

EXPRESSÃO TECIDUAL DOS GENES MUTYH E OGG1 EM DOENTES COM CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO

Tissue expression of the genes MUTYH and OGG1 in patients with sporadic colorectal cancer

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

Trabalho realizado no ¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP; ³Departamento de Cirurgia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP; ⁴Centro Integrado de Assistência a Saúde da Mulher, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

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

Correspondência:

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

Fonte de financiamento: não há
 Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 12/12/2016
 Aceito para publicação: 14/03/2017

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

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

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

INTRODUÇÃO

Segundo recente inquérito epidemiológico, o câncer colorretal (CCR) acometeu, em 2015, 1,4 milhão de pessoas em todo o mundo, sendo o terceiro tipo de neoplasia maligna mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres⁹. O Instituto Nacional de Câncer estima que para o biênio 2016-2017 no Brasil, dependendo da região geográfica considerada, ele possa acometer de 3,35 a 28,15/100.000 habitantes entre os homens e 2,09 a 29,13/100.000 habitantes entre as mulheres¹³. Com o aumento da expectativa de vida, os fenômenos da globalização à maior exposição a agentes carcinogênicos e, principalmente, à mudança de hábitos dietéticos, espera-se que o CCR tenha importância crescente no perfil da mortalidade por câncer em todo o mundo aumentando consideravelmente os custos econômicos e sociais^{19, 23}.

Estudos genéticos mostraram que o desenvolvimento do CCR esporádico é processo evolutivo que envolve uma série de mutações sequenciais ou modificação na expressão de genes relacionados ao ciclo celular²¹. Já se encontra bem estabelecido que o desenvolvimento do CCR a partir da mucosa normal é mediado por uma sequência de mutações de genes controladores do ciclo celular (proliferação, diferenciação, apoptose e reparo do DNA)^{8,30}. Mutações nesses genes podem conferir vantagens adicionais para crescimento do tecido tumoral em relação aos tecidos normais¹⁹.

Apesar de os fenômenos iniciais da carcinogênese colorretal ainda serem motivo

de constante pesquisa, já se demonstrou que o dano ao DNA ocasionado por radicais livres de oxigênio (RLO) está relacionado ao desenvolvimento do CCR^{34,27,31,20,4}. Os RLO são produzidos em grande quantidade nos processos inflamatórios crônicos que acometem o epitélio intestinal. Esses radicais induzem dano persistente ao DNA e, caso não sejam prontamente neutralizados pelos sistemas antioxidantes, podem ocasionar mutações relacionadas ao desenvolvimento do CCR¹⁶. Um dos mecanismos de dano ao DNA mais bem estudados relaciona-se à oxidação da base nitrogenada guanina, formando a 8-oxoguanina (8-oxoG). Ela é uma base oxidada altamente mutagênica capaz de ocasionar transversões de CC→TA nas fitas do DNA, possibilitando, quando não reparadas, o aparecimento de mutações. Quando essas mutações comprometem genes supressores de tumores ou oncogenes, pode surgir um clone de células com autonomia proliferativa e crescimento descontrolado, alterações inerentes às células neoplásicas³¹.

Já se encontra bem estabelecido que a oxidação de bases do DNA possibilita o desenvolvimento do CCR e que a remoção dessas bases oxidadas é vital para evitar o aparecimento de mutações²⁶. Um desequilíbrio crônico entre os mecanismos de dano e reparo do DNA aumenta o risco de ocorrer instabilidade genômica e, portanto, torna-se importante compreenderem-se os mecanismos pelos quais os sistemas de reparo que removem as bases oxidadas do DNA presentes no genoma. Para tanto, os organismos vivos possuem genes específicos para corrigir os erros de pareamento ocasionados pelo estresse oxidativo. O sistema de excisão de bases (BER) é a via primária de reparo do DNA responsável pela correção de bases oxidadas, tendo papel fundamental na preservação da integridade do DNA submetido à ação deletéria dos RLO^{28,24}. Dentre todos os genes envolvidos no reparo e na remoção da 8-oxoG, os genes MUTYH e OGG1, componentes do sistema BER, apresentam papel de destaque. Esses genes codificam DNA-glicosilases que têm como função remover as bases oxidadas erroneamente pareadas, assegurando a manutenção da integridade das fitas do DNA. Estudos recentes sugerem que pacientes com CCR apresentam menor expressão dos genes OGG1 e MUTYH nos tecidos neoplásicos quando comparados aos tecidos normais, sugerindo que esses sistemas funcionem de maneira deficiente³³. Todavia, a correlação entre o nível de expressão tecidual e variáveis clínicas e histopatológicas ainda foram pouco estudadas³³.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão tecidual dos genes MUTYH e OGG1 nos tecidos normal e neoplásico de portadores de CCR esporádico e correlacioná-la aos principais aspectos clínicos e histopatológicos.

MÉTODOS

Esse estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco, em Bragança Paulista (Projeto N° 0235.0.142.000-07). Todos os doentes que forneceram material biológico para o presente estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, concordando em participar de todas as etapas experimentais, bem como foram esclarecidos do objetivo da pesquisa.

Casuística

Foram estudados de modo prospectivo 49 doentes, sendo 26 (53%) mulheres, com média de idade de 65,8±11,3 anos, portadores de adenocarcinoma do cólon e reto, operados com intenção curativa por uma mesma equipe cirúrgica, entre janeiro de 2010 e dezembro de 2013. Foram excluídos por meio de critérios de clínicos e endoscópicos os doentes suspeitos de CCR hereditário (polipose adenomatosa familiar e síndrome de Lynch), enfermos submetidos a tratamento quimiorradioterápico neoadjuvante, portadores de CCR associado à doença inflamatória intestinal, menores de 18 anos, enfermos submetidos a tratamento

cirúrgico em caráter de urgência e aqueles que se negaram a participar do estudo. Os doentes selecionados para o estudo foram submetidos ao estadiamento clínico, laboratorial e por exames de imagem segundo as diretrizes recomendadas pela American Society of Colorectal Surgeons⁵.

Coleta das amostras

Imediatamente após a remoção do espécime cirúrgico, foram colhidos fragmentos em triplicata de tecido obtidos da mucosa cólica normal (distanto no mínimo 10 cm da margem proximal da lesão) e da periferia da lesão neoplásica. Após a coleta, os fragmentos foram identificados com o registro do doente, data e local de onde tinham sido coletados. Os fragmentos foram acondicionados em tubos apropriados para armazenamento em ultrarrefrigeração e imediatamente armazenados a -80° C até o momento do processamento. Os dados, epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos foram obtidos a partir do prontuário médico. Dados histopatológicos como localização do tumor, aspecto macroscópico do tumor, tamanho da lesão, tipo histológico, grau de diferenciação celular, profundidade de invasão na parede intestinal, presença de invasão angiolinfática ou perineural, número de linfonodos ressecados, número de linfonodos comprometidos, razão de linfonodos comprometidos e estadiamento TNM foram extraídos a partir do laudo histopatológico elaborado por um único médico patologista com experiência em neoplasias colorretais. O estadiamento dos tumores obedeceu à classificação TNM (Tumor, Node, Metastasis) segundo a 6ª edição proposta pela UICC (União Internacional de Controle do Câncer). Todos os enfermos foram acompanhados no ambulatório de neoplasia colorretal do Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus, Bragança Paulista, SP, Brasil, pelo mesmo profissional.

Extração do RNA e RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)

ORNA total foi isolado utilizando-se o kit de tecido RNeasy (Qiagen). A pureza foi avaliada usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A fita simples de cDNA foi sintetizada a partir do RNA utilizando-se o kit de alta capacidade de arquivo de cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

A PCR quantitativa foi realizada utilizando-se um sistema de 7500 PCR em tempo real (Applied Biosystems), com os números de ciclos limite determinados pelo software RQ Study (Applied Biosystems). As reações foram corridas em triplicata, e os números de ciclo limiar foram considerados pela média. A mistura da reação contendo um total de 50 µl foi preparada como se segue: 25 µl SYBR Green™, PCR SuperMix UDG (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, EUA), 10 mM de cada primer (Tabela 1) e 1 µl de cDNA (100 ng). O primeiro ciclo foi feito com tratamento preliminar com UDG durante 2 min a 50° C e desnaturação por mais 2 min a 95° C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95° C por 15 s, anelamento a 60° C por 15 s e extensão do primer a 72° C durante 15 s. Este passo foi seguido por análise de pontos de fusão dos produtos de amplificação da fita dupla consistindo em 40 ciclos de 1° C decrescentes (15 s cada) começando a 95° C. A primeira derivada deste mapa, dF/dT, representa a taxa de variação da fluorescência na reação. Uma mudança significativa na fluorescência ocorre no ponto de fusão dos produtos de cadeia dupla encontrados na PCR. Um mapa de dF/dT em função da temperatura mostra essas mudanças como picos distintos.

A expressão dos genes MUTYH e OGG1 foi medida e normalizada para o gene constitutivo 18S, que mostrou expressão constante em todas as amostras testadas. A expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ e os resultados foram expressos como média de expressão do gene ± EP.

TABELA 1 – Primers utilizados para a RT-PCR

Gene	Sequência (5'-3')
18S	CGCGTTCTATTTTGTGGT CGGTCCAAGAATTTACCTC
MUTYH	CCTGTGGGGACCTTATGCT CCTTTGGAACCCTTTCTGC
OGG1	CCTGTGGGGACCTTATGCT CCTTTGGAACCCTTTCTGC

Análise estatística

Foi realizada utilizando-se a versão 13.0 do software estatístico SPSS (SPSS, Chicago, IL). Os valores encontrados para a expressão dos genes nos tecidos normais e nas variáveis consideradas foram identificados por estatística descritiva e expressos como a média de expressão do gene com seu respectivo erro padrão. A comparação da expressão dos genes entre os tecidos normal e neoplásico, assim como entre as variáveis propostas, foi realizada utilizando-se o teste paramétrico de Mann-Whitney. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os valores significantes obtidos na comparação entre os tecidos normal e neoplásico foram identificados com uma cruz (\dagger), enquanto os valores obtidos comparando as estratificações entre as variáveis clínicas e histopatológicas, com um asterisco (*).

RESULTADOS

A Tabela 2 mostra a distribuição da casuística em relação às variáveis consideradas no estudo.

TABELA 2 – Relação das variáveis estudadas

Características	Pacientes (%)
Gênero	
Masculino	23/49 (47%)
Feminino	26/49 (53%)
Idade	
41-51 anos	5/49 (10%)
52-62 anos	9/49 (19%)
>63 anos	35/49 (71%)
Localização	
Cólon	17/49 (35%)
Reto	32/49 (65%)
Tamanho do tumor	
≤ 3 cm	14/30 (47%)
> 3 cm	16/30 (53%)
Tipo histológico	
Usual	47/49 (96%)
Mucoprodutor	2/49 (4%)
Grau de diferenciação celular	
Bem	5/49 (10%)
Moderadamente	38/40 (78%)
Pouco	6/49 (12%)
Grau de invasão na parede intestinal	
T1 - T2	38/49 (78%)
T3 - T4	11/49 (22%)
Linfonodos ressecados	
≤ 12	27/49 (55%)
> 12	32/49 (65%)
Linfonodos comprometidos	
N0	29/49 (59%)
N1-N2	20/49 (41%)
Razão de linfonodos comprometidos	
0 - $\leq 10\%$	24/49 (49%)
$> 11\%$ - $\leq 20\%$	7/49 (14%)
$> 21\%$	18/49 (37%)
Invasão angiolinfática	
Sim	17/49 (35%)
Não	32/49 (65%)
Invasão perineural	
Sim	27/49 (55%)
Não	22/49 (45%)
Estadiamento TNM	
I e II	19/49 (39%)
III e IV	30/49 (61%)

A Tabela 3 mostra a expressão dos genes MUTYH e OGG1 com relação às características das amostras estudadas, bem como entre o tecido normal e o neoplásico, considerando apenas as variáveis onde houve diferença estatística significativa em um dos genes.

TABELA 3 – Expressão dos genes OGG1 e MUTYH de acordo com as características da amostra

Característica OGG1	Gene	Gene	
		MUTYH	
Fold induction	Tumor/Normal	0,28 \pm 0,12 \dagger	0,41 \pm 0,02 \dagger
Localização	Cólon	1,09 \pm 0,38	0,69 \pm 0,34
	Reto	0,48 \pm 0,02*	0,50 \pm 0,10
Tamanho do tumor	≤ 3 cm	0,21 \pm 0,05	0,36 \pm 0,08*
	> 3 cm	0,22 \pm 0,05	0,13 \pm 0,02
Invasão angiolinfática	Sim	0,24 \pm 0,04	0,30 \pm 0,09*
	Não	0,29 \pm 0,09	0,89 \pm 0,11
TNM (estádio)	I - II	0,49 \pm 0,12	0,78 \pm 0,20
	III - IV	0,16 \pm 0,08*	0,33 \pm 0,07*

\dagger = $p < 0,05$ quando comparado com o tecido normal; ** $p < 0,05$ quando comparadas as características

DISCUSSÃO

O genoma humano é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo. Os RLO nas células da mucosa cólica são formados como produtos do metabolismo aeróbico normal ou como consequência da exposição das células a radiação ionizante, substâncias químicas, isquemia, processos inflamatórios agudos e crônicos ou, até mesmo, pela simples modificação no fornecimento do substrato energético habitual aos colonócitos representados pelos ácidos graxos de cadeia curta^{20,12}. Como são moléculas eletrofílicas, com capacidade altamente reativa, os RLO atacam substâncias com alta densidade de elétrons tais como as bases nitrogenadas que formam o DNA³. Esses radicais podem ocasionar quebras simples ou duplas nas fitas do DNA ou oxidar suas bases nitrogenadas, possibilitando o aparecimento de erros de pareamento e, conseqüentemente, o desenvolvimento de mutações^{7,2}. Quando se consideram os fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento do CCR, estudos mostraram que o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos responsáveis pelo aparecimento de mutações relacionadas ao desenvolvimento da doença^{6,2}. Já se demonstrou que a inflamação crônica e contínua à mucosa intestinal, como ocorre nas doenças inflamatórias intestinais, aumentando a produção de RLO, aumenta a possibilidade do desenvolvimento do CCR³¹. Reforçam ainda mais essa possibilidade os resultados de estudos demonstrando que os níveis de estresse oxidativo no tecido neoplásico de portadores de CCR são significativamente maiores quando comparados aos do tecido normal^{126,27}.

O dano oxidativo mais frequente causado no DNA pela exposição aos RLO é a formação da 8-oxoG. O tecido neoplásico de portadores de CCR apresenta em média duas vezes mais 8-oxoG quando comparado à mucosa normal¹⁷.

Com o intuito de corrigir os erros de pareamento ocasionados pela 8-oxoG e evitar o surgimento de mutações, o organismo possui diferentes sistemas de reparo do DNA. O sistema BER é o principal responsável pela excisão de bases oxidadas²². Os genes MUTYH, OGG1, MTH1, NEIL1, APEX1, PARP1, LIG3, MGP e NTHL1 são os principais componentes do sistema BER.

O gene MUTYH localiza-se no braço curto do cromossomo 1 (1p 32-34) e possui 16 éxons. Codifica uma DNA-glicosilase formada por 535 aminoácidos, com peso molecular de 39 kD, denominada MUTHY-glicosilase, que atua no reparo do DNA por excisão de bases. Durante a duplicação do DNA, a base adenina pareia-se habitualmente com a timina (A-T), enquanto a guanina pareia-se com a citosina (C-G). Durante o metabolismo aeróbico celular normal ou em situações que provocam o aumento da produção de RLO pode ocorrer a oxidação da guanina, formando a 8-oxoG. Essa base oxidada pareia-se rápida e erroneamente com

adenina em vez da citosina. A MUTY-glicosilase age removendo da fita do DNA as bases de adenina mal pareadas com a 8-oxoG. A enzima corrige este erro para que não ocorra o desenvolvimento de mutações por transversões do tipo G:C>T:A, que podem levar à formação de tumores, caso comprometam genes controladores do ciclo celular. A importância das mutações no gene MUTYH na carcinogênese colorretal ganhou destaque com os estudos de Al-Tassan et al. em 2002, em que os autores demonstraram, pela primeira vez, indivíduos de uma mesma família que apresentavam mutações germinativas bialélicas no gene MUTYH e que cursavam com formas recessivas de polipose adenomatosa familiar, associadas ao desenvolvimento de adenomas colorretais que apresentavam progressão para CCR em idade mais tardia, quando comparado às formas clássicas da polipose adenomatosa familiar¹. Ao analisarem os tecidos neoplásicos desses doentes, encontraram um índice elevado de transversões do tipo G:C>T:A em genes habitualmente mutados no CCR (APC e K-RAS). Posteriormente outros autores confirmaram esses achados mostrando que mutações no gene MUTYH, reduzindo a eficácia do sistema BER, predispõem ao aparecimento de CCR^{1,14,15}.

O gene OGG1 localiza-se no braço curto do cromossomo 3 (3p25.3). É formado por 12 éxons e codifica a enzima 8-oxoguanina glicosilase. Estima-se que a enzima contenha 424 aminoácidos em sua molécula e peso molecular de 47kD²⁵. Demonstrou-se que o gene OGG1 possui papel fundamental na via de reparo BER, corrigindo transversões G:C>T:A. A enzima transcrita promove a hidroxilação das ligações glicofílicas formadas entre a 8-oxoG e a fração de açúcar da base nitrogenada, removendo a molécula da 8-oxoG e formando um sítio apurínico na fita do DNA que, após a excisão, é preenchido posteriormente com a base nitrogenada correta. Por seu papel fundamental no sistema BER, mutação e polimorfismos no gene OGG1 são considerados eventos que aumentam a susceptibilidade a várias formas de câncer³⁵. Estudos mostraram que a redução da atividade do gene pode contribuir para o desenvolvimento do CCR³².

Um número não desprezível de CCRs hereditários apresentam defeitos genéticos ou epigenéticos em genes do sistema de reparo. A possibilidade de que também ocorram mutações no sistema BER no CCR esporádico é uma hipótese plausível. Assim, a investigação do perfil de expressão de genes do sistema BER relacionados à correção de bases oxidadas comparando tecidos normais e neoplásicos pode melhorar a compreensão do papel desses genes nos doentes com CCR esporádico³². Estudos anteriores já demonstraram que existe menor eficiência do sistema BER nos doentes com CCR quando comparados a voluntários saudáveis^{15,33}. Todavia, as mutações do gene MUTYH e OGG1 nos portadores de CCR esporádico não são frequentes e sofrem influência da etnia estudada^{14,15,33}. Dessa forma, para avaliar as mutações nesses genes é necessário estudar um contingente grande de doentes pertencentes, se possível, à mesma etnia. Estudo que avalia a importância de mutações no MUTYH com o objetivo de examinar sua prevalência na etnia polonesa constatou que entre 1042 doentes apenas 0,4% apresentava mutação bialélica associada ao desenvolvimento de adenomas e CCR¹⁵. Outros autores que analisam a contribuição das mutações germinativas no MUTYH no desenvolvimento dos CCR avaliaram 358 pacientes não selecionados¹⁰. Encontraram dois doentes (0,6%) com mutações germinativas bialélicas e oito (2,2%) mutações monoalélicas no gene MUTYH. Os doentes com mutação bialélica apresentavam adenomas múltiplos, mas não polipose adenomatosa profusa e, em ambos os casos, os tumores localizavam-se no cólon distal. Esses resultados sugerem que mutações bialélicas do gene, apesar de aumentarem a formação de adenomas e, conseqüentemente, a chance do desenvolvimento de câncer, é provável que representem menos de 3% dos casos de CCR esporádico¹⁰.

Estudo avaliou a expressão tecidual de vários genes do sistema BER e a capacidade de reparo do DNA desses genes comparando tecidos normal e neoplásico e correlacionando-a com variáveis clínicas e patológicas³². Os autores verificaram que a expressão tecidual do gene OGG1 era significativamente menor

nos tecidos neoplásico, enquanto a do gene MUTYH não mostrava diferenças significantes. Constataram ainda que, ao relacionarem a expressão dos genes OGG1 e MUTYH a gênero, idade, localização do tumor, grau histológico e estadios da classificação TNM (I+II x II+IV) não encontraram diferenças significantes³². No Brasil, apenas um estudo avaliou o comportamento do gene OGG1 em portadores de CCR esporádico²⁹. Utilizando amostras oriundas da mesma população de doentes, os autores encontraram menor expressão do OGG1 no tecido tumoral²⁹. Com relação à localização do tumor, identificaram menor expressão do gene apenas nos portadores de câncer de reto e nos tumores com estadiamento mais avançado²⁹.

No presente estudo encontraram-se resultados semelhantes. Ao avaliar-se a expressão do OGG1, verificou-se redução da expressão no tecido tumoral, à semelhança dos estudos anteriormente citados^{32,29}. Também se encontrou redução da expressão tecidual do gene nos portadores de tumores localizados no reto e em doentes classificados nos estadios mais avançados da doença. Com relação à expressão do gene MUTYH, apesar de ser menor no tecido neoplásico, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p=0,06$). É possível que esses valores pudessem apresentar diferenças significantes caso fosse incluído maior número de doentes. Quando relacionada à expressão do gene MUTYH com as variáveis selecionadas para o presente estudo, verificou-se que ocorria menor expressão do gene nos tumores que apresentavam diâmetro maior que 3 cm, nos que apresentavam invasão angiolinfática e naqueles classificados nos estadios mais avançados (T3-T4) da classificação TNM. Esses achados sugerem que a menor expressão nesses doentes possa contribuir para o pior prognóstico da doença, pois se relacionavam a variáveis que conferem pior prognóstico à doença.

Quando considerados os resultados do presente estudo, e tendo ciência de que existe maior grau de estresse oxidativo nos tecidos neoplásicos, é possível que a menor expressão dos genes OGG1 e MUTYH no tecido tumoral, bem como nas variáveis relacionadas ao pior prognóstico da doença, possa ocorrer por acúmulo de mutações epigenéticas ou hipermetilação nesses genes, reduzindo sua capacidade de reparo e favorecendo o desenvolvimento de um fenótipo mais agressivo como mostrado anteriormente¹¹. A hipermetilação da região promotora de genes que compõe o sistema BER tem sido encontrada em uma variedade de tumores (tireoide, bexiga, ovário, cerebrais, assim como no CCR)¹⁸.

Considerando que os genes OGG1, MUTYH, PARP-1 e XRCC1 fazem parte do mesmo sistema de reparo (BER) é possível que a presença de polimorfismos nesses genes possa interferir na sua expressão tecidual. Recente estudo que avalia a influência do polimorfismo APE1 T2197G (asp148Glu) mostrou que essa alteração interfere na expressão dos genes do sistema BER ao compararem-se tecidos normais e neoplásicos. Os resultados encontrados no presente estudo não só confirmam resultados anteriores como reforçam a importância da integridade do reparo por excisão de bases na etiopatogênese e na progressão do CCR esporádico.

CONCLUSÃO

Os genes MUTYH e OGG1 apresentam menor expressão tecidual nos estadios mais avançados do CCR.

REFERÊNCIAS

1. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, et al. Inherited variants of *MYH* associated with somatic G:C->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet.* 2002;30(2):227-32.
2. Ames BN, Shigenawa MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(17):7915-22.
3. Battacharya PK, Barton JK. Influence of intervening mismatches on long range guanine oxidation in DNA duplexes. *J Am Chem Soc.* 2001;123(36):8649-56.

4. Boiteux S, Radicella P. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2000;377(1):1-8.
5. Chang GJ, Kaiser AM, Mills S, Rafferty JF, Bui WD, on behalf of Standards Practice Task Force of American Society of Colon and Rectal Surgeons. *Dis Colon Rectum*. 2012; 55(8):831-43.
6. Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:915-48.
7. Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biol Med*. 1991;10(3-4):225-42.
8. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
9. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136(5): 359-86.
10. Fleischmann C, Peto J, Cheadle J, Shah B, Sampson J, Houlston RS. Comprehensive analysis of the contribution of germline MYH variation to early-onset colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2004;109(4): 554-8.
11. Gao D, Herman JG, Guo M. The clinical value of aberrant epigenetic changes of DNA damage repair genes in human cancer. *Oncotarget*. 2016;7(24):37331-46.
12. Hwang BJ, Shi G, Lu AL. Mammalian MutY homolog (MYH or MUTYH) protects cells from oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2014; 13:10-21.
13. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2016. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID2>. Acesso em: 18 out. 2016.
14. Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, et al. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum Mol Genet*. 2002;11(23):2961-7.
15. Kabzinski J, Mucha B, Cuchra M, Markiewicz L, Przybyłowska K, Dżiki A, et al. Efficiency of base excision repair of oxidative DNA damage and its impact on the risk of colorectal cancer in the Polish population. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 3125989.
16. Kidane D, Chae WJ, Czochoch J, Eckert KA, Glazer PM, Bothwell AL, et al. Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014; 49(2):116-39.
17. Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M, Slupphaug G. Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett*. 2000; 476(1-2):73-77.
18. Lahtz C, Pfeifer GP. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J Mol Cell Biol* 2011; 3(1): 51-8.
19. Malheiros APR, Teixeira MG, Habr-Gama A, Alcântara PSM. Resultados do tratamento cirúrgico do câncer colorretal em doentes de idade até 64 anos e de 65 anos ou mais. *Rev. bras Coloproct*. 2005; 25:128-36.
20. Martinez CA, Ribeiro ML, Gambero A, Miranda DD, Pereira JA, Nadal SR. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. *Acta Cir Bras*. 2010;25(5):387-95.
21. Martinez CAR, Cordeiro AT, Priolli DG, Miranda DDC, Bartchewsky Junior W, Margarido NF, et al. Avaliação da expressão tecidual do gene de reparo MLH1 e dos níveis de dno oxidativo ao DNA em doentes com câncer colorretal. *Rev. bras. colo-proct*. 2009;29(3):303-13.
22. Mol CD, Parikh SS, Putnam CD, Lo TP, Tainer JA. DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1999; 28:101-28.
23. Nahas, SC, et al. Prognostic factors of surgically-treated patients with cancer of the right colon: a ten years' experience of a single university institution. *ABCD, arq. bras. cir. dig.*, 2015; 28(1):3-7. ISSN 0102-6720.
24. Peterson CL, Cote J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev*. 2004, 18(6): 602-16.
25. Radicella JP, Dherin C, Desmaze C, Fox MS, Boiteux S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 1997; 94(15): 8010-15.
26. Ribeiro ML, Priolli DG, Miranda DCC, Arçari DP, Pedrazzoli Júnior J, Martinez CAR. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2008;7(4):267-72.
27. Ribeiro ML, Priolli DG, Miranda DDC, Paiva DA, Pedrazzoli Júnior J, Martinez CAR. Avaliação do dano oxidativo ao DNA de células normais e neoplásicas da mucosa cólica de doentes com câncer colorretal. *Rev bras. colo-proctol*. 2007; 27(4):391-402.
28. Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. DNA repair in mammalian cells: base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(6):981-3.
29. Santos JC, Funck A, Silva-Fernandes IJL, Rabenhorst AHB, Martinez CAR, Ribeiro ML. Effect of APE1 T2197G (Asp148Glu) polymorphism on APE1, XRCC1, PARP1 and OGG1 expression in patients with colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2014; 15:17333-17343
30. Schumutte C, Yang AS, Nguyen TT, Beart RW, Jones PA. Mechanisms for the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 1996;56(10):2375-81.
31. Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in human and animals models. *Carcinogenesis*. 2003;24(3):353-62.
32. Slyskova J, Korenkova V, Collins AR, Prochazka P, Vodickova L, Svec J, et al. Functional genetic and epigenetic aspects of base nucleotide excision repair in colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5878-87.
33. Slyskova J, Naccarati A, Pardini B, Polakova V, Vodickova L, Smerhovsky Z, et al. Differences in nucleotide excision repair capacity between newly diagnosed colorectal cancer patients and healthy controls. *Mutagenesis* 2012; 27(4):225-32.
34. Wheeler JM. Epigenetics, mismatch repair and colorectal cancer. *Ann R Col Surg Eng*. 2005;87(1):15-20.
35. Zou H, Li Qing, Xia W, Liu Y, Xi W, Wang D. Association between the OGG1 Ser326Cys polymorphism and cancer risk: evidence from 152 case-control studies. *J Cancer*. 2016; 7(10):1273-1280.