

REGINA CAELI GUERRA POÇAS

**DANO OXIDATIVO AO DNA EM TECIDO NORMAL,
ADENOMA E ADENOCARCINOMA COLORRETAL**

Bragança Paulista, 2014

REGINA CAELI GUERRA POÇAS

**DANO OXIDATIVO AO DNA EM TECIDO NORMAL,
ADENOMA E ADENOCARCINOMA COLORRETAL**

ORIENTADOR

PROF^a. DENISE GONÇALVES PRIOLLI

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Bragança Paulista, 2014

FICHA CATALOGRAFICA

ATA

Dedicatória

À toda minha família, em especial a meus pais, Maria e Alberto e a minha querida irmã Stella. Não se contentaram em presentear-me com a vida. Revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Abriram as portas do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar.

À querida Orientadora Denise Gonçalves Priolli.

“Venham até a borda, ele disse. Eles disseram: Nós temos medo. Venham até a borda, ele insistiu. Eles foram, ele os empurrou...E eles voaram.” (Guilherme Apollinaire)

Muito obrigada pela sensibilidade, dedicação, paciência e conhecimento. Se o exercício da orientação é uma arte, você é a sua mais completa tradução. Sou sua eterna discípula e admiradora.

Aos queridos Professores Claudionor Picarelli e Luiz Fernando Ribeiro da Silva Paulin.

São meus presentes de Deus. Médicos, professores e pessoas que tento ser ao menos um pouco parecida. Responsáveis pela minha escolha da profissão. Proporcionaram-me a concretização do maior sonho de minha vida, o exercício da docência. Não há sentimentos, palavras e atos que expressem meu carinho e admiração. Agradeço infinitamente a oportunidade de conhecê-los.

AGRADECIMENTOS

Aos grandes amigos do Departamento de Psiquiatria, Residentes e alunos da Medicina. *“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, mas não vai só, nem nos deixa sós, leva um pouco de nós, deixa um pouco de si. Há os que levaram muito, mas não há os que nada deixaram. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso...”*

Antoine de Saint-Exupéry

À querida amiga Eloísa Cristina Bueno, que acompanhou meus passos, mesmo quando foi preciso eu correr para andarmos juntas. Que abraçou este meu sonho, como se fosse seu, sempre se mostrando disponível. Não há como agradecer sua amizade e sua imensa contribuição para concretização deste projeto.

Aos Pacientes. Agradeço humildemente tudo o que me proporcionaram. Talvez nem percebessem que participaram da construção de um ideal e que foram imprescindíveis para esta conquista.

RESUMO

Evidências sugerem que a agressão crônica ao epitélio cólico pelas espécies reativas de oxigênio possa ser fator predisponente ao câncer colorretal. Logo após ser deflagrado o processo mutagênico, ocorre transcrição de proteínas defeituosas que atuarão nos processos de proliferação, diferenciação e disseminação tumoral. Pesquisas vêm demonstrando que é possível detectar o dano oxidativo no tecido considerado histologicamente normal. Contudo, poucos são os estudos que compararam o dano oxidativo existente no tecido normal e em tecido displásico ou neoplásico. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é comparar o dano oxidativo ao DNA no tecido normal e tumoral de pacientes portadores de adenoma e adenocarcinoma colorretal. **Casuística e Método:** As biópsias utilizadas foram obtidas por colonoscopia de mucosa colônica. Foi analisado dano oxidativo ao DNA pelo Ensaio Cometa no tecido tumoral e normal de 44 doentes. A análise estatística foi executada por estatística descritiva; medidas de tendência central; testes de normalidade, análise de variância com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$) para a rejeição da hipótese de nulidade. **Resultados:** A casuística contou com 23 adenomas e 21 adenocarcinomas, sendo 22 homens e 22 mulheres, com média de idade de 60.4 anos para os adenomas e 57 anos para os adenocarcinomas. Houve diferença ($p = 0,002$) entre os níveis de dano observados no adenoma quando comparados aos níveis encontrados no tecido normal adjacente a ele. O mesmo ocorreu quando comparamos o adenocarcinoma com seu tecido normal correspondente ($p = 0,000$). Ao se comparar a quantidade de dano oxidativo ao DNA em portadores de adenoma e adenocarcinoma observou-se maior dano oxidativo ao DNA nos adenomas ($p = 0,04$). **Conclusão:** Há maiores quantidades de dano oxidativo ao DNA no tecido tumoral quando comparado ao tecido normal. O dano oxidativo ao DNA é maior nos adenomas comparativamente aos adenocarcinomas.

Palavras-chave: Neoplasias Colorretais. Pólipos do Colo. Estresse Oxidativo. Dano ao DNA. Ensaio Cometa.

ABSTRACT

The chronic aggression to the colic epithelium by oxygen reactive species has been suggested as a predisposing factor to colorectal cancer. After the mutagenic process has being triggered, a transcription of defective proteins will act in the processes of proliferation, differentiation and tumor spread. Few studies have been done to approach the relation between oxidative DNA damage and adenoma-carcinoma sequence as a phenomenon in the initial colorectal cancer development. Objective: The objective is to compare the oxidative DNA damage from colon tissue of patients with adenoma and adenocarcinoma. Methods: The samples were obtained by biopsies from colonic mucosa by colonoscopy. Oxidative damage was analyzed by Komet-assay in tumor tissue and normal tissue of 44 patients. Statistical analysis was performed by descriptive analysis, normality and comparison test, adopting significance level below 5% ($p < 0.05$). Results: The sample included 23 adenomas and 21 adenocarcinomas, 22 were men and 22 women with a mean age of 60.4 years for adenomas and adenocarcinomas for 57 years. There was difference ($p = 0.002$) between oxidative DNA damage in tissue obtain from adenoma with compared to the normal adjacent tissue. The same happened comparing adenocarcinoma with its corresponding normal tissue ($p = 0.000$). Oxidative damage in patients with adenoma and adenocarcinoma showed a difference between both and its normal tissue ($p = 0.04$). Conclusion: There are greater amounts of oxidative DNA damage in tumor tissue compared to normal tissue. Oxidative DNA damage is higher in adenomas than adenocarcinomas.

Keywords: Colorectal Cancer. Colon Polyps. Oxidative Stress. DNA Damage. Comet Assay.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ l - Microlitro

μ m – Micrômetro

8-OHdG – 8-Hidróxi-guanina

CCR – Câncer Colorretal

CIN – do Inglês *Chromosomal Instability*, Instabilidade Cromossômica

CONEP – Conselho de Ética em Pesquisa

DMSO – do Inglês *Dimethyl Sulfoxide*, Sulfóxido de Dimetilo

EDTA – do Inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etilenodiaminotetraacético

ELN – Espécies Livres de Nitrogênio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

HBSS – do Inglês *Hank's Balanced Salt Solution*, Solução salina equilibrada de Hank

HE - Hematoxilina-Eosina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

M – Molar

mA – MiliAmpére

ml – Mililitro

mM – Milimolar

RNAm – Ácido Ribonucléico mensageiro

MSI – do Inglês *Microsatellite Instability*, Instabilidade de Microssatélites

PBS – do Inglês *Phosphate Buffered Saline*, Solução Tampão Fosfato-salino

SDS - do Inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*, Dodecil sulfato de sódio

TM – do Inglês *Tail Moment*, Momento de Cauda

UNIFAG – Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia

V – Volts

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre dano oxidativo ao DNA em adenoma e tecido normal dos mesmos pacientes17

Tabela 2: Comparação entre dano oxidativo ao DNA no adenocarcinoma e tecido normal dos mesmos pacientes.....18

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Delineamento do estudo. Foram feitas 127 colonoscopias de onde vários diagnósticos macroscópicos foram feitos. Os casos de doenças inflamatória intestinal e doença polipoide foram excluídos. Das lesões macroscópicas, sugestivas de pólipos ou tumores, foram colhidas biópsias da própria lesão e de seu seguimento proximal, a cinco centímetros da lesão, em área macroscopicamente normal. Desta forma, a amostra final foi composta tecido normal, adenoma e adenocarcinoma11
- Figura 2:** Casuística. Distribuição da amostra estudada de acordo com o diagnóstico anatomopatológico15
- Figura 3:** Microfotografia de corte histológico de cólon normal. Ausência de atipia celular, conformação glandular normal. HE. 400X.....16
- Figura 4:** Microfotografia de corte histológico de adenoma de cólon. Notar as longas papilas estruturadas em torno do eixo vascular em forma de dedo de luva. HE. 100X...16
- Figura 5:** Microfotografia de corte histológico de adenocarcinoma de cólon. Notar a atipia celular pronunciada, perda da polarização celular, inversão da relação núcleo/citoplasma, núcleos vesiculosos, nucléolos evidentes. HE. 400X17
- Figura 6:** Microfotografia em microscópio de fluorescência com intensificação de imagem. Dano oxidativo ao DNA em cólon normal. Notar ausência de fragmentação do DNA, com regularidade da borda nuclear e ausência de formação de cauda. Ensaio do Cometa18
- Figura 7:** Microfotografia em microscópio de fluorescência com intensificação de imagem. Dano oxidativo ao DNA em adenoma de cólon. Notar intensa fragmentação

nuclear do DNA, demonstrada pela formação da “cauda do cometa” (Tail Moment).
Ensaio do Cometa19

Figura 8: Microfotografia em microscópio de fluorescência com intensificação de imagem. Dano oxidativo ao DNA em adenocarcinoma de cólon. Notar fragmentação do DNA, demonstrada pela formação da “cauda do cometa” (Tail Moment). Ensaio do Cometa19

Figura 9: Dano oxidativo ao DNA em adenoma, adenocarcinoma e respectivos tecidos normais adjacentes. Notar diferença entre o tecido tumoral e o tecido normal adjacente, assim como entre os tecidos normais de pacientes portadores de adenoma e adenocarcinoma. Ensaio Cometa20

Figura 10: Dano oxidativo ao DNA em adenoma e tecido normal adjacente. Notar maior dano oxidativo ao DNA no adenoma quando comparado ao tecido normal adjacente. Ensaio Cometa21

Figura 11: Dano oxidativo ao DNA em adenocarcinoma e tecido normal adjacente. Notar maior dano oxidativo ao DNA no adenocarcinoma quando comparado ao tecido normal adjacente. Ensaio Cometa22

Figura 12: Dano oxidativo ao DNA em adenoma e adenocarcinoma. Notar maior dano oxidativo ao DNA nos adenomas. Ensaio Cometa23

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVO	9
3.	MÉTODO	10
3.1.	Amostra	10
3.2.	Conservação das Amostras.....	12
3.3.	Estudo Histopatológico	12
3.4.	Ensaio Cometa	12
3.5.	Análise Estatística	14
4.	RESULTADOS	15
4.1.	Casuística	15
4.2.	Quantificação do dano oxidativo ao DNA	17
4.3.	Comparação entre os valores de dano oxidativo observado nos tecidos neoplásicos e normais correspondentes	20
4.4.	Comparação entre os valores de dano oxidativo ao DNA observado nos tecidos normais	22
4.5.	Comparação entre os valores de dano oxidativo ao DNA observado nos tecidos neoplásicos	23

5.	DISCUSSÃO.....	24
5.1.	Quanto ao Método	24
5.1.1.	Quanto à Casuística.....	24
5.1.2.	Quanto ao Ensaio Cometa.....	25
5.2.	Quanto aos Resultados.....	26
5.3.	Considerações Finais.....	28
6.	CONCLUSÃO	30
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
8.	ANEXO.....	37

1. INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda causa de morte no mundo, ficando atrás somente das doenças cardiovasculares. Entre os cânceres de maior incidência, o câncer colorretal (CCR) é o quarto mais comum na espécie humana, excluindo-se os tumores de pele, em ordem de incidência: próstata, mama, pulmão e CCR (Instituto Nacional do Câncer, 2013; Cancer Facts & Figures, 2013).

As taxas de incidência do CCR variam bastante entre diferentes regiões do mundo, havendo predileção por áreas de maior desenvolvimento. A Austrália, Nova Zelândia, Europa e América do Norte são regiões com maior incidência, enquanto a África e o Centro-Sul da Ásia possuem as menores taxas (Jemal et al., 2011).

Estimou-se que em 2012 foram 103.170 novos casos de câncer de cólon nos Estados Unidos (Cancer Facts & Figures, 2013). Em 2012, calculou-se que 557.190 americanos morreram de câncer. Óbitos por câncer devem continuar a crescer além de 11 milhões até 2030 (Cancer Facts & Figures, 2013).

A incidência e a taxa de mortalidade pelo CCR aumenta com a idade. Noventa por cento dos novos casos e 94% das mortes ocorrem em indivíduos com 50 anos ou mais, sendo a incidência 35% a 40% maior em homens do que em mulheres e mais elevadas em afroamericanos (Cancer Facts & Figures, 2013).

Homens e mulheres a partir dos 50 anos estão sob risco e devem ser rastreados para o CCR, resultando em detecção precoce e remoção de pólipos colorretais que podem tornar-se neoplásicos, além da detecção do próprio câncer em estágios iniciais, quando o tratamento é menos extenso e com maiores chances de cura. (Cancer Facts & Figures, 2013) No Brasil, para o ano de 2012 calculou-se um total 30.140 casos novos de CCR, sendo 14.180 em homens e 15.960 em mulheres. Isto corresponde a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 16 a cada 100 mil mulheres.

Entre os Estados mais afetados estão São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, com mais de 23 casos para cada 100 mil habitantes, incluindo homens e mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2013). Segundo o senso de 2013 do Instituto Nacional do Câncer, o Brasil registrou em 2010, 13.344 óbitos causados pelo CCR.

Desde a implementação de novos procedimentos como a detecção do CCR em estágios iniciais e terapias mais eficazes, a taxa de mortalidade em países com alta incidência de CCR, como os Estados Unidos, vêm diminuindo. A adoção de medidas mais efetivas também aumentou a taxa de sobrevivência média de pacientes com CCR em cinco anos: no início da década de 80, a sobrevivência era de 56,5%, enquanto na década de 90 passou para 63,2%, e em 2004 foi de 65,9% (Howlader et al., 2012).

Os principais fatores de risco do CCR são: idade avançada, presença anterior de pólipos colônicos ou câncer colorretal e fatores ambientais como ingestão de carne vermelha, ingestão de alimentos gordurosos, ingestão inadequada de fibras, obesidade, sedentarismo, diabetes mellitus, tabagismo e consumo elevado de álcool (Cunningham et al., 2010).

Os adenomas colorretais são lesões que têm o potencial de evolução em adenocarcinomas (Tannapfel et al., 2010). O tempo de transformação do carcinoma a partir do adenoma pode ser de 10 a 15 anos naqueles casos de câncer de cólon esporádico. Os sinais que indicam que o adenoma está se transformando em adenocarcinoma incluem o aumento da massa e do componente viloso, o grau de displasia e a idade do paciente (Jorgensen et al., 1993).

Em razão da facilidade em definir histologicamente as etapas da progressão do adenoma em adenocarcinoma no CCR, foi possível identificar quais genes são mais frequentemente mutados e relacionados diretamente com tal progressão. Portanto, o CCR é o câncer que tem sua base genética melhor caracterizada desde os estudos apresentados por Fearon e Vogelstein em 1990 (Fearon e Vogelstein, 1990).

O processo de carcinogênese tem início a partir da formação de clone de células mutantes que desenvolvem ganho proliferativo descontrolado. A intensa capacidade de divisão, possibilita crescimento descontrolado e migração tumoral, facilitando a disseminação das células cancerosas para órgãos e tecidos (Hanahan e Weinberg, 2000).

Encontra-se bem estabelecido que o surgimento do CCR, a partir da mucosa cólica normal, é mediado por uma sequência de mutações em genes controladores do ciclo celular, tais como proliferação, diferenciação e apoptose, e/ou em genes responsáveis pelo reparo do DNA. (Fearon e Vogelstein, 1990). Esta descoberta propiciou grandes avanços no campo da biologia molecular e vêm permitindo a melhor compreensão dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na carcinogênese colorretal.

O CCR se desenvolve a partir de duas vias principais de carcinogênese. Estas duas vias são conhecidas como instabilidade cromossômica (CIN) e instabilidade de microssatélites (MSI) e respondem por 85% e 15%, respectivamente, dos casos de câncer colorretal esporádico (Kim et al., 1994; Pool-Zobel e Leucht, 1997).

Não obstante a presença destas vias distintas de carcinogênese do câncer colorretal esporádico, seu desenvolvimento surge a partir de mucosa cólica normal. A grande dúvida concentra-se nos fenômenos iniciais que levam a mucosa normal a transformar-se progressivamente em pólipos adenomatosos ou em áreas de displasia focal. Existem fortes evidências sugerindo que o evento inicial de agressão ao colonócito normal seja provocado por agentes genotóxicos existentes na luz intestinal (Pinho e Rossi, 1999; Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Priolli et al., 2013). Os agentes genotóxicos são caracterizados por possuírem atividade biológica primária, própria ou de metabólitos, capazes de alterar informações codificadas no DNA. A genotoxicidade ocorre quando a exposição ao agente tóxico leva à alteração da estrutura ou do conteúdo de cromossomos (clastogenicidade) ou da sequência de pares de bases do DNA (mutagenicidade) (Mc Gregor, 2000).

Dentre os agentes genotóxicos, as espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas durante o metabolismo aeróbico das células da mucosa intestinal ou oriundas da dieta apresentam papel importante no desenvolvimento do estresse oxidativo (Gedik et al., 2002). É sabido que o dano oxidativo ao DNA celular, ocasionado pelas EROs e por outros radicais, tais como as espécies livres de nitrogênio (ELN) e grupo metil (CH₃), encontram-se relacionados ao processo de inflamação da mucosa cólica e, possivelmente ao surgimento e desenvolvimento do câncer do aparelho digestório (Ames et al., 1993).

A mucosa de todo o trato digestório é continuamente exposta e particularmente vulnerável a radicais livres que determinam dano oxidativo ao DNA celular. Várias doenças que cursam com inflamação crônica de mucosa do trato digestório já foram associadas ao estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1990; Ames et al., 1993; Seril et al., 2003; Kawanishi et al., 2006; Ribeiro et al., 2007; Ladeira et al., 2008).

Evidências relacionam a agressão crônica ao epitélio cólico por EROs, a exemplo do que ocorre em portadores de doença inflamatória intestinal (DII), como um fator predisponente ao CCR. Em doentes com retocolite ulcerativa inespecífica, o risco de desenvolvimento do câncer aumenta significativamente com o tempo de duração da agressão inflamatória, estimando-se em 0,5% a 1% ao ano (Halliwell e Gutteridge, 1990; Seril et al., 2003; Kawanishi et al., 2006; Ribeiro et al., 2007).

As EROs são eletrofílicas, com atividade de elétrons, tais como as bases nitrogenadas que formam os ácidos nucléicos que compõe a molécula de DNA (Battacharya e Barton, 2012). As EROs correspondem aos radicais livres e outras espécies. São muito reativas em decorrência de sua instabilidade. Os radicais livres de oxigênio que apresentam maior potencial agressivo para as células da mucosa intestinal são: superóxido (O₂⁻) e a hidroxila (OH⁻), resultantes da dissociação do H₂O₂ (Norat et al., 2005). O radical hidroxila é formado no interior da luz intestinal por meio da reação de Feanton, catalizada pelo íon Fe⁺⁺, e é considerado o radical livre mais reativo

e danoso de todos. (Imlay et al.,1998) O mecanismo pelo qual o estresse oxidativo promove a agressão ao DNA das células da mucosa cólica ainda não é totalmente conhecido.

Dentre as injúrias causadas pelas EROs podemos destacar clivagem da ligação fosfodiéster, alteração de ribose e oxidação de bases nitrogenadas. A genotoxicidade é devida a sua atividade altamente reativa às bases nitrogenadas que compõe os ácidos nucleicos da molécula de DNA, substâncias com alta densidade de elétrons (Battacharya e Barton, 2001). As modificações mais compreendidas são as que ocorrem nas bases, tendo sido identificados aproximadamente 20 produtos oxidados (Dizdaroglu,1991). A oxidação da base nitrogenada guanina é um dos mecanismos de dano ao DNA mais bem estudados (Hata et al.,1997). Durante o processo normal de duplicação do DNA, a guanina pareia-se com a citosina (G-C). Contudo, caso ocorra a incorporação de radical OH^\cdot no carbono 8 da molécula da guanina, haverá formação da 8-hidroxi-guanina (8-OHdG), esta, por sua vez irá parear, de forma errônea, com a molécula de adenina, gerando uma mutação do tipo transversão (G>T) (Kasai e Nishimura, 1983). Na eventualidade de não haver correção, por meio das proteínas de reparo, no local onde ocorreu este fenômeno, pode ocorrer a transcrição equivocada de proteínas, gerando, assim, um produto proteico defeituoso.

Toda molécula de DNA possui um mecanismo de reparação que evita que ocorram erros no momento da sua duplicação. Os mecanismos de reparação do DNA são guiados, principalmente, por proteínas codificadas pelo próprio DNA, conhecidas como proteínas de reparo do DNA. Estas proteínas reconhecem eventuais danos na seqüência de nucleotídeos durante o processo de replicação, e atuam promovendo a substituição da área danificada por uma semelhante à original. O processo possui uma margem de erro mínima, e evita que haja morte celular ou mutações decorrente de tais feridas. Em células normais, quando os danos ao DNA não podem ser reparados pelas proteínas de reparo a replicação é abortada e a célula morre (Clancy, 2008).

Nas neoplasias, caso as proteínas de reparo ao DNA estejam mutadas não ocorrerá correção de outras proteínas codificadas pelo DNA, então, no local onde ocorreu a inserção da 8-OHdG, haverá formação de proteína mutada acumulando nova mutação. Caso esta proteína mutada esteja relacionada aos mecanismos de controle do ciclo celular, a célula ganhará autonomia proliferativa formando clone de células mutantes com características semelhantes, ou seja, com acúmulo de mutações (Kasai e Nishimura, 1983).

Este desequilíbrio do ciclo celular, com favorecimento da proliferação em detrimento a apoptose, poderia se constituir na explicação molecular para o início da formação dos pólipos (Toyokuni et al., 1995). Assim, podem surgir clones de células com acentuada capacidade de divisão celular e diferentes graus de diferenciação, determinando a formação de displasia tecidual de graus progressivos e o surgimento do câncer (Kasai e Nishimura, 1983) caso ocorra dano oxidativo ao DNA.

Durante os últimos anos diferentes métodos bioquímicos e analíticos foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar a presença do estresse oxidativo nos tecidos humanos. A quantificação do estresse oxidativo em bases do DNA apresenta grande interesse, por permitir a melhor compreensão do seu papel nas diferentes etapas do processo de carcinogênese. (Pool-Zobel et al., 1999) Habitualmente, a quantificação do dano oxidativo envolve técnicas de extração do DNA dos tecidos e análise por cromatografia a gás ou técnicas imunistoquímicas. Geralmente estas técnicas não podem ser aplicadas para pequenos fragmentos de tecidos obtidos por biópsia, em virtude dos limites relacionados à sua metodologia. Por esta razão, encontram-se poucos estudos que analisaram comparativamente, a intensidade de estresse oxidativo em diversas tecidos presentes na evolução do processo de carcinogênese colorretal (Seril et al., 2003; Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Priolli et al., 2013).

A possibilidade de mensuração do dano oxidativo em determinado tecido, compreendendo este dano como sendo o resultado do desequilíbrio entre o estresse oxidativo e os fenômenos antioxidantes do organismo, poderia permitir estabelecer a

relação entre dano de DNA e o acúmulo de mutações em células normais e pré-neoplásicas. Com o advento da técnica da eletroforese em gel de célula isolada, a possibilidade de quantificação de dano oxidativo do DNA de cada célula torna-se realidade.

O desenvolvimento da técnica se deve aos trabalhos pioneiros de Östling e Johanson (Östling e Johanson, 1984), por meio de eletroforese do DNA em microgel e de Singh e colaboradores que atribuíram ao método maior sensibilidade por meio do uso de solução alcalina (Singh et al., 1988). Os autores desenvolveram, em 1988, técnica simples, capaz de detectar os níveis de dano oxidativo ao DNA em uma célula isolada (Östling e Johanson, 1984; Singh et al., 1988). Esta técnica foi inicialmente chamada de “eletroforese em gel de célula única” e é hoje popularmente conhecida como “Ensaio Cometa”.

O Ensaio Cometa, por permitir a quantificação de dano oxidativo tecidual em diferentes etapas do processo de carcinogênese, é ferramenta útil na melhor compreensão da importância do dano oxidativo ao DNA na etiopatologia do câncer colorretal (Seril et al., 2003; Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Priolli et al., 2013).

Pesquisas vêm demonstrando que é possível detectar o dano oxidativo no tecido considerado histologicamente normal (Kondo et al., 1999; Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Balasubramanyan et al., 2010, Redon et al., 2010; Priolli et al., 2013). Contudo, poucos são os estudos que compararam o dano oxidativo existente no tecido normal e tecido displásico ou neoplásico (Oliva et al., 1997, Pool-Zobel e Leuncht, 1997; Kondo et al., 1999; Pool-Zobel et al., 1999; Kawanishi et al., 2006; Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Priolli et al., 2013). Do melhor de nosso conhecimento, apenas dois destes compararam tecido normal, adenoma e adenocarcinoma conjuntamente (Kondo et al., 1999; Priolli et al., 2013).

A mensuração do dano oxidativo ao DNA é essencial para o melhor entendimento dos mecanismos etiopatogênicos do estresse oxidativo e seus efeitos

moleculares. A possibilidade de mensurar o dano oxidativo ao DNA em pequenos fragmentos de tecido da mucosa cólica em diversos estágios da carcinogênese poderá contribuir para melhor compreensão do papel representado pelas EROs em todas as etapas do desenvolvimento do CCR, assim como indicar uma modalidade profilática para o câncer colorretal, os antioxidantes.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é comparar o dano oxidativo ao DNA no tecido normal e tumoral de pacientes portadores de adenoma e adenocarcinoma colorretal.

3. MÉTODO

Previamente à realização desse estudo, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco, segundo resolução do Conselho de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde (Resolução CNS 466/13), sendo aprovado sob o número 0002.0.142.000-07 (Anexo I).

3.1. Amostra

Os sujeitos da pesquisa foram submetidos ao preparo para colonoscopia segundo o protocolo da UNIFAG (Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia) onde foram realizadas as colonoscopias.

As ressecções seguiram o padrão dos polipectomias convencionais. Nenhuma técnica de magnificação de imagem foi utilizada. Fragmentos de tecido normal e adenomatoso foram retirados do segmento do cólon que continha o adenoma e divididos em duas partes para conservação dos tecidos.

Foram executadas 127 colonoscopias e identificados 44 pacientes portadores de tumores do cólon.

Foram excluídos pacientes com menos de 18 anos, portadores de doenças inflamatórias intestinais, pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante, que poderiam incrementar a produção de dano oxidativo ao DNA, e/ou com história clínica sugestiva de doença polipoide intestinal, além de pólipos diagnosticados como hiperplásicos e/ou inflamatórios (Figura 1).

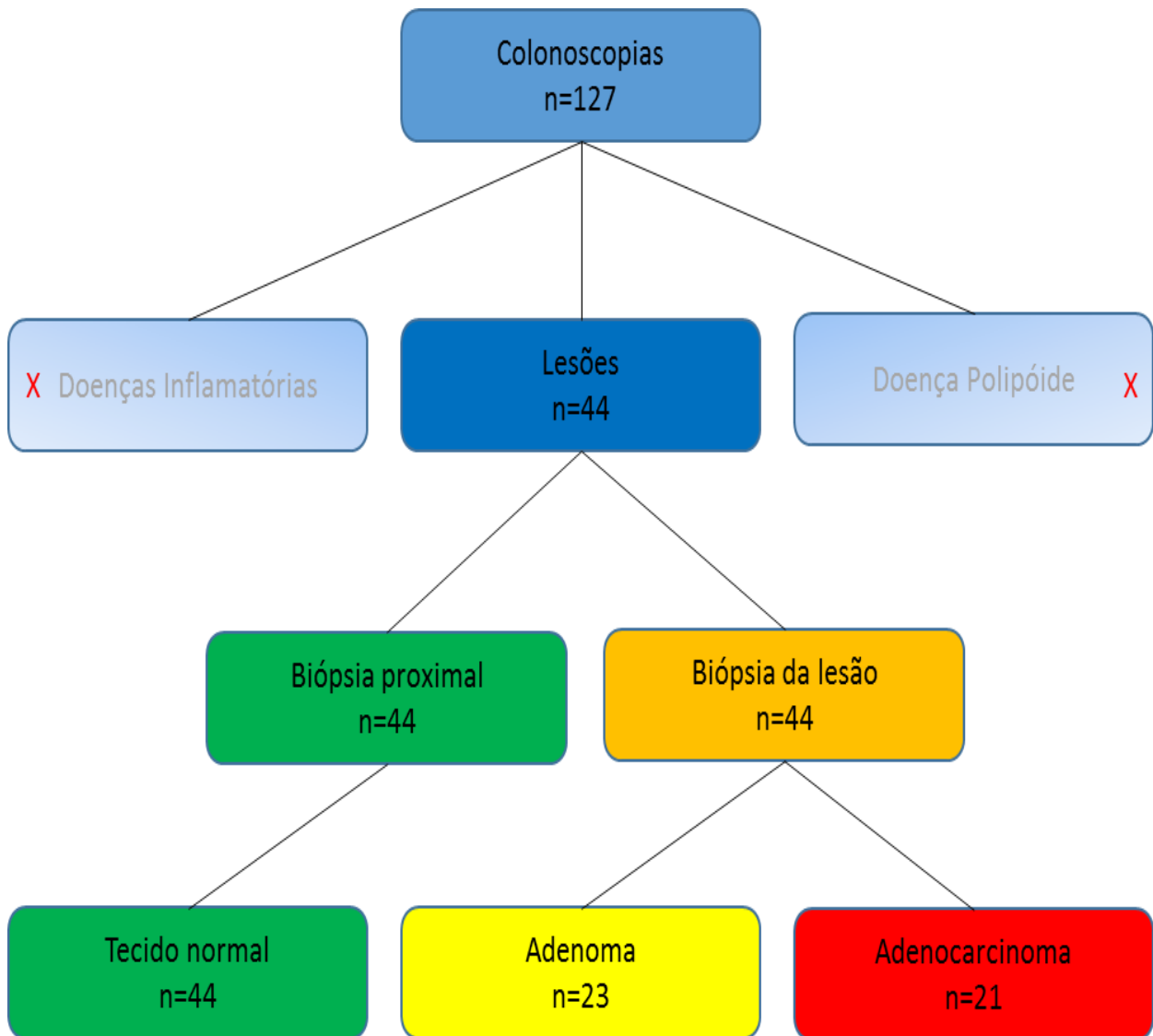


Figura 1: Delineamento do estudo. Foram feitas 127 colonoscopias de onde vários diagnósticos macroscópicos foram feitos. Os casos de doenças inflamatória intestinal e doença polipóide foram excluídos. Das lesões macroscópicas, sugestivas de pólipos ou tumores, foram colhidas biópsias da própria lesão e de seu seguimento proximal, a cinco centímetros da lesão, em área macroscopicamente normal. Desta forma, a amostra final foi composta tecido normal, adenoma e adenocarcinoma

3.2. Conservação das Amostras

Biópsias da região tumoral e do tecido normal adjacente, destinadas ao Ensaio Cometa, foram submetidas à estabilização e proteção do RNA later (Quiagen, Valencia, CA, USA) e mantidas a -80°C até o momento do Ensaio Cometa. As biópsias destinadas ao estudo anatomopatológico foram fixadas em formol tamponado a 10% para conservação e posterior processamento.

3.3. Estudo Histopatológico

Para realização do estudo histopatológico todos os espécimes previamente fixados em solução de formalina a 10% foram incluídos em blocos de parafina. Três cortes de quatro micrometros foram obtidos, sendo corados pela técnica de Hematoxilina–Eosina (HE) para diagnóstico.

O estudo histopatológico foi realizado por dois patologistas experientes, em consenso, e que não tiveram acesso aos demais aspectos do estudo, determinando tratar-se de tecido cólico normal, adenoma ou adenocarcinoma, em microscopia ótica simples.

3.4. Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa foi realizado na UNIFAG, conforme previamente descrito na literatura (Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Priolli *et al.*, 2013).

Para a detecção de dano oxidativo ao DNA foram utilizados os fragmentos previamente armazenados de (Figura 1):

- a. Tecido tumoral oriundo de pacientes portadores de adenomas e adenocarcinomas e;
- b. Tecido não tumoral, macro e microscopicamente, 5 cm proximal ao tumor, oriundos de pacientes portadores de adenoma e adenocarcinoma.

Os espécimes foram incubados em 3 mL de solução de Hanks' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo 5,5 mg de proteinase K (Sigma Chemical CO®, St. Lois, MO) e 3 mg de colagenase IV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 45 minutos a 37°C para liberação das células. Após, foram ressuspensas em 10 mL de HBSS (Life Technologies, USA) e centrifugadas, para seu isolamento. Alíquotas foram retiradas e viabilidade celular foi avaliada por meio do azul de Tripán. A análise das amostras obedeceu à viabilidade mínima superior a 75%.

Foram pipetadas 15 µL da suspensão celular viável em lâmina previamente coberta em agarose *low melting point* 0.5% (Sigma Chemical CO®, St. Louis, MO), sendo coberta com lamínula. Estas foram imersas em solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% SDS, pH 10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e permaneceram a 4°C *overnight*. Subsequentemente, foram expostas a tampão alcalino (1 mM EDTA E 300 mM NaOH, pH~13,4) por 40 minutos a 4°C. A eletroforese foi realizada neste tampão a 4°C por 30 minutos a 25 V e 300 mA. As lâminas foram então neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5), coradas com SYBR® Safe™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e analisadas com microscópio de fluorescência. De cada réplica, cem células foram aleatoriamente selecionadas e analisadas.

Com auxílio do software Komet 5.5® (Kinetic Imaging, USA) obteve-se valor da extensão da cauda do cometa, Tail Moment (TM), sendo seus valores médios determinados. Segundo o manual do fabricante, o TM é definido como o produto do comprimento da cauda e da fração de DNA total contido nela. O tamanho da cauda reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA com dano oxidativo, o qual foi quantificado por métodos de intensificação de imagem em microscópio de imunofluorescência.

3.5. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada adotando-se nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). Para a rejeição da hipótese de nulidade foram analisados os resultados mediante os seguintes modelos: estatística descritiva; medidas de tendência central; testes de normalidade, análise de variância.

O teste t de Student foi utilizado para comparar amostras do mesmo indivíduo (amostra dependente, pareada), ou seja, tecido normal e tumoral (adenoma e adenocarcinoma) dos mesmos indivíduos. O teste de Levene foi utilizado para averiguar a homogeneidade dos grupos independentes ou seja comparar os tecidos normais e os tecidos tumorais de indivíduos distintos.

Para análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de análise estatística SPSS for Windows, versão 13.0.

4. RESULTADOS

4.1. Casuística

Foram realizados 127 colonoscopias e identificados 44 pacientes portadores de tumores do cólon, sendo 22 homens e 22 mulheres. Após diagnóstico histopatológico, 23 (18%) foram diagnosticados como adenoma e 21 (17%) como adenocarcinoma (Figura 2).

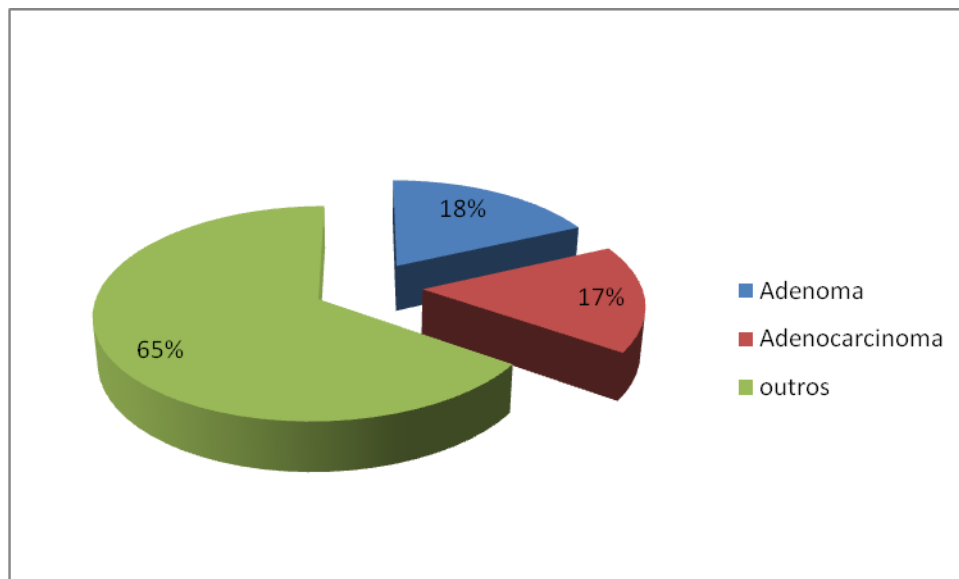


Figura 2: Casuística. Distribuição da amostra estudada de acordo com o diagnóstico anatomopatológico

Trinta e seis lesões encontravam-se na porção distal e oito na porção proximal do cólon. O anatomopatológico revelou sete pólipos tubulovilosos e 16 tubulares, sendo todos de baixo grau de displasia. Nos pacientes portadores de adenoma (Figura 4) a idade variou entre 42 e 83 anos (média de 60.4 anos), e nos portadores de adenocarcinoma (Figura 5) a idade variou de 31 a 84 anos (média de 57 anos).

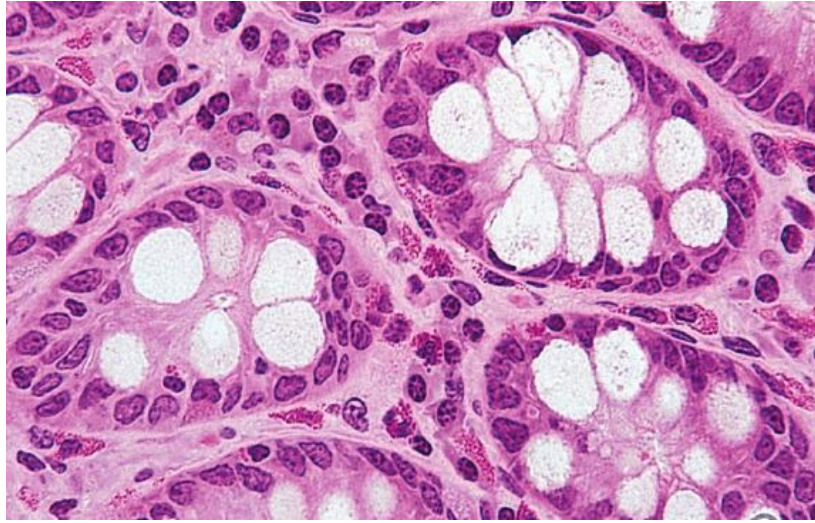


Figura 3: Microfotografia de corte histológico de cólon normal. Ausência de atipia celular, conformação glandular normal. HE. 400X

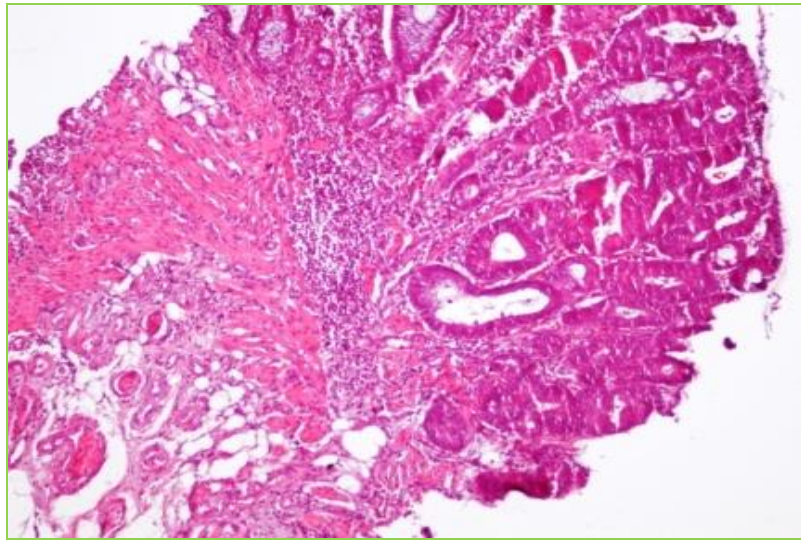


Figura 4: Microfotografia de corte histológico de adenoma de cólon. Notar as longas papilas estruturadas em torno do eixo vascular em forma de dedo de luva. HE. 100X

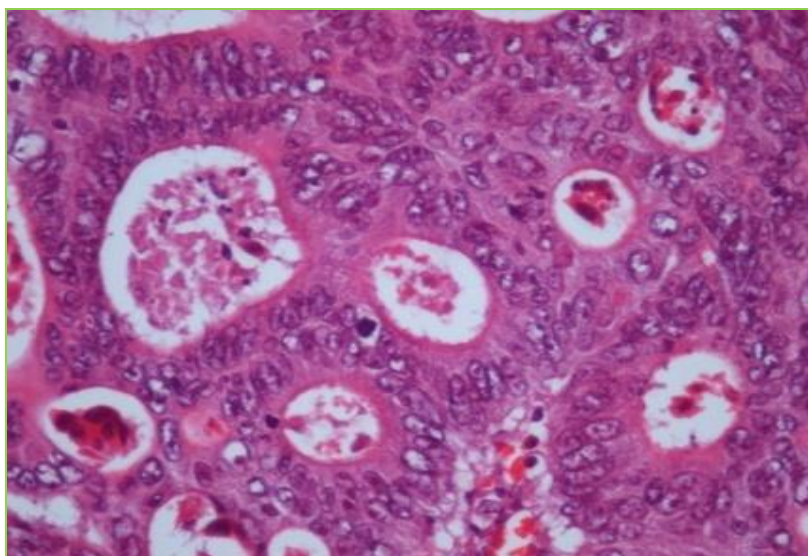


Figura 5: Microfotografia de corte histológico de adenocarcinoma de cólon. Notar a atipia celular pronunciada, perda da polarização celular, inversão da relação núcleo/citoplasma, núcleos vesiculosos, nucléolos evidentes. HE. 400X

4.2. Quantificação do dano oxidativo ao DNA

As tabelas 1 e 2 mostram o dano oxidativo ao DNA (“*Tail moment*”) encontrado no tecido normal (Figura 6), adenoma (Figura 7) e adenocarcinoma (Figura 8) de pacientes portadores de adenoma e adenocarcinoma colorretal, respectivamente.

Tabela 1: Comparação entre dano oxidativo ao DNA em adenoma e tecido normal dos mesmos pacientes

Tecido	n	Tail Moment (TM)			p
		Mínimo	Máximo	Média	
Normal de adenoma	23	0.27	5.38	0.997	0.002
Adenoma	23	0.40	11.13	2.520	

Teste “t” pareado. n- número; p- significância a 5%; TM- Tail Moment

Tabela 2: Comparação entre dano oxidativo ao DNA no adenocarcinoma e tecido normal dos mesmos pacientes

Tecido	n	Tail Moment (TM)			p
		Mínimo	Máximo	Média	
Normal de adenoma	21	0.47	1.21	0.766	0.000
Adenoma	21	3.56	2.113	2.113	

Teste “t” pareado. n- número; p- significância a 5%; TM- Tail Moment

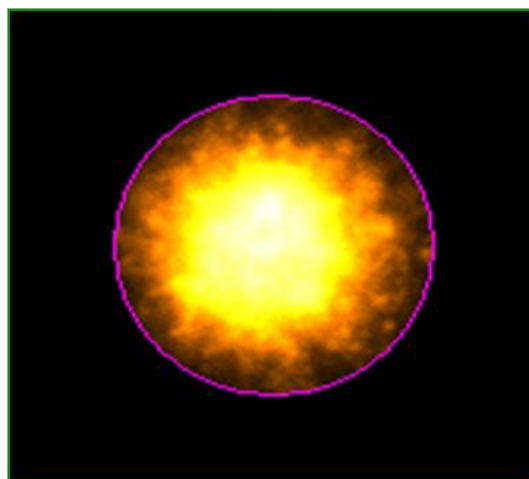


Figura 6: Microfotografia em microscópio de fluorescência com intensificação de imagem. Dano oxidativo ao DNA em cólon normal. Notar ausência de fragmentação do DNA, com regularidade da borda nuclear e ausência de formação de cauda. Ensaio do Cometa

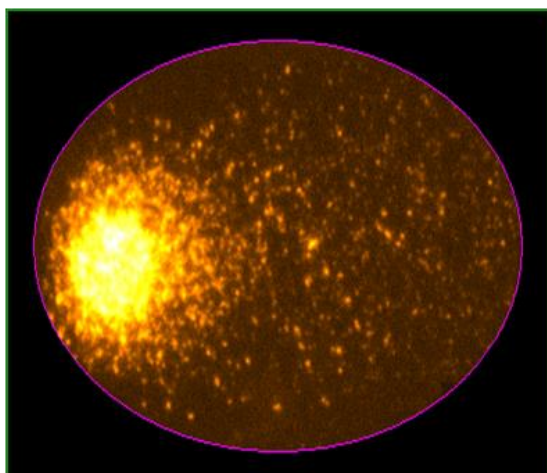


Figura 7: Microfotografia em microscópio de fluorescência com intensificação de imagem. Dano oxidativo ao DNA em adenoma de cólon. Notar intensa fragmentação nuclear do DNA, demonstrada pela formação da “cauda do cometa” (Tail Moment). Ensaio do Cometa

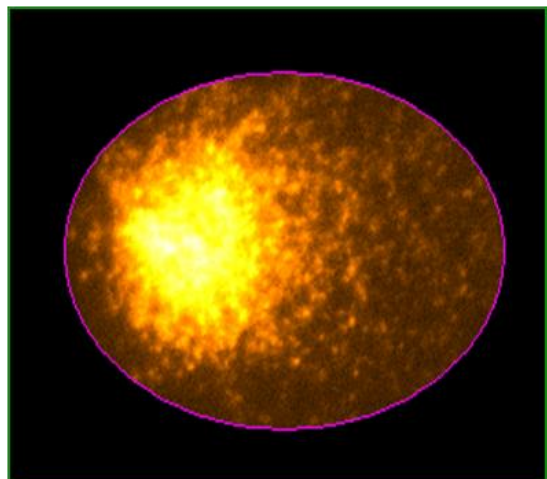
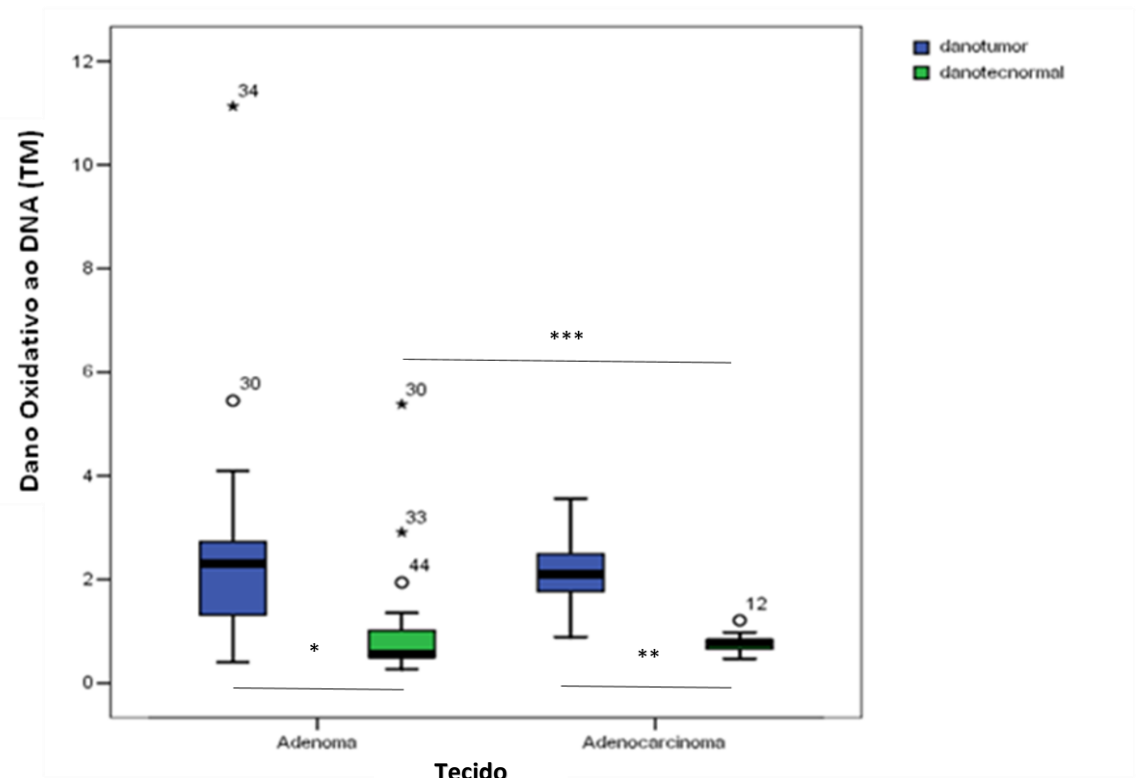


Figura 8: Microfotografia em microscópio de fluorescência com intensificação de imagem. Dano oxidativo ao DNA em adenocarcinoma de cólon. Notar fragmentação do DNA, demonstrada pela formação da “cauda do cometa” (Tail Moment). Ensaio do Cometa

4.3. Comparação entre os valores de dano oxidativo observado nos tecidos neoplásicos e normais correspondentes

A partir do teste t de Student pareado podemos perceber que houve diferença ($p = 0.002$) no dano oxidativo ao DNA observado no adenoma quando comparado ao encontrado no tecido normal adjacente a ele, com maior quantidade de dano no tecido tumoral (Figura 9,10).

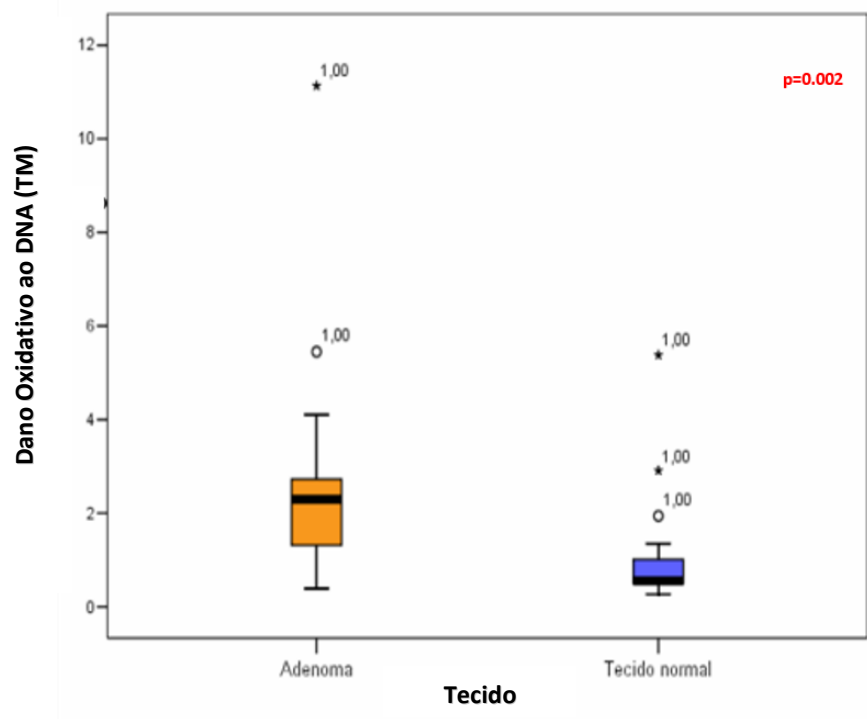


* Adenoma X Tecido normal $p=0.002$ (t de Student);

** Adenocarcinoma X Tecido normal de adenocarcinoma $p=0.000$ (t de Student);

*** Tecido normal de adenoma X Tecido normal de adenocarcinoma $p=0.007$ (Levene)

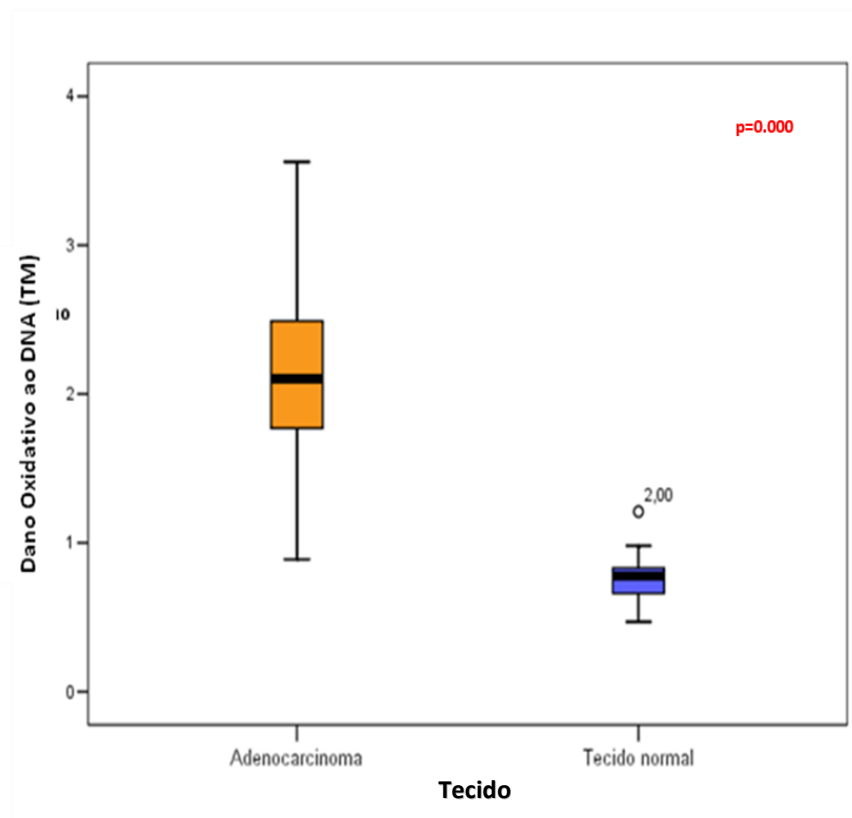
Figura 9: Dano oxidativo ao DNA em adenoma, adenocarcinoma e respectivos tecidos normais adjacentes. Notar diferença entre o tecido tumoral e o tecido normal adjacente, assim como entre os tecidos normais de pacientes portadores de adenoma e adenocarcinoma. Ensaio Cometa



*t de Student; $p=0.000$

Figura 10: Dano oxidativo ao DNA em adenoma e tecido normal adjacente. Notar maior dano oxidativo ao DNA no adenoma quando comparado ao tecido normal adjacente. Ensaio Cometa

O mesmo ocorre quando foi comparado o adenocarcinoma e seu respectivo tecido normal correspondente (Figuras 9, 11), com maiores quantidades de dano no tecido tumoral ($p = 0.000$).



*t de Student; $p=0.000$

Figura 11: Dano oxidativo ao DNA em adenocarcinoma e tecido normal adjacente. Notar maior dano oxidativo ao DNA no adenocarcinoma quando comparado ao tecido normal adjacente. Ensaio Cometa

4.4. Comparação entre os valores de dano oxidativo ao DNA observado nos tecidos normais

Por meio do teste estatístico de Levene foi possível demonstrar que o valor de dano oxidativo ao DNA aferido no tecido normal de pacientes portadores de adenoma foi menor do que o verificado no tecido normal daqueles portadores de adenocarcinoma colorretal ($p = 0.007$) (Figura 9).

4.5. Comparação entre os valores de dano oxidativo ao DNA observado nos tecidos neoplásicos

Foi possível demonstrar (teste de Levene) diferença entre os valores de dano aferidos no adenoma e adenocarcinoma ($p = 0.04$), tendo sido encontrado maior dano no tecido adenomatoso (Figuras 9, 12).

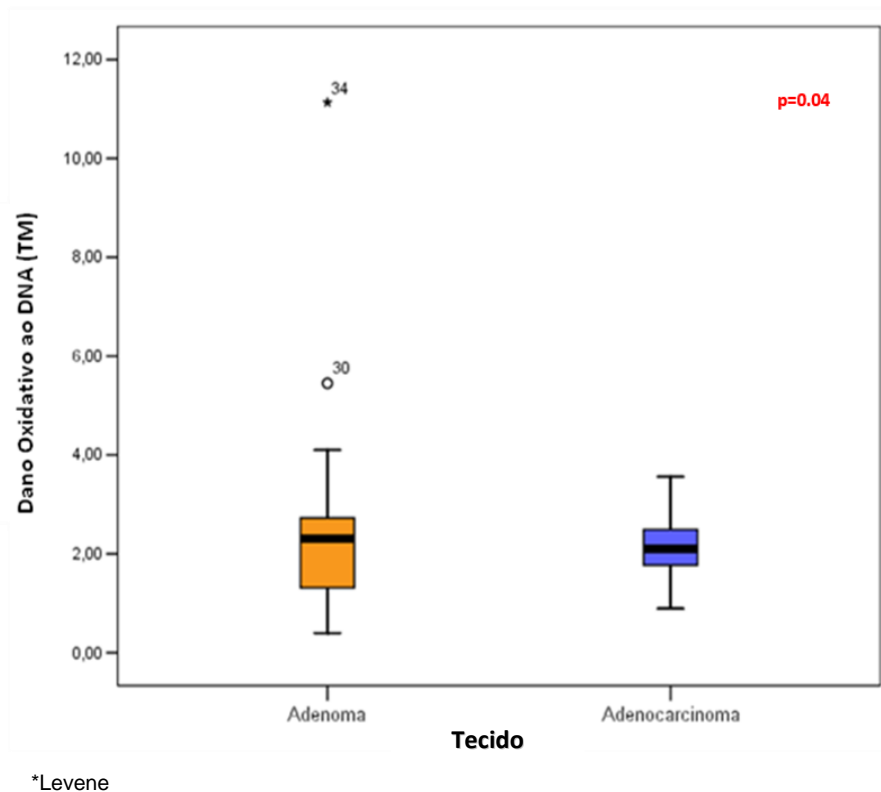


Figura 12: Dano oxidativo ao DNA em adenoma e adenocarcinoma. Notar maior dano oxidativo ao DNA nos adenomas. Ensaio Cometa

5. DISCUSSÃO

5.1. Quanto ao Método

5.1.1. Quanto à Casuística

Nos últimos anos a incidência de CCR parece ter atingido uma plataforma nas áreas de alto risco e tem aumentado nas áreas antes consideradas de baixo risco. Supõe-se que isso se deva ao envelhecimento das populações, à adoção de estilos de vida com tendência mais sedentária e ao aumento na preferência e aceitação de dietas pouco saudáveis (Cancer Facts & Figures, 2013) o que torna o estudo desta entidade nosológica de extrema importância no Brasil, onde se demonstra processo de inversão da pirâmide populacional e mudanças de hábitos alimentares, à semelhança de países desenvolvidos.

Há coincidência quanto à faixa etária estudada na presente casuística e a população mundial, a qual demonstra maior incidência da doença entre a 5ª e 6ª décadas de vida. As mais altas taxas de incidência de câncer de cólon situam-se entre os 75 e 84 anos de idade, respondendo por 27.2% do total de cânceres de colón diagnosticados, sendo de 19% entre os 65 e 74 anos e de 11,3% na faixa etária anterior, entre 55 e 64 anos de idade (Instituto Nacional do Câncer, 2013; Cancer Facts & Figures, 2013). Estes dados são compatíveis com a presente amostra.

A razão de incidência entre sexo masculino e feminino na literatura (M:F) para esse câncer varia entre 1,4:1 e 1:1, (Instituto Nacional do Câncer, 2013; Cancer Facts & Figures, 2013), semelhante a presente casuística que demonstrou razão de 1:1.

Da mesma forma como acontece com a maioria das neoplasias epiteliais, a idade está também associada ao aumento da incidência e a detecção de adenomas.

Após os 60 anos de idade o risco de adenomas é 80% mais alto do que em pessoas mais jovens (Duarte-Franco e Franco, 2004). A casuística apresentada mostra média de idade de 60 anos, coincidente com o encontrado na literatura para os portadores de pólipos.

Demonstra-se, desta forma, que a presente casuística é representativa da população estudada.

5.1.2. Quanto ao Ensaio Cometa

A opção pelo Ensaio Cometa, ou eletroforese em gel de célula única, ocorreu por este ser um método de estudo genotoxicológico sensível que avalia o dano oxidativo ao DNA em célula individual e possibilita quantificar quebras da fita em pequenos fragmentos teciduais. Possui custo relativamente baixo, rapidez, precisão e reprodutibilidade (Ribeiro et al., 2008; Priolli et al., 2013).

O Ensaio Cometa permite, de maneira simples e precisa, a quantificação dos níveis de dano oxidativo ao DNA de pequenas quantidades de tecido obtidos a partir de biópsias (Pool-Zobel et al., 1999; Priolli et al., 2013). Talvez uma de suas maiores vantagens seja possibilitar a quantificação do dano oxidativo ao DNA de uma única célula, o que permite a interpretação individualizada do resultados do estresse oxidativo à mucosa cólica nos diversos estágios da carcinogênese, tal como executado neste estudo, onde foram obtidos pequenos fragmentos de biópsias a partir da colonoscopia.

Vantagem adicional é o fato de poder quantificar a lesão ao DNA resultante da agressão após a ação dos sistemas de reparo, ou seja, demonstrar o resultado final produzido pelo equilíbrio/desequilíbrio entre fenômenos oxidantes e antioxidantes no tecido. Desta forma demonstra-se a aplicabilidade do método para alcançar os objetivos propostos neste estudo, onde o interesse recai sobre o resultado final da homeostase oxidativa na etiopatogênia do câncer colorretal.

5.2. Quanto aos Resultados

O câncer de cólon ilustra alguns dos princípios gerais dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na maioria dos processos de tumorigênese no organismo humano sendo, dessa forma, bom exemplo para o estudo das alterações precursoras de neoplasias. Cabe ressaltar, obviamente, que cada caso de câncer é caracterizado por seu conjunto de lesões genéticas.

Fearon e Vogelstein, estabeleceram, em 1990, modelo explicativo para o desenvolvimento dos tumores colorretais no qual o aparecimento das displasias teciduais focais que culminam com o câncer está intimamente relacionado a uma série de mutações acumuladas em genes chaves do controle do ciclo celular envolvendo tanto componentes inibitórios como genes supressores de tumor ou estimulatórios como os oncogenes (Fearon e Vogelstein,1990). Mas apesar desta constatação, continua sendo coerente questionar quais seriam os fatores que deflagrariam o início das mutações somáticas no material genético do indivíduo que acabam por gerar o câncer.

De maneira peculiar, as células tumorais produzem energia preferencialmente pela glicólise anaeróbia em detrimento à fosforilação oxidativa mitocondrial. (Warburg et al.,1927; Reitzer et al.,1979; Rossingol et al., 2004) Há mais de 70 anos Warburg realizou experimentos em tumores e tecidos normais que levaram a proposta para a patogênese metabólica do câncer. *“Enquanto as células normais morrem se forem mantidas em glicólise anaeróbia, as células tumorais não somente continuam a existir, mas são capazes de crescer a uma extensão sem limite, com a energia química proveniente da glicólise. A glicólise anaeróbia da célula tumoral é derivada de um distúrbio da respiração. Seja a respiração tumoral pequena ou grande, a glicólise anaeróbia está sempre presente. A respiração está sempre perturbada e ela é incapaz de provocar o desaparecimento da fermentação (glicólise). Assim os dois tipos de distúrbios da respiração que podem ser artificialmente produzidos nas células normais – limitar a extensão da respiração ou impedir o efeito da respiração – ocorrem*

naturalmente nos tumores.” Warburg conclui que as células tumorais possuem distúrbio da fosforilação oxidativa mitocondrial, mas apesar disto, são perfeitamente viáveis e se reproduzem com a energia proveniente da glicólise quase de forma exclusiva. Assim, o câncer foi proposto como resultado de deficiência da respiração celular e aumento da produção de energia nas células cancerosas em resposta a respiração anormal. Dessa forma, a célula tumoral, em virtude da alteração respiratória, é capaz de produzir EROs tanto pelo processo aeróbio quanto pelo anaeróbio, o que justifica encontrar maiores quantidades de dano oxidativo ao DNA em tecidos tumorais.

Alguns trabalhos vêm demonstrando que a quantidade de dano oxidativo ao DNA na mucosa cólica normal é menor que no tecido neoplásico. (Ames et al., 1993; Oliva et al., 1997; Pool-Zobel e Leucht, 1997; Kondo et al., 1999; Pool-Zobel et al.;1999; Seril et al., 2003; Kawanishi et al., 2006; Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Priolli et al., 2013) Os presentes resultados confirmaram que no adenocarcinoma existe maior dano oxidativo ao DNA quando comparado ao tecido normal do mesmo doente, corroborando, portanto, dados da literatura. Da mesma forma, pode-se encontrar maior dano oxidativo ao DNA em células de adenoma quando comparado ao respectivo tecido normal. Estes achados parecem reforçar a importância do papel representado pelo dano oxidativo nas diferentes etapas da carcinogênese colorretal.

Os resultados mostraram maiores quantidades de dano oxidativo ao DNA nos adenomas quando comparados aos adenocarcinomas. Este resultado não foi inesperado, visto a casuística contar com adenomas de baixo grau de displasia, ou seja, adenomas que não se encontram ainda em fase final de transição adenoma/carcinoma. Isso pode ser explicado pelo fato dos genes e das proteínas de reparo apresentarem-se íntegros nas fases iniciais do adenoma. A manutenção das proteínas de reparo promove aumento no dano oxidativo ao DNA, já que o dano sofrido pela célula está sendo continuamente reparado e propicia a ocorrência de novos danos na mesma célula. No adenocarcinoma, de forma contrária, o sistema de reparo mutado não promove reparação e, por já haver fragmentação decorrente do dano, a manutenção desta fragmentação é, necessariamente limitada e, portanto, menor. De

forma análoga, seria como ter ferimento em dois indivíduos, onde em um deles ocorre uma nova lesão após a sua completa cicatrização e em outra ocorre nova lesão sem ter ocorrido ainda a cicatrização. A medida de dano oxidativo ao DNA em ambos é diferente, sendo maior no indivíduo que apresentou reparo do que naquele onde este ainda não ocorreu. O tecido displásico, como o adenoma, é exposto continuamente às EROs, assim como o adenocarcinoma, mas neste por haver alteração dos genes de reparo, não sofre reparo em seu DNA e, conseqüentemente, tem menor quantidade a ser fragmentado, pois já o foi anteriormente. Este fato parece justificar maiores quantidades de dano oxidativo verificado no adenoma em comparação ao adenocarcinoma, como demonstra este estudo. A presente afirmação diverge de achados da literatura que apontam para o aumento crescente de dano oxidativo no processo de progressão da carcinogênese (Tudek & Speina, 2012, Priolli, 2013). Novas pesquisas serão necessárias com um maior número de casos e especialmente pólipos em diferentes graus de displasia para que esta controvérsia possa ser melhor compreendida. Vale a pena ressaltar que estudos associados do dano oxidativo ao DNA e proteínas/genes de reparo poderiam ser muito esclarecedores para comprovar esta inferência.

5.3. Considerações finais

Interferir na modulação da carcinogênese do cólon é de suma importância nos dias atuais, em especial no Brasil que deverá considerar o envelhecimento de sua população, a adoção de estilo de vida moderna com preferência por dietas pouco saudáveis e o sedentarismo como desafios contemporâneos a serem vencidos com vistas à prevenção de doenças, foco principal da promoção da saúde da população.

A mutagênese, o envelhecimento e o processo de carcinogênese estão relacionadas ao acúmulo de lesões no DNA gerados por dano oxidativo provocado principalmente pelas EROs (Nie et al.,2001). A formação endógena de EROs é uma

conseqüência indiscutível do metabolismo aeróbio dos seres vivos (Michiels et al., 1994), entretanto, quando há exposição intensa e contínua as EROs decorrente, por exemplo, de processo inflamatório intestinal, ou agentes carcinógenos na luz intestinal, há aumento patológico dos níveis destes radicais e, conseqüentemente, do dano oxidativo ao DNA, o qual atuará como fator de risco ao surgimento de alterações displásicas do tecido colônico, com potencial para o desenvolvimento do câncer colorretal, (D' Inca et al., 2004), assim como demonstrado no presente estudo.

Se bem determinado o papel do dano oxidativo ao DNA como responsável pelas mutações que originam o câncer esporádico, poder-se-á utilizar antioxidantes ou antiinflamatórios como terapia neoadjuvante na tentativa da preservação do tecido normal, especialmente em pacientes com risco ao desenvolvimento das neoplasias, como hoje já bem estabelecido para os casos das doenças polipóides intestinais e mais recentemente em portadores da Síndrome de Lynch (Burn et al, 2012).

6. CONCLUSÃO

Há maiores quantidades de dano oxidativo ao DNA no tecido tumoral quando comparado ao tecido normal. O dano oxidativo ao DNA é maior nos adenomas comparativamente aos adenocarcinomas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ames, B.; Shigenaga, M.; Hagen, T.. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90:7915–922, 1993.

Balasubramanyam, M.; Adaikalakoteswari, A.; Sameermahmood, Z.; Mohan, V.. Biomarkers of oxidative stress: methods and measures of oxidative DNA damage (COMET assay) and telomere shortening. **Methods Mol Biol**, 610:245–261, 2010.

Battacharya, P.K.; Barton, J.K.. Influence of intervening mismatches on long range guanine oxidation in DNA duplexes. **J Am Chem Soc**, 123:8649-8656, 2001.

Burn J.; Mathers J.; Bishop D.T.. Lynch Syndrome: History, Causes, Diagnosis, Treatment and Prevention (CAPP2 Trial). **Dig Dis** 30(2):39–47, 2012.

Cancer Facts & Figures – 2013, American Cancer Society (ACS), Atlanta, Georgia, 2012 [Acesso em 09 ag. 2014]. Disponível em <
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>>)

Clancy, S.. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. **Nature Education** 1(1):103, 2008.

Cunningham,D.; Atkin,W.; Lenz,H.J.; Lynch,H.T.; Minsky,B.; Nordlinger,B.; Starling,N.. Colorectal cancer. **Lancet** 375(9719):1030-1047, 2010.

D’Inca R.; Cardin R.; Benazzato L.; Angriman I.; Martines D.; Stuniolo G.C.. Oxidative DNA damage in the mucosa of ulcerative colitis increases with disease duration and dysplasia. **Inflamm Bowel Dis** 10:23-27, 2004.

Dizdaroglu M.. Chemical determination of free radical-induced damage in DNA. **Free Radical Biology and Medicine** 10(3/4):225-242, 1991.

Duarte-Franco, E.; Franco, E.L.. Epidemiologia e Fatores de Risco em Câncer Colorretal In: In: Rossi, B. M.; Nakagawa, W. T.; Ferreira, F. O.; Junior, S. A.; Lopes A. **Câncer de Cólon Reto e Ânus**. São Paulo, p:3-21, 2004.

Fearon, E. R.; Vogelstein, B.. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 61:759-767, 1990.

Gedik, C.M.; Boyle, S.P.; Wood, S.G.; Vaughan, N.J.; Collins, A.R.. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. **Carcinogenesis** 23(9):1441-1446, 2002.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch Biochem Biophys** 280(1):1-8, 1990.

Hanahan, D.; Weinberg, R.A.. The hallmarks of cancer. **Cell** 100(1):57-70, 2000.

Hata Y.; Kawabe T.; Hiraishi H.; Ota S.; Terano A.; Ivey K.J.. Hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity to cultured colonic epithelial cells. **Life Sci** 60:2221-2230, 1997.

Howlander, N.; Noone, A.; Krapcho, M.; Neyman, N.; Aminou, R.; Waldron, W.; Cronin, K. SEER Cancer Statistics Review. National Cancer Institute 2012.

Imlay, J.; Chin, S. M.; Linn, S.. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. **Science** 240:640-642, 1998.

Instituto Nacional do Câncer. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA, 2013.

Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D.. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 61(2):69-90, 2011.

- Jorgensen, O.D.; Kronborg, O.; Fenger, C.. The Funen Adenoma Follow-Up Study. Characteristics of patients and initial adenomas in relation to severe dysplasia. **Scand J Gastroenterol** 28(3):239-243, 1993.
- Kasai, H.; Nishimura, S.. Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen. **Nucleic Acids Symp Ser** 12:165-167, 1983.
- Kawanishi, S.; Hiraku, Y.; Pinlaor, S.; Ma, N.. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. **Biol Chem** 387(4):365-372, 2006.
- Kim, H.; Jen, J.; Vogelstein, B.; Hamilton, S.R.. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. **Am J Pathol** 145:148-156, 1994.
- Kondo, S.; Toyokuni, S.; Iwasa, Y.; Tanaka, T.; Onda, H.; Hiai, H.; Imamura, M.. Persistent oxidative stress in human colorectal carcinoma, but not in adenoma. **Free Radic Biol Med** 27(3-4):401-410, 1999.
- Ladeira, M.S.; Bueno, R.C.; Dos Santos, B.F.; Pinto, C.L.; Prado, R.P.; Silveira, M.G.; Rodrigues, M.A.; Bartchewsky, W.Jr.; Pedrazzoli, J.Jr.; Ribeiro, M.L.; Salvadori, D.M.. Relationship among Oxidative DNA Damage, Gastric Mucosal Density and the Relevance of cagA, vacA and iceA Genotypes of Helicobacter pylori. **Dig Dis Sci** 53(1):248-55, 2008.
- McGregor, D.. Carcinogenicidade and genotoxic carcinogens. In: Ballantyne, B.; T. Mars & T. Syversen. **General and Applied Toxicology**. 2nd Edition. London, Macmillan Reference. P:1099-1117, 2000.

Michiels C.; Raes M.; Toussaint O.; Remacle J.. Importance of Seglutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Rad Biol and Med** 17(3):235-248, 1994.

Nie G.; Wei T.; Shen S.; Zhao B.. Polyphenol protection of DNA against damage. **Methods in Enzymology** 335:232-244, 2001.

Norat T.; Bingham S.; Ferrari P.; Slimani N.; Jenab M.; Mazuir M.; Overvad K.; Olsen A.; Tjønneland A.; Clavel F.; Boutron-Ruault MC.; Kesse E.; Boeing H.; Bergmann M.M.; Nieters A.; Linseisen J.; Trichopoulou A.; Trichopoulos D.; Tountas Y.; Berrino F.; Palli D.; Panico S.; Tumino R.; Vineis P.; Bueno-de-Mesquita H.B.; Peeters P.H.; Engeset D.; Lund E.; Skeie G.; Ardanaz E.; González C.; Navarro C.; Quirós J.R.; Sanchez M.J.; Berglund G.; Mattisson I.; Hallmans G.; Palmqvist R.; Day N.E.; Khaw K.T.; Key T.J.; San Joaquin M.; Hémon B.; Saracci R.; Kaaks R.; Riboli E.. Meat, Fish and colorectal cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. **J Nat Cancer Inst** 97:906-916, 2005.

Oliva, M.R.; Ripoll, F.; Muniz, P.; Iradi, A.; Trullenque, R.; Valls, V.; Drehmer, E.; Sáez, G. T.. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. **Mol Carcinog** 18:232-243, 1997.

Östling, O.; Johanson, K.J.. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun** 123(1): 291-298, 1984.

Pinho, M.S.L.; Rossi, B.M.. Conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal. **Rev Bras Coloproct** 19(1) 57-60, 1999.

Pool-Zobel, B.L.; Leucht, U.. Induction of DNA damage in human colon cells derived from biopsies by suggested risk factors of colon cancer. **Mutat Res** 375:105-116, 1997.

Pool-Zobel, B.L.; Abrahamse, S.L.; Collins, A.R.; Kark, W.; Gugler, R.; Oberreuther, D.; Siegel, E.G.; Treptow-van Lishaut, S.; Rechkemmer, G.. Analysis of DNA strand breakes, oxidized bases, and glutathione S-tranferase P1 in human colon cellsfrom biopsies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 8:609-614, 1999.

Priolli, D.G.; Canelloi, T.P.; Lopes, C.O.; Valdívia, J.C.; Martinez, N.P.; Açari, D.P.; Cardinalli, I.A.; Ribeiro, M.L.. Oxidative DNA damage and β -catenin expression in colorectal cancer evolution. **Int J Colorectal Dis** 28(5):713-722, 2013.

Redon, C.E.; Dickey, J.S.; Nakamura, A.J.; Kareva, I.G.; Naf, D.; Nowsheen, S.; Kryston, T.B.; Bonner, W.M.; Georgakilas, A.G.; Sedelnikova, O.A.. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107(42):17992–17997, 2010.

Reitzer L.; Wice B.; Kennel D.. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured Hela cells. **J.Biol.Chem** 254:2669-2676, 1979.

Ribeiro, M.L.; Priolli D.G.; Miranda, D.D.C.; Paiva, D.A.; Pedrazoli Jr.J.; Martinez, C.A.R.. Avaliação do Dano Oxidativo ao DNA de Células Normais e Neoplásicas da Mucosa Cólica de Doentes com Câncer Colorretal. **Rev Bras Coloproct** 27(4): 391-402, 2007.

Ribeiro, M.L.; Priolli, D.G.; Miranda, D.D.C.; Arçari, D.P.; Pedrazzoli, J.Jr.; Martinez, C.A.R.. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer** 7(4):267-272, 2008.

Rossingol, R.; Gilkerson, R.; Aggeler, R.; Yamagata, K.; Remington, S. J.; Capaldi, R. A.. Energy substrate mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. **Cancer Research** 64:985-993, 2004.

Seril, D.N.; Liao, J.; Yang, G.Y.; Yang, C.S.. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animals models. **Carcinogenesis** 24:353-62, 2003.

Singh, N.P.; Mccoy, M.T.; Tice, R.R.; Shneider, E.L.. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res** 175:184-191, 1988.

Tannapfel, A.; Neid, M.; Aust, D.; Baretton, G.. **The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. Dtsch Arztebl Int** 107(43):760-766, 2010.

Toyokuni, S.; Okamoto, K.; Yodoi, J.; Hiai, H.. Persistent oxidative stress in cancer, **FEBS Lett** 358:1-3, 1995.

Tudek B, Speina E. Oxidatively damaged DNA and its repair in colon carcinogenesis. **Mutat Res** 736(1-2):82-92, 2012.

Warburg O.; Wind F.; Negelein E.. The metabolism of tumors in the body. **J Gen Physiol** 8(6):519-530, 1927.

