalados às quatorze horas, pelo Professor Dr. Marcelo Lima Ribeiro, orientador e presidente da Banca Examinadora, constituída pelos seguintes Professores: Professor Sergio de Mendonça, Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Campinas, Professor Cláudio Saddy Rodrigues Coy, Doutor em Ciências da Cirurgia Universidade Estadual de Campinas, Professor Carlos Augusto Real Martinez, Doutor em Gastroenterologia Cirurgica pelo Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual, professor Lúcio Fabio Caldas Ferraz, doutor em Genética e biologia Molecular pela Universidade Estadual de Campinas. A Banca Examinadora tendo decidido aceitar a tese, passou à Arguição Pública do candidato. Encerrados os trabalhos às 16:50 horas, os examinadores, consideraram o candidato aprovado estando apto a receber o título de "Doutor em Ciências da Saúde". E, para constar, eu Professor Doutor Marcelo Lima Ribeiro lavrei a presente Ata, que assino juntamente com os demais membros da Banca Examinadora.


Bragança Paulista, 27 de Junho de 2014.



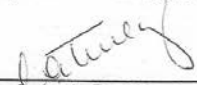
Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro
Universidade São Francisco



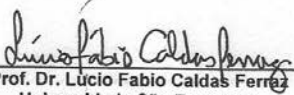
Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy
Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Sérgio de Mendonça
Universidade Bandeirante Anhanguera



Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Lúcio Fabio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco

Obs.:

Campus Bragança Paulista Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825
Campus Campinas - Unidade Cambui R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambui - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370
Campus Campinas - Unidade Swift R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321
Campus Itatiba R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015
Campus São Paulo R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do O - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus amados pais, João (*in memoriam*) e Elizeth, além de minha querida irmã Patrícia Funck.

Ao professor Dr. Marcelo L. Ribeiro pela excelente orientação e a todos os professores que contribuíram na minha formação.

Ao professor Dr. Carlos Augusto Martinez pelo fornecimento das amostras biológicas utilizadas neste trabalho e a toda equipe do laboratório de biologia molecular pelo apoio nos experimentos.

Obrigado.

“A ciência sem a religião é manca; a religião sem a ciência é cega”.

Albert Einstein

RESUMO

O câncer colorretal é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo e a quarta causa de morte mais frequente por câncer. Este tipo de câncer é caracterizado por falhas no sistema de reparo ao DNA culminando com o acúmulo anormal de mutações, e assim fazendo com que as células da mucosa do cólon proliferem e se dupliquem de forma descontrolada gerando tumores. O sistema de reparo do DNA tem papel fundamental na manutenção da estabilidade genômica evitando o surgimento dessas mutações. Além disso, polimorfismos em genes de reparo podem gerar insuficiência de proteínas e contribuir com risco de desenvolvimento de câncer colorretal. O polimorfismo 135G>C no gene *RAD51* está relacionado com a estabilidade e tradução do mRNA e como resultado, uma menor expressão do gene *RAD51* o que restringe a capacidade de reparar quebras em fita dupla ao DNA. Adicionalmente, o polimorfismo -93G>A no gene *MLH1* têm sido associado com maior risco de desenvolvimento de câncer colorretal pelo fato de estar localizado na região promotora do gene, num potencial sítio de ligação de fatores de transcrição podendo então interromper a transcrição e expressão de *MLH1*, diminuindo a eficiência do reparo ao DNA. O polimorfismo Asp148Glu no gene *APE1* está relacionado ao risco de câncer colorretal pelo fato de reduzir a capacidade da proteína se comunicar com as demais proteínas do sistema de reparo BER e desempenhar um reparo eficiente ao DNA. Visto isso, esse estudo analisou o padrão de expressão e o efeito destes polimorfismos em amostras normais e tumorais de pacientes com câncer colorretal. Os resultados obtidos indicam uma redução significativa na expressão de *APE1*, *OGG1* e *MLH1* e um aumento significativo na expressão de *ERCC1*, *XRCC1* e *XRCC3* em amostras tumorais quando comparada às suas contrapartidas normais. Além disso, houve uma alteração na expressão dos genes avaliados dependendo da localização do tumor (cólon ou reto). Os genes *RAD51*, *XRCC3* e *MLH1* também tiveram uma repressão significativa em amostras de pacientes que tinham algum grau de invasão do tumor em outros órgãos. De forma complementar, aqueles pacientes que estavam em um estágio mais avançado do tumor (III e IV) tiveram uma redução significativa nos genes *APE1*, *ERCC2*, *OGG1*, *RAD51*, *XRCC3* e *MLH1*. Em relação aos polimorfismos estudados, o genótipo heterozigoto (GC) e o alelo variante (CC) de *RAD51* foram significativamente relacionados a uma redução na expressão nos genes do sistema DSB, assim como o alelo variante (GG) do gene *APE1* reduziu também de forma significativa, a expressão dos genes de reparo BER (*APE1*, *XRCC1* e *PARP1*). Por fim, o genótipo mutante (AA) de *MLH1* foi associado a uma redução significativa na expressão deste gene. Os achados desse estudo, portanto, oferecem uma contribuição relevante na gênese do câncer colorretal ao associar o perfil genotípico de genes que afetam negativamente a capacidade do sistema de reparo ao DNA e sugerem que os polimorfismos analisados possam contribuir para a susceptibilidade individual agindo com um fator de risco para o câncer colorretal.

Palavras-chave: Câncer Colorretal, Sistema de Reparo ao DNA, Polimorfismos.

ABSTRACT

Colorectal cancer is the third most common type of cancer worldwide and the fourth most frequent cause of cancer death. This type of cancer is characterized by a DNA repair system faulty culminating in the abnormal accumulation of mutations, and thus causing the cells of the colonic mucosa duplicate and proliferate uncontrollably generating tumors. The machinery of DNA repair plays a key role in maintaining genomic stability avoiding the emergence of these mutations. Additionally, polymorphisms in repair genes may generate proteins insufficiency and contribute to risk of developing colorectal cancer. Specifically, the location of polymorphisms 135 G>C of *RAD51* gene is related to the stability and translation of mRNA and as a result, a lower expression of the *RAD51* gene which restricts the ability to repair the breaks in double stranded DNA. Furthermore, the - 93 G>A polymorphism in the *MLH1* gene have been associated with increased risk of developing colorectal cancer by the fact of being located in the promoter region of the gene, a potential binding site for transcription factors can then interrupt the transcription and expression of *MLH1* decreasing the efficiency of DNA repair. The Asp148Glu *APE1* gene polymorphism is related to risk of colorectal cancer because of reducing the ability of the protein to communicate with the other proteins of the BER repair system and play an efficient DNA repair. Seen it, this study examined the expression pattern and the effect of these polymorphisms in normal and tumor samples from patients with colorectal cancer. The results indicate a significant decrease in expression of *APE1*, *OGG1* and *MLH1* and a significant increase in the expression of *ERCC1*, *XRCC1* and *XRCC3* in tumor samples compared to their normal counterparts. In addition, there was a change in gene expression depending on the tumor location (colon or rectum). The *RAD51*, *XRCC3* and *MLH1* genes also had a significant repression in samples from patients who had some degree of tumor invasion into other organs. In a complementary way, those patients who were in a more advanced tumor stage (III and IV) had a significant reduction in *APE1*, *ERCC2*, *OGG1*, *RAD51*, *XRCC3* and *MLH1* genes. Regarding the polymorphisms, the heterozygous genotype (GC) and the variant allele (CC) of *RAD51* were significantly related to a decrease in gene expression in the DSB system, as well as the variant allele (GG) of the gene *APE1* also reduced significantly the expression of genes of BER repair system (*APE1*, *XRCC1* and *PARP1*). Finally, the mutant genotype AA of *MLH1* was associated with a significant decrease in expression of this gene. Our findings thus provide an important contribution in genesis of colorectal cancer by combining the genotypic profile of genes that negatively affect the ability of the DNA repair machinery and suggest that the analyzed polymorphisms may contribute to individual susceptibility acting with a factor risk for colorectal cancer.

Key words: Colorectal cancer, DNA repair, DNA polymorphisms

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-oxoG - 8-oxoguanine

APC - *adenomatous polyposis coli*

APE1 - AP *endonuclease*

ATM - *ataxiatangiectasia mutated*

ATR - ATM-Rad3-*related*

BER - *base excision repair*

C_t - *threshold cycle*

DCC - *Deleted in colorectal cancer*

DNA-PK - DNA-*dependent protein kinase*

dNTP - *deoxinucleotídeos tri-fosfato*

DSBR - double-strand break repair

ERCC1 - *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 1*

ERCC2- *Excision repair cross-complementing 2*

ERCC4 - *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 4*

FAP - *familial adenomatous polyposis*

HNPCC – *hereditary non-polyposis colorectal cancer*

HR - *homologous recombination*

INCA - *Instituto Nacional do Câncer*

K-RAS - *rat sarcoma*

LOH - *loss of heterozygosity*

MGMT - *O6-Methylguanine DNA methyltransferase*

MLH1 - *mutL homolog 1*

MLH3 - *mutL homolog 3*

MMR - *misMatch Repair*

MSH2 - *mutS homolog 2*

MSH3 - *mutS homolog 3*

MSH6 - *mutS homolog 6*

MSI - *microsatellite instability*

NAD - *2-oxoaldehyde dehydrogenase*

NCBI - *National Center of Biotechnology Information*

NER - *base excision repair*

NHEJ - *recombinação não-homóloga*

OGG1 - *8-oxoguanine DNA glycosylase*

PARP-1 - *Poly(ADP-ribose) polymerase-1*

PCR - *polymerase chain reaction*

PI3K - *phosphatidylinositol 3-kinase*

PMS1 - *postmeiotic segregation increased 1*

PMS2 - *postmeiotic segregation increased 2*

PNK - *polynucleotide kinase*

qPCR - *quantitative polymerase chain reaction*

RAD51 - *RAD51 recombinase*

RFLP - *restriction fragment length polymorphism*

RNAPII - *RNA polimerase II*

SNPs - *single-nucleotide polymorphism*

UDG - *uracil-DNA Glicosilase*

UTR - *untranslated Region*

XPA - *xerodermapigmentosum, complementation group A*

XRCC1 - *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*

XRCC3 - *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – *Primers* utilizados para análise da expressão gênica

Tabela 2 – Características dos polimorfismos dos genes estudados.

Tabela 3 – Níveis de expressão dos genes de reparo ao DNA associados às diferentes características histopatológicas.

Tabela 4 – Níveis de expressão do gene *MLH1* associados aos genótipos de *MLH1*.

Tabela 5 – Níveis de expressão dos genes de reparo DSB correlacionado aos genótipos de *RAD51*.

Tabela 6 – Níveis de expressão dos genes de reparo BER correlacionado aos genótipos de *APE1*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Os 20 tipos de câncer mais comumente diagnosticado no mundo, segundo estimativas de 2008.

Figura 2 – Incidência de câncer colorretal no mundo e taxa de mortalidade para o sexo masculino e feminino.

Figura 3 – Eventos genéticos associados ao desenvolvimento de câncer colorretal.

Figura 4 – Representação esquemática da via de reparo DSB.

Figura 5 – Representação esquemática da via de reparo MMR.

Figura 6 – Representação esquemática das via de reparo BER.

Figura 7 – Representação esquemática das vias de reparo NER.

Figura 8 - Exemplos de fragmentos de restrição em géis de poliacrilamida.

Figura 9 – Aspectos clinico-patológicos dos pacientes com câncer colorretal.

Figura 10 – Distribuição dos pacientes com câncer colorretal em relação ao estadiamento dos tumores.

Figura 11–Frequência genotípica dos polimorfismos nos genes de reparo *MLH1*, *RAD51* e *APE1* nos casos de câncer colorretal estudados.

Figura 12– Frequências genotípicas dos genes *MLH1*, *RAD51* e *APE1* por faixa etária.

Figura 13 – Frequência genotípica dos genes *MLH1*, *RAD51* e *APE1* de acordo com a localização do tumor.

Figura 14 – Frequência genotípica dos genes *MLH1*, *RAD51* e *APE1* nos diferentes estadios do tumor.

Figura 15 – Modelo proposto para efeito do polimorfismo -93G>A no silenciamento de *MLH1*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CÂNCER COLORRETAL	1
1.1.1 – <i>Incidência</i>	1
1.1.2 – <i>Carcinogênese</i>	4
1.2 SISTEMAS DE REPARO AO DNA.....	7
1.2.1 – <i>Reparo de quebra de fita dupla</i>	8
1.2.2 – <i>Reparo de erros de pareamento</i>	11
1.2.3 – <i>Reparo por excisão de bases</i>	13
1.2.4 – <i>Reparo por excisão de nucleotídeos</i>	18
2. OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. METODOLOGIA	23
3.1 CASUÍSTICA	23
3.2 COLETA DE DADOS	23
3.3 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA.....	24
3.4 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO POR PCR EM TEMPO REAL.....	24
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA	26
3.5 DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS	26
3.6 ANÁLISE DOS DADOS	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS	29
4.2 ESTADIAMENTO	30
4.3 FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DAS ENZIMAS DE REPARO DO DNA	31
4.4 CORRELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS COM OS PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS.....	33
4.5 CORRELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS COM O NÍVEL DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	38
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
8. ANEXO.....	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal

1.1.1 – Incidência

O câncer colorretal é tratável e, na maioria dos casos, curável, ao ser detectado precocemente, quando ainda não se espalhou para outros órgãos. Este é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo (Figura 1). Estima-se que 1,24 milhão de pessoas no mundo foram diagnosticadas com câncer colorretal em 2008, representando 10% do total dos cânceres.

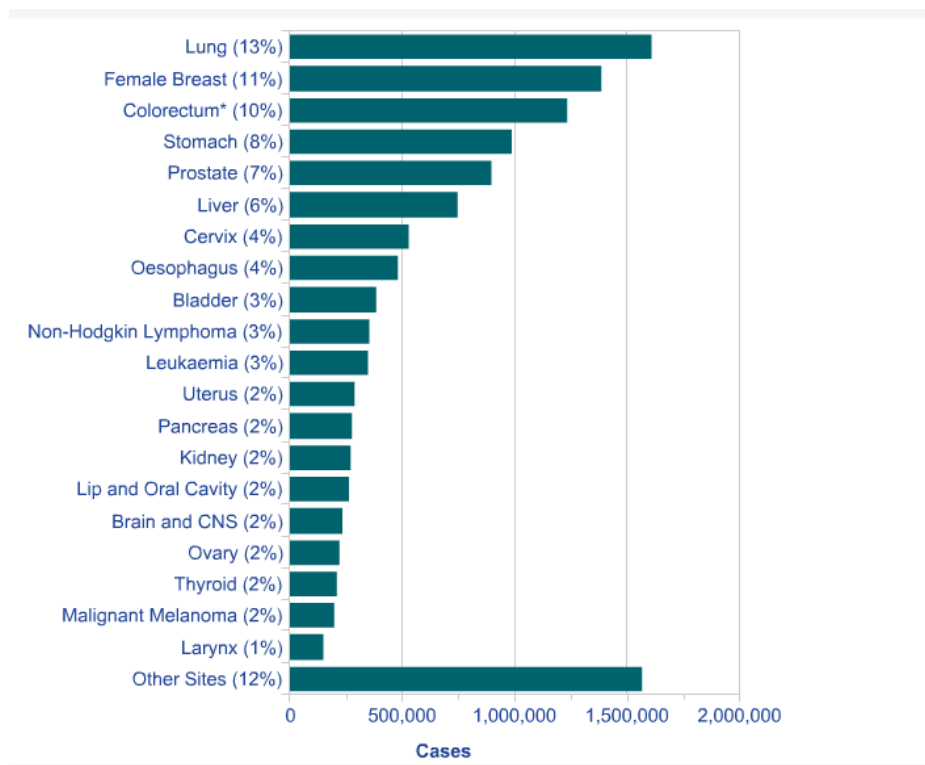
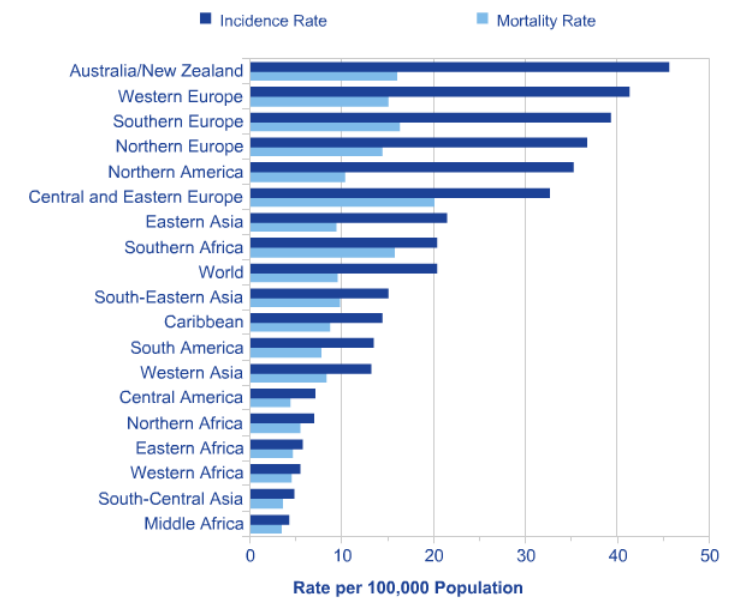


Figura 1 – Os 20 tipos de câncer mais comumente diagnosticado no mundo, segundo estimativas de 2008. Retirado de <http://www.cancerresearchuk.org>.

Há uma grande variação geográfica em relação à incidência desse câncer no mundo, que pode ser atribuído principalmente a diferenças na dieta, particularmente o consumo de carne vermelha processada, de fibras e de álcool, bem como obesidade e estilo de vida. Além disso, a incidência de câncer colorretal no mundo é visivelmente maior em homens do que em mulheres (Figura 2a e 2b) (Larsson & Wolk, 2006; Moghaddam et al., 2007; Moskal et al., 2007).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, o câncer colorretal é a quarta causa mais comum de morte por câncer no mundo. Estima-se que 610.000 pessoas morreram desta doença em 2008 (Figura 2a e 2b).

A



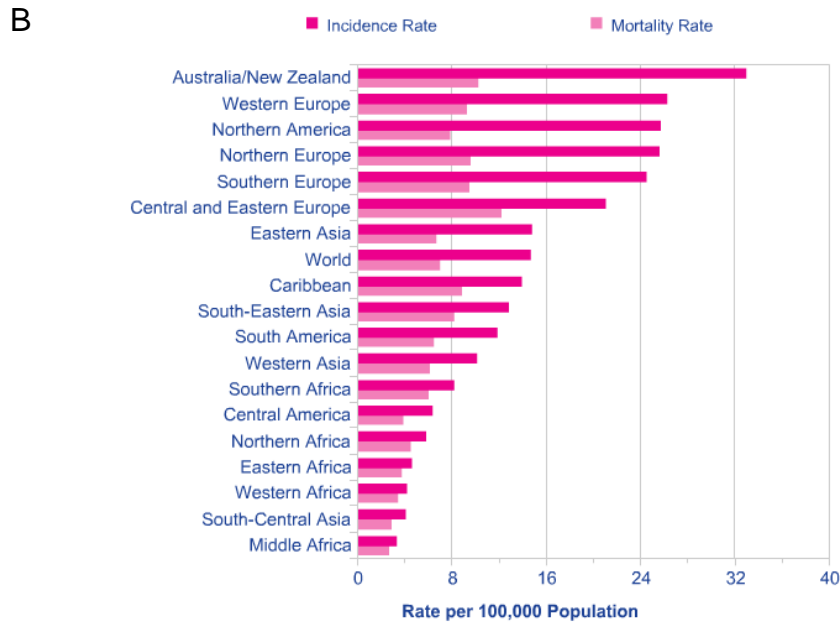


Figura 2 – A) Incidência de câncer colorretal no mundo e taxa de mortalidade para o sexo masculino; B) Incidência de câncer colorretal no mundo e taxa de mortalidade para o sexo feminino. Retirado de <http://www.cancerresearchuk.org>.

A incidência de câncer colorretal varia de um país para outro, inclusive dentro de um mesmo país. O risco de desenvolvimento desta doença também varia entre os indivíduos segundo sua dieta, estilo de vida e fatores hereditários. No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostram que em 2012 surgiram 30.140 novos casos desta doença, sendo 14.180 em homens e 15.960 em mulheres. Em 2010, 13.344 brasileiros morreram vítimas de câncer colorretal, sendo 6.452 homens e 6.892 mulheres. As estimativas de 2012 são que as regiões Sul e Sudeste apresentem as maiores incidências da doença tanto para homens quanto para mulheres.

1.1.2 – Carcinogênese

A carcinogênese é um processo que envolve múltiplas etapas distintas, tais como iniciação, promoção e progressão. Os mecanismos moleculares envolvendo cada uma destas fases incluem danos ao DNA, aumento na proliferação celular, morte celular deficiente, e instabilidade genética. Proto-oncogenes são ativados qualitativamente ou quantitativamente em certos tumores e parecem agir como sinais proliferativos para crescimento neoplásico. Em contraste, os genes supressores tumorais são genes que precisam ser inativados para o desenvolvimento do tumor. Quando ativos, os genes supressores tumorais controlam o crescimento neoplásico. Algumas substâncias químicas podem influenciar o processo carcinogênico ativando proto-oncogenes e/ou inativando genes supressores tumorais. O risco de desenvolvimento de câncer é um conjunto de fatores que envolvem vários processos genéticos e epigenéticos(Barrett et al., 1987).

A proporção estimada de cânceres colorretais atribuível a causas hereditárias varia de 5% a 30%, podendo ser polipose adenomatosa familiar (FAP - sigla em inglês) ou câncer colorretal não polipóide hereditário (HNPCC, ou síndrome de Lynch). A FAP tem caráter autossômico dominante. Um terço dos novos casos é causado por uma mutação *de novo*. O HNPCC também apresenta transmissão autossômica dominante e é a forma mais comum de câncer colorretal familiar sindrômico, acometendo 1-4% de todos os casos de câncer colorretal. Este tipo de câncer é caracterizado por falhas no sistema de reparo MMR (*MisMatchRepair*) e resulta de um segundo evento somático que inativa o alelo funcional de determinados genes de reparo. Foi estabelecida uma lista de critérios (critérios de Amsterdam II) que sugere a presença do fenótipo HNPCC, são eles: a existência de pelo menos três familiares com câncer colorretal ou outros cânceres relacionados com HNPCC (endométrio, estômago, rim, ureter, biliar, intestino delgado), sendo um familiar de primeiro grau, em que o câncer colorretal tenha sido detectado em um dos familiares antes dos 50 anos(Vasen et al., 2010; Tuttlewska et al., 2013). Estudos apontam que em mais de 75% dos casos o câncer colorretal pode ser

definido como esporádico, de caráter não familiar e decorrente de uma exposição crônica da mucosa intestinal a agentes cancerígenos.

Bert Vogelstein definiu o câncer como "uma doença genética de células somáticas" (Vogelstein & Kinzler, 2004). Essa definição sintética é particularmente apropriada para definir a gênese do câncer colorretal. Seja através instabilidade cromossômica (possivelmente mediada pela perda da função de APC (*adenomatous polyposis coli*) ou por outros mecanismos (Michor et al., 2005) ou pelo acúmulo anormal de mutações (mediado por um MMR deficiente) (Li, 2008), as células da mucosa do cólon que suportam alterações no DNA podem sobreviver e proliferar-se, eventualmente acumulando anormalidades em genes importantes permitindo que elas se dupliquem de forma descontrolada e adquiram um comportamento aberrante, e assim gerar tumores.

A carcinogênese colorretal é possivelmente uma das mais estudadas e caracterizadas em humanos (Cummings, 2000). Isto é devido, em parte, pela relativa facilidade de detecção e remoção de lesões pré-cancerosas, o que permite a identificação das fases sequenciais do desenvolvimento do câncer colorretal. Esse câncer acontece pela sequência de adenoma-carcinoma em que o carcinoma surge a partir de lesões precursoras, chamadas de adenomas. Os adenomas surgem a partir de mutações no gene *APC* ou em genes de reparo de DNA e apresentam epitélio displásico. A lesão com displasia é o foco de criptas aberrantes. Com o tempo, esta lesão adquire mutações adicionais, que evolui para um pólipo adenomatoso clássico. Geralmente, como pólipos aumentam de tamanho, o grau de displasia piora. Há aumentadas vilosidades, do número de anormalidades genéticas, e uma maior probabilidade de desenvolver um carcinoma invasivo.

O câncer colorretal esporádico desenvolve-se a partir de estágios histologicamente bem definidos, compreendendo uma aquisição sequencial de alterações genéticas. Diversas mutações podem culminar no desenvolvimento de câncer colorretal, principalmente no gene supressor tumoral *K-RAS* (Ronai, 1992).

A função de genes supressores tumorais pode ser perdida por um mecanismo envolvendo o surgimento de alguma mutação ou pela deleção de ambos os alelos. A presença de um alelo ativo é suficiente para manter a regulação gênica, embora em alguns casos, a condição de heterozigoto pode proporcionar à célula uma vantagem de crescimento como resultado de uma concentração reduzida do produto (efeito de dosagem gênica). A perda do alelo ativo é o passo crítico para a progressão neoplásica. A perda do alelo pela não junção de um cromossomo durante a mitose, exclusão ou recombinação, pode ser monitorizada pela perda de heterozigosidade (LOH) em comparação com o tecido normal. Este processo reflete em células com instabilidade genética e está fortemente associado com câncer colorretal, ao passo que é extremamente raro em adenomas. A LOH é observada em 30% dos cânceres esporádicos e FAP com alta recorrência no cromossomo 18q, onde está localizado de um gene supressor tumoral chamado *DCC* (deletado em câncer colorretal), cuja expressão é reduzida ou ausente na maioria dos casos de câncer colorretal. Além disso, mutações no gene *p53* são frequentes em câncer colorretal e a perda da sua função pode ser crítica na transição de adenoma para carcinoma (Finlay, 1993). Um esquema do desenvolvimento do câncer colorretal está apresentado na Figura 3.

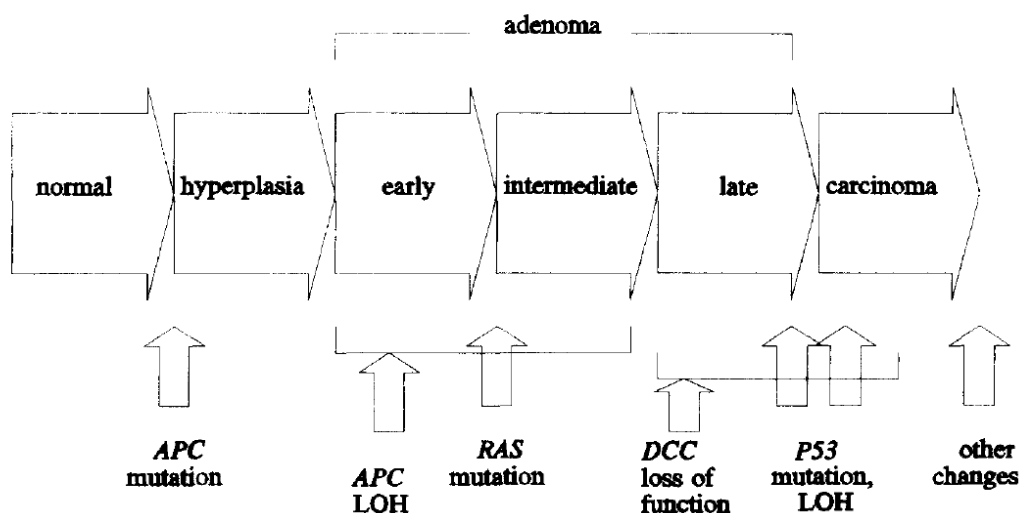


Figura 3 – Eventos genéticos associados ao desenvolvimento de câncer colorretal. Retirado de Finlay, 1993.

Dessa forma, a hipótese aceita descreve um processo de transformação neoplásica a partir do epitélio gastrointestinal normal via hiperproliferação e pólipos adenomatosos até um carcinoma invasivo (Vogelstein et al., 1988). De acordo com este modelo, as alterações genéticas ocorrem em etapas em que sucessivos subclones sobrevivem ou ganham vantagem de crescimento sobre seus vizinhos até que um subclone maligno emerge com características de invasão e metástase. A progressão neoplásica culminando em uma forte instabilidade genética representa não apenas a perda de fidelidade na replicação do genoma durante a divisão celular, mas também envolve um desequilíbrio dos mecanismos celulares que normalmente detectam os danos causados ao DNA e desencadeiam o reparo ou apoptose (Jass, 2006).

1.2 Sistemas de Reparo ao DNA

O sistema de reparo do DNA tem papel fundamental na manutenção da estabilidade genômica evitando o surgimento de mutações. As enzimas de reparo de DNA monitoram continuamente os cromossomos a fim de corrigir possíveis danos causados por agentes mutagênicos exógenos e endógenos. Em resposta a esses danos ao DNA acham-se associados os seguintes mecanismos de reparo: (1) O reparo por excisão de base (BER), fundamental para remover bases oxidadas ou quimicamente modificadas; (2) reparo por excisão de nucleotídeo (NER), o qual repara dímeros de pirimidina; (3) reparo por mau pareamento (MMR) necessário para a correção de erros que acontecem durante a replicação do DNA (erros base-base, deleções e inserções); (4) reparo de quebra de fita dupla (DSBR), vital em todo organismo vivo, age em diversas etapas do ciclo celular (Shin et al., 2008).

1.2.1 – Reparo de quebra de fita dupla

O DSB pode atuar de duas maneiras: recombinação homóloga (HR) e recombinação não-homóloga (NHEJ)(Figura 4). Acredita-se, pois, que falhas no(s) sistema(s) de reparo anteriormente descrito são importantes fatores de risco na carcinogênese (Stratton, 2011). Adicionalmente, diversos autores mostraram que tais alterações podem potencialmente levar a uma desregulação no ciclo celular e/ou apoptose (Lagerwerf et al., 2011; Wouters et al., 2011).

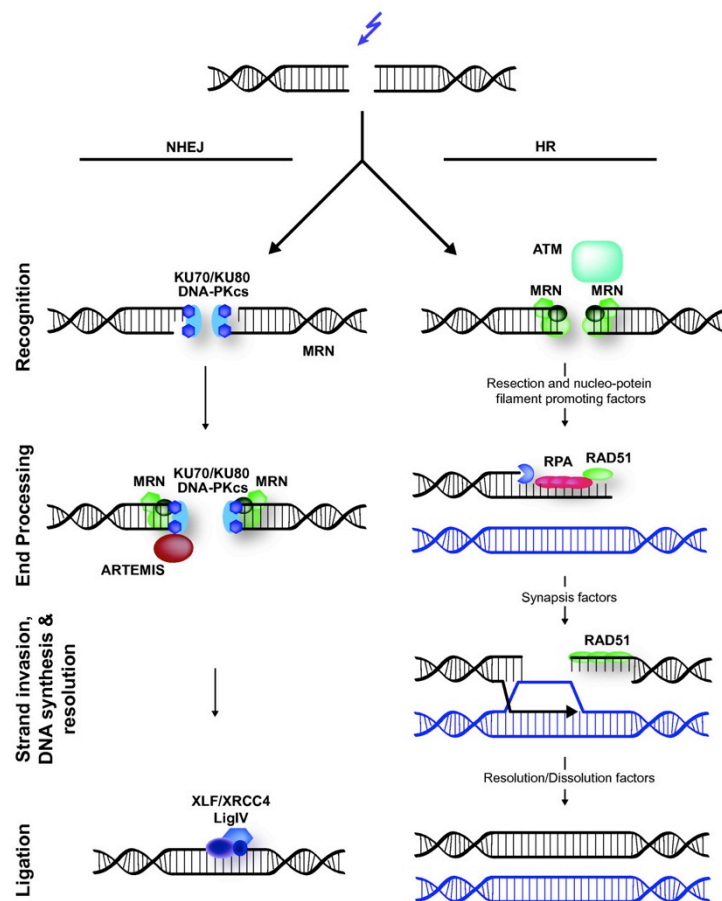


Figura4 – Representação esquemática da via de reparo DSB. Retirado de <http://www.epigeneticsandchromatin.com/content/5/1/4/figure/F3?highres=y>.

As quebras em fitas duplas de DNA (DSB) são lesões críticas a molécula de DNA que podem resultar além da morte celular, uma grande variedade de alterações genéticas tais como deleções, LOH, translocações e perda cromossômica, que são considerados marcadores do desenvolvimento de câncer (Shen e Nickoloff, 2007). Acredita-se que tais lesões possam ser resultantes da ação de agentes exógenos (tais como radiação ionizante, drogas quimioterápicas e agentes infecciosos), agentes endógenos (radicais livres de oxigênio) e estresse mecânico agindo nos cromossomos (Nijnik et al., 2007). Para manter a fidedignidade do genoma as células eucarióticas possuem mecanismos que são ativados por proteínas cuja função na cascata de sinalização é reconhecer esses DSBs ou danos ao DNA, parar o ciclo celular e ativar as vias de reparo ao DNA. Quando a quantidade de danos ao DNA está acima da capacidade de reparo ao DNA, é ativada esta via de sinalização de checagem. Um dos primeiros passos na resposta celular aos danos ao DNA induzidos por agentes genotóxicos é a ativação de proteínas reparadoras do DNA tais como DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), Ku70/80, PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), ATM (*ataxiatelangetasiamutated*) e ATR (*ATM-Rad3-related*) (Abraham, 2001).

Alguns trabalhos mostram que ATM e DNA-PK podem regular a função de Ku70/80 por meio de fosforilação e/ou translocação nuclear das proteínas Ku. Nos danos ao DNA induzidos pelo estresse, ATM parece ser essencial para ativação de Ku e pela sobrevivência celular (Morio e Lim, 2008). As proteínas Ku 70 (70 kDa) e Ku80 (80 kDa) são subunidades regulatórias de ligação ao DNA da DNA-PK, as quais são compostas por uma subunidade catalítica de 470 kDa (DNA-PKcs). Ku70 e Ku80 iniciam o processo de reparo às quebras em fita dupla de DNA, a qual induz a fragmentação do DNA por meio da ativação de DNA-PK depois de sua ligação às quebras em dupla fita. A fosforilação de Ku70/80 pela DNA-PK controla sua localização, sua capacidade de ligação ao DNA, bem como sua função (Song et al., 2003). Além disso, alguns estudos mostram que Ku possa gerar uma proteção contra o estresse oxidativo (Shackelford et al., 1999). O ponto crucial da NHEJ é a ligação das proteínas Ku70/Ku86 às pontas livres de DNA seguido pelo recrutamento da subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs), que em

uma cascata de fosforilação regula proteínas que operam o processo de ligação das fitas duplas quebradas (Hefferin e Tomkinson, 2005).

XRCC3(*X-rayrepaircomplementingdefectiverepair in Chinesehamstercells 3*)e *RAD51*(*RAD51* recombinase) são dois membros importantes da via de reparo de HR. *RAD51* desempenha papel central no pareamento de HR catalisando a transferência de uma fita entre a sequência quebrada e a fita homóloga não danificada, permitindo o reparo da região lesada. Entretanto, sua localização no DSB depende da função e interação direta com *XRCC3* (Masson et al., 2001). Um estudo que analisou 1.210 biópsias de pacientes com câncer colorretal mostrou que indução de *RAD51* é significativamente correlacionada com pior prognóstico (Tennstedt et al., 2013). Os autores relacionaram a expressão de *RAD51* com o tempo de sobrevivência dos pacientes e constataram que pacientes cujos tumores exibiam altos níveis de expressão de *RAD51* tinham, em média, 11 meses a menos de tempo de sobrevivência em comparação com pacientes com níveis de expressão moderado (46 meses), fraco (76 meses) ou sem expressão (68 meses) de *RAD51* (Tennstedt et al., 2013).

Além disso, polimorfismos em genes de reparo de HR, podendo gerar insuficiência de proteínas, têm sido associados com risco de desenvolvimento de câncer (Smilenov, 2006). O polimorfismo mais frequente no gene *XRCC3* é uma transição C>T resultando em uma substituição de aminoácido de Thr para Met no códon 241. Portadores deste genótipo apresentam maiores níveis de adutos de DNA de linfócito, o que poderia ser resultado de um reparo ineficiente no DNA (Matullo et al., 2001). Além disso, tem sido demonstrado que o polimorfismo 135G>C na região 5'UTR de *RAD51*(rs1801320) influencia a atividade de transcrição gênica e pode modificar o efeito do polimorfismo em *XRCC3* em câncer de mama (Hasselbach et al., 2005; Krupa et al., 2009). Sugere-se que a localização do polimorfismo 135G>C do gene *RAD51* esteja relacionada com a estabilidade e tradução do mRNA. A transcrição de *RAD51* se dá em duas principais isoformas: Isoforma I com 104 nucleotídeos a mais que a isoforma II, a qual é resultado de *splicing* alternativo. A isoforma II contém 77% de pares de bases GC e, portanto, esta sequência favorece estruturas tridimensionais

regulando negativamente a tradução (Hughes, 2006; Antoniou et al., 2007). O nível da isoforma II é menor em linhagens celulares com genótipo C/C do polimorfismo 135G>C, e assim este genótipo pode estar relacionado com menores níveis da proteína RAD51. De fato, a ocorrência de câncer colorretal é, em parte, resultado de uma menor expressão do gene *RAD51* e conseqüentemente, menor capacidade de reparar quebras em fita dupla por HR (Krupa et al., 2011).

1.2.2 – Reparo de erros de pareamento

O sistema de reparo de DNA MMR (*Mismatch repair system*) é composto por dois complexos protéicos: as proteínas MutS que incluem MSH2 (*mutShomolog2*), MSH3 (*mutShomolog3*) e MSH6 (*mutShomolog 6*) e as proteínas MutL que engloba *MLH1* (*mutLhomolog 1*), *PMS1* (*postmeioticsegregationincreased 1*), *PMS2* (*postmeioticsegregationincreased 2*) e *MLH3* (*mutLhomolog 3*). Para o funcionamento do sistema MMR é necessário que o complexo protéico MutL se ligue a MutS- α (MSH2 e MSH6) ou MutS- β (MSH2 e MSH3). Desse modo, acredita-se que deficiência nesse sistema de reparo possa ser responsável pelo acúmulo de mutações (Figura 5) (Kolodner & Marsischky, 1999; Lipkin et al., 2000). Além disso, a enzima de reparo *MGMT* (*O6-Methylguanine DNA methyltransferase*) protege o DNA contra mutações causadas por agentes alquilantes, e a perda da expressão desta pode levar ao desenvolvimento de câncer (Iwakuma et al., 1996).

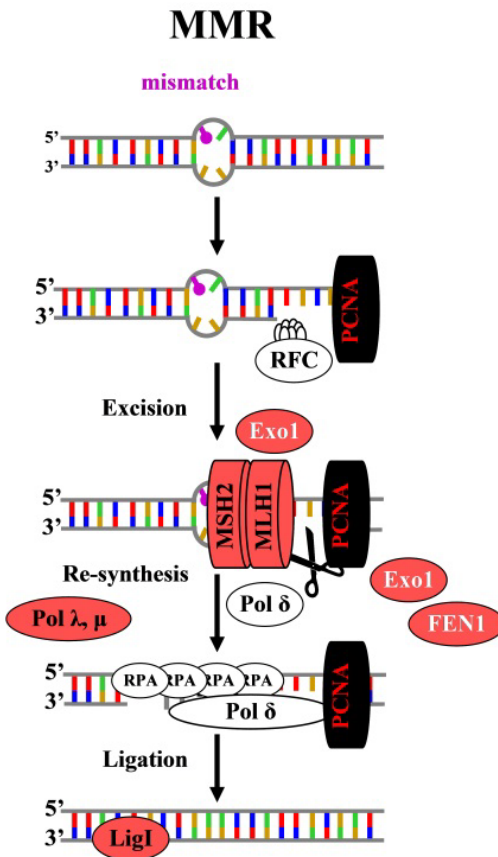


Figura5 – Representação esquemática da via de reparo MMR. Retirado de <http://www.intechopen.com/books/dna-repair-on-the-pathways-to-fixing-dna-damage-and-errors/new-insight-on-entangled-dna-repair-pathways-stable-silenced-human-cells-for-unraveling-the-ddr-jigs>.

Defeitos em genes envolvidos no sistema de reparo MMR estão frequentemente associados à instabilidade de microssatélites (MSI). A instabilidade genética é um fator fortemente envolvido no processo de carcinogênese e é caracterizada pelas expansões ou contrações de uma simples sequência repetida no DNA. A MSI foi descrita pela primeira vez em 1993 em pacientes com HNPCC, e desde sua descoberta até o presente a mesma tem sido descrita em diferentes tipos de câncer. Os microssatélites consistem em unidades de cerca de um a quatro nucleotídeos, repetidas *in tandem* (em sequência), dentro do genoma humano. O deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase

durante a replicação do DNA é tida como a principal causa da variação no número de repetições nesses *locus* (Moskaluk et al., 1998;).

O polimorfismo -93G>A (rs1800734) no gene *MLH1* têm sido associado com maior risco de desenvolvimento de câncer colorretal (Wang et al., 2012). Este polimorfismo está localizado na região promotora do gene, a 93 nucleotídeos *upstream* do sítio de início da transcrição (Ito et al., 1999). O sítio polimórfico também está localizado em um potencial sítio de ligação de fatores de transcrição, GT-IIB (*GT-motif 2B*) e NF-IL6 (*interleukin-6-regulated nuclear factor*) podendo então interromper a transcrição e expressão de *MLH1* (Campbell et al., 2009).

De forma complementar, a ligação alterada de fatores de transcrição no promotor de *MLH1* poderia causar metilação e silenciamentogênico (Ito et al., 1999). Diversos estudos também relacionam o polimorfismo -93G>A de *MLH1* com o aumento do risco de câncer colorretal em pacientes com alta instabilidade de microssatélites (Raptis et al., 2007; Whiffin et al., 2011; Martinez-Uruena et al., 2013). Baseado nisso, tem-se estabelecido que a alteração da posição 93G>A favoreça a hipermetilação de *MLH1*, com o conseqüente silenciamento do produto gênico, que por sua vez, facilitaria o fenótipo mutante em MMR caracterizado por MSI. O alelo *MLH1* -93 A também altera a interação entre DNA-proteína na região promotora, contribuindo também para a diminuição na expressão de *MLH1* (Allan et al., 2008; Mei et al., 2010).

1.2.3 – *Reparo por excisão de bases*

Estima-se que cada célula humana repare de 10.000 a 20.000 lesões no DNA diariamente (Lindahl, 1993). Para isso, enzimas envolvidas no sistema BER reconhecem os danos nas bases do DNA e catalisam a excisão e substituição do nucleotídeo danificado (Dianov et al., 2000). Este reparo é iniciado pela ação de DNA glicosilases específicas que reconhecem a base danificada do DNA e cliva a ligação N-glicosídica que liga a base do DNA a estrutura de açúcar-fosfato (Dianov & Hubscher,

2013). O surgimento de um sítio sem base (também chamado sítio abásico, sítioapurínico / apirimidínico ou sítio AP) é então processado por uma endonuclease AP (APE1 em células humanas), que cliva a ligação 5' fosfodiéster para um sítio AP, gerando assim uma quebra de DNA fita simplesque 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 posteriormente a DNA ligase (complexo XRCC1–DNA ligase III α) ligue a porção terminal do DNA (Figura 6)(Nash et al., 1997; Dianov & Hubscher, 2013).

A via de reparo BER está envolvida no reparo de pequenas alterações nas bases do DNA que podem ocorrer tanto pela via curta, necessária para a remoção de um nucleotídeo, tanto pela via longa, que remove de 2 a 13 nucleotídeos. As lesões mais comuns que são removidas por este sistema são de bases oxidadas, 8-oxoguanina, que podem parear tanto com adenina como com citosina, resultando em tranversões G:C para T:A (Peterson & Cote, 2004). Além disso, BER também está envolvido na remoção de uracilas formadas no DNA pelo processo espontâneo de deaminação de citosina, resultando no pareamento errôneo U:G (Jagannathan et al., 2006).

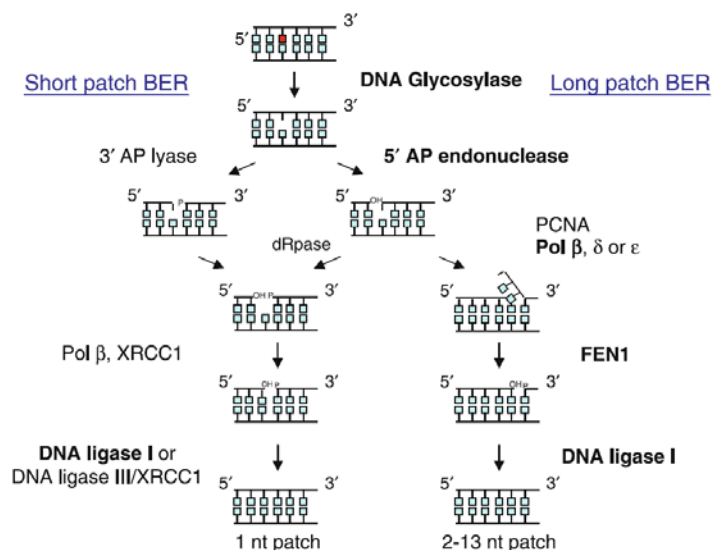


Figura 6 – Representação esquemática das via de reparo BER. Retirado de (Jagannathan et al., 2006).

O epitélio do cólon é um dos tecidos mais constantemente regenerados no corpo e, portanto, tem maior vulnerabilidade a uma diversidade de compostos mutagênicos presentes no intestino e/ou no sangue. Estilo de vida como hábito de fumar, o consumo de álcool, carne vermelha e alimentos processados ricos em gordura saturada tem sido descritos como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer colorretal pela geração de fortes compostos reativos ao DNA (Potter, 1999). Dentre estes compostos, benzopireno, aminas aromáticas, agentes alquilantes e espécies reativas de oxigênio representam substratos para o reparo por excisão. Acredita-se que a falha no reparo por excisão não esteja relacionado com a transformação maligna, mas contribui dando vantagem ao crescimento da massa tumoral existente, permitindo uma maior vulnerabilidade ao acúmulo de danos ao DNA (Slyskova et al., 2012).

Poly(ADP-ribose)polimerase-1 (*PARP-1*) é uma enzima nuclear ativada por quebras em DNA e está envolvida no reparo do DNA via BER, bem como na regulação de transcrição e ciclo celular (Schreiber et al., 2006). *PARP-1* tem um importante papel na carcinogênese colorretal (Nosho et al., 2006). Baseado em estudos pré-clínicos que demonstraram que inibidores da *PARP-1* podem aumentar a radiosensibilidade e o sinergismo com a quimioterapia em modelos experimentais de câncer colorretal. Vários testes clínicos têm sido iniciados com a utilização de inibidores de *PARP-1* em pacientes com câncer colorretal (Solier et al., 2012).

Loetschere colaboradores (1987) propuseram que *PARP-1* pode sinalizar para a cromatina em condições metabólicas alteradas. Eles constataram isso pela observação de que o nível constitutivo de modificações pós traducionais poly(ADP-ribose) na cromatina em células de mamíferos estava relacionada com a disponibilidade de NAD, que varia em diferentes estados fisiológicas e patológicas (Loetscher et al., 1987). A ADP-ribosilação é uma modificação pós traducional de proteínas que é fortemente induzida pela presença de danos no DNA e, portanto, *PARP-1* tem um importante papel no reparo do DNA e contribui assim para uma eficiente manutenção da integridade do genoma (Grube & Burkle, 1992). Em seu estudo, Sulzyc-Bielicka e colaboradores (2012) avaliaram o nível de expressão de *PARP-1* e as características

clínico-patológicas de pacientes com câncer colorretal e concluíram que pelo fato deste câncer apresentar grande heterogeneidade de tumores, a expressão de *PARP-1* variava, apresentando níveis mais baixos ou mais altos dependendo do tipo do tumor (Sulzyc-Bielicka et al., 2012).

A maioria dos fatores que favorece o desenvolvimento de câncer de cólon envolve a indução de estresse oxidativo nas células do cólon, caracterizado pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio oriundas de processos inflamatórios, consumo de carne e álcool, fumo e metabolismo de gordura, e pela insuficiência de mecanismos de proteção antioxidante (Valko et al., 2007). A produção deste estresse oxidativo está associada com níveis aumentados de danos no DNA, favorecendo assim o surgimento de mutações, o que por sua vez, poderia favorecer a iniciação e progressão do câncer colorretal (Tudek & Speina, 2012). O gene *8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1)* faz parte de uma família de glicosilases responsável por reconhecer e excisar as bases 8-oxoguanine (8-oxoG) formadas pela exposição à espécies reativas de oxigênio. A presença desta base no DNA leva a transições GC/TA (Cheng et al., 1992). Indivíduos que não expressam ou que expressam em um nível reduzido a enzima *OGG1* e assim, não podem reparar essas transições, de fato tem um risco maior de desenvolver câncer de pulmão e cabeça e pescoço (Paz-Elizur et al., 2008). De forma complementar, um estudo realizado por Slyskova e colaboradores em amostras de pacientes com câncer colorretal mostrou menores níveis de expressão de *OGG1* no tecido tumoral quando comparado com o tecido normal (Slyskova et al., 2012).

Além de *OGG1*, AP-endonuclease (*APE1*) também é essencial no reparo de bases oxidadas na via de reparo BER, assim como um importante regulador da ligação de diversos fatores de transcrição ao DNA (Xanthoudakis et al., 1992). O polimorfismo Asp148Glu (rs3136820) neste gene tem sido associado com o maior risco de câncer colorretal (Moreno et al., 2006; Pardini et al., 2008). Apesar deste polimorfismo estar localizado no domínio endonuclease da proteína, isso não reduz sua atividade. Estudos indicam que o alelo Glu148 poderia estar associado a um atraso na mitose após a

exposição à radiação ionizante(Hu et al., 2001) e a relação de *APE1*Asp148Glu com o risco de câncer colorretal possa ser atribuída a uma reduzida capacidade desta proteína se comunicar com as demais proteínas do sistema BER e desempenhar um reparo eficiente (Kasahara et al., 2008). Interessantemente, diversos autores observaram um aumento no nível de mRNA de *APE1* em pacientes com câncer colorretal induzido por espécies reativas de oxigênio (Obtulowicz et al., 2010; Tudek & Speina, 2012). Diferentes níveis de mRNA podem ocorrer durante o processo de carcinogênese, em que a indução da maioria dos genes de reparo ocorre num estágio inicial seguida de uma repressão num estágio tardio.

XRCC1(*X-rayrepaircomplementingdefectiverepair in Chinesehamstercells 1*) é outra proteína importante, que interage com o polinucleotídeo quinase humano (PNK), DNA polimerase β e DNA ligase III para realizar um reparo eficiente via BER. Além disso, *XRCC1* estimula as atividades de DNA quinase e fosfatase de PNK na porção terminal do DNA danificado, acelerando assim, a reação global do sistema de reparo (Whitehouse et al., 2001). Em seu estudo, Murakami e colaboradores (2001) utilizaram tecnologia de microarray para examinar o efeito da radiação UVB na expressão do mRNA de 588 genes relacionados com câncer em queratinócitos humanos, abrangendo genes que regulam crescimento, apoptose, adesão celular, citocinas e reparo ao DNA e demonstraram uma indução na expressão do gene *XRCC1*(Murakami et al., 2001). Os dados deste trabalho sugerem que uma cascata de alterações na expressão gênica acontece depois do dano ao DNA, culminando no perfil tumoral da célula. Da mesma forma, Yue colaboradores (2006) também constataram maiores níveis de *XRCC1* em amostras de pacientes com câncer colorretal. Este estudo ainda apontou uma correlação significativa entre a expressão de *XRCC1* e o padrão de instabilidade de microssatélites, ao passo que nenhuma associação foi atribuída a expressão deste gene e as características clínico-patológicas do paciente como, idade, gênero, localização do tumor, tipo histológico ou grau de diferenciação do tumor.

1.2.4 – *Reparo por excisão de nucleotídeos*

Concomitante com o sistema de reparo BER os organismos têm evoluído uma hierarquia de vias de reparo para lidar com as diversas injúrias causadas no DNA, para que a estabilidade genômica seja garantida. Entre todos os mecanismos de reparo do DNA, o NER é o mais versátil, podendo reparar um grande repertório de lesões, quimicamente e estruturalmente distintas. Neste processo, a ligação fosfodiéster 3' e 5' da lesão do DNA é hidrolisada por enzimas denominadas 'excinuclease'. Então, um curto oligonucleotídeo contendo lesão é removido, e a lacuna resultante é preenchida por uma polimerase. Dessa forma, a via consiste em cinco etapas: reconhecimento do dano, incisão, excisão, síntese de reparo, e ligação (Nospikel, 2009).

Outro ponto interessante do sistema NER é que ele pode acontecer juntamente com a transcrição. O reparo “acoplado” à transcrição garante que a fita transcrita de genes ativos seja reparada com uma prioridade maior do que o resto do genoma, provavelmente devido à RNA polimerase II (RNAPII) que age como um sensor de lesão (Figura 7) (Deaconescu et al., 2012).

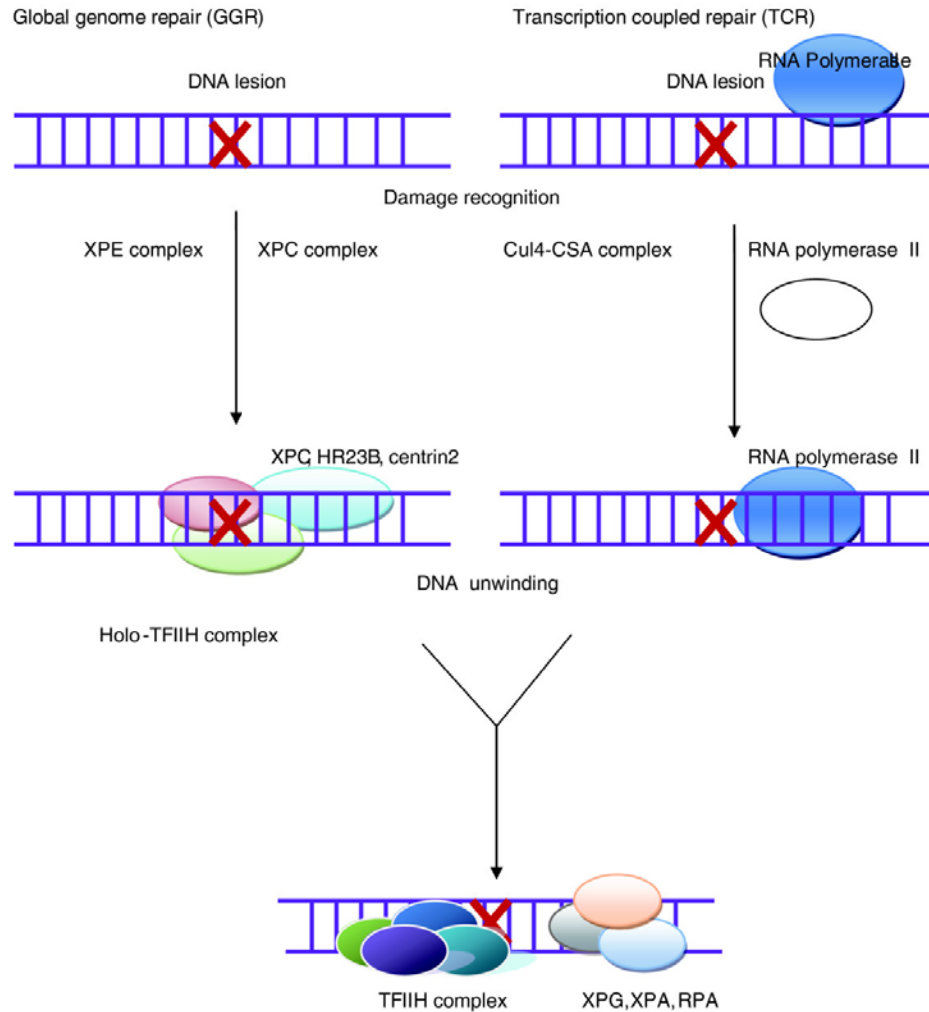


Figura 7 – Representação esquemática das vias de reparo NER, global (GG-NER) e acoplada à transcrição (TC-NER). Em GG-NER, o dano é reconhecido por proteínas como XPE e XPC. Em TC-NER, o surgimento da lesão bloqueia o progresso da RNAPII em um processo envolvendo as proteínas CSA e CSB. Em seguida, as duas vias convergem. As proteínas ERCC3 (XPB) e ERCC2 (XPD) desenovelam a região em torno da lesão, juntamente com as proteínas XPA, XPG (ERCC5) e RPA. Retirado e adaptado de Wang et al. 2008.

O produto do gene *ERCC1* (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*) interage com *ERCC4* (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4*) e *XPA* (*xeroderma pigmentosum, complementation group A*)

para formar um complexo que participa tanto do reconhecimento do dano como pela atividade de endonuclease que excisa o DNA para subsequente reparo. Já foi demonstrado que *ERCC1* é necessário para a estabilização e estímulo da atividade de *ERCC4*(Kashiyama et al., 2013).

Alguns estudos tem demonstrado que vários genes do sistema de reparo NER, incluindo *ERCC1*, apresentam uma maior expressão depois da indução de dano ao DNA (Murakami et al., 2001) e em pacientes com câncer colorretal (Yu et al., 2006; Cho et al., 2011). Além disso, um menor nível de expressão de *ERCC1* está associado com metástase no linfonodo de pacientes com câncer colorretal (Yuanming et al., 2013). Interessantemente, a expressão de *ERCC1* é também associada com a resistência celular e clínica de compostos comumente utilizados no tratamento de câncer (Kwon et al., 2007).

Excisionrepaircross-complementing 2 (*ERCC2*) ou proteína XPD é uma helicasedependente de ATP conservada no processo evolutivo associada com complexo de fatores de transcrição TFIIH que possui um importante papel no NER. Defeitos neste gene podem resultar na síndrome do xerodermapigmentoso grupo D, tricotiodistrofia, e síndrome Cockayne(Gatzidouet al., 2010).*ERCC2*também desempenha papel na regulação do ciclo celular em que o excesso da proteína causa defeitos mitóticos e letalidade e a diminuição, por sua vez, resulta na proliferação celular (Chen et al., 2003). Em relação ao câncer colorretal, os níveis de expressão de *ERCC2* são mais elevados em tecidos tumorais do que em tecidos normais (Slyskova et al., 2012).

Como mencionado anteriormente, sabe-se que diversos fatores induzem danos ao DNA como, por exemplo, a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais podem levar a oxidação do DNA, quebras nas fitas do DNA e aberrações cromossômicas, que estão envolvidos na carcinogênese colorretal. Em contrapartida, em células eucarióticas, o combate desses danos é feito por meio de eficientes vias de reparo ao DNA. Tendo em vista a importância das alterações descritas acima na manutenção da estabilidade genômica, foi avaliado o padrão de expressão de genes

essenciais nos sistemas de reparo BER, NER e DSB, assim como o efeito dos polimorfismos MLH1 -93G>A (rs1800734), RAD51 135G>C (rs1801320) e APE1 Asp148Glu (rs3136820) em amostras normais e tumorais de pacientes com câncer colorretal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o padrão de expressão e o efeito de polimorfismos em genes de reparo ao DNA em amostras normais e tumorais de pacientes com câncer colorretal.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o padrão de expressão dos genes *PARP1*, *OGG1*, *APE1*, *XRCC3*, *XRCC1*, *ERCC2*, *RAD51*, *MLH1* e *ERCC1* em amostras normais e tumorais de pacientes com câncer colorretal;
- Correlacionar o nível de expressão dos genes de reparo descritos acima com a presença dos polimorfismos *MLH1* -93G>A (rs1800734), *RAD51* 135G>C (rs1801320) e *APE1* Asp148Glu (rs3136820) em amostras normais e tumorais de pacientes com câncer colorretal;
- Detectar a frequência dos polimorfismos *MLH1* -93G>A (rs1800734), *RAD51* 135G>C (rs1801320) e *APE1* Asp148Glu (rs3136820) em amostras normais e tumorais de pacientes com câncer colorretal;
- Correlacionar as características clínico-epidemiológicas com a distribuição genotípica dos polimorfismos estudados.

3. METODOLOGIA

3.1 Casuística

Foram incluídos 49 pacientes portadores de câncer colorretal, operados com intenção curativa por um mesmo cirurgião (Professor Dr. Carlos Augusto Martinez), entre 2010 e 2013. Os enfermos selecionados para o estudo foram submetidos ao estadiamento clínico, laboratorial e por exames de imagem segundo as diretrizes recomendadas pela Associação Médica Brasileira. Todos os doentes tiveram o diagnóstico de câncer colorretal confirmado por patologistas experientes.

Imediatamente após a extirpação do espécime foi retirado um fragmento de tecido normal da margem proximal de ressecção cirúrgica. Da mesma forma, foi colhido um fragmento de tecido neoplásico obtidos da periferia do tumor. As amostras foram congeladas imediatamente após a coleta das biópsias e armazenadas em freezer - 80°C até o uso.

A classificação histológica final foi obtida a partir de cortes de parafina corados com hematoxilina e eosina. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Comissões da Universidade São Francisco e foi conduzido de acordo com a Declaração de Princípios Helsinki (ANEXO 1).

3.2 Coleta de Dados

Os dados epidemiológicos e clínico-patológicos foram obtidos no momento da entrevista com o paciente, bem como por meio da consulta de prontuários sendo registrados em fichas estruturadas. Os dados histopatológicos tais como subtipos tumorais, profundidade da invasão, acometimento de linfonodos e/ou metástase à

distância e estadiamento, foram extraídos dos laudos patológicos, presentes nos respectivos prontuários.

3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA foi feita usando-se o *RNeasy[®]tissue kit* (Qiagen,Valencia, CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração ~100 ng de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

3.4 Quantificação da expressão por PCR em tempo real

A análise de expressão dos genes *PARP1*, *OGG1*, *APE1*, *XRCC3*, *XRCC1*, *ERCC2*, *RAD51*, *MLH1*e *ERCC1*e do gene constitutivo *18S* foram feitas por meio da PCR em tempo real. Os *primers* utilizadas neste estudo foram desenhados usando o software *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Tabela 1). A reação de PCR em tempo real foi feita usando o *Platinum[®] SYBR GREEN[®]qPCRSupermix UDG* (Invitrogen, Foster City, CA, USA) seguindo as especificações do fabricante. A reação utilizada continha para cada 50µL: 25µL de *Platinum[®] SYBR GREEN[®]qPCRSupermix UDG* (Invitrogen), 10µM de cada *primer* e 10µL de cDNA (50ng). Para amplificação foi usado o ciclo descrito a seguir: 2 min a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 2 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 59°C por 15 s, e uma extensão a 72°C por 30 s, seguida de uma análise de curva de melting (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s iniciando-se em 95°C). Através desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado. A reação de PCR em tempo real foi realizada no

equipamento 7300 Real-Time PCR System (AppliedBiosystems) e o C_t (*thresholdcycle* - momento da reação em que a fluorescência da amostra começa a ser detectada) determinado com o auxílio do RQ Study Software (AppliedBiosystems).

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

Tabela 1 –*Primers* utilizados para análise da expressão gênica

Genes	Sequência(5' - 3')
<i>APE1</i>	CTGCTCTTGGAATGTGGATG TTTGGTCTCTTGAAGGCACA
<i>ERCC1</i>	GGCCTATGAGCAGAAACCAG ACTTTCAAGAAGGGCTCGTG
<i>ERCC2</i>	GACAACGTCTGCATCGACTC CGCTGCTCGTCTGTCTCTT
<i>PARP1</i>	TAGCTGATGGCATGGTGTTT GACGTCCCCAGTGCAGTAAT
<i>OGG1</i>	CCTGTGGGGACCTTATGCT CCTTTGGAACCCTTTCTGC
<i>RAD51</i>	AGTGATTCTCCTGCCTCAGC TACATGGCCTTTCTTCACC
<i>XRCC1</i>	GTTCCAGCAGTGAGGAGGAT GTGGGCTTGGTTTTGGTCT
<i>XRCC3</i>	TGAGCAGTGCCTTCCAGA GAAACACGTTTCGTCCCAGA
<i>MLH1</i>	CGGTAACTACCCAATGCCTCAAC TTCTCGACTAACAGCATTTC
<i>18S</i>	CGCGGTTCTATTTTGTGGT CGGTCCAAGAATTTACCTC

3.4 Extração de DNA

As biópsias oriundas de tecido normal e tumoral foram utilizadas para a extração de DNA genômico, a qual foi realizada de acordo com o protocolo de fenol-clorofórmio. As amostras de DNA genômico foram ressuspensas em 300 µL de solução tampão (Tris-HCl 50mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0; tween 0,5 %), adicionando 15 µL de solução de proteinase K (10 mg/mL). As amostras foram incubadas à 37°C por pelo menos 2 horas. Em seguida, o DNA foi purificado por meio de centrifugações com Fenol/Clorofórmio, e precipitado com acetato de sódio 3M.

3.5 Detecção dos Polimorfismos

A presença de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) nos genes que codificam as enzimas de reparo, *MLH1* -93G>A (rs1800734), *RAD51* 135G>C (rs1801320) e *APE1* Asp148Glu (rs3136820) foram detectados por meio da análise do DNA genômico em ambos os tecidos (normal e tumoral), utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e RFLP (*restrictionfragmentlengthpolymorphism*), que é a PCR seguida de restrição enzimática. O número de referência de cada SNP para acesso no *genbank* foi obtido a partir do endereço eletrônico do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). Amostras distintas, sabidamente possuidoras dos sítios de clivagem para cada enzima de restrição específica, foram usadas como controle das reações de restrição enzimática. Os resultados da genotipagem foram regularmente confirmados por re-genotipagem de aproximadamente 10% das amostras.

Em cada uma das reações de PCR, foram utilizados na mistura o tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 0,4µM de cada *primer*, 3,6 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 0,3 mM deoxinucleotídeostri-fosfato (dNTP); 2,0 mM de MgCl₂; e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25µL. O produto amplificado a partir de cada gene foi visualizado em gel de poliacrilamida 8% corado

com nitrato de prata. Os produtos gerados foram submetidos à digestão enzimática com 5U da endonuclease de restrição específica descrita na Tabela 7, acrescida do tampão sugerido pelo fabricante em um volume final de 20µL. Os fragmentos resultantes da restrição foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% e posteriormente corados com nitrato de prata (Figura 8).

Tabela 2 – Características dos polimorfismos dos genes estudados.

Genes	Polimorfismos				
	No resíduo de aa	Na base	Tamanho dos fragmentos digeridos (pb)	Enzima de Restrição	Sítio de corte
<i>APE1</i>	Asn148Glu		TT (164)	<i>Bfal</i>	5' C↓TAG 3'
		T2197G	GG (144+20)		3'GAT↑C 5'
			TG (164+144+20)		
<i>RAD51</i>	-		GG (86+71)	<i>Mval</i>	5' CC↓W GG 3'
		135G>C	GC(157+86+71)		
			CC(157)		3' GG W↑CC 5'
<i>MLH1</i>	-		GG (134+125)	<i>PvuII</i>	5' CAG↓CTG 3'
		-93G>A	AA (259)		3' GTC↑GAC 5'
			GA (259+134+125)		

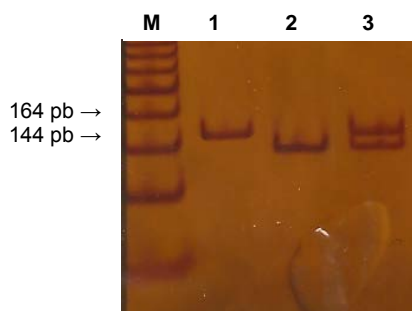


Figura 8 - Exemplos de fragmentos de restrição em géis de poliacrilamida: *APE1* (M) Marcador de 50pb, (1) Homozigoto Selvagem, (2) Homozigoto para o alelo variante e (3) Heterozigoto.

3.6 Análise dos Dados

Os dados categóricos foram apresentados por meio de frequências e porcentagens. A associação entre as variáveis categóricas foram comparadas pelo teste qui-quadrado. A significância estatística dos dados oriundos das análises de expressão gênica foram determinadas por teste *t* não pareado. Valores $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados obtidos foram analisados usando o programa estatístico SPSS 12.0 (SPSS Inc., USA).

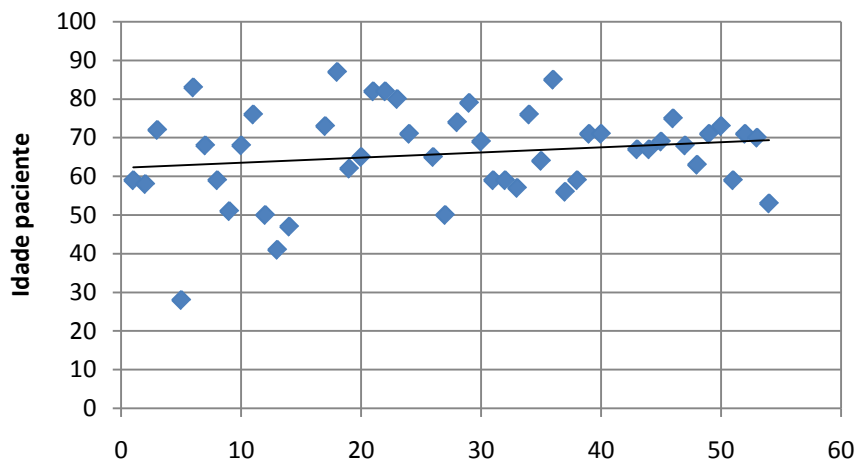
4. RESULTADOS

4.1 Aspectos Clínico-Epidemiológicos

Do total de casos de adenocarcinoma de cólon analisados, 47% eram de pacientes do sexo masculino e 53% de pacientes do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 29 a 87 anos com uma média de 65,8 anos ($\pm 10,3$) (Figura 9A). Não houve diferença na prevalência entre homens e mulheres.

Considerando a localização anatômica, 35% (17/49) dos tumores estavam localizados no cólon e 65% (32/49) estavam localizados no reto. Em relação aos tumores localizados no cólon, observou-se que 35% (6/17) estavam presentes em pacientes do sexo masculino e 65% (11/17) em pacientes do sexo feminino. Já em relação aos tumores localizados no reto, 53% (16/30) estavam presentes em pacientes do sexo masculino e 47% (14/30) em pacientes do sexo feminino (Figura 9B).

A



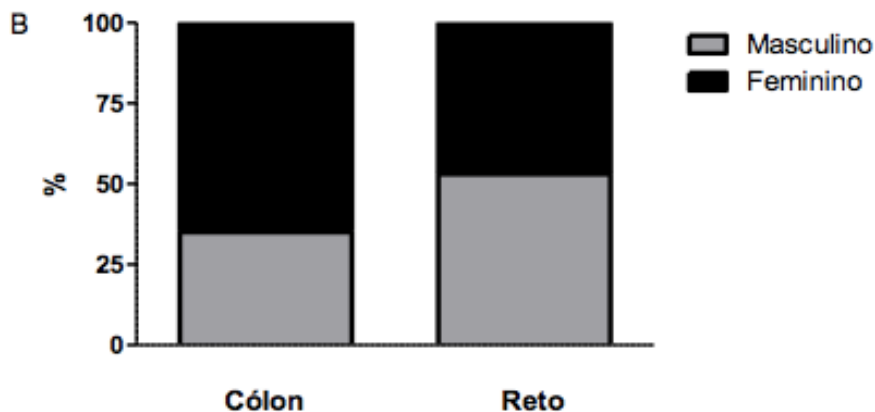


Figura 9 – Aspectos clinico-patológicos dos pacientes com câncer colorretal. A) idade e B) localização anatômica do tumor.

4.2 Estadiamento

O sistema de estadiamento utilizado para definir extensão da doença ao diagnóstico é a classificação TNM. De acordo com as características abaixo, o tumor pode ser classificado como Estadio I - T1N0M0, T2N0M0; Estadio II- Ila T3N0M0, IIB T4N0M0; Estadio III - IIIa T1N1M0, T2N1M0, IIIb, T3N1M0, T4N1M0, IIIc TqN2M0 e Estadio IV- TqNqM1.

Foi observado que 61% (30/49) dos casos apresentaram-se nos estadiamentos mais avançados, III e IV. Apenas 39% (19/49) dos casos apresentaram estádios I e II, respectivamente, com maior chance de sobrevida (Figura 10).

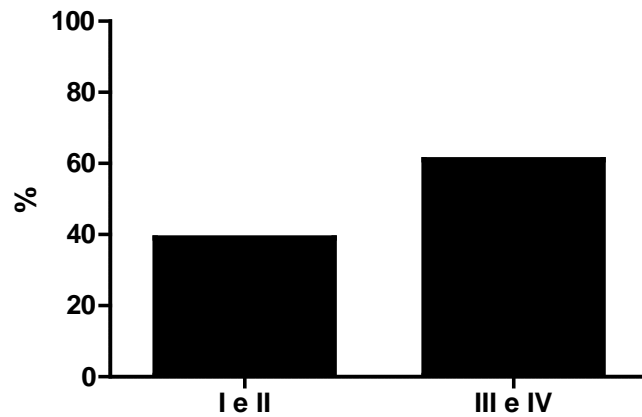


Figura 10– Distribuição dos pacientes com câncer colorretal em relação ao estadiamento dos tumores.

4.3 Frequência dos polimorfismos das enzimas de reparo do DNA

Foram estudados os genótipos em relação aos polimorfismos nos genes de reparo *MLH1*, *RAD51* e *APE1*. Em relação ao gene *MLH1*, 16% (8/49) eram portadores do genótipo AA, 47% (23/49) eram portadores do genótipo selvagem GG e 37% (18/49) eram portadores do genótipo GA. Para o gene *RAD51*, 10% (5/49) dos casos apresentaram genótipo CC, 69% (34/49) apresentaram genótipo selvagem GG e 21% (10/49) apresentaram genótipo GC. Quanto ao gene *APE1* verificou-se que 20% (10/49) dos casos eram GG, 27% (13/49) eram TT, e 53% (26/49) eram TG (Figura 11). As amostras de tecido normal e tumoral apresentaram os mesmos genótipos.

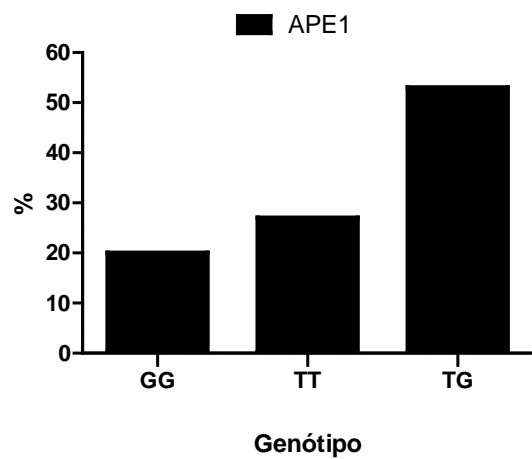
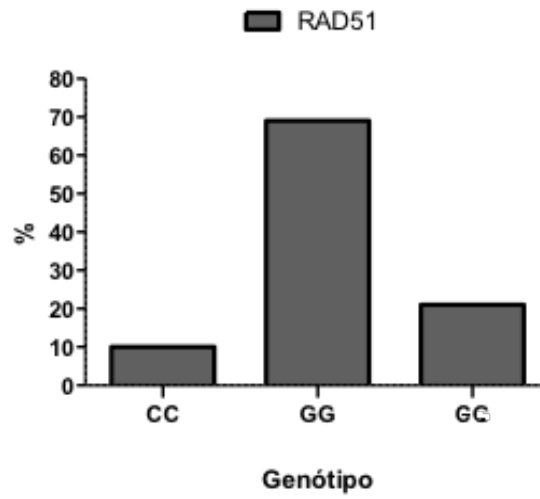
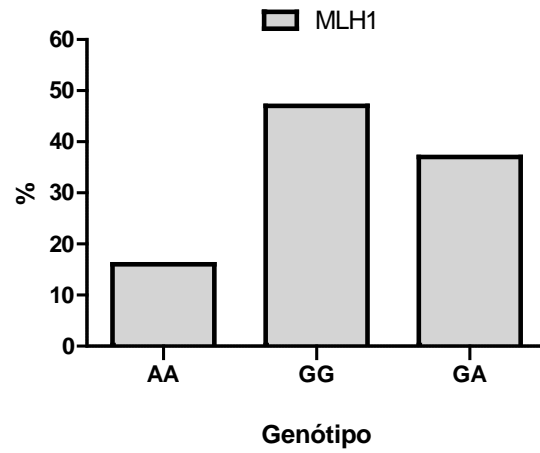


Figura 11 - Frequência genotípica dos polimorfismos nos genes de reparo *MLH1*, *RAD51* e *APE-1* nos casos de câncer colorretal estudados.

Como observado na Figura 11, com exceção do gene *APE1*, o genótipo mais frequente foi o homocigoto selvagem, seguido pelo heterocigoto e posteriormente pelo homocigoto para o alelo variante. No entanto, para *APE1* o genótipo heterocigoto foi o predominante.

4.4 Correlação dos polimorfismos com os parâmetros epidemiológicos e histopatológicos

A Figura 12 mostra a distribuição dos genótipos dos genes estudados de acordo com a faixa etária. Por esses gráficos observa-se que para os genes *MLH1* e *RAD51* o genótipo selvagem foi mais frequente na faixa etária acima de 52 anos, ao passo que para *APE1* o genótipo heterocigoto foi mais frequente em pacientes nesta faixa etária, enquanto o alelo variante foi mais frequente em pacientes entre 41 e 51 anos, porém de forma não significativa em todos os casos.

A análise genotípica de acordo com a localização anatômica do tumor (cólon ou reto) também não indicou diferenças significativas entre os grupos estudados. Entretanto, observou-se uma tendência na prevalência do genótipo heterocigoto para *MLH1* e *APE1*, assim como do genótipo selvagem GG para *RAD51* em pacientes com tumores no cólon. Em relação aos pacientes com tumores no reto observou-se uma maior frequência do genótipo selvagem GG para *MLH1* e *RAD51* e do genótipo heterocigoto TG para *APE1* (Figura 13).

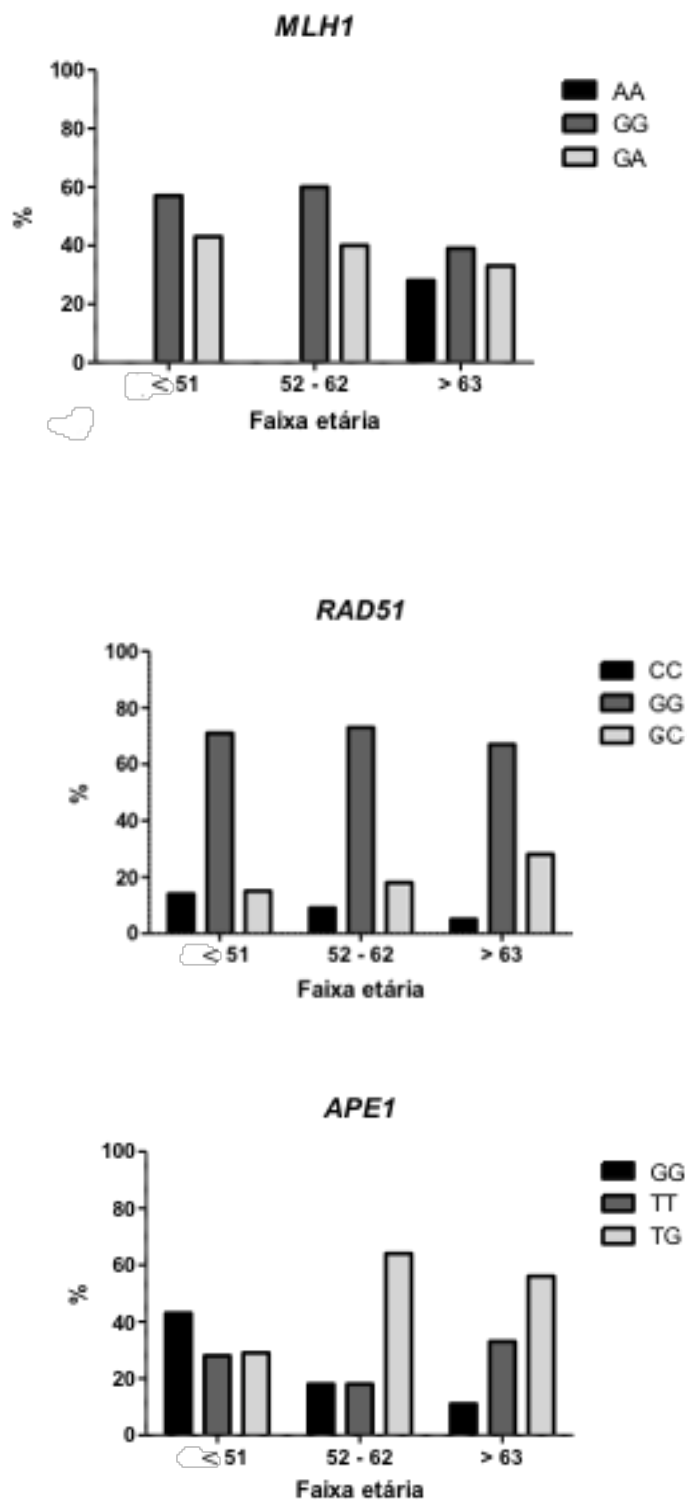


Figura 12 -Frequências genotípicas dos genes *MLH1*,*RAD51* e *APE1* por faixa etária.

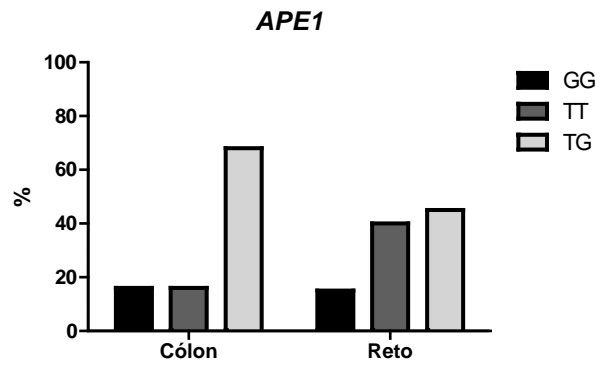
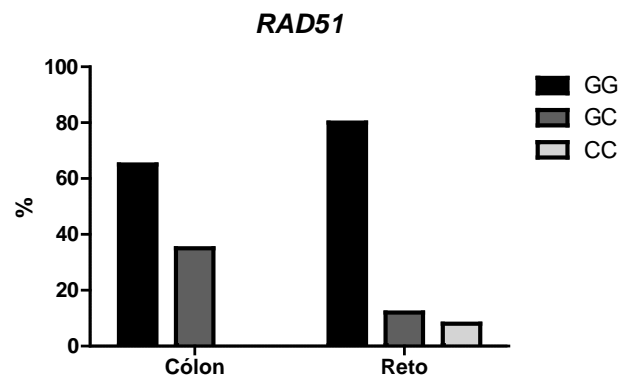
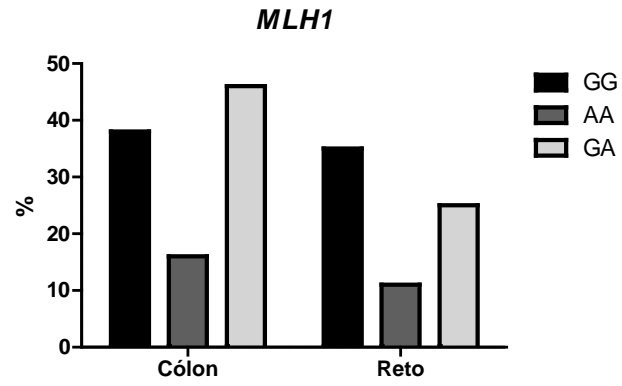


Figura 13—Frequência genotípica dos genes *MLH1*, *RAD51* e *APE1* de acordo com a localização do tumor.

A análise genotípica de acordo com o estadiamento do tumor mostrou que, para *MLH1*, 42% do estadio I e II e 50% do estadio III e IV eram portadores do genótipo selvagem, ao passo que para o heterozigoto, a frequência diminuía de acordo com o grau de estadiamento. O alelo variante teve uma prevalência similar nos dois graus de estadiamento. Observando o perfil de *RAD51*, verificamos que nos estágios mais avançados (III e IV) há maior prevalência do genótipo selvagem, ao passo que o heterozigoto e o alelo variante são menos frequentes com a diminuição do grau de estadiamento. Diferentemente, a genotipagem de *APE1* apresentou uma maior frequência de heterozigoto e uma queda do genótipo selvagem no grau mais avançado do tumor (Figura 14). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados.

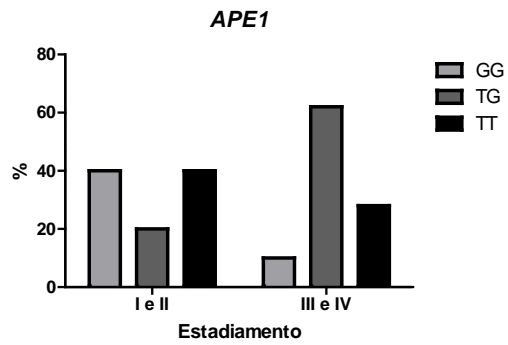
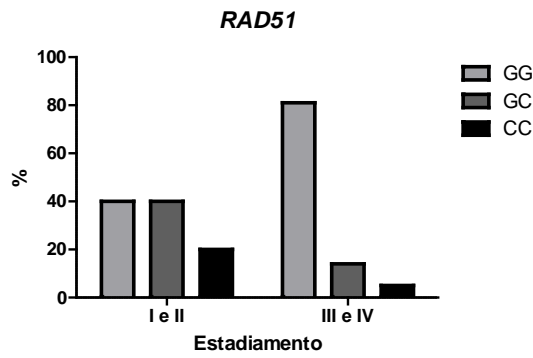
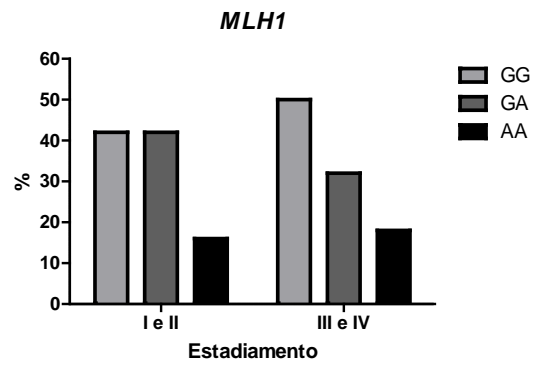


Figura 14 – Frequência genotípica dos genes *MLH1*, *RAD51* e *APE1* nos diferentes estádios do tumor.

4.5 Correlação dos polimorfismos com o nível de expressão gênica

Tendo em vista que os polimorfismos *MLH1* -93G>A (rs1800734), *RAD51* 135G>C (rs1801320) e *APE1* Asp148Glu (rs3136820) poderiam influenciar na atividade dos respectivos produtos gênicos assim como na formação de complexos com as proteínas dos sistemas de reparo ao DNA MMR, DSB e BER, respectivamente, foi analisado o padrão de expressão dos genes *MLH1*, *RAD51*, *APE1*, *ERCC1*, *ERCC2*, *OGG1*, *PARP1*, *XRCC1* e *XRCC3*.

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram os diferentes padrões de expressão quando comparado tecido tumoral ao tecido normal (T/N) assim como as características histopatológicas. A partir desses dados, pode-se observar que houve uma diminuição significativa na expressão de *OGG1* e *MLH1* e um aumento significativo de *ERCC1*, *XRCC1* e *XRCC3* quando comparado tecido tumoral ao tecido normal.

Em relação à localização anatômica do tumor, observamos uma modulação significativa na expressão da razão T/N para os genes *APE1*, *OGG1*, *RAD51* e *XRCC1* naqueles pacientes com tumores no reto. Em relação aos tumores localizados no cólon, houve uma modulação significativa na razão T/N para os genes *OGG1*, *RAD51*, *XRCC1* e *XRCC3*. A comparação entre a expressão e a localização anatômica do tumor mostrou que os genes *APE1*, *OGG1*, *PARP1* e *XRCC3* tiveram uma repressão significativa no reto.

Já para aqueles pacientes que tinham algum grau de invasão do tumor em outros órgãos, *RAD51*, *XRCC3* e *MLH1* mostraram redução de forma significativa no seu nível de expressão. Interessantemente, levando em conta o estágio do tumor, aqueles pacientes com grau mais avançados (III e IV) tiveram uma repressão significativa em quase todos os genes analisados (Tabela 3).

Tabela 3 – Níveis de expressão dos genes de reparo ao DNA associados às diferentes características histopatológicas.

Grupos		Genes								
		<i>APE1</i>	<i>ERCC1</i>	<i>ERCC2</i>	<i>OGG1</i>	<i>PARP1</i>	<i>RAD51</i>	<i>XRCC1</i>	<i>XRCC3</i>	<i>MLH1</i>
Fold induction	Razão T/N	0,83 ± 0,13	2,09 ± 0,79‡	1,04 ± 0,64	0,28 ± 0,09‡	1,35 ± 0,12	0,98 ± 0,36	2,54 ± 1,06‡	4,42 ± 1,72‡	0,47 ± 0,04‡
Localização	Reto	0,48 ± 0,02**‡	1,31 ± 0,18	0,70 ± 0,09	0,17 ± 0,02*‡	0,82 ± 0,06*	0,38 ± 0,07‡	2,37 ± 0,68‡	0,73 ± 0,30**	0,65 ± 0,10
	Colon	1,09 ± 0,38	1,75 ± 0,55	0,86 ± 0,41	0,31 ± 0,07‡	1,70 ± 0,31	0,48 ± 0,01‡	2,25 ± 1,63‡	8,26 ± 2,92‡	1,09 ± 0,34
Invasão	Sim	0,73 ± 0,20	1,28 ± 0,67	0,86 ± 0,09	0,24 ± 0,04	1,22 ± 0,49	0,33 ± 0,16*	2,59 ± 0,96	0,48 ± 0,13*	0,75 ± 0,09*
	Não	0,71 ± 0,08	1,89 ± 0,96	1,22 ± 0,84	0,29 ± 0,09	0,89 ± 0,06	0,87 ± 0,51	2,47 ± 0,60	1,20 ± 0,22	1,79 ± 0,18
Estadio	I e II	1,31 ± 0,24	2,96 ± 0,98‡	1,65 ± 0,33	0,49 ± 0,12‡	1,98 ± 0,35	1,75 ± 0,41	3,18 ± 1,26‡	6,31 ± 2,02‡	1,52 ± 0,20
	III e IV	0,61 ± 0,09*	1,22 ± 0,32*	0,78 ± 0,15*	0,16 ± 0,08*‡	0,90 ± 0,10	0,48 ± 0,06**‡	2,29 ± 0,50‡	0,94 ± 0,20**	0,58 ± 0,09*‡

± p < 0,05 quando comparado ao tecido normal; *p < 0,05 e **p < 0,01 quando comparado entre as características histopatológicas
T/N < 0,5 = 100% reprimido; > 2,0 = 100% induzido.

Levando em consideração os polimorfismos dos genes estudados, observou-se que para *MLH1* -93G>A, houve uma redução significativa na expressão gênica em pacientes portadores do alelo variante AA, quando comparado com o genótipo selvagem (Tabela 4).

Tendo em vista que o gene *XRCC3* pertence ao mesmo sistema de reparo (DSB) que *RAD51*, foi avaliada influência do polimorfismo *RAD51* 135G>C na expressão destes genes. Observou-se uma repressão significativa nos genes *RAD51* e *XRCC3* tanto para o genótipo heterozigoto (GC) quanto para o alelo mutante (CC) quando comparado com o alelo selvagem (Tabela 5).

Por fim, a análise de *APE1* Asp148Glu mostrou que o gene *APE1* bem como os outros genes do sistema de reparo BER *XRCC1* e *PARP1* tiveram uma redução significativa no nível de expressão em pacientes portadores do genótipo mutante GG (Tabela 6).

Tabela 4 -Níveis de expressão do gene *MLH1* correlacionados aos genótipos de *MLH1*.

	Genótipos	Gene
		<i>MLH1</i>
<i>MLH1</i>	GG	0,96 ± 0,22
	GA	0,79 ± 0,18
	AA	0,45 ± 0,14*

*p<0,05 quando comparado ao genótipo selvagem *GG.

Tabela 5 - Níveis de expressão dos genes de reparo DSB correlacionados aos genótipos de *RAD51*.

	Genótipos	Genes	
		<i>RAD51</i>	<i>XRCC3</i>
<i>RAD51</i>	GG	0,91 ± 0,25	1,14 ± 0,33
	GC	0,33 ± 0,10*	0,57 ± 0,13*
	CC	0,24 ± 0,09*	0,38 ± 0,08**

*p<0,05 e ** p < 0,01 quando comparado ao genótipo selvagem *GG.

Tabela 6 - Níveis de expressão dos genes de reparo BER correlacionados aos genótipos de *APE1*.

	Genótipos	Genes			
		<i>APE1</i>	<i>XRCC1</i>	<i>PARP1</i>	<i>OGG1</i>
<i>APE1</i>	TT	1,24 ± 0,25	3,35 ± 1,43	1,81 ± 0,36	0,45 ± 0,10
	TG	1,02 ± 0,10	3,19 ± 1,01	1,82 ± 0,50	0,43 ± 0,15
	GG	0,39 ± 0,09**††	1,72 ± 0,40*†	0,50 ± 0,10**††	0,31 ± 0,09

*p<0,05 e ** p< 0,01 quando comparado ao genótipo selvagem *TT; †p<0,05 e †† p < 0,01 quando comparado ao genótipo heterozigoto *TG.

5. DISCUSSÃO

O câncer colorretal é uma das causas mais frequentes de morte nos países ocidentais. Os casos são distribuídos de forma similar entre os sexos. Este câncer é causado por um complexo de interações entre fatores ambientais e genéticos (Malekzadeh et al., 2009). O aumento no número de mutações no DNA e as predisposições genéticas são os principais fatores (Tudek & Speina, 2012). Variações nas sequências de DNA em genes de reparo são capazes de modular a eficiência do reparo ao DNA e podem estar relacionadas com o risco de câncer. A herança destas variações em genes de reparo ao DNA pode influenciar a susceptibilidade individual para o desenvolvimento de câncer colorretal (Karahalil et al., 2012).

Os dados obtidos neste estudo mostram uma frequência similar de câncer colorretal entre homens e mulheres, o que corrobora a estimativa do INCA para 2014. Até o presente momento, o estágio patológico, estabelecido pelo *International Union Against Cancer* (Fisseler-Eckhoff, 2009) é considerado o principal indicador do tumor e a base da conduta terapêutica. Nas amostras incluídas neste estudo, a maioria dos casos estava no estágio mais avançado (III e IV) assim como em outros estudos (Debusse & Ceelen, 2013; Barresi et al., 2014), o que representa grande relevância clínica para subseqüente tratamento do paciente.

Adicionalmente, polimorfismos em genes de reparo podem gerar insuficiência de proteínas e contribuir com risco de desenvolvimento de câncer colorretal. Alterações no DNA podem ocorrer tanto pela replicação, devido a deslização da DNA polimerase, como pela inserção de bases errôneas, que levam a incompatibilidade no pareamento. Fatores ambientais e endógenos podem induzir essas modificações nas bases. Dependendo do tipo específico de alteração na dupla hélice do DNA e a fase do ciclo celular, diferentes mecanismos de reparo são acionados para corrigir os danos. Na maioria dos casos, as células usam a fita complementar do DNA não modificada como um molde para restaurar a fita original (Michailidi et al., 2012).

No sistema MMR, mutações no gene *MLH1* são a principal causa de câncer colorretal (Michailidi et al., 2012). O polimorfismo -93G>A (rs1800734) localiza-se na região promotora de *MLH1*, que é responsável pela máxima atividade de transcrição deste gene (Arita et al., 2003), e tem sido associado com o risco de desenvolvimento do câncer colorretal (Wang et al., 2012). Devido a dois sítios de ligação dos fatores de transcrição NF-IL6 e GT-IIB, existentes nesta região promotora, o polimorfismo *MLH1* -93G>A pode reduzir a transcrição e expressão do gene e, desse modo, prejudicar a capacidade de reparo do DNA (Ito et al., 1999). Diversos autores investigaram a associação entre este polimorfismo e risco de câncer colorretal, mas os resultados foram inconclusivos. Numa análise de 1.518 pacientes com câncer colorretal, Allan et al. demonstraram que o alelo variante -93A foi associado com um aumento significativo do risco de câncer colorretal mediante a deficiência de *MLH1*, detectado por imunohistoquímica (Allan et al., 2008). Entretanto, alguns estudos não encontraram relação entre este polimorfismo e o risco de câncer colorretal (Koessler et al., 2008; Campbell et al., 2009). Uma meta-análise envolvendo 17.791 casos e 13.782 controles constatou que o polimorfismo -93G>A de fato está associado ao risco de câncer colorretal (Wang et al., 2012). O mecanismo biológico que poderia explicar esta associação pode ser que a substituição -93G>A altere a função da região promotora do gene e reduzindo assim sua atividade. Além disso, a alteração da ligação de fatores de transcrição pode causar metilação e silenciamento gênico (Ito et al., 1999). O presente trabalho aponta uma alta frequência do genótipo selvagem GG e uma menor frequência do genótipo homozigoto AA na população estudada, distribuição semelhante a de estudos conduzidos nos EUA (Allan et al., 2008), Espanha (Martinez-Uruena et al., 2013) e Canadá (Raptis et al., 2007). Até o momento não existem relatos deste polimorfismo em pacientes com câncer colorretal na população brasileira.

Estratificando os casos pela idade, foi observado, neste estudo, que apenas os indivíduos com idade acima de 62 anos eram portadores do alelo variante AA, sugerindo uma associação do alelo variante de *MLH1* à susceptibilidade do indivíduo em desenvolver câncer colorretal em idade tardia. Além disso, houve uma maior frequência do genótipo heterozigoto GA em pacientes com tumor no cólon, entretanto,

não houve diferença significativa entre o genótipo de *MLH1*, a faixa etária, a localização e estadiamento do tumor. Já em relação aos níveis de expressão gênica, o polimorfismo *MLH1* -93G>A reduziu de forma significativa a expressão deste gene em pacientes portadores do alelo variante AA, quando comparado com o genótipo selvagem. Esse achado sugere que o polimorfismo poderia aumentar o risco de desenvolvimento de câncer colorretal mediante a um sistema MMR deficiente, particularmente, pela perda somática na expressão da proteína MLH1, em que o promotor de *MLH1* seria transcricionalmente silenciado de maneira alelo-específico (Figura 15). Esse achado é consistente com estudos conduzidos por Allan et al.,(2008) e Martinez e Uruena (2013) que, utilizando imunohistoquímica, também atribuíram a perda de expressão de *MLH1* ao polimorfismo -93G>A. Além disso, este polimorfismo também está associado a um elevado nível de instabilidade de microssatélites, contribuindo para um risco aumentado de câncer colorretal (Raptis et al., 2007). De forma complementar, os dados apresentados neste trabalho mostram que a expressão de *MLH1* também foi reduzida significativamente em pacientes que possuíam algum grau de invasão em outros órgãos, assim como num estágio mais avançado do tumor, sugerindo que a deficiência no reparo MMR poderia contribuir para um pior prognóstico, favorecendo características mais graves do tumor.

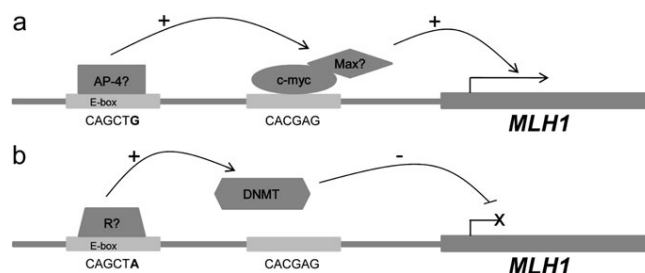


Figura 15 – Modelo proposto para efeito do polimorfismo -93G>A no silenciamento de *MLH1*. A) AP-4 ativa a expressão do gene *MLH1* através da interação com c-myc, que se liga a um motivo adjacente. AP-4 se liga apenas ao alelo -93G num motivo E-box. B) Um repressor pode se ligar ao alelo -93A reprimindo a expressão de *MLH1* de forma direta ou através do recrutamento de fatores modificadores epigenéticos tais como DNA metiltransferases (DNMTs), resultando na metilação do promotor e silenciamento de *MLH1*. Retirado de (Whiffin et al., 2011).

RAD51 é uma proteína componente do sistema de reparo DSB. Células com deficiência deste gene são caracterizadas por um sistema de reparo de recombinação homóloga defeituoso e demonstram instabilidade genômica (Thacker, 2005). A proteína XRCC3 também faz parte do reparo DBS por recombinação homóloga e é estruturalmente e funcionalmente relacionada com RAD51, uma vez que interage diretamente com RAD51 para desempenhar o reparo ao dano (Masson et al., 2001). A localização do polimorfismo 135G>C de *RAD51* na região 5'UTR indica uma relação na estabilidade do mRNA e tradução. A distribuição genotípica de *RAD51* deste estudo aponta que o alelo selvagem (GG) estava presente na maioria dos casos, seguido do genótipo heterozigoto (GC) e uma minoria do homozigoto variante (CC). Essa frequência é similar a de estudos realizados em populações do mundo todo como, por exemplo, um trabalho realizado na Polônia que associou a presença deste polimorfismo e câncer colorretal (Krupa et al., 2011). Para outros tipos de câncer, observou-se que este polimorfismo está relacionado ao desenvolvimento de câncer de bexiga na Índia (Sobti et al., 2012). De modo complementar, estudos conduzidos no Chile (Jara et al., 2007), em Portugal (Costa et al., 2007) e no Brasil (Dufloth et al., 2005) mostraram que a alteração neste gene foi associada a câncer de mama. É interessante notar que o alelo variante de *RAD51* estava presente apenas em amostras de pacientes com tumores localizados no reto, porém nenhuma das características clinico-patológicas foi associada de forma significativa com o polimorfismo 135G>C. Sugere-se que o alelo variante de *RAD51* 135G>C tenha um efeito no *splicing* alternativo de RAD51 na região 5'UTR. O nível de transcrição da isoforma alternativa 2 de RAD51 é menor em células portadoras do homozigoto 135CC, em comparação a outros genótipos. Interessantemente, a região 5'UTR que falta a isoforma 2 tem um nível elevado de GC e parece criar estruturas secundárias em *loop* altamente estáveis (Zuker, 2003). Essas estruturas são conhecidas por regular negativamente a tradução, pela inibição da ligação do sistema de tradução (Hughes, 2006). Dessa forma, pode-se concluir que o alelo 135C *RAD51* pode causar a perda da proteína RAD51, dado que de fato foram confirmados por nossos achados, elucidando o mecanismo molecular pelo qual este polimorfismo pode afetar o risco de câncer.

Já em relação ao nível de expressão dos genes afetados por este polimorfismo, pode-se observar que tanto *RAD51* quanto *XRCC3* tiveram uma repressão significativa em amostras de pacientes portadores dos genótipos heterozigoto e variante. Estes dados sugerem que esses pacientes apresentaram falhas no sistema de reparo ao DNA como resultado da ocorrência deste polimorfismo e assim, tiveram um maior risco de desenvolver o câncer (Krupa et al., 2011).

Independentemente do genótipo, também foi observada uma redução significativa na expressão de *RAD51* em amostras tumorais, tanto no cólon quanto no reto, em amostras de pacientes com algum grau de invasão do tumor a outros órgãos assim como uma repressão significativa em amostras de pacientes num estágio avançado do tumor (III e IV). Esses dados corroboram outro estudo que analisou diversos genes relacionados à replicação, ciclo celular, apoptose, proliferação e reparo utilizando a técnica de *microarray* e também encontrou uma redução na expressão de *RAD51* (Galamb et al., 2006).

Já em relação ao nível de expressão de *XRCC3*, houve uma redução significativa na expressão em pacientes com algum grau de invasão do tumor em outros órgãos. Em contrapartida, houve um aumento significativo deste gene em amostras tumorais quando comparada a amostras normais, em amostras de pacientes com tumores localizados no cólon e num estágio inicial do tumor (I e II). Este aumento na expressão de *XRCC3* também foi encontrado por Hu et al. (2013) que utilizou imunohistoquímica para associar o aumento na expressão deste gene a câncer de mama (Hu et al., 2013). Estudos que avaliaram a função de *XRCC3* revelaram que *XRCC3* é necessário para a proliferação de células MCF-7 e a diminuição da sua expressão levava ao acúmulo de quebras no DNA e indução de morte celular dependente de *p53* (Loignon et al., 2007). E, por outro lado, as células com uma superexpressão de *XRCC3* tinham características mais invasivas e apresentavam um maior perfil tumorigênico *in vivo* (Martinez-Marignac et al., 2011). O aumento da expressão deste gene num estágio inicial do tumor pode ser explicado pela ativação imediata de componentes do reparo por DBS em resposta ao dano no DNA.

No sistema de reparo BER, a DNA glicosilase é ativada quando há alterações de bases no DNA, devido aos danos induzidos por fatores intracelulares. APE1 reconhece o sítio abásico e hidrolisa a ligação fosfodiéster. O reparo é então catalisado pela DNA polimerase e o DNA é religado por uma DNA ligase (Lindahl, 2000). Existem 18 SNPs relatados no gene *APE1*, mas o mais extensivamente estudado é a transversão T>G que resulta na mutação Asp148Glu (Xi et al., 2004). Alguns estudos têm mostrado que variações funcionais nesse gene podem alterar as funções do sistema BER. O alelo G deste polimorfismo tem sido associado com um atraso na mitose após exposição à radiação ionizante (Hu et al., 2001). Em nossa população, houve uma maior frequência do genótipo heterozigoto TG, seguido do selvagem TT e homozigoto variante GG. Distribuição similar pôde ser observada em um estudo realizado na Polônia (Jelonek et al., 2010), China (Li et al., 2013), Turquia (Canbay et al., 2011) e nordeste do Brasil (Silva-Fernandes et al., 2012) sugerindo uma influência étnica entre as populações. Além disso, houve um predomínio do heterozigoto TG em pacientes acima de 52 anos, pacientes com tumores no cólon e num estágio mais avançado do tumor, porém não houve diferença significativa entre nenhum genótipo e as características clínico-patológicas. O polimorfismo Asp148Glu tem sido associado com o risco de câncer colorretal (Jelonek et al., 2010), câncer de pulmão (Zhou et al., 2002) e cabeça e pescoço (Sturgis et al., 1999) principalmente pela falha em se comunicar com outras proteínas do sistema BER e reparar danos induzidos por espécies reativas de oxigênio. De fato, estudos funcionais deste polimorfismo demonstraram que o alelo G pode alterar a atividade da proteína de endonuclease e de ligação ao DNA e assim, reduzir a capacidade em se comunicar com outras proteínas do sistema BER (Hadi et al., 2000). Os dados apresentados no presente trabalho estão de acordo com essa hipótese, uma vez que o genótipo GG do polimorfismo Asp148Glu afetou a expressão de outros genes do sistema BER, diminuindo de forma significativa a expressão dos genes *APE1*, *XRCC1* e *PARP*.

Além disso, independentemente deste polimorfismo, houve uma repressão significativa no gene *OGG1*, também do sistema BER, em amostras tumorais quando comparado às amostras normais, assim como em todos os estágios do tumor (I, II, III e

IV). A enzima *OGG1* é responsável por catalisar a excisão de 8-oxoGua do DNA, um resíduo produzido pela oxidação da guanina no DNA e que tem importante papel na carcinogênese, podendo levar a transições GC > TA e causar instabilidade genômica (Tudek & Speina, 2012). A diminuição de sua atividade encontrada na população estuda poderia então contribuir para o desenvolvimento do câncer colorretal. Ao contrário de *OGG1*, *XRCC1* teve sua expressão aumentada de forma significativa em amostras tumorais quando comparada as amostras normais, assim como em todos os estágios do tumor (I, II, III e IV). *XRCC1* estimula as atividades de DNA quinase e fosfatase de PNK na porção terminal do DNA danificado, acelerando assim, a reação global do sistema de reparo (Whitehouse et al., 2001). O aumento na expressão observado no presente trabalho pode ser uma resposta da proteína diante o dano ao DNA gerado durante a carcinogênese. Em seu estudo, Murakami e colaboradores (2001) utilizaram tecnologia de *microarray* para examinar o efeito da radiação UVB na expressão do mRNA de 588 genes relacionados com câncer em queratinócitos humanos, abrangendo genes que regulam crescimento, apoptose, adesão celular, citocinas e reparo ao DNA e, corroborando os dados do presente trabalho, demonstraram uma indução na expressão do gene *XRCC1* (Murakami et al., 2001). Os dados deste trabalho sugerem que uma cascata de alterações na expressão gênica acontece depois do dano ao DNA, culminando no perfil tumoral da célula.

O sistema de reparo NER é responsável pela remoção de um segmento do DNA com adutos causados por agentes químicos que fazem ligações covalentes entre diferentes bases, seguido pela restauração do DNA. *ERCC* e *ERCC2* são os principais componentes do complexo NER. Os dados obtidos neste estudo mostram um aumento significativo na expressão de *ERCC1* em amostras tumorais quando comparado às amostras normais, assim como nos estágios iniciais do tumor (I e II). Isso sugere que a expressão anormal de *ERCC1* pode compreender um passo inicial na progressão do câncer colorretal. Além disso, *ERCC1* está localizado na mesma região do cromossomo que *XRCC1*, que também teve uma indução significativa no gene, sugerindo um possível papel regulatório funcional em *cis* no sistema de reparo ao DNA, afetando tanto a região de *XRCC1* como de *ERCC1*. De fato, alguns estudos têm

demonstrado que vários genes do sistema de reparo NER, incluindo *ERCC1*, apresentam uma maior expressão depois da indução de dano ao DNA (Murakami et al., 2001) e em pacientes com câncer colorretal (Yu et al., 2006; Cho et al., 2011).

6. CONCLUSÃO

- O polimorfismo *MLH1* -93G>A reduziu de forma significativa a expressão deste gene em pacientes portadores do alelo variante AA, sugerindo que o polimorfismo poderia aumentar o risco de desenvolvimento de câncer colorretal mediante a um sistema MMR deficiente;
- A expressão de *MLH1* foi reduzida significativamente em pacientes que possuíam algum grau de invasão em outros órgãos, assim como num estágio mais avançado do tumor, sugerindo que a deficiência no reparo MMR poderia contribuir para um pior prognóstico, favorecendo características mais graves do tumor;
- *RAD51* e *XRCC3* tiveram uma repressão significativa em amostras de pacientes portadores dos genótipos heterozigoto e variante, sugerindo que esses pacientes apresentaram falhas no sistema de reparo ao DNA como resultado da ocorrência do polimorfismo 135G>C em *RAD51*;
- Houve uma redução significativa na expressão de *RAD51* em amostras tumorais, tanto no cólon quanto no reto, em amostras de pacientes com algum grau de invasão do tumor em outros órgãos assim como uma repressão significativa em amostras de pacientes num estágio avançado do tumor, sugerindo que a perda de atividade deste gene poderia contribuir para um pior prognóstico;
- Houve um aumento significativo na expressão de *XRCC3* em amostras tumorais, em amostras de pacientes com tumores localizados no cólon e num estágio inicial do tumor, sugerindo uma ativação imediata de componentes do reparo por DBS em resposta ao dano no DNA;
- O genótipo GG do polimorfismo Asp148Glu afetou outras proteínas do sistema BER diminuindo de forma significativa a expressão dos genes *APE1*, *XRCC1* e *PARP1*, sugerindo que esta alteração pode afetar a comunicação de

APE1 com outros componentes do sistema BER, reduzido a capacidade de reparo deste sistema;

- Houve uma repressão significativa no gene *OGG1*, também do sistema BER em amostras tumorais, assim como em todos os estágios do tumor;
- *XRCC1* teve sua expressão aumentada de forma significativa em amostras tumorais, assim como em todos os estágios do tumor;
- Houve um aumento significativo na expressão de *ERCC1* em amostras tumorais, assim como nos estágios iniciais do tumor, sugerindo que a expressão anormal de *ERCC1* pode compreender um passo inicial na progressão do câncer de colorretal;
- *ERCC1* estando localizado na mesma região do cromossomo que *XRCC1*, poderia ser alvo de um possível papel regulatório funcional em *cis* na maquinaria de reparo ao DNA, afetando tanto a região de *XRCC1* como de *ERCC1*;
- Os dados deste trabalho sugerem que uma cascata de alterações na expressão gênica acontece depois do dano ao DNA, culminando no perfil tumoral da célula.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allan, J. M.; Shorto, J.; Adlard, J.; Bury, J.; Coggins, R.; George, R., . . . Colorectal Cancer Study, Group. MLH1 -93G>A promoter polymorphism and risk of mismatch repair deficient colorectal cancer. **International journal of cancer. Journal international du cancer**. 123 (10): 2456-2459, 2008.
- Antoniou, A. C.; Sinilnikova, O. M.; Simard, J.; Leone, M.; Dumont, M.; Neuhausen, S. L., . . . Consortium of Investigators of Modifiers of, Brca. RAD51 135G-->C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. **American journal of human genetics**. 81 (6): 1186-1200, 2007.
- Arita, M.; Zhong, X.; Min, Z.; Hemmi, H.; Shimatake, H. Multiple sites required for expression in 5'-flanking region of the hMLH1 gene. **Gene**. 306 57-65, 2003.
- Barresi, V.; Bonetti, L. R.; Ieni, A.; Branca, G.; Baron, L.; Tuccari, G. Histologic grading based on counting poorly differentiated clusters in preoperative biopsy predicts nodal involvement and pTNM stage in colorectal cancer patients. **Human pathology**. 45 (2): 268-275, 2014.
- Barrett, J. C.; Wiseman, R. W. Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis: relevance to carcinogen risk assessment. **Environmental health perspectives**. 76 65-70, 1987.
- Campbell, P. T.; Curtin, K.; Ulrich, C. M.; Samowitz, W. S.; Bigler, J.; Velicer, C. M., . . . Slattery, M. L. Mismatch repair polymorphisms and risk of colon cancer, tumour microsatellite instability and interactions with lifestyle factors. **Gut**. 58 (5): 661-667, 2009.
- Canbay, E.; Cakmakoglu, B.; Zeybek, U.; Sozen, S.; Cacina, C.; Gulluoglu, M., . . . Bugra, D. Association of APE1 and hOGG1 polymorphisms with colorectal cancer risk in a Turkish population. **Current medical research and opinion**. 27 (7): 1295-1302, 2011.
- Chen, J.; Larochelle, S.; Li, X.; Suter, B. Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. **Nature**. 424 (6945): 228-232, 2003.
- Cheng, K. C.; Cahill, D. S.; Kasai, H.; Nishimura, S.; Loeb, L. A. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. **The Journal of biological chemistry**. 267 (1): 166-172, 1992.
- Cho, Y. B.; Chung, H. J.; Lee, W. Y.; Choi, S. H.; Kim, H. C.; Yun, S. H.; Chun, H. K. Relationship between TYMS and ERCC1 mRNA expression and in vitro

- chemosensitivity in colorectal cancer. **Anticancer research**. 31 (11): 3843-3849, 2011.
- Costa, S.; Pinto, D.; Pereira, D.; Rodrigues, H.; Cameselle-Teijeiro, J.; Medeiros, R.; Schmitt, F. DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: a study on a Portuguese population. **Breast cancer research and treatment**. 103 (2): 209-217, 2007.
- Cummings, O. W. Pathology of the adenoma-carcinoma sequence: from aberrant crypt focus to invasive carcinoma. **Seminars in gastrointestinal disease**. 11 (4): 229-237, 2000.
- Deaconescu, A. M.; Artsimovitch, I.; Grigorieff, N. Interplay of DNA repair with transcription: from structures to mechanisms. **Trends in biochemical sciences**. 37 (12): 543-552, 2012.
- Debunne, H.; Ceelen, W. Mucinous differentiation in colorectal cancer: molecular, histological and clinical aspects. **Acta chirurgica Belgica**. 113 (6): 385-390, 2013.
- Dianov, G. L.; Hubscher, U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. **Nucleic acids research**. 41 (6): 3483-3490, 2013.
- Dianov, G. L.; Thybo, T.; Dianova, I.; Lipinski, L. J.; Bohr, V. A. Single nucleotide patch base excision repair is the major pathway for removal of thymine glycol from DNA in human cell extracts. **The Journal of biological chemistry**. 275 (16): 11809-11813, 2000.
- Dufloth, R. M.; Costa, S.; Schmitt, F.; Zeferino, L. C. DNA repair gene polymorphisms and susceptibility to familial breast cancer in a group of patients from Campinas, Brazil. **Genetics and molecular research : GMR**. 4 (4): 771-782, 2005.
- Finlay, G. J. Genetics, molecular biology and colorectal cancer. **Mutation research**. 290 (1): 3-12, 1993.
- Fisseler-Eckhoff, A. [New TNM classification of malignant lung tumors 2009 from a pathology perspective]. **Der Pathologe**. 30 Suppl 2 193-199, 2009.
- Galamb, O.; Sipos, F.; Dinya, E.; Spisak, S.; Tulassay, Z.; Molnar, B. mRNA expression, functional profiling and multivariate classification of colon biopsy specimen by cDNA overall glass microarray. **World journal of gastroenterology : WJG**. 12 (43): 6998-7006, 2006.
- Grube, K.; Burkle, A. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 89 (24): 11759-11763, 1992.

- Hadi, M. Z.; Coleman, M. A.; Fidelis, K.; Mohrenweiser, H. W.; Wilson, D. M., 3rd. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. **Nucleic acids research**. 28 (20): 3871-3879, 2000.
- Hasselbach, L.; Haase, S.; Fischer, D.; Kolberg, H. C.; Sturzbecher, H. W. Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene Rad51. **European journal of gynaecological oncology**. 26 (6): 589-598, 2005.
- Hefferin, M. L.; Tomkinson, A. E. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. **DNA repair**. 4 (6): 639-648, 2005.
- Hu, J. J.; Smith, T. R.; Miller, M. S.; Mohrenweiser, H. W.; Golden, A.; Case, L. D. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. **Carcinogenesis**. 22 (6): 917-922, 2001.
- Hu, J.; Wang, N.; Wang, Y. J. XRCC3 and RAD51 expression are associated with clinical factors in breast cancer. **PloS one**. 8 (8): e72104, 2013.
- Hughes, T. A. Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. **Trends in genetics : TIG**. 22 (3): 119-122, 2006.
- Ito, E.; Yanagisawa, Y.; Iwahashi, Y.; Suzuki, Y.; Nagasaki, H.; Akiyama, Y., . . . Maruyama, K. A core promoter and a frequent single-nucleotide polymorphism of the mismatch repair gene hMLH1. **Biochemical and biophysical research communications**. 256 (3): 488-494, 1999.
- Iwakuma, T.; Shiraishi, A.; Fukuhara, M.; Kawate, H.; Sekiguchi, M. Organization and expression of the mouse gene for DNA repair methyltransferase. **DNA and cell biology**. 15 (10): 863-872, 1996.
- Jagannathan, I.; Cole, H. A.; Hayes, J. J. Base excision repair in nucleosome substrates. **Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology**. 14 (1): 27-37, 2006.
- Jara, L.; Acevedo, M. L.; Blanco, R.; Castro, V. G.; Bravo, T.; Gomez, F., . . . Gonzalez-Hormazabal, P. RAD51 135G>C polymorphism and risk of familial breast cancer in a South American population. **Cancer genetics and cytogenetics**. 178 (1): 65-69, 2007.
- Jass, J. R. Colorectal cancer: a multipathway disease. **Critical reviews in oncogenesis**. 12 (3-4): 273-287, 2006.
- Jelonek, K.; Gdowicz-Klosok, A.; Pietrowska, M.; Borkowska, M.; Korfanty, J.; Rzeszowska-Wolny, J.; Widlak, P. Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and

- risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population. **Journal of applied genetics**. 51 (3): 343-352, 2010.
- Karahalil, B.; Bohr, V. A.; Wilson, D. M., 3rd. Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. **Human & experimental toxicology**. 31 (10): 981-1005, 2012.
- Kasahara, M.; Osawa, K.; Yoshida, K.; Miyaishi, A.; Osawa, Y.; Inoue, N., . . . Takahashi, J. Association of MUTYH Gln324His and APEX1 Asp148Glu with colorectal cancer and smoking in a Japanese population. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**. 27 49, 2008.
- Kashiyama, K.; Nakazawa, Y.; Pilz, D. T.; Guo, C.; Shimada, M.; Sasaki, K., . . . Ogi, T. Malfunction of nuclease ERCC1-XPF results in diverse clinical manifestations and causes Cockayne syndrome, xeroderma pigmentosum, and Fanconi anemia. **American journal of human genetics**. 92 (5): 807-819, 2013.
- Koessler, T.; Oestergaard, M. Z.; Song, H.; Tyrer, J.; Perkins, B.; Dunning, A. M., . . . Pharoah, P. D. Common variants in mismatch repair genes and risk of colorectal cancer. **Gut**. 57 (8): 1097-1101, 2008.
- Kolodner, R. D.; Marsischky, G. T. Eukaryotic DNA mismatch repair. **Current opinion in genetics & development**. 9 (1): 89-96, 1999.
- Krupa, R.; Sliwinski, T.; Wisniewska-Jarosinska, M.; Chojnacki, J.; Wasylecka, M.; Dziki, L., . . . Blasiak, J. Polymorphisms in RAD51, XRCC2 and XRCC3 genes of the homologous recombination repair in colorectal cancer--a case control study. **Molecular biology reports**. 38 (4): 2849-2854, 2011.
- Krupa, R.; Synowiec, E.; Pawlowska, E.; Morawiec, Z.; Sobczuk, A.; Zadrozny, M., . . . Blasiak, J. Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer. **Experimental and molecular pathology**. 87 (1): 32-35, 2009.
- Kwon, H. C.; Roh, M. S.; Oh, S. Y.; Kim, S. H.; Kim, M. C.; Kim, J. S.; Kim, H. J. Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**. 18 (3): 504-509, 2007.
- Lagerwerf, S.; Vrouwe, M. G.; Overmeer, R. M.; Fousteri, M. I.; Mullenders, L. H. DNA damage response and transcription. **DNA repair**. 10 (7): 743-750, 2011.
- Larsson, S. C.; Wolk, A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. **International journal of cancer. Journal international du cancer**. 119 (11): 2657-2664, 2006.

- Li, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell research**. 18 (1): 85-98, 2008.
- Li, Y.; Li, S.; Wu, Z.; Hu, F.; Zhu, L.; Zhao, X., . . . Zhao, Y. Polymorphisms in genes of APE1, PARP1, and XRCC1: risk and prognosis of colorectal cancer in a northeast Chinese population. **Medical oncology**. 30 (2): 505, 2013.
- Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**. 362 (6422): 709-715, 1993.
- Lindahl, T. Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. **Mutation research**. 462 (2-3): 129-135, 2000.
- Lipkin, S. M.; Wang, V.; Jacoby, R.; Banerjee-Basu, S.; Baxevanis, A. D.; Lynch, H. T., . . . Collins, F. S. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. **Nature genetics**. 24 (1): 27-35, 2000.
- Loetscher, P.; Alvarez-Gonzalez, R.; Althaus, F. R. Poly(ADP-ribose) may signal changing metabolic conditions to the chromatin of mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 84 (5): 1286-1289, 1987.
- Loignon, M.; Amrein, L.; Dunn, M.; Aloyz, R. XRCC3 depletion induces spontaneous DNA breaks and p53-dependent cell death. **Cell cycle**. 6 (5): 606-611, 2007.
- Malekzadeh, R.; Bishehsari, F.; Mahdavinia, M.; Ansari, R. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in iran: a review. **Archives of Iranian medicine**. 12 (2): 161-169, 2009.
- Martinez-Marignac, V. L.; Rodrigue, A.; Davidson, D.; Couillard, M.; Al-Moustafa, A. E.; Abramovitz, M., . . . Aloyz, R. The effect of a DNA repair gene on cellular invasiveness: XRCC3 over-expression in breast cancer cells. **PloS one**. 6 (1): e16394, 2011.
- Martinez-Uruena, N.; Macias, L.; Perez-Cabornero, L.; Infante, M.; Lastra, E.; Cruz, J. J., . . . Duran, M. Incidence of -93 MLH1 promoter polymorphism in familial and sporadic colorectal cancer. **Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland**. 15 (3): e118-123, 2013.
- Masson, J. Y.; Tarsounas, M. C.; Stasiak, A. Z.; Stasiak, A.; Shah, R.; McIlwraith, M. J., . . . West, S. C. Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. **Genes & development**. 15 (24): 3296-3307, 2001.
- Matullo, G.; Palli, D.; Peluso, M.; Guarrera, S.; Carturan, S.; Celentano, E., . . . Vineis, P. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. **Carcinogenesis**. 22 (9): 1437-1445, 2001.

- Mei, M.; Liu, D.; Dong, S.; Ingvarsson, S.; Goodfellow, P. J.; Chen, H. The MLH1 -93 promoter variant influences gene expression. **Cancer epidemiology**. 34 (1): 93-95, 2010.
- Michailidi, C.; Papavassiliou, A. G.; Troungos, C. DNA repair mechanisms in colorectal carcinogenesis. **Current molecular medicine**. 12 (3): 237-246, 2012.
- Michor, F.; Iwasa, Y.; Vogelstein, B.; Lengauer, C.; Nowak, M. A. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? **Seminars in cancer biology**. 15 (1): 43-49, 2005.
- Moghaddam, A. A.; Woodward, M.; Huxley, R. Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**. 16 (12): 2533-2547, 2007.
- Montgomery, R. K.; Mulberg, A. E.; Grand, R. J. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. **Gastroenterology**. 116 (3): 702-731, 1999.
- Moreno, V.; Gemignani, F.; Landi, S.; Gioia-Patricola, L.; Chabrier, A.; Blanco, I., . . . Canzian, F. Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**. 12 (7 Pt 1): 2101-2108, 2006.
- Moskal, A.; Norat, T.; Ferrari, P.; Riboli, E. Alcohol intake and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis of published cohort studies. **International journal of cancer. Journal international du cancer**. 120 (3): 664-671, 2007.
- Murakami, T.; Fujimoto, M.; Ohtsuki, M.; Nakagawa, H. Expression profiling of cancer-related genes in human keratinocytes following non-lethal ultraviolet B irradiation. **Journal of dermatological science**. 27 (2): 121-129, 2001.
- Nash, R. A.; Caldecott, K. W.; Barnes, D. E.; Lindahl, T. XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. **Biochemistry**. 36 (17): 5207-5211, 1997.
- Nijnik, A.; Woodbine, L.; Marchetti, C.; Dawson, S.; Lambe, T.; Liu, C., . . . Cornall, R. J. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. **Nature**. 447 (7145): 686-690, 2007.
- Nosho, K.; Yamamoto, H.; Mikami, M.; Taniguchi, H.; Takahashi, T.; Adachi, Y., . . . Shinomura, Y. Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the early stage of colorectal carcinogenesis. **European journal of cancer**. 42 (14): 2374-2381, 2006.

- Nouspikel, T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**. 66 (6): 994-1009, 2009.
- Obtulowicz, T.; Swoboda, M.; Speina, E.; Gackowski, D.; Rozalski, R.; Siomek, A., . . . Tudek, B. Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. **Mutagenesis**. 25 (5): 463-471, 2010.
- Pardini, B.; Naccarati, A.; Novotny, J.; Smerhovsky, Z.; Vodickova, L.; Polakova, V., . . . Vodicka, P. DNA repair genetic polymorphisms and risk of colorectal cancer in the Czech Republic. **Mutation research**. 638 (1-2): 146-153, 2008.
- Paz-Elizur, T.; Sevilya, Z.; Leitner-Dagan, Y.; Elinger, D.; Roisman, L. C.; Livneh, Z. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. **Cancer letters**. 266 (1): 60-72, 2008.
- Peterson, C. L.; Cote, J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. **Genes & development**. 18 (6): 602-616, 2004.
- Potter, J. D. Colorectal cancer: molecules and populations. **Journal of the National Cancer Institute**. 91 (11): 916-932, 1999.
- Rao JN, Wang JY. (2010). *San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences*.
- Raptis, S.; Mrkonjic, M.; Green, R. C.; Pethe, V. V.; Monga, N.; Chan, Y. M., . . . Bapat, B. MLH1 -93G>A promoter polymorphism and the risk of microsatellite-unstable colorectal cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. 99 (6): 463-474, 2007.
- Ronai, Z. ras oncogene detection in pre-neoplastic lesions: possible applications for diagnosis and prevention. **Oncology research**. 4 (2): 45-48, 1992.
- Schreiber, V.; Dantzer, F.; Ame, J. C.; de Murcia, G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. **Nature reviews. Molecular cell biology**. 7 (7): 517-528, 2006.
- Shackelford, D. A.; Tobaru, T.; Zhang, S.; Zivin, J. A. Changes in expression of the DNA repair protein complex DNA-dependent protein kinase after ischemia and reperfusion. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 19 (12): 4727-4738, 1999.
- Shin, A.; Lee, K. M.; Ahn, B.; Park, C. G.; Noh, S. K.; Park, D. Y., . . . Kang, D. Genotype-phenotype relationship between DNA repair gene genetic polymorphisms and DNA repair capacity. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**. 9 (3): 501-505, 2008.

- Silva-Fernandes, I. J.; da Silva, T. A.; Agnez-Lima, L. F.; Ferreira, M. V.; Rabenhorst, S. H. Helicobacter pylori genotype and polymorphisms in DNA repair enzymes: where do they correlate in gastric cancer? **Journal of surgical oncology**. 106 (4): 448-455, 2012.
- Slyskova, J.; Korenkova, V.; Collins, A. R.; Prochazka, P.; Vodickova, L.; Svec, J., . . . Vodicka, P. Functional, genetic, and epigenetic aspects of base and nucleotide excision repair in colorectal carcinomas. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**. 18 (21): 5878-5887, 2012.
- Smilenov, L. B. Tumor development: insufficiency and local network assembly. **Cancer letters**. 240 (1): 17-28, 2006.
- Sobti, R. C.; Kaur, S.; Sharma, V. L.; Singh, S. K.; Hosseini, S. A.; Kler, R. Susceptibility of XPD and RAD51 genetic variants to carcinoma of urinary bladder in North Indian population. **DNA and cell biology**. 31 (2): 199-210, 2012.
- Solier, S.; Zhang, Y. W.; Ballestrero, A.; Pommier, Y.; Zoppoli, G. DNA damage response pathways and cell cycle checkpoints in colorectal cancer: current concepts and future perspectives for targeted treatment. **Current cancer drug targets**. 12 (4): 356-371, 2012.
- Song, J. Y.; Lim, J. W.; Kim, H.; Morio, T.; Kim, K. H. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. **The Journal of biological chemistry**. 278 (38): 36676-36687, 2003.
- Stratton, M. R. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. **Science**. 331 (6024): 1553-1558, 2011.
- Sturgis, E. M.; Castillo, E. J.; Li, L.; Zheng, R.; Eicher, S. A.; Clayman, G. L., . . . Wei, Q. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Carcinogenesis**. 20 (11): 2125-2129, 1999.
- Sulzyc-Bielicka, V.; Domagala, P.; Hybiak, J.; Majewicz-Broda, A.; Safranow, K.; Domagala, W. Colorectal cancers differ in respect of PARP-1 protein expression. **Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists**. 63 (2): 87-92, 2012.
- Tennstedt, P.; Fresow, R.; Simon, R.; Marx, A.; Terracciano, L.; Petersen, C., . . . Borgmann, K. RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. **International journal of cancer. Journal international du cancer**. 132 (9): 2118-2126, 2013.

- Thacker, J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. **Cancer letters**. 219 (2): 125-135, 2005.
- Tudek, B.; Speina, E. Oxidatively damaged DNA and its repair in colon carcinogenesis. **Mutation research**. 736 (1-2): 82-92, 2012.
- Tutlewska, K.; Lubinski, J.; Kurzawski, G. Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome - literature review. **Hereditary cancer in clinical practice**. 11 (1): 9, 2013.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**. 39 (1): 44-84, 2007.
- Vasen, H. F.; Moslein, G.; Alonso, A.; Aretz, S.; Bernstein, I.; Bertario, L., . . . Muller, H. Recommendations to improve identification of hereditary and familial colorectal cancer in Europe. **Familial cancer**. 9 (2): 109-115, 2010.
- Vogelstein, B.; Fearon, E. R.; Hamilton, S. R.; Kern, S. E.; Preisinger, A. C.; Leppert, M., . . . Bos, J. L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **The New England journal of medicine**. 319 (9): 525-532, 1988.
- Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature medicine**. 10 (8): 789-799, 2004.
- Wang, T.; Liu, Y.; Sima, L.; Shi, L.; Wang, Z.; Ni, C., . . . Wang, M. Association between MLH1 -93G>a polymorphism and risk of colorectal cancer. **PloS one**. 7 (11): e50449, 2012.
- Whiffin, N.; Broderick, P.; Lubbe, S. J.; Pittman, A. M.; Penegar, S.; Chandler, I.; Houlston, R. S. MLH1-93G > A is a risk factor for MSI colorectal cancer. **Carcinogenesis**. 32 (8): 1157-1161, 2011.
- Whitehouse, C. J.; Taylor, R. M.; Thistlethwaite, A.; Zhang, H.; Karimi-Busheri, F.; Lasko, D. D., . . . Caldecott, K. W. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. **Cell**. 104 (1): 107-117, 2001.
- Wouters, M. D.; van Gent, D. C.; Hoeijmakers, J. H.; Pothof, J. MicroRNAs, the DNA damage response and cancer. **Mutation research**. 717 (1-2): 54-66, 2011.
- Xanthoudakis, S.; Miao, G.; Wang, F.; Pan, Y. C.; Curran, T. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. **The EMBO journal**. 11 (9): 3323-3335, 1992.

- Xi, T.; Jones, I. M.; Mohrenweiser, H. W. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. **Genomics**. 83 (6): 970-979, 2004.
- Yu, J.; Mallon, M. A.; Zhang, W.; Freimuth, R. R.; Marsh, S.; Watson, M. A., . . . McLeod, H. L. DNA repair pathway profiling and microsatellite instability in colorectal cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**. 12 (17): 5104-5111, 2006.
- Yuanming, L.; Lineng, Z.; Baorong, S.; Junjie, P.; Sanjun, C. BRCA1 and ERCC1 mRNA levels are associated with lymph node metastasis in Chinese patients with colorectal cancer. **BMC cancer**. 13 103, 2013.
- Zhou, W.; Liu, G.; Miller, D. P.; Thurston, S. W.; Xu, L. L.; Wain, J. C., . . . Christiani, D. C. Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer. **Cancer research**. 62 (5): 1377-1381, 2002.
- Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic acids research**. 31 (13): 3406-3415, 2003.

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 ENEOPLÁSTICAS 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)

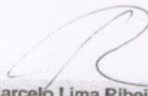
Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

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: *APROVADO*

Atenciosamente,



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