

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Daniel de Barcellos Azambuja

**Estudo da expressão
imunohistoquímica da *Adenomatous
poliposis coli* (APC) e das proteínas
da via do reparo do DNA por excisão
de bases (BER) sobre o prognóstico
de pacientes com câncer colorretal**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2015

Daniel de Barcellos Azambuja

**Estudo da expressão
imunohistoquímica da *Adenomatous
poliposis coli* APC e das proteínas
da via do reparo do DNA por excisão
de bases (BER) sobre o prognóstico
de pacientes com câncer colorretal**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Fundação
Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de
Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden
Co-orientadora: Prof. Dra. Jenifer Saffi

Porto Alegre
2015

Catalogação na Publicação

Azambuja, Daniel de Barcellos

Estudo da expressão imunohistoquímica da Adenomatous poliposis coli (APC) e das proteínas da via do reparo do DNA por excisão de bases (BER) sobre o prognóstico de pacientes com câncer colorretal / Daniel de Barcellos

Azambuja. -- 2015.

111 p.: il., graf., tab.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.

Orientador(a): Ernani Luis Rhoden ; coorientador(a): Jennifer Saffi.

1. cancer colorretal. 2. biologia molecular. 3. Reparo dna. I. Título.

*“Todo guerreiro já ficou com medo de entrar em
combate...*

Todo guerreiro já perdeu a fé no futuro.□

Todo guerreiro já trilhou um caminho que não era dele.□

Todo guerreiro já sofreu por bobagens.□...□

Todo guerreiro já achou que não era guerreiro.□

Todo guerreiro já falhou em suas obrigações.□

Todo guerreiro já disse "SIM" quando queria dizer "NÃO".□

Todo guerreiro já feriu alguém que amava.□

*Por isso é um guerreiro; porque passou por estes desafios, e não perdeu a
esperança de ser melhor do que era.”*

Paulo Coelho

*Dedico este trabalho à minha esposa, Graziela,
e aos meus filhos, Pedro e Vicente*

Agradecimentos

Ao professor Dr. Ernani Rhoden pela orientação e incentivo para buscar sempre a excelência acadêmica.

À professora Dra. Jenifer Saffi pela orientação e por abrir os caminhos para a continuidade da minha formação.

Às técnicas do laboratório de Patologia da UFCSPA, Rosalva, Keli e Terezinha pela consultoria e colaboração na execução das atividades deste trabalho.

Aos professores Dr. Jose Vinicius Cruz e Dr. Antonio Nocchi Kalil, meus mestres e exemplos a serem seguidos.

À doutoranda Natalia Leguisamo Meirelles e à aluna de iniciação científica Helena de Castro e glória do Laboratório de Genética Toxicológica pela amizade e ajuda na realização deste estudo.

Aos pacientes que tornaram possível essa pesquisa.

Aos meus pais e irmão que sempre me ajudaram em todos os momentos da minha vida

À minha esposa, Graziela, por ser companheira e incentivadora das minhas conquistas.

Aos meus filhos, Pedro e Vicente, por serem a razão do meu viver,

Sumário

RESUMO	8
ABSTRACT	10
REVISÃO DA LITERATURA	12
1 Conceito e epidemiologia do Câncer Colorretal	12
1.2 Etiologia e aspectos patológicos do Câncer Colorretal	18
1.3 Estadiamento e tratamento do câncer colorretal	22
1.4 Aspectos histológicos e seu valor prognóstico no câncer colorretal	27
1.5 Etiologia molecular do Câncer Colorretal	30
1.5.1 Via APC/ β catenina	33
1.6 Sistema de reparo do DNA	36
1.6.1 Reparo por excisão de bases	43
1.6.2 Reparo por excisão de bases e câncer colorretal	47
2 JUSTIFICATIVA	54
3 OBJETIVO GERAL	56
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
5 REFERÊNCIAS	57
6 ARTIGO	74
7 ANEXOS	106
ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e esclarecido	106
ANEXO II - Parecer de aprovação do Comitê de Ética da UFCSPA	110

RESUMO

Introdução: O estadiamento do câncer colorretal (CCR) apresenta limitações em predizer acuradamente sua recorrência. Painéis moleculares já se mostraram de grande auxílio para estratificação do prognóstico na prática clínica. Desequilíbrios na via do reparo por excisão de bases (BER) estão associados com aumento do dano ao DNA, redução da capacidade de reparo e pior resposta à quimioterapia, podendo atuar como promissoras ferramentas de refinamento do estadiamento. **Pacientes e métodos:** Amostras, emblocadas de 72 pacientes com idade média de 66.7 ± 12.4 anos, sem tratamento neoadjuvante foram avaliadas quanto à expressão de APC, MPG, Pol β , XRCC1 e Fen1 por imunohistoquímica. Foram realizados estudos de associação dos dados moleculares com os dados clínicos e da escala TNM como preditores de prognóstico. Tabelas de contingência e associações foram analisadas com o teste do qui-quadrado e teste exato de Fischer. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos. **Resultados:** Baixa expressão de MPG (36 casos), Pol β (42 casos) e XRCC1 (28 casos) foram associados com melhor desfecho patológico, representado por tumores que apresentaram melhor diferenciação celular, baixos estádios TNM e ausência de invasões linfática e perineural. Os níveis de expressão de Fen-1 não foram relacionados a nenhuma das características clinico-patológicas. Foi também encontrado um padrão de expressão associado, no qual quanto maior a expressão de APC, menor foi a expressão de Pol β (-0.441 ; $p=0.001$), assim como uma co-expressão entre MPG e Pol β (0.384 ; $p=0.001$) e of Pol β and Fen1 (0.257 ; $p=0.03$) . **Conclusões:** Nossos resultados sugerem que aqueles pacientes que apresentaram menor

expressão de MPG, Pol β e XRCC1 eram mais propensos a evoluir para um desfecho mais favorável. Nós propomos um modelo que pode explicar este fato em que o acúmulo de intermediários do BER levam à disfunção e morte celulares. As proteínas do BER parecem ser candidatos adequados para refinar o atual estadiamento TNM do câncer colorretal.

Palavras-chave: Câncer colorretal; reparo por excisão de bases; estadiamento TNM; prognóstico.

ABSTRACT

Background: Colorectal cancer (CRC) pathological staging fails to accurately predict recurrence. Molecular panel has proven reliable for prognosis stratification in clinical practice. Imbalance in base excision repair (BER) proteins expressions is associated with increase of DNA damage, poor capacity of repair and poor response to chemotherapy and might be promisors as a tool for current staging refinement. **Patients and methods:** Pre-treatment tumour samples from 72 patients with sporadic colorectal adenocarcinoma were assessed for APC, MPG, PolB, XRCC1 and Fen1 expression by immunohistochemistry. The associations of molecular data were analysed in relation to clinical features and TNM staging as a prognosis predictor. Contingency tables and associations were analysed with the chi-square (χ^2) test and Fisher's exact test. P values <0.05 were considered statistically significant. **Results:** Low expression of MPG (36 cases), Pol β (42 cases) and XRCC1 (28 cases) were associated with favourable pathological outcome, represented by well-defined cellular differentiation, lower TNM stages and absence of lymphatic and perineural invasions. Fen1 expression levels were not related to any of the clinicopathological features. We also found a coupled expression pattern, in which the higher is the expression of APC, the lower is the expression of Pol β (-0.441 ; $p=0.001$) and also a co-expression between MPG and Pol β (0.384 ; $p=0.001$) and between Pol β and Fen1 (0.257 ; $p=0.03$). **Conclusions:** Our results suggest that those patients presenting low expression of MPG, Pol β and XRCC1 are more likely to evolve to a better outcome. We propose a model by which it may occur as consequence of the accumulation of toxic BER intermediates that lead to cellular dysfunction and cell

death. The BER proteins appear to be suitable candidates to refine the TNM current staging of colorectal cancer.

Keywords: Colorectal cancer; Base excision repair; TNM staging; Prognosis.

REVISÃO DA LITERATURA

1 Conceito e epidemiologia do Câncer Colorretal

De acordo com a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) e a Organização Mundial de Saúde (WHO), o câncer é a principal causa de mortes no mundo, respondendo por cerca de 13% de todos óbitos. Mesmo com o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e combate a esta condição clínica, a mortalidade atribuída ela continua a crescer, com uma estimativa de 13,1 milhões de óbitos em 2030 (WHO, 2014). Os principais tipos de neoplasias malignas do ser humano são: pulmonar (1,37 milhões de mortes), estômago (736.000), fígado (695.000) e colorretal (608.000) (IARC, 2014).

O câncer do cólon e do reto, ou câncer colorretal (CCR), é apresentado com um conjunto de doenças abordadas como câncer colorretal que, embora unificadas didaticamente, diferem em relação à epidemiologia, etiologia, fatores de risco e desenvolvimento. Desta forma, o CCR refere-se às neoplasias que acometem o cólon, a junção retossigmóide, o reto, o ânus e o canal anal (*BELOV et al, 2011*) . Por causa das diferenças quanto à localização anatômica, já que se tratam de estruturas diferentes, diferentes modalidades de tratamentos também serão necessárias. Mesmo assim, embora haja estudos que sugiram distintos fatores etiológicos, os cânceres do cólon e do reto permanecem relacionados, sendo separados apenas para facilitar a abordagem clínica e cirúrgica (*VASQUES et al, 2010*).

O principal tipo histológico de neoplasia colônica é o adenocarcinoma, responsável por cerca de 95% dos casos. Os demais tipos histológicos incluem

o adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células escamosas e carcinomas indiferenciados (*ZAMPINO et al., 2009*)

O CCR, configura-se, em termos de incidência, como a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa em países desenvolvidos. Aproximadamente 9,4%, equivalendo a um milhão de casos novos, de todos os cânceres são de cólon e reto (*JEMAL et al, 2011*). Os padrões geográficos são bem similares entre homens e mulheres, porém especificamente para o câncer de reto, sua incidência é cerca de 20% a 50% maior em homens na maioria das populações. A sobrevida média global para este tipo de câncer se encontra em torno de 59% em países desenvolvidos e 42% em países em desenvolvimento, podendo chegar a 90% se a doença é diagnosticada em estágio inicial (*IARC, 2014*).

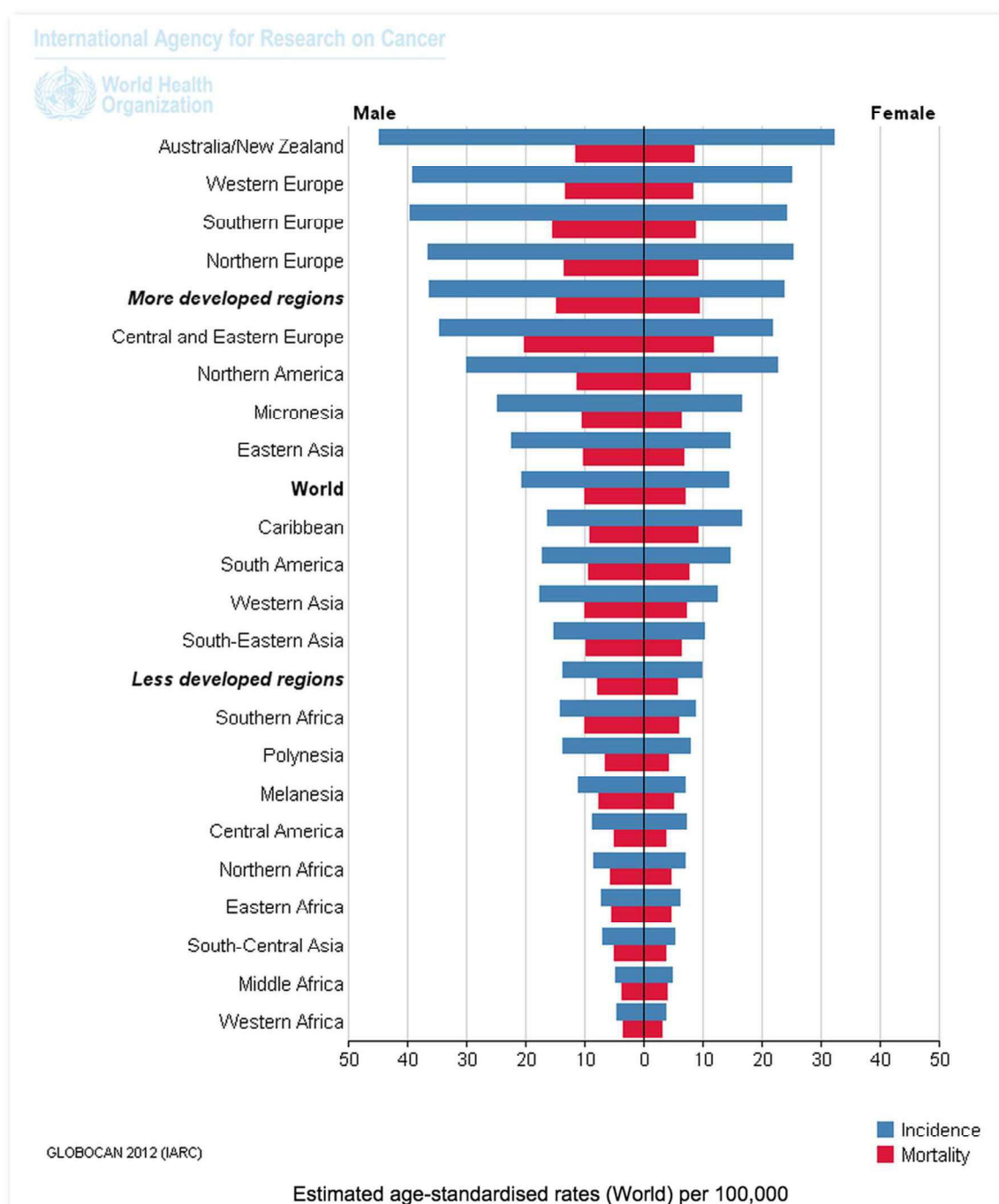


Figura 1: Incidência e mortalidade do câncer colorretal nas regiões do mundo.

Fonte: GLOBOCAN (IARC), 2012.

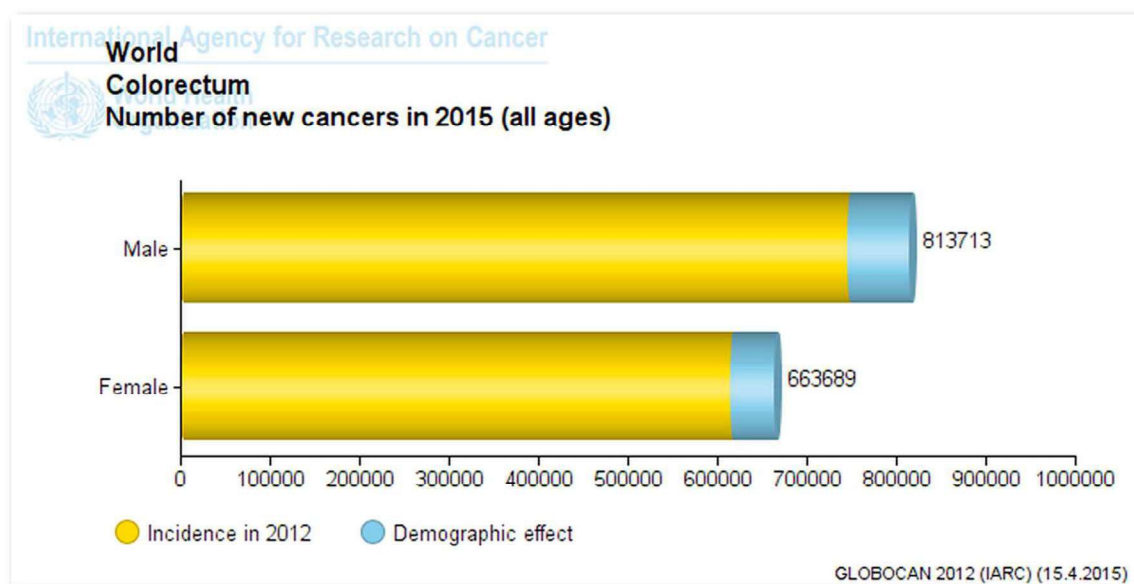


Figura 2: Incidência de câncer colorretal em 2012 (amarelo) e o efeito demográfico previsto para 2015 no mundo (azul) por sexo. Fonte: GLOBOCAN (IARC), 2012.

Nos Estados Unidos da América, o CCR responde de forma significativa como causa de morbidade e mortalidade, uma vez que pelo menos dois indivíduos do sexo masculino para cada 18 e um do sexo feminino a cada 20 indivíduos estão sujeitos a desenvolverem este tipo de neoplasia (*GELLAD et al, 2010*). Na Europa, por sua vez, o CCR é a segunda principal causa de morte considerando ambos os sexos. No mundo, estima-se que nos últimos cinco anos 2,8 milhões de pessoas foram diagnosticadas com CCR (*GELLAD et al, 2010*).

Em se tratando de Brasil e desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o CCR em homens é o segundo mais frequente na região Sudeste (22,67/ 100 mil) e terceiro nas regiões Sul (20,43/ 100 mil) e Centro-Oeste (12,22/ 100 mil). Na região Norte (4,48/ 100 mil), ocupa a quarta posição e, na região Nordeste, (6,19/ 100 mil) a quinta. Para as mulheres, é o segundo mais frequente

nas regiões Sudeste (24,56/ 100 mil) e Sul (21,85/ 100 mil). O terceiro nas regiões Centro-Oeste (14,82/100 mil) e Nordeste (7,81/ 100 mil), enquanto, na região Norte (5,30/ 100 mil), é o quarto mais frequente (INCA, 2014).

Os estados da região sul são classificados como de elevada incidência para CCR. Neste contexto, o Rio Grande do Sul ocupa lugar de destaque com as maiores taxas de incidência bruta para entre homens (26/ 100.000 habitantes) e mulheres (28/ 100.000 habitantes). Entre as capitais, Porto Alegre ocupa a terceira e quarta posições em termos de incidência bruta respectivamente entre homens e mulheres (DATASUS, 2014).

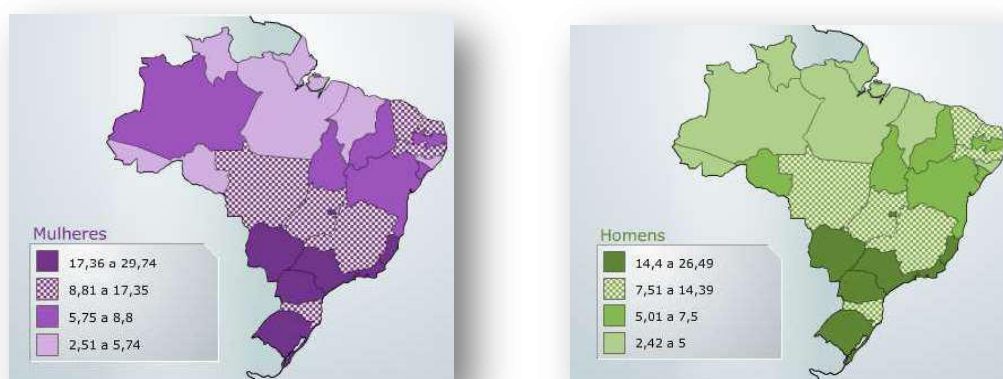


Figura 3: Incidência do câncer colorretal nos estados brasileiros em relação aos sexos em 2014. Fonte: DATASUS, 2014.

O recente aumento na incidência de CCR no Brasil é devido à maior expectativa de vida, combinado com mudanças no estilo de vida da população, especialmente relacionado com a dieta e o sedentarismo. De qualquer forma, é notório que o CCR é muito mais comum em indivíduos com mais de 50 anos, com um aumento exponencial no número de diagnósticos a partir desta idade (GUIMARAES *et al*, 2013).

As diferenças regionais das taxas de mortalidade por câncer de cólon/reto têm sido cada vez mais apontadas, visto que atestam a contribuição de hábitos culturais e alimentares, bem como diferenças socioeconômicas e de estilo de vida para essa heterogeneidade. As regiões Sul e Sudeste, em comparação com as demais, apresentam, provavelmente, hábitos de vida que poderiam levar a maior risco de desenvolvimento de câncer de cólon/reto, como o baixo consumo de fibras e o alto teor de lipídios na dieta, ingestão elevada de álcool e prevalências mais altas de tabagismo (HABR-GAMA, 2005; CAPELLANI et al, 2013; INCA, 2014).

1.2 Etiologia e aspectos patológicos do Câncer Colorretal

A etiologia do CCR é resultado da interação complexa e ainda não completamente elucidada de fatores genéticos e ambientais. O maior conhecimento que se tem hoje trata do conceito de que o seu desenvolvimento do é fruto do acúmulo de uma série de mutações genéticas aleatórias em um determinado clone de células epiteliais somáticas ou germinativas do cólon ou reto, conferindo-lhe uma capacidade proliferativa superior. Mais especificamente, as células intestinais perdem a capacidade de resposta aos determinantes inter e intracelulares de divisão, diferenciação e morte celular, conforme proposto no primeiro modelo de evolução molecular do CCR por Fearon e Vogelstein (1990). Clinicamente, porém, é possível identificar três principais etiologias distintas do CCR: a esporádica, a familiar e a hereditária.

A) **Esporádica:** acomete cerca de 70% de todos os CCR e é resultado do acúmulo de mutações gênicas e/ou anomalias cromossômicas (*HISAMUDDIN et al, 2006*). Esta forma de CCR pode resultar da ativação de oncogenes como K-ras e BRAF, à inativação dos genes supressores tumorais como p53 e APC (do inglês: *adenomatous polyposis coli*) ou dos genes de reparo, principalmente mutL homolog 1 (MLH1) e mutS homolog 2 (MSH2) (*TANAKA et al, 2006*). Não possui associação com história familiar, síndrome genética ou doença inflamatória intestinal.

B) **Familiar:** É responsável por cerca de 20% dos casos de CCR. Isto significa dizer que eles ocorrem em indivíduos com história familiar de CCR, mas na

ausência de qualquer forma de síndrome ou doença intestinal específica, como a Doença de Chron ou a retocolite ulcerativa. Em 4/5 dos casos estes pacientes têm um parente de primeiro grau afetado, mas, mesmo assim, não são considerados hereditários (BUTTERWORTH et al, 2006; JASPERSON et al, 2010)

C) **Hereditária:** Responde pelos demais casos de CCR. É representada pela polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês *familial adenomatous polyposis*), que é a proliferação do epitélio do intestino grosso, sendo transmitida como traço autossômico dominante, e pelos casos de câncer de cólon associados com síndromes não polipose, que incluem a síndrome Lynch. (GALA et al, 2011).

De uma maneira geral, o CCR é resultado de um processo de modificações moleculares e estruturais em cascata, no qual o epitélio colônico normal se modifica, adquirindo a forma dos pólipos, que contêm as alterações celulares precursoras do CCR. Portanto, o desenvolvimento da neoplasia do cólon segue uma progressão clara, atribuída à transformação do epitélio normal da mucosa do cólon a pólipos adenomatosos e, por último, ao câncer invasivo (DE LA CHAPELLE et al, 2004; PALOZZA et al, 2009).

A maioria dos tumores colorretais origina-se de pólipos adenomatosos. O adenoma ou pólio adenomatoso tem papel fundamental no desenvolvimento do câncer, sendo reconhecido como sua única lesão precursora (BRASIL, 2011). Inicialmente estes pólipos são neoplasias benignas, mas com o tempo podem sofrer processo de malignização.

Os pólipos adenomatosos podem ser classificados de acordo com sua vilosidade e tubularidade. O mais prevalente é o adenoma tubular, o qual possui baixo risco de se tornar um carcinoma invasivo. Os adenomas vilosos, por sua vez, apresentam maior risco de desenvolver displasias de alto grau, enquanto, os adenomas túbulo-vilosos estão em uma faixa de risco intermediária (NAKAGAWA *et al*, 2004). Além destas características, o tamanho, o grau de displasia e a estrutura das vilosidades também estão associados com aumento do risco de malignidade.

A mais forte evidência de que os pólipos adenomatosos originam o câncer colorretal provém do estudo do “National Polyp Study” (NPS), conduzido nos Estados Unidos. Nesse estudo, 1418 pacientes foram submetidos à colonoscopia e tiveram todos os pólipos encontrados removidos, tendo um total de 3371 pólipos ao todo analisados. Os pacientes foram acompanhados por um período de seis anos, ao final do qual se observou uma redução de 76 a 90% na incidência do CCR em relação a três outras populações (O'BRIEN *et al*, 1990).

Além deste fator de risco, muitos outros já foram relacionados à incidência do CCR. Em relação à dieta, baixo consumo de fibras e elevado consumo de carne vermelha estão diretamente relacionados com maior incidência do CCR (PARK *et al*, 2005; BORDONARO *et al*, 2008). Inatividade física e obesidade (SAMAD *et al*, 2005; DONOHOER *et al*, 2010) também foram associados a um aumento significativo no risco de CRC, e uma associação mais fraca entre tabagismo e câncer retal (DIERGAARDE *et al*, 2003). Elevada ingestão de álcool também está entre os fatores de risco estabelecidos para CCR (CHO *et al*, 2004). Por outro lado, a utilização de aspirina e de outros anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) (BURN *et al*, 2008) bem como terapias de reposição

hormonal foram qualificadas como protetores em estudos de base populacional (BRÄNDSTEDT et al, 2014).

Os cânceres de cólon e reto são geralmente combinados em estatísticas de câncer, embora sejam entidades clínico-patológicas distintas (LIE LAI, 2009). A distribuição do CCR ao longo do intestino grosso apresenta uma predominância pelos segmentos distais (GÓMEZ et al, 2004), apresentando cerca de 40% de casos no cólon proximal (ceco, ascendente e cólon transversos), 30% no cólon distal (descendente e sigmoide cólon), e 30% no reto (HOWLADER et al 2015).

Importante notar também que as células neoplásicas do CCR primário apresentam potencial metastático para órgãos distantes através do sangue ou da circulação linfática, sendo que o fígado é o órgão-alvo preferencial para a alocação destas células. Aproximadamente 20% dos pacientes têm metástase hepática detectável no momento do diagnóstico (metástase sincrônica) e cerca de 35% desenvolverão metástase nos 5 anos seguintes após a cirurgia do tumor primário (metástase metacrônica). (ANWAR et al, 2011).

1.3 Estadiamento e tratamento do câncer colorretal

Desde a proposição da sequência adenoma-carcinoma, a sua progressão de eventos tem sido intensamente estudada no intuito de definir variáveis clínicas e marcadores moleculares com valor não apenas diagnóstico, mas também prognóstico e que possam permitir estratificar grupos de alto e baixo risco e, então, determinar a terapia mais adequada para cada paciente (CHEN et al, 2012).

O estadiamento é um conjunto de normas sob a forma de escala ou sistema usado para classificar o câncer de acordo preceitos universalmente aceitos. O seu objetivo é o de identificar a extensão loco-regional da lesão primária e a sua extensão à distância, para a escolha da melhor opção de tratamento (CORDEIRO et al, 2001).

Neste contexto, os sistemas de estadiamento do CCR não apenas permitem delinear a abordagem terapêutica, como permitem avaliar seus resultados e estimar o seu prognóstico, levando em consideração, além das informações sobre a extensão da doença, os seus aspectos anatomopatológicos (EDGE et al, 2010).

Dois principais sistemas de classificação diferentes são utilizados para fornecer informações de prognóstico e determinar estratégia de tratamento no CRC. O sistema de classificação Dukes de 1932 (DUKES, 1932; GREEN et al, 2002) e a escala TNM (tumor, linfonodos, metástases), criada e mantida pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). A escala de Dukes descreve três estádios: estágio A (tumor limitado á parede do intestino); estágio B

(disseminação do tumor por continuidade direta) e estágio C (envolvimento de linfonodos). Esta classificação foi posteriormente modificada por Astler-Coller, que subdividiu os 24 estádios Dukes B e C, em três partes.

Já o estadiamento de acordo com a classificação TNM, leva em consideração o tamanho do tumor (T), o envolvimento dos linfonodos (N) e a presença de metástases (M). O estadiamento pela escala TNM é usado em muitos tumores sólidos e foi adaptado para CCR e atualmente encontra-se na 7ª edição a partir do ano de 2010. Em linhas gerais, os três parâmetros da escala TNM devem ser avaliados através de exame físico, diagnóstico por imagem, endoscopia e/ou exploração cirúrgica. Os estágios são descritos em numerais romanos, como descrito na tabela 1 (I, II, III, IV) (SOBIN et al, 2002; COMPTON et al, 2004; ALTERI et al, 2011)

T Tumor Primário	TX O tumor primário não pode ser avaliado T0 Não há evidência de tumor primário Tis Carcinoma <i>in situ</i> : intra-epitelial ou invasão da lâmina própria T1 Tumor que invade a submucosa T2 Tumor que invade a muscular própria T3 Tumor que invade além da muscular própria, alcançando a subserosa ou os tecidos peri-cólicos ou peri-retais, não peritonizados T4 Tumor que invade diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou que perfura o peritônio visceral
N Linfonodos Regionais	NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais N1 Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais N2 Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais
M Metástases à Distância	MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada M0 Ausência de metástase à distância M1 Metástase à distância

Tabela 1: Classificação clínica dos carcinomas colorretais de acordo com a escala TNM. Adaptado de Classificação de tumores malignos. INCA, 2014.

A avaliação histopatológica proverá ainda dados sobre os graus de diferenciação celular e a presença de invasão linfática e/ou perineural. A presença de invasão venosa e linfática pelo tumor já foi demonstrada como um fator adverso independente no prognóstico do CCR (LANGLEY et al, 2007; ZLOBEC et al, 2008). Além disto, já foi demonstrado que a presença de infiltração linfática relaciona-se com tumores com maior infiltração na parede e, também, potencial metastático (LONGATTO-FILHO et al, 2008).

GX	O grau de diferenciação não pode ser avaliado
G1	Bem diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pouco diferenciado
G4	Indiferenciado

Tabela 3: Classificação histopatológica do CCR. Adaptado de Classificação de tumores malignos. INCA, 2014

A seleção do tratamento deverá ser adequada ao estadiamento clínico da doença, capacidade funcional, condições clínicas e preferência do doente. Quando diagnosticado precocemente, a possibilidade de curabilidade terapêutica do CCR aumenta significativamente. Seu tratamento consiste, basicamente, na cirurgia - envolvendo a ressecção cirúrgica por via aberta do

tumor primário e dos linfonodos regionais-, quimioterapia – em regimes adjuvantes e neoadjuvante - e radioterapia (*JASS et al, 2008*).

A quimioterapia antineoplásica consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou combinadas, que atuam sob diferentes mecanismos de ação: agredindo o DNA tumoral, inibindo processos metabólicos essenciais, impedindo a sua vascularização, entre outros. Os esquemas aplicados podem ocorrer de forma adjuvante (realizada posteriormente ao tratamento principal, que pode ser cirúrgico ou radioterápico) e; neoadjuvante (administrada previamente ao tratamento principal). (*BRASIL, 2011*).

Os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de CRC induzem diferentes tipos de danos tanto ao DNA como ao metabolismo celular. O 5-Fluoracil (5-FU), base de todos os esquemas quimioterápicos utilizados no tratamento do CCR, é um análogo de pirimidina cuja principal função consiste em inibir a atividade da enzima timidilato sintase, embora possa também ser incorporado aos DNA, levando à inibição da sua síntese e à formação de quebras simples e duplas na sua estrutura (*MATUO et al, 2010*). A Oxaliplatina, por sua vez, utilizada juntamente com o 5-FU e a leucovorina no esquema denominado FOLFOX, é um agente platinado que forma ligações intra- e intercadeia com o DNA que, também irão induzir quebras simples e duplas (*FAIVRE et al, 2003*). No esquema denominado FOLFIRI, que inclui 5-FU, oxaliplatina e irinotecano e é utilizado no tratamento do CCR avançado, este é classificado como um análogo sintético da camptotecina, o qual atua como inibidor topoisomerase I, impedindo a replicação e a transcrição do DNA (*ZHUANG et al, 2010; ILLUM, 2011*).

Recomenda-se que o início do tratamento adjuvante deve ocorrer entre 4 e 6 semanas após à cirurgia (BRASIL, 2011), sendo que a cada 4 semanas de atraso, a sobrevida reduz em 14% (BIAZI *et al*, 2011). Já a quimioterapia neoadjuvante associada à radioterapia está indicada principalmente para pacientes com câncer de reto do estágio II em diante. Utilizada principalmente no câncer do reto, a irradiação na pelve pode ser usada antes da cirurgia para diminuir o tamanho do tumor; após a cirurgia, para prevenir a recidiva local ou, ainda, no tratamento da recidiva pélvica (LATKAUSKAS *et al*, 2011).

Em casos de câncer colorretal recidivado inoperável ou com doença em estágio IV ao diagnóstico, é indicada a quimioterapia paliativa. Neste caso, os esquemas irão incluir, basicamente, o 5-FU, associado ou não a oxaliplatina, além do irinotecano, mitomicina C, bevacizumabe, cetuximabe ou panitumumabe (BRASIL, 2011). Estes dois últimos, bloqueadores de EGFR (receptor do crescimento epidérmico), são limitados aos pacientes com que apresentem expressão do gene KRAS não mutado, já que aqueles pacientes que apresentam mutação neste gene KRAS não apresentam melhores desfechos após esta terapia (PETRELLI *et al*, 2011).

1.4 Aspectos histológicos e seu valor prognóstico no câncer colorretal

O fator prognóstico é uma característica (clínica ou histológica) ou ainda um marcador (proteico ou molecular) que pode racionalizar a predição sobre a evolução de doença. Inúmeras são as variáveis consideradas na avaliação prognóstica dos adenocarcinomas colorretais. Diversos estudos demonstraram vários fatores que estão associados a um melhor ou pior prognóstico do CCR, considerando principalmente a sobrevida global e a sobrevida livre de doença dos pacientes.

Estudos (CLODOALDO et al, 2004; ANTIÉ et al, 2008) já relataram que a profundidade da invasão das lesões na parede intestinal, a ocorrência de invasão linfática da cadeia regional do cólon, o grau de diferenciação celular do tumor e a presença de invasão de vasos sanguíneos por células neoplásicas são fatores determinantes no prognóstico do CCR. Sua presença está fortemente relacionada com redução da sobrevida em 5 anos.

Outros autores (SHEN et al, 2009) consideraram ainda que esta redução da sobrevida está associada ao tamanho do segmento ressecado, à idade dos pacientes e à localização do tumor embora para o primeiro destes parâmetros haja controvérsias (MATSUDA et al, 2009). Ainda, desde 1982 há estudos que vêm analisando quais determinantes clínico-patológicos mais significativos no resultado do tratamento destas neoplasias são aqueles vistos no estadiamento patológico, ou seja, o grau de penetração na parede intestinal e a ocorrência de metástases linfáticas. (EISENBERG et al, 1982; STEINBERG et al, 1986; WEITZ et al, 2005).

No que diz respeito à localização da lesão primária, a literatura mostra um resultado conflitante. Existem diversos relatos de que o carcinoma do reto apresenta um pior prognóstico quando comparado aos tumores de cólon (WEITZ et al, 2005). Se tratados como entidades patológicas distintas, pode-se inferir que os tumores de reto realmente trazem maior dificuldade na obtenção de margens mais amplas e confiáveis, seja pelas diferenças biológicas, seja pelas condições complexas de intervenção cirúrgica na pelve (ANDEREGGEN et al, 2006).

Considerando o grau de diferenciação histológica, a literatura demonstra claramente a sua importância prognóstica. O grau de diferenciação histológica foi relacionado à presença de invasão linfática, à profundidade da invasão tumoral na parede intestinal, à fixação a estruturas adjacentes e ao número de linfonodos envolvidos (YING et al, 2009) Um estudo com 136 pacientes portadores de CCR, demonstrou que o grau de diferenciação celular apresentava importante relação com a chance de metástase linfonodal (DERWING et al, 2008) Outro estudo Shen e colaboradores (2009) correlacionaram o número de óbitos com tumores pouco diferenciados. Provavelmente, o grau de diferenciação histológica seja uma das variáveis com maior influência na sobrevida em cinco anos dos pacientes com CCR. Neste contexto de avaliação histológica, os tumores mucinosos também são considerados de pior prognóstico (CONSORTI et al, 2000).

A ocorrência de invasão vascular, principalmente invasão venosa, foi amplamente demonstrada em tumores malignos de cólon e reto e frequentemente correlacionada com pior prognóstico através da redução da

sobrevida global e da presença de metástases e recidivas neoplásicas (ISHIBASHI et al, 2007; SHEN et al, 2009).

A ocorrência de metástases hepáticas como desfecho de pior prognóstico também está relacionada com a presença de invasão vascular adjacentes ao tumor primário. Além disto, pacientes que apresentaram maior profundidade na invasão vascular estiveram associados a prognósticos ainda mais desfavoráveis (ISHIBASHI et al, 2007; DERWING et al, 2008). Ainda, há relatos de um aumento na recidiva e no surgimento de metástases hepáticas em pacientes que apresentavam invasão vascular peritumoral, o que reflete um potencial impacto desfavorável na sobrevida dos pacientes (SHIROUZU et al, 1991; ISHIBASHI et al, 2007; LEGOLVAN et al, 2010).

1.5 Etiologia molecular do Câncer Colorretal

A carcinogênese, de um modo geral, é um processo composto por múltiplas etapas, envolvendo fatores genéticos e epigenéticos adquiridos ou herdados, bem como alterações celulares e morfológicas. Didaticamente, o processo carcinogênico pode ser dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão (HANAHAHAN E WEINBERG, 2011). A genética molecular dos carcinomas colorretais é a melhor compreendida dentre as neoplasias humanas.

No caso dos tumores colorretais, 95% são adenocarcinomas (ou seja, de origem e características glandulares e epiteliais). Estes tumores partem inicialmente de um adenoma formado a partir de pólipos, que são lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso (HANAHAHAN E WEINBERG, 2000). Normalmente, para o epitélio colorretal normal sofrendo mudanças moleculares evoluir para carcinoma demanda um período entre 10 e 20 anos (TANAKA et al, 2010).

Os mecanismos moleculares que estão por trás do desenvolvimento das neoplasias colorretais são clinicamente importantes porque eles estão relacionados com o prognóstico e resposta aos tratamentos (SADANANDAM et al, 2013).

O CCR esporádico origina-se através de múltiplas interações moleculares consecutivas, as quais alteram o genótipo e o fenótipo de uma célula normal até sua transformação em uma célula neoplásica (PEREA et al, 2011). O modelo de sequência adenoma-carcinoma, proposto por Fearon & Vogelstein em 1990 (FEARON, 2011), ainda é amplamente aceito como a provável sequência de

eventos do desenvolvimento do câncer colorretal esporádico, a qual apresenta alterações fenotípicas identificáveis, iniciando-se por proliferação epitelial com a formação de adenomas, os quais passam a apresentar alterações cada vez mais atípicas até o surgimento de células ou clones celulares neoplásicos (KINZLER & VOGELSTEIN, 1996).

A sequência de eventos moleculares que ocorre desde uma célula normal da mucosa colorretal até surgimento do carcinoma pode ocorrer através de dois modelos: (1) a via do APC/ β catenina e (2) a via da instabilidade de microssatélites (MSI) (FEARON & VOGELSTEIN 1990; KNUDSON, 2001; PEREA et al, 2011).

A via Wnt/ β -catenina foi a primeira associada com o desenvolvimento do CCR, sendo encontrada permanentemente ativada em pacientes com polipose adenomatosa familiar, mas também surgindo da mesma forma em CCR esporádicos, sendo que nestes esta via apresentará mutações em pelo menos um de seus componentes em cerca de 90% dos casos (MORÁN et al, 2010) Essa ativação é considerada o evento inicial para a carcinogênese colorretal, fazendo com que as células do epitélio intestinal ganhem capacidade proliferativa acima do normal, resultando nos pólipos adenomatosos.

Segundo este o modelo, os genes que são mutados nos estágios iniciais do câncer de cólon são o APC (gene da adenomatose poliposa do cólon), durante a transição epitélio normal para adenoma; o KRAS (do inglês: *Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homologue*), e genes supressores de tumor nos cromossomos 18q (*DCC*, *SMAD2*, *SMAD4*) e 17q (*p53*) na fase de adenomas e carcinoma (LESLIE et al, 2003; NAMBIAR et al, 2010). No entanto, como o número de modificações tanto em oncogenes e genes supressores tumorais é

muito elevado, acredita-se na possibilidade de combinação destes eventos moleculares.

Além disto, os tumores gerados através desta via são caracterizados por apresentarem instabilidade cromossômica (CIN) com frequentes anomalias citogenéticas e perdas alélicas.

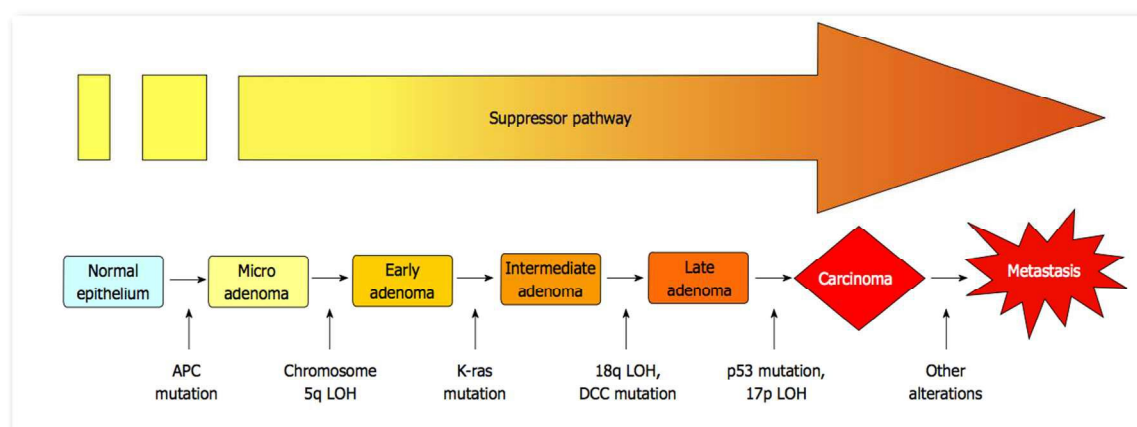


Figura: Alterações moleculares na via supressora tumoral e sequência adenoma-carcinoma no epitélio colorretal. (LOH: Perda de heterozigosidade, do inglês: loss of heterozygosity) (Adaptado de MORÁN et al, 2010)

Por outro lado, a via da instabilidade de microssatélites é caracterizada por mutações ou modificações epigenéticas em genes do reparo de malpareamento (*Mismatch repair* – MMR) e está envolvida em cerca de 10% a 15% dos casos esporádicos de adenocarcinoma colorretal, a maioria das mutações envolvendo os genes MSH2 e MLH1 (GRADY, 2004; PEREA et al. 2011). A característica desta via é a instabilidade de microssatélites (IMS) difundida pelo genoma.

Estudos dos 15% dos CCR esporádicos com instabilidade de

microsatélites atestam que estes tumores são fruto da inativação somática de genes da via do MMR. Isto significa dizer que embora mutações somáticas ocasionais de *hMSH2* e *hMLH1* possam ocorrer, o mecanismo predominante que inativa esta via é o silenciamento epigenético do promotor de *hMLH1* (ISHIKUBO et al., 2004).

As diferenças moleculares resultantes da inativação do MMR geram tumores com características clínicas diferenciadas. Tumores com alta instabilidade de microsatélites, são mais prevalentes no cólon proximal, são menos diferenciados, mucinosos e com infiltração linfocitária, diferentemente dos tumores com baixa instabilidade de microsatélites, conferindo aos pacientes pior prognóstico e menor sobrevida. (revisado em RAUT et al, 2004; BUCKOVITZ et al, 2005; GREENSON et al, 2009).

1.5.1 Via APC/ β catenina

A via de sinalização Wnt participa da regulação de uma grande variedade de processos fisiológicos em diferentes espécies de animais, tendo um papel crucial no desenvolvimento embrionário (KLAUS; BIRCHMEIER, 2008). Nos seres humanos, existem 19 membros conhecidos dessa família, os quais desempenham papéis essenciais na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (GILES et al, 2003; MacDONALD et al, 2009). Ela pode ser classificada em dois tipos: canônica (dependente de B-catenina) e não canônica (independente da B-catenina). A via canônica é mais relacionada com o desenvolvimento do CCR (NAJDI et al, 2011)

Mutações no gene APC são responsáveis pela PAF (Polipose adenomatosa familiar) e pela maioria dos CCR esporádicos. Tanto APC como

a β -catenina são considerados os primeiros alvos de mutação relacionados com a carcinogênese colorretal. A disfunção na qualidade final destas proteínas é capaz de induzir a desorganização do citoesqueleto, apoptose, perda do controle do ciclo celular e da adesão celular (TANAKA et al, 2011).

Normalmente, cada indivíduo tem duas cópias funcionais do APC em todas as células. Assim, a perda de função do gene APC nas células epiteliais do cólon, pela mutação germinativa de um alelo do gene seguida pela perda do outro por mutação somática, é uma etapa genética precoce e crítica no desenvolvimento da neoplasia colorretal (PITERS et al., 2008).

A proteína APC é o principal fator de sinalização da via Wnt, a qual regula a ligação e a degradação da β -catenina pelo proteossoma. Ela desempenha funções que englobam adesão e migração celular, bem como participa na supressão tumoral uma vez que está presente em processos fisiológicos desde o crescimento celular a apoptose. Por sua vez, a β -catenina, normalmente conjugada com a e-caderina, é uma proteína que faz parte de um complexo de adesão intercelular e em altas concentrações, ativa o programa de proliferação celular, pois se liga a fatores de crescimento tumoral (BARKER et al, 2008).

Fisiologicamente, a proteína APC liga-se ao complexo axina/ β -catenina/GSK3 β (Do inglês: *Glycogen Synthase Kinase 3-Beta*) que leva à fosforilação da β -catenina e promove a degradação do proteossoma que contém a β -catenina fosforilada, prevenindo assim a sua migração para o núcleo. Porém, em condições patológicas, a ativação da via sinalizadora Wnt irá ocorrer quando o gene da APC ou o codificador da β -catenina (CTNBB1) estiverem mutados. Diante da impossibilidade de degradação β -catenina através da formação do complexo multiproteico e de seu acúmulo no citoplasma, a APC

transloca-se para o núcleo e se liga ao promotor TCF-LEF (do inglês, *T-cell specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor-1*) ativando a transcrição de diversos genes incluindo o c-myc, um proto-oncogene, e a ciclina D1, promotora da proliferação celular (FODDE et al, 2001). Desta forma, APC é considerada como um regulador negativo de β -catenina e a via Wnt. (KUMAR, et al, 2010; JUHN & KHACHEMOUNE, 2010).

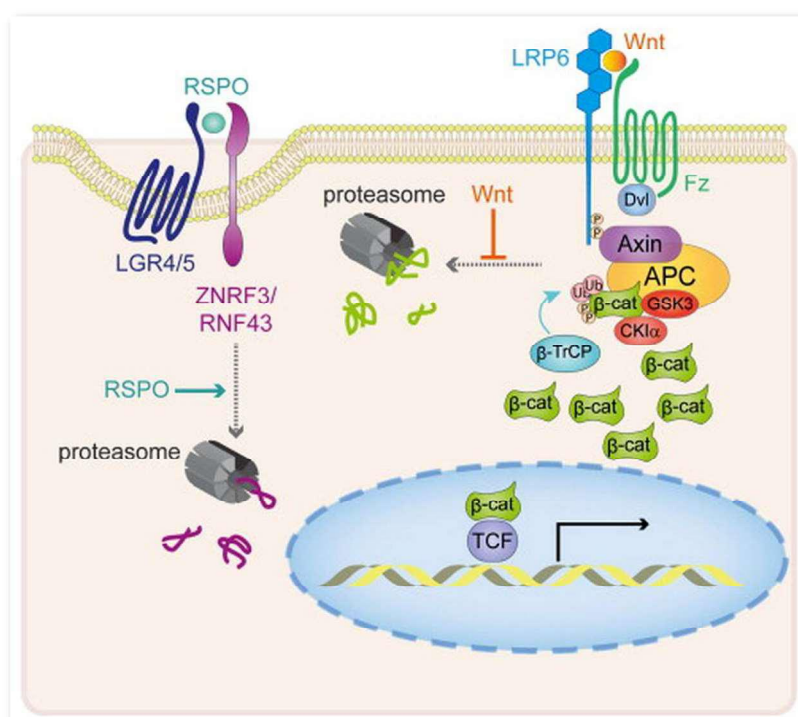


Figura: Via Wnt canônica ou clássica. Na ausência da sinalização Wnt, a proteína APC auxilia na fosforilação da β -catenina que seguirá a via de degradação pelo proteassoma. Porém, diante da mutação em APC, a β -catenina se acumula no citoplasma e conjuga-se com o fator de transcrição TCF no núcleo, favorecendo a proliferação celular. (KRAUSOVA et al, 2014)

1.6 Sistema de reparo do DNA

Apesar de considerável estabilidade química da molécula de DNA, sabe-se que a dinamicidade da molécula sofre com a exposição constante a diversos agentes, podendo adquirir uma variedade de lesões na sua estrutura (FRIEDBERG, 2006). Estas lesões podem afetar mecanismos celulares essenciais como a replicação do DNA e sua transcrição em RNA. Como o DNA é o maior alvo de agentes genotóxicos, estas alterações podem resultar em disfunções celulares, como instabilidade genética, mutagênese ou morte celular (apoptose ou necrose). (HELLEDEY et al, 2008; MORAES et al, 2012).

Agentes mutagênicos exógenos e endógenos têm a capacidade de interferir nos genomas de todas as células vivas, resultando na produção danos às bases do DNA (COLLINS et al, 2012). Estas bases danificadas – que podem ser citotóxicas e/ou levarem à codificação errônea- são sabidas serem grande fonte de intermediários na carcinogênese (HELLEDAY et al, 2008) Além disto, durante o metabolismo normal da molécula de DNA podem ocorrer alterações espontâneas na sua estrutura que comprometam o seu bom funcionamento, como por exemplo, desemparelhamento de bases.

Especificamente, as lesões espontâneas são fruto da instabilidade intrínseca das ligações químicas dos nucleotídeos e sua suscetibilidade às variações do microambiente ao seu redor, como os produtos do metabolismo celular, como as espécies reativas de oxigênio na sua quase totalidade. Neste contexto, ainda existem as lesões ambientais, que são aquelas que resultam da interação entre o DNA com diferente agentes físicos e químicos inseridos de forma exógena (CURTIN, 2012).

Uma vez alterado o DNA, as células acionam um complexo mecanismo de reparo que garante a integridade do genoma através de diversos mecanismos, específicos para cada tipo de lesão reconhecida. O objetivo final deste sistema, composto por centenas de genes e proteínas diferentes é o de manter a integridade da dupla fita do DNA e impedir a transmissão do dano às células filhas, após a replicação do material genético.

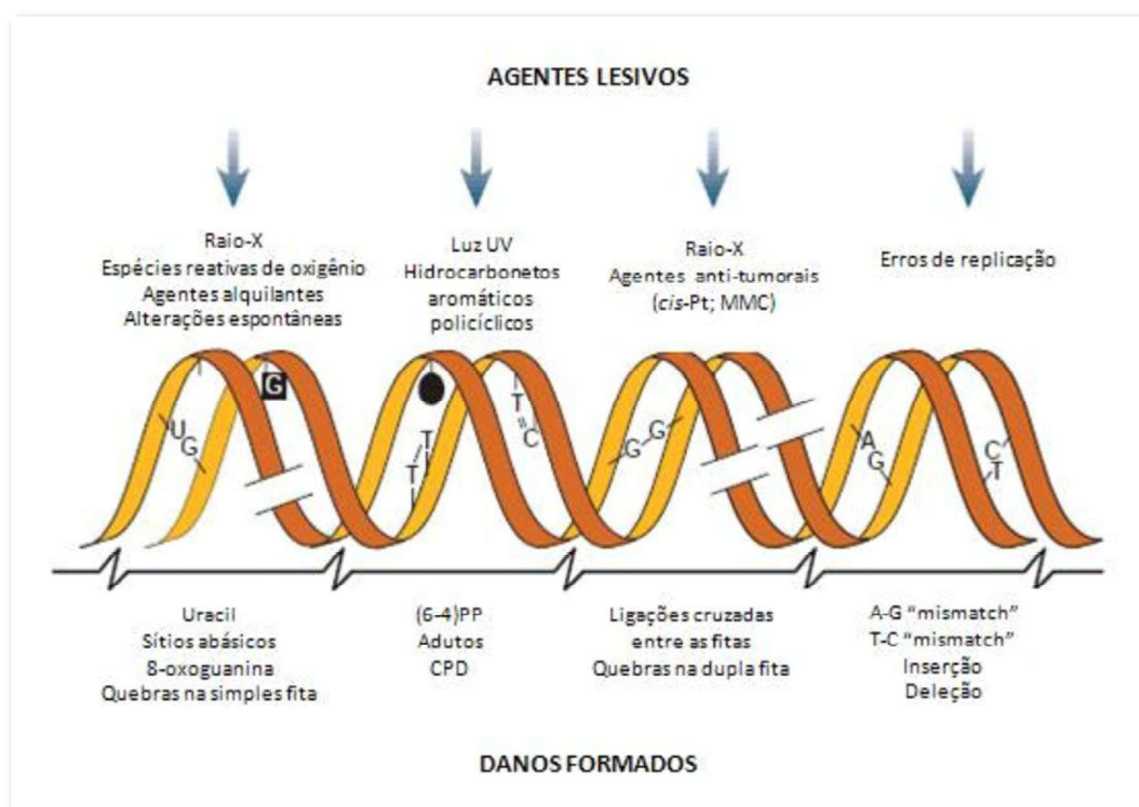


Figura 4: Esquema dos principais agentes que podem danificar o DNA e os tipos de lesões induzidas. Abreviações: cis-Pt (cisplatina); MMC (mitomicina-C); 6-4(PP) (6-4 fotoprodutos); CPD (dímeros de pirimidina). Adaptada de (HOEIJMAKERS, 2001).

Existem diversas vias de reparo de DNA, com diferentes enzimas que atuam em distintos tipos de lesões, basicamente com o intuito de reconhecer a

lesão, processá-la e restabelecer a estrutura do DNA. Apesar da proteção que estes mecanismos oferecem, alguns danos escapam ao reparo e causam erros tanto na replicação e transcrição, promovendo mutagênese, morte celular, envelhecimento e, obviamente, câncer.

Os mecanismos de reparo do DNA são divididos em diretos e indiretos. O primeiro caracteriza um processo de reparação catalisado por uma única enzima, que reconhece e reverte o dano em um único passo, representado pela a metilguanina-metiltransferase (MGMT), que repara alquilações endógenas ou induzidas por agentes externos e, finalmente, o reparo de dímeros de pirimidina, catalisados pela fotoliase (MICHAILDI et al, 2012). MGMT possui uma atenção especial pelo seu potencial envolvimento na resistência de tumores a quimioterápicos (KAINA et al., 2010).

Esta proteína atua transferindo um grupamento alquil do oxigênio do DNA para o resíduo de cisteína no seu núcleo catalítico, gerando a sua própria inativação. Funciona de forma estequiométrica, ou seja, cada molécula da proteína remove apenas um grupo alquil e logo perde sua função. Em seguida à inativação, ela é ubiquitinada e degradada pelo proteassoma (CHRISTMANN et al., 2011).

Por outro lado, no caso do reparo indireto, são utilizadas diversas proteínas com funções de reconhecimento da lesão, incisão na fita de DNA, remoção da lesão, síntese do novo segmento e restauração da integridade do DNA. Estas proteínas atuam de forma sequencial. Os mecanismos indiretos são divididos em três grandes grupos: o reparo por excisão, que inclui as vias de reparo por excisão de bases (BER), o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), e o reparo recombinacional, incluindo o reparo por recombinação homóloga (HR)

e o reparo por junções não-homólogas (NHEJ) (FRIEDBERG et al., 2006). Existe ainda a possibilidade que um dano persista no genoma, sendo tolerado por mecanismos nos quais a maquinaria de replicação é capaz de utilizar o DNA lesado como molde (síntese translesão) (SALE et al, 2012), assim como a via de Fanconi (FA, do inglês: *Fanconi Anemia Pathway*) que atua em processos de sinalização e reparação de danos no DNA, especialmente danos do tipo pontes intercadeias no DNA (ICL, do inglês *interstrand crosslinks*) (KIM & D'ANDREA, 2012).

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (do inglês: *Nucleotide Excision Repair*) é um dos mais importantes processos no reparo de lesões no DNA. Sua principal função é reparar lesões que causam distorção na dupla-hélice do DNA geradas, principalmente, por agentes exógenos. Dímeros de pirimidina ciclo butano (CPD) e 6-4 fotoprodutos (6-4 PP) são lesões mais frequentes induzidas por luz UV. Adutos de DNA, como os gerados pela formação de ligações covalentes entre as bases de DNA e hidrocarbonetos benzopireno), também pode ser reparados por essa via (BENHAMOU & SARASIN, 2000).

Esta via envolve cerca de 30 proteínas que atuam em um processo sequencial da seguinte forma: reconhecendo da lesão; abrindo a dupla hélice; incisando nos pontos extremos da lesão; sintetizando a nova fita de DNA utilizando como molde a fita não danificada; e finalizando o processo através da ligação da porção 5' da nova fita sintetizada à sequência original (DE BOER & HOEIJMAKERS, 2000). Além disto, ela apresenta duas sub-vias: o reparo por excisão de nucleotídeos genômico global (GGR, do inglês: *Global Genome Repair*) e o reparo por excisão de nucleotídeos acoplado à transcrição (TCR, do

inglês: *Transcription Coupled Repair*). A diferença entre as sub-vias se dá apenas no passo em que o dano é reconhecido. Porém, o TCR é o mais demandado e o que ocorre em uma velocidade maior, já que acontece em genes que estão sendo ativamente transcritos (BENHAMOU & SARASIN, 2000).

A via BER - que será tratada com maiores detalhes adiante – atua sobre lesões como bases oxidadas ou reduzidas, pequenos adutos e lesões produzidas por agentes alquilantes. A base danificada é removida por enzimas DNA glicosilases base-específicas, como a enzima OGG1, que remove a guanina modificada 8-oxoG, causada por espécies reativas de oxigênio. A remoção da base danificada gera um sitio abásico, que irá ser restaurado por endonuclease. Após, uma polimerase fará a síntese do DNA usando a outra fita como molde e a fita será ligada por DNA ligase (DALHUS et al, 2009).

O reparo por malpareamento (MMR, do inglês: *Mismatch Repair*) corrige alças de inserção/deleção (IDLs, do inglês: *Insertion/Deletion Loops*) de nucleotídeos e erros de pareamento de bases advindos, especialmente, de erros da replicação. (WU et al, 2004). Em humanos, esta via é a mais estudada no que tange ao CCR, visto que a deficiência em MMR através de mutações e inativações epigenéticas está associada a câncer colorretal hereditário. Os genes envolvidos nesta via incluem MLH1, MSH2, PMS2 e MSH6 (DALHUS et al, 2009). MLH1 e MSH2 são as principais proteínas envolvidas no processo de reparo do DNA (AL-SUKHNI et al, 2008). A MLH1 forma um complexo com a PMS2. O complexo formado por MSH2 e MSH3 reconhece e realinha inserções e deleções de dois a oito nucleotídeos. Ainda, compondo esta via, há a MSH6, sobre a qual se acredita que a proteína MSH6 seja a subunidade responsável por reconhecer os erros (DA SILVA et al.; 2009).

Existem dois caminhos envolvidos no reparo por recombinação, especializado em quebras duplas: recombinação homóloga (HR) (do inglês: *Homologous Recombination*), que assegura um reparo bastante preciso; e junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (do inglês: *Non-Homologous End-Joining*), sujeito a erro (KOBAYASHI et al, 2008). Estas vias são especializadas em reparar quebras duplas (DSBs, do inglês: *Double Strand Breaks*) geradas por vários processos celulares fisiológicos - como erros de replicação - ou por agentes exógenos, como a irradiação ionizante. inibidores de topoisomerasas e bleomicina (LITMAN et al, 2008).

As quebras duplas correspondem ao tipo de lesão mais tóxico para o DNA e quando não reparadas são as responsáveis por deleções, translocações, e fusões entre os cromossomos, levando a aberrações e à instabilidade cromossômica. Diante de uma quebra dupla, é o estágio do ciclo celular que irá determinar o mecanismo de reparo escolhido. Células na fase G1 do ciclo celular reparam as DSBs principalmente por NHEJ , enquanto HR é mais propensa a ocorrer durante as fases S e G2 (GREENBERG, 2008). Tanto a HR como a NHEJ são processos são regulados por muitos passos que apresentam intersecções com as demais vias de reparo do DNA (BURMA et al, 2006).

A HR promove o reparo de DSBs através extensões da fita homóloga como molde para reparar as quebras, sendo considerado, portanto, livre de erros. Os genes centrais na HR são os genes da família RAD52 (RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RDH54/TIDI, RAD55, RAD57, RAD59, MRE11 e XRS2). Poder ter uma fita molde à disposição obviamente favorece a HR, e por isso ela é autorregulada durante as fases S e G2 do ciclo celular, graças à presença de cromátides-irmãs.

Por outro lado, a NHEJ apenas liga as extremidades de uma DSB, sendo, portanto, considerada uma via sujeita a erros, já que pode ocasionar principalmente inserções e deleções que certamente comprometem a integridade do genoma (Chen *et al.*, 2006). O processo é iniciado através do dímero Ku70 e Ku80, que se liga à lesão, sendo precedido, através da sinalização pelas DNA-PKcs, pela ligação do complexo XRCC4-ligase IV. (FELL *et al.*, 2015).

Porém, em alguns momentos como durante a parada da replicação do DNA, não existe um mecanismo específico para fazer o reparo. Neste momento, se a célula não pode reparar uma base ou um nucleotídeo danificado, mal pareado ou mal inserido, existem mecanismos que atuam conferindo tolerância ao dano ou reparação pós-replicativa. A síntese translesão (TLS, do inglês: *translesion synthesis*) é um processo no qual o dano não é diretamente reparado mas, através de um *bypass* da lesão, a replicação prossegue. Neste contexto atuam as polimerases translesão, as quais, diferentemente das polimerases replicativas - altamente eficazes e precisas, porém bloqueadas por lesões que distorcem a dupla hélice – atuam através das lesões, mas com o ônus da maior taxa de erros (STALLONS *et al.*, 2010; LIVNEH *et al.*, 2010).

1.6.1 Reparo por excisão de bases

Modificações de bases no DNA podem ser causadas por fatores exógenos ou endógenos. Sabe-se que processos celulares fisiológicos geram danos no DNA, da mesma natureza, ainda que em maior frequência do que aqueles gerados por fatores ambientais (ALMEIDA et al, 2007).

A maioria destas lesões consiste em desaminações, hidrólises espontâneas das ligações N-glicosídicas (que geram sítios abásicos), metilações e danos causados por espécies reativas do oxigênio e produtos de peroxidação de lipídeos. Importante notar que, os intermediários do BER, como os sítios abásicos, e geram quebras simples são também subsequentemente reparados pelos componentes do BER (CALDECOTT, 2008). Outras, ainda, são oriundas de erros no metabolismo do próprio DNA, também levando à formação de SSBs e DSBs, sendo estas as lesões mais tóxicas que podem haver para as células (TUDEK et al., 2006; OLINSKI et al., 2007).

O mecanismo do BER foi primeiramente descrito em *E. coli* (Revisado em FRIEDBERG et al., 2006), e em seguida outros estudos mostraram que essa via é altamente conservada nos eucariotos, incluindo os mamíferos (HEGDE et al., 2008). Embora esta via seja responsável por reparar a maioria dos danos no DNA celular, o seu real papel na etiologia de uma série de doenças ainda não foi descrita (HEGDE et al., 2008).

Neste contexto, a via do BER atua como um dos processos mais ativos de reparo do DNA tão exposto aos danos endógenos, permitindo o reconhecimento específico da lesão e a excisão de apenas uma base danificada no DNA. Em leveduras e mamíferos, BER é a principal via de remoção de danos

gerados pelo metabolismo normal das células (WALLACE, 2014), sendo também responsável pela remoção de bases danificadas geradas pela exposição a agentes exógenos, como agentes alquilantes, radiação ionizante e luz UV (CHRISTMANN et al, 2003).

O BER é normalmente definido como uma via de reparo iniciada por proteínas denominadas DNA glicosilases e continuada por uma das duas vias: a via curta (do inglês: *short-patch BER*), mecanismo mais comum, em que apenas 1 nucleotídeo é substituído, ou a via longa (do inglês: *long-patch BER*), na qual entre 2 a 13 nucleotídeos são substituídos (PARSONS et al, 2013).

A via curta irá envolver inicialmente o reconhecimento da lesão através de uma glicosilase especializada. Em seguida, se procederá a remoção desta base que apresenta lesão ou mesmo malpareamento. Quando esta base é removida, é criado um sítio abásico (AP ou apurínico/apirimidínico), deixando a estrutura do DNA instável e sujeita a quebras. Neste momento, o sítio AP sofre hidrólise por uma AP endonuclease (APE1), que irá deixar um resíduo terminal 3'-OH e um grupo desoxirribose-fosfato na outra extremidade (5'-dRP). A DNA polimerase β (POL β), através de sua atividade liásica, remove o grupamento dRP e insere um único nucleotídeo no *gap* formado, preparando a fita para a ligação por uma DNA ligase (Lig I ou Lig IIIA/XRCC1) (PARSONS et al, 2013).

A decisão para prosseguir com o mecanismo da via longa ou curta do BER ainda é pouco compreendida, mas sendo cogitada a hipótese de que pode ser determinada pelo intermediário 5'-dRP produzido pela atividade da AP endonuclease (WALLACE, 2014) Outro fator que pode determinar esta escolha é a concentração de ATP próximo ao sítio AP, o que é aparentemente modulado por LIG3 e XRCC1, já que se sabe que a via longa do BER está mais propensa

a ser recrutada em baixas concentrações de ATP (PETERMANN et al., 2003). Neste caso, as polimerases β ou δ/ϵ , associadas à PCNA e várias outras proteínas (como FEN1, PARP1, LigI), realizam a síntese de DNA para o preenchimento do *gap*, resultando em deslocamento de um *flap*, ou seja, 2 a 13 bases da fita anterior. Este fragmento será clivado por uma flap endonuclease (FEN1) e a fita será então religada.

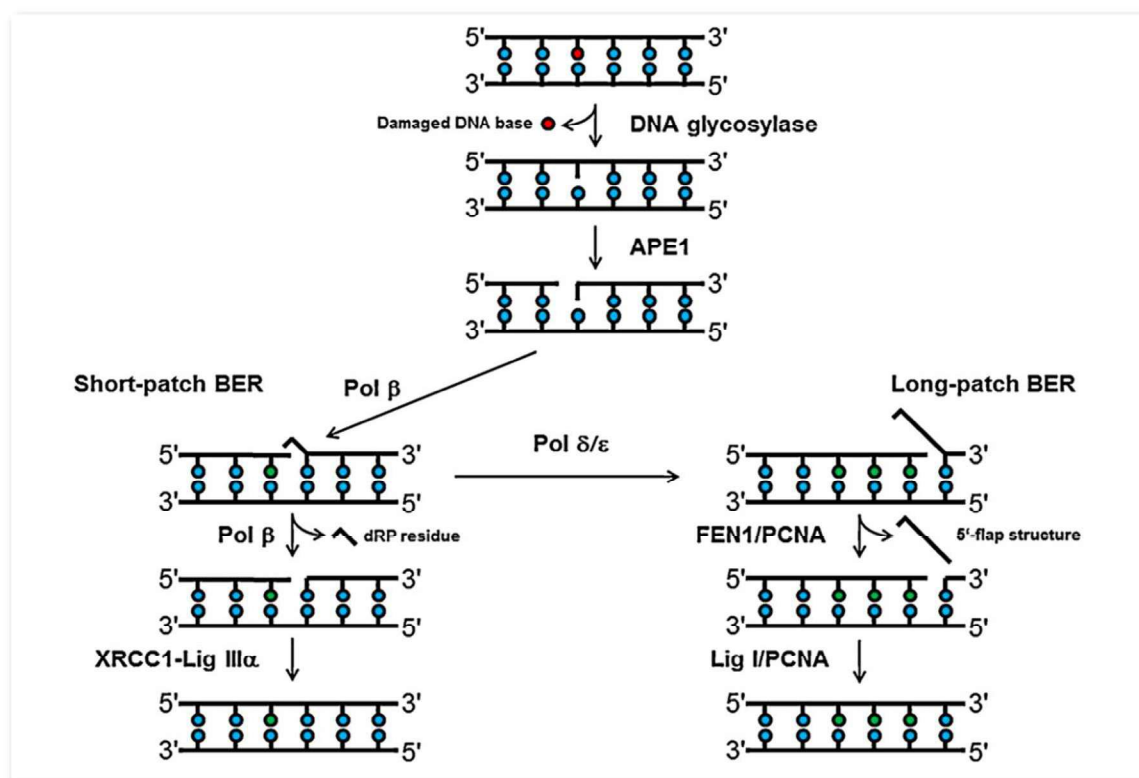


Figura: Representação das vias curta e longa do BER, iniciadas por uma DNA glicosilase, seguida pela incisão da fita por APE1. O processamento do terminal 5' e o preenchimento do *gap* são feitos pela POL β na via curta. A quebra é selada pelo complexo XRCC1/LigIII α . Na via longa, incorporação de nucleotídeos é feita por POL β ou POL δ/ϵ , acompanhada por *flap*, removido através de FEN1 (Adaptado de PARSONS et al, 2013).

Como dito anteriormente, a via BER sempre será iniciada através de uma

DNA glicosilase, que irá reconhecer a lesão ou a modificação da base de forma especializada. Cada glicosilase é específica para um número limitado de bases modificadas. As glicosilases podem ser de dois tipos: (1) monofuncionais, que removem apenas a base modificada deixando um sítio AP; (2) bifuncionais, que além da sua atividade de glicosilase, vão exercer a atividade liase. Outra função das DNA glicosilase é participar do processo que define qual via será processada. Por exemplo, 8-oxo-guanina (8-OxoG) e timina glicol são removidas pela via curta, enquanto que uracila e hipoxantina são removidas tanto pela via curta como pela via longa (FORTINI e DOGLIOTTI, 2007).

A POL β é uma polimerase dependente de molde e está envolvida nas etapas de liase e polimerase do BER, pertencendo à família X das DNA polimerases. Sua atividade envolve a remoção do grupamento dRP (ação de liase) e inserção de uma base através de seu subdomínio de nucleotidil transferase (ação de polimerase). A POL β de mamíferos é descrita como mesma é mutagênica, uma vez que por apresenta erros de substituição de bases, já que não possui atividade endonucleásica – diferentemente das polimerases replicativas. A atividade da POL β é essencial para progressão do BER, principalmente da via curta. Considera-se que a POL β como a principal efetora da etapa de liase no BER (DIANOV et al, 2003; ROBERTSON et al, 2009).

A FEN1, por sua vez, é uma proteína que participa apenas *da via longa de BER*, retirando uma sequência entre 2-10 nucleotídeos que contenha a base danificada, para que ela possa ser ressintetizada. (ZHARKOV, 2008).

A XRCC1 é uma proteína que se liga a regiões de quebra, após a retirada de um sítio AP pela APE1. Esta proteína forma um complexo com a polimerase β e a ativa a ligase III (Zharkov, 2008). XRCC1 também liga-se diretamente ao

DNA clivado e ao DNA clivado ligado à pol β , conferindo-lhe um papel extra de reconhecimento do dano no DNA (ROBERTSON et al, 2009). Além disso, interage com a PARP-1 (poli ADP-ribose polimerase), com a DNA ligase III e com a APE1. Logo, vê-se que a XRCC1 interage com todos os componentes que atuam sobre o DNA abaixo da glicosilase na via BER, tendo uma ação central na coordenação da atividade das outras proteínas desta via (HORTON et al, 2000).

Sua versatilidade é tanta que além de recrutar outras enzimas que farão o reparo da lesão, ainda colabora na remoção de pequenos adutos de cadeia simples resultantes da ação de agentes alquilantes e também aqueles induzidos pela ação da cisplatina, auxiliando na via NHEJ (HORTON et al, 2008). Desta forma, as células que apresentam variações no gene XRCC1 acabam respondendo de forma diferente, geralmente apresentando maior sensibilidade à radiação ionizante e ultravioleta, assim como a agentes oxidantes, metilantes e alquilantes. (FU et al, 2012).

1.6.2 Reparo por excisão de bases e câncer colorretal

A habilidade de manter a integridade do DNA é essencial para evitar o processo neoplásico. Todas as vias de reparo do DNA já foram alvo de estudo no CCR, sendo relacionadas com diversos fatores clínicos e moleculares. porém, sua caracterização - principalmente dentro de um painel molecular - ainda é muito escassa.

A principal fonte de danos ao DNA colônico vem do metabolismo oxidativo e da respiração celular, os quais geram produtos que podem atuar tanto na modificação de bases quanto induzindo quebras simples e duplas na cadeia do DNA (SLUPPHAUG et al., 2003). Portanto, a superprodução de espécies reativas do oxigênio combinada com a insuficiência de mecanismos de defesa aos danos oxidativo é um dos maiores contribuintes para a carcinogênese colorretal (TUDEK et al, 2012).

Além disto, é possível que entre 50.000 a 200.000 sítios AP surjam espontaneamente diariamente em cada uma das células intestinais (SOBOL et al, 2002). Considerando ainda que os principais fatores etiológicos do CCR - elevado consumo de carne vermelha e baixo consumo de fibras, tabagismo e elevado consumo de álcool – são sabidos por estimular não apenas os processos oxidativo como a lipoperoxidação, vê-se o quanto uma via que remova os danos causados é essencial para a estabilidade destas células (SIMONELI et al, 2012).

De acordo com Tudek e colaboradores (2012), pacientes com CCR apresentam maior estresse oxidativo tanto em leucócitos como na urina, assim

como depleção de vitaminas antioxidantes (ácido ascórbico, alfa-tocoferol e retinol, por exemplo) em relação aos pacientes sem esta forma de neoplasia. Além disso, como a depleção destas vitaminas no sangue é gradual e conforme a progressão da doença, sugere-se que o estresse oxidativo aumenta diretamente conforme a sequência adenoma- carcinoma progride.

Uma enzima de reparo dos danos oxidativos ao DNA é a OGG1. As 8oxoG glicosilase é responsável por reconhecer e remover o produto da oxidação da guanina (8-oxoG), considerado um dos mais estáveis. Esta alteração transforma a guanina em uma base de estrutura idêntica à timina, fazendo com que o pareamento com citosina seja substituído por aquele com a adenina. Alguns estudos demonstram um claro aumento dos níveis desta lesão nas células epiteliais e inflamatórias em modelos em animais de desenvolvimento de carcinomas mucinosos do cólon (LIAO et al, 2008) e pacientes, neste caso incluindo o estudo de leucócitos e de biópsias de adenocarcinomas colorretais (TUDEK & SPEINA, 2012).

Este fato é suportado ainda pelo aumento da glicosilase OGG1, responsável pela remoção de 8-oxoGua na urina. Mais do que isto, foi também observado que os níveis de mRNA de OGG1 e APE1 estão elevados nos leucócitos de pacientes com CCR. Isto nos leva a crer que a indução das enzimas de reparo do BER fazem parte de um programa celular carcinogênico, que pode estar protegendo as células tumorais através da manutenção da sua estabilidade genômica e redução da apoptose.

Outra glicosilase essencial é a N-metil purina DNA glicosilase (MPG). Ela atua sobre diversos tipos de substratos, excisando desde lesões inócuas, como

a 7-metiladenina, a lesões tóxicas que são citotóxicas e bloqueiam a replicação, como a 3-metiladenina (CALVO et al, 2013). Poucos trabalhos relacionam esta glicosilase com o CCR, porém parece haver uma associação sobre o aumento da sua expressão no epitélio colônico que se apresenta inflamado, denotando como esta enzima contribui para a instabilidade de microssatélites em pacientes com colite ulcerativa (HOFSETH et al, 2003). Em um modelo animal de inflamação crônica induzida, os animais nocaute para MPG apresentaram lesões mais graves que são precursoras de neoplasia (MEIRA et al, 2008).

Nos últimos 10 anos estudos que envolvem a expressão gênica ou do produto proteico da polimerase beta têm demonstrado frequentemente um aumento nos tumores em comparação ao tecido adjacente saudável (YU et al, 2006). Este aumento da sua expressão fez com que ela fosse, inclusive, considerada como um gene de resistência aos agentes platinados como a oxaliplatina, tendo, portanto, um papel prognóstico no CCR. Iwatsuki e colaboradores (2009), avaliaram 97 pares de tumores colorretais e tecido normal e viram, além de aumento da expressão por imunohistoquímica nos tumores, correlação com presença de linfonodos metastáticos, metástases à distância e estágio TNM mais elevado. Neste mesmo estudo foi demonstrado que a supressão de Pol β em células de câncer colorretal, aumentam sua suscetibilidade à oxaliplatina.

Recentemente, Tiong e colaboradores (2014) consideraram que o par MSH2 (via do MMR) e PolB são dois alvos moleculares que podem induzir morte celular a partir do princípio da letalidade sintética em modelos celulares. Já foi relatado também que o bloqueio da PolB com um agente químico, potencializa a ação da temozolomida tanto em células de CCR MMR proficientes e deficientes

(JAISWAL et al, 2011).

Donigan e colaboradores (2010) afirmaram que a Pol β está mutada em pelo menos 30% dos tumores de um modo geral e em 40% dos tumores de cólon e reto, concluindo que a via do BER deve conduzir o processo tumorigênico neste caso. PolB interage com várias as proteínas da via do BER, incluindo XRCC1, PARP1 e APE1. Quando Pol β está inativa através de mutações gênicas que geram um produto truncado, ela não tem capacidade de preencher o *gap* no sítio AP. Porém, diferentemente do esperado, o recrutamento de XRCC1 e a sua ligação ao sítio AP é ainda mais forte, sugerindo que XRCC1 está diretamente envolvida com a atividade negativa exercida pela PolB truncada – e que isto contribua para a instabilidade genômica (BHATTACHARYYA & BANERJEE, 2001).

A expressão de XRCC1 em tumores colorretais vem sendo alvo de estudo como marcador de quimiossensibilidade às terapias de primeira linha que incluem 5-FU e oxaliplatina em pacientes com CCR em estágio III, porém sem sucesso (HUANG et al, 2013). XRCC1 é muito estudada em termos de polimorfismos, uma vez que a substituição de aminoácidos nas proteínas do reparo do DNA influenciam na sua capacidade de resposta ao dano. Alguns SNPs (do inglês: *single nucleotide polymorphisms*) do gene XRCC1 já foram reportados resultados muito contraditórios, entre eles aumento do risco de desenvolvimento do CCR ou nenhuma associação, mas que não são passíveis de reprodução entre as diferentes populações (ABDEL-RAHMAN et al, 2000; MORT et al, 2003; SKJEKBRED et al, 2006; NISSAR et al, 2013).

Neste contexto, é de suma importância assinalar também que atividade e

expressão de proteínas do BER são moduladas por duas moléculas de clássicas e frequentemente mutadas na carcinogênese colorretal, que são os produtos do gene APC e do gene TP53. Assim, mutações nestes genes afetam a taxa de reparo do DNA oxidado, e favorece eventos pró-mutagênicos nas células epiteliais do cólon (TUDEK et al, 2012).

As mutações no gene APC, como já descrito anteriormente, são eventos precoces na carcinogênese colorretal, e são encontrados em cerca de 80% dos adenomas e carcinomas do cólon. Os resultados de mutação mais frequente são uma proteína truncada na sua parte C-terminal. Quando funcional, a APC interage diretamente com a DNA polimerase, a FEN1 e com APE1 (JAISWAL et al 2006; JAISWAL et al 2011) , inibindo a ligação e a atividade das proteínas BER no DNA danificado. Em estudos in vitro com células LoVo, células de adenocarcinoma colorretal que expressam proteína APC truncada, foi observado um maior recrutamento das proteínas do BER, bem como o aumento da atividade de APE1, FEN1 e DNA polimerase (JAISWAL et al 2011).

A ativação de APE1 também pode ocorrer como consequência de mutações do gene TP53 que, embora tardias, são frequentes no desenvolvimento do CCR, estando presentes em cerca de 50% deles. Foi demonstrado que a proteína TP53 participa da *downregulation* da transcrição de APE1 em células tratadas com agentes que lesam o DNA (ZAKY et al, 2008). Além disto, células tratadas com inibidores de TP53 apresentam menor degradação de APE1, já que está envolvido com a sua ubiquitinação [123], demonstrando que quanto menor a expressão de TP53, maior será a quantidade de APE1 nas células tumorais. Ainda, o aumento de APE1 também pode acelerar a taxa de excisão das DNA glicosilases. Especialmente a OGG1 foi demonstrada

ser muito suscetível à indução pela APE1, uma vez que ambas se ligam aos sítios AP, e a APE1 aumenta o *turnover* destas enzimas no DNA danificado (HILL et al, 2001; TUDEK, 2007), levando a um desequilíbrio da via do BER.

Recentemente, porém, sabe-se que pacientes com CCR que apresentam mutações em APC não são beneficiados das terapias à base de 5-FU. APC interage fisicamente com Pol β e FEN1, bloqueando a via longa do BER via “reparo inibitório do DNA” in vitro. Ou seja, a resistência ao 5-FU está diretamente ligada à capacidade de APC, através da presença ou ausência do seu domínio inibitório do reparo em bloquear ou não a via longa do BER (DAS et al, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

A identificação de parâmetros que refletem o comportamento biológico dos tumores, correlacionado com a gravidade e grau de evolução, é um importante determinante do prognóstico e melhora na terapia do câncer. Cada vez mais se estuda a viabilidade de novos marcadores diagnósticos e prognósticos para o CCR. Todavia, até o momento, as conclusões se apresentam pouco sólidas, seja pela variabilidade de técnicas que são utilizadas para detecção, seja porque a maioria destes apresenta populações pequenas ou são estudos de subgrupos.

Como dito anteriormente, a caracterização anatomopatológica do CCR através do sistema TNM é a base mais utilizada para estabelecer o prognóstico e decidir o tipo de tratamento a ser destinado para o paciente. Embora indivíduos em estado inicial do CCR sejam excluídos de quimioterapia adjuvante através da ressecção cirúrgica potencialmente curativa do tumor, 20 a 30% apresentam recorrência da doença, sugerindo que o estadiamento atual não garanta de forma realmente acurada o prognóstico do paciente (RESNICK et al, 2004).

Apesar de o prognóstico para estes pacientes ser considerado de moderado a bom, cerca de metade deles irá desenvolver metástases. Atualmente, todos os esquemas de tratamento do CCR esporádico e das suas complicações neoplásicas utilizam-se de esquemas que utilizam como base o antimetabólito 5-fluoracil, o derivado do ácido fólico, leucovorin, e o agente platinado, oxaliplatina. Mesmo com os investimentos nas terapias biológicas pouco se nota em termos de diferença real sobrevida dos pacientes (RODEL et al., 2012).

Além disto, apesar dos também relevantes avanços nas técnicas tradicionais de cirurgia (ressecções clássicas, ampliadas e laparoscópicas) e radioterapia e suas combinações terapêuticas, todas as abordagens ainda são consideradas de eficiência limitada. Portanto, a pesquisa de marcadores moleculares é uma importante ferramenta a ser explorada não apenas para o refinamento do prognóstico, como também para a alocação de indivíduos em protocolos apropriados de tratamento (COLLINS et al, 2012), aumentando a eficácia dos tratamentos disponíveis.

E embora cada vez mais se busque marcadores prognósticos para o CCR individualmente, ainda não foi possível encontrar algo que compile os parâmetros clínicos, morfológicos e moleculares de prognóstico neste tipo de tumor. Além disto, são utilizadas diferentes técnicas para identificação destes marcadores, dificultando a comparação entre os resultados. Finalmente, o ideal repousa sobre a criação de um painel de marcadores ou de uma assinatura molecular para direcionar melhor o tratamento e acompanhamento de pacientes com câncer colorretal.

O diagnóstico, estadiamento e o tratamento do CCR não são baseados na eficiência da maquinaria de reparo do DNA nas células tumorais, embora os estudos in vitro apontem constantemente para as alterações moleculares neste sistema. Desta forma, as proteínas do BER surgem como um alvo potencial para nortear a intervenção quimioterapêutica e elucidar também os mecanismos de insucesso quimioterápico, além de poderem agregar grande valor às ferramentas atuais de estadiamento.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar relação da expressão da proteína *Adenomatous poliposis coli* (APC) com o padrão de expressão das proteínas-chaves do reparo por excisão de bases em pacientes com adenocarcinomas colorretais submetidos à cirurgia.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão imunohistoquímica de APC em tumores colorretais esporádicos;
- Avaliar a expressão imunohistoquímica de MPG, XRCC1, Fen-1 e Pol- β , de forma a caracterizar a via do reparo do DNA por excisão de bases (BER);
- Relacionar a expressão de APC com a expressão dos genes do BER;
- Avaliar a relação prognóstica da a expressão dos genes do BER estratificado por estágio do tumor no momento do tratamento cirúrgico;
- Relacionar dados demais dados clínicos com os moleculares.

5 REFERÊNCIAS

1. Abdel-Rahman SZ, Soliman AS, Bondy ML, Omar S, El-Badawy, Khaled HM, et al. Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett* 2000;159(1):79–86.
2. AJCC. Cancer staging manual. 6th ed. New York: Springer; 2002.
3. Al-Sukhni W, Aronson M, Gallinger S. Hereditary colorectal cancer syndromes: Familial Adenomatous Polyposis and Lynch syndrome. *Surg Clin North Am* 2008; 88(4):819-844.
4. Almeida KH, Sobol RW. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)*. 2007; 6(6): 695–711.
5. Anderegg E, Ris F, Gervaz P, Bucher P, Morel P. Outcome of surgery for rectal cancer in octogenarians. *Swiss Med Wkly* 2006; 136(11-12): 185-8.
6. Antic A, Kalezic V, Kecmanovic D, Petrovic M, Zuvela M, Matic S, et al. Influence of tumor size and intestinal wall invasion on development of colorectal liver metastases. *Acta Chir Iugosl*. 2008; 55(4): 27- 30
7. Anwar S, Peter M, Dent J, Scott N. Palliative excisional surgery for primary colorectal cancer in patients with incurable metastatic disease. Is there a survival benefit? A systematic review. *Colorectal Dis*; 2011 Sep 8.
8. Barker N. The canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Methods Mol Biol*. 2008; 468:5-15.

9. Benhamou S, Sarasin A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutat Res.* 2000;462(2-3):149-58.
10. Bhattacharyya N, Banerjee S. A novel role of XRCC1 in the functions of a DNA polymerase beta variant. *Biochemistry.* 2001;40(30):9005-13.
11. Biagi JJ, Raphael MJ, Mackillop WJ, Kong W, King WD, Booth CM. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2011;305(22):2335-42.
12. Bordonaro M, Lazarova DL, Sartorelli AC. Butyrate and Wnt signaling: a possible solution to the puzzle of dietary fiber and colon cancer risk? *Cell Cycle.* 2008; 7(9):1178-83.
13. Brandt J, Wangefjord S, Nodin B, Eberhard J, Jirstrom K, Manjer J. Associations of hormone replacement therapy and oral contraceptives with risk of colorectal cancer defined by clinicopathological factors, beta-catenin alterations, expression of cyclin D1, p53, and microsatellite instability. *BMC Cancer.* 2014;14:371.
14. BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Bases Técnicas da Oncologia - SIA/SUS - Sistema de Informações Ambulatoriais. 13 ed. Brasília: MS/SAS/DRAC/CGSI, 2011. 110p
15. Buckowitz A, Knaebel HP, Benner A, Bläker H, Gebert J, Kielen P, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer* 2005; 92: 1746-53

16. Burma S, Chen BP, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5(9-10): 1042–8.
17. Burn J, Bishop DT, Mecklin JP, Macrae F, Möslin G, Olschwang S, et al. Effect of aspirin or resistant starch on colorectal neoplasia in the Lynch syndrome. *N Engl J Med* 2008; 359:2567-78.
18. Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2006; 42:216-227.
19. Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat. Rev. Genet.* 2008; 9(8): 619–31.
20. Calvo JA, Moroski-Erkul CA, Lake A, Eichinger LW, Shah D, Jhun I, Limsirichai P, et al. Aag DNA glycosylase promotes alkylation-induced tissue damage mediated by Parp1. *PLoS Genet.* 2013; 9(4):e1003413.
21. Cappellani A, Zanghi A, Di Vita M, Cavallaro A, Piccolo G, Veroux P, et al. Strong correlation between diet and development of colorectal cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013;18:190-8.
22. Chen YW, Cleaver JE, Hanaoka F, Chang CF, Chou KM. A novel role of DNA polymerase eta in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents. *Mol. Cancer Res.* 2006; 4(4): 257–65.
23. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, Van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med.* 2004; 140(8):603-13.
24. Christmann M, Tomicic MT, Ross WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* 2002; 193:3-34□

25. Christmann M, Verbeek B, Roos WP, Kaina B. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1816(2):179-90.
26. Clodoaldo HF, Bromberg HS, Barreto E, Godoy AC, Mattosinho- França LC. Prognostic value of the grade of cellular differentiation, of mucus presence and the growth pattern of the invasive margin in colorectal adenocarcinomas Dukes B. *Arq Gastroenterol*. 2004;41(3):185-9.
27. Collins AR, Ferguson LR. DNA repair as a biomarker. *Mutat Re*. 2012;736(1-2):2-4.
28. Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin*. 2004;54(6):295-308.
29. Compton CC. Pathology and prognostic determinants of colorectal cancer. 2012.
30. Consorti F, Lorenzotti A, Midiri G, Di Paola M. Prognostic significance of mucinous carcinoma of colon and rectum: a prospective case-control study. *J Surg Oncol*. 2000;73(2):70-4.
31. Da Silva FC, Valentin MD, Ferreira F de O, Carraro DM, Rossi BM. Mismatch repair genes in Lynch Syndrome: a review. *Sao Paulo Med J*. 2009; 127(1):46-51.
32. Dalhus B, Laerdahl JK, Backe PH, Bjoras M. DNA base repair recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(6):1044-78.
33. Das D, Preet R, Mohapatra P, Satapathy SR, Siddharth S, Tamir T, et al. 5-Fluorouracil mediated anti-cancer activity in colon cancer cells is through the induction of Adenomatous Polyposis Coli: Implication of the

- long-patch base excision repair pathway. *DNA repair (Amst)*. 2014; 24:15-25.
34. de Boer J, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):453-60.
35. Derwinger K, Gustavsson B. A study of lymph node ratio in stage IV colorectal cancer. *World J of Surg Oncol*. 2008;6:127.
36. Dianov G, Allinson SL, Budworth H, Sleeth KM. Mammalian base excision repair. In: Caldecott KW, editor. *Eukaryotic DNA Damage Surveillance and Repair*. Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003:1–22. □
37. Diergaarde B, Vrieling A, van Kraats AA, van Muijen GN, Kok FJ, Kampman E. Cigarette smoking and genetic alterations in sporadic colon carcinomas. *Carcinogenesis*. 2003;24(3):565-71.
38. Donohoe CL, Pidgeon GP, Lysaght J, Reynold JV. Obesity and gastrointestinal cancer. *Br J Surg*. 2010; 97(5):628-42.
39. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol* 1932, 35:323-332. Edge SB et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7. ed. New York: Springer, 2010.
40. Eisenberg B, Decosse J, Harford F. Carcinoma of the colon and rectum: the natural history reviewed in 1704 patients. *Cancer*. 1982;49:1131-4.
41. Faivre S, Chan D, Salinas R, Woynarowska B, Woynarowsky JM. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2003; 66(2):225-237.
42. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol*. 2001; 6:479-507.

43. Fell VL, Schild-Poulter C. The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;763:15-29.
44. Fodde, R.; Smits, R.; Clevers, H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature*. 2001; vol.1, p.55-67, 2001.
45. Fortini P, Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA repair (Amst)*. 2007;6(4):398-409.
46. Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, et al. DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)*. 2006; 5(8):986-96.
47. Gala M, Chung DC. Hereditary colon cancer syndromes. *Semin Oncol*. 2011; 38(4):490-99.
48. Gellad ZF, Provenzale D. Colorectal cancer: National and international perspective on the burden of disease and public health impact.. *Gastroenterology*. 2010;138:2177-90.
49. Giles RH, Van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1653(1):1-24.
50. Gomez D, Dalal Z, Raw E, Roberts C, Lyndon PJ. Anatomical distribution of colorectal cancer over a 10-year period in a district general hospital: is there a true "rightward shift"? *Postgrad Med J*. 2004;80(949):667-9.
51. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004; 23(1-2):11-27.
52. Greenberg RA. Recognition of DNA double strand breaks by the BRCA1 tumor suppressor network. *Chromosoma*. 2008;117(4):305-17.

53. Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V, Bonner JD, Tomsho LP, et al. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(1): 126-33.
54. Guimarães RM, Rocha PG, Muzi CD, Ramos R de S. Increase income and mortality of colorectal cancer in Brazil, 2001-2009. *Arq. Gastroenterol*. 2013; 50(1):64-9.
55. Habr-Gama A. Colorectal câncer: the importance of its prevention. *Arq Gastroenterol*. 2005; 42(1):2-3.
56. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
57. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
58. Hedge ML, Hazra TK, Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res*. 2008;18(1):27-47.
59. Helleday T, Petterman E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(3):193-204.
60. Hill JW, Hazra TK, Izumi T, Mitra S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(2):430-8.
61. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411:366– 374.
62. Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M, Kartalou M, et al. The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. *J Clin Invest*.

- 2003;112(12):1887-94.
63. Horton, J. K. *et al.* XRCC1 and DNA polymerase β in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell Res.* 2008; 18, 48–63 □
 64. Horton, J.K. *et al.* (2000) Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase beta-dependent long patch base excision repair. *J. Biol. Chem.*, 275, 2211–2218.
 65. Hou YY, Lu SH, Zhou Y, Qi WD, Shi Y, Tan YS, *et al.* Stage and histological grade of gastrointestinal Stromal tumors based on a new approach are Strongly associated with clinical behaviors. *Mod Pathol.* 2009;22(4):556-69.
 66. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015.
 67. Huang MY, Tsai HL, Lin CH, Huang CW, Ma CJ, Huang CM, *et al.* Predictive value of ERCC1, ERCC2, and XRCC1 overexpression for stage III colorectal cancer patients receiving FOLFOX-4 adjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol.* 2013;108(7):457-64.
 68. Illum H. Irinotecan and radiosensitization in rectal cancer. *Anticancer Drugs.* 2011;22(4):324-9.
 69. INCA, Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde do Brasil. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2014.
 70. Ishibashi K, Sobajima J, Ohsama T, Okada N, Yokoyama M, Mitsunashi, *et al.* Relationship between the size and metastasis of hepatic lymph

- nodes in patients with synchronous liver metastasis of colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2007;34(12):2035-7.
71. Ishikubo T, Nishimura Y, Yamaguchi K, Khanswan U, Arai Y, Kobayashi T, et al. The clinical features of rectal cancers with high-frequency microsatellite instability (MSI-H) in Japanese males. *Cancer Lett*. 2014;216(1):55-62.
 72. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Tanaka F, Tahara K, Inoue H, et al. A platinum agent resistance gene, POLB, is a prognostic indicator in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2009;100(3):261-6.
 73. Jaiswal AS, Banerjee S, Aneja R, Sarkar FH, Ostrov DA, Narayan S. DNA polymerase β as a novel target for chemotherapeutic intervention of colorectal cancer. *PLoS One*. 2011;6(2):e16691.
 74. Jaiswal S, Narayan S. Assembly of the base excision repair complex on abasic DNA and role of adenomatous polyposis coli on its functional activity. *Biochemistry*. 2011; 50(11) 1901–9.
 75. Japerson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-58.
 76. Jass JR, O'Brien J, Ridell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma: Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. *Am J Clin Pathol*. 2008;129(1):13-23.
 77. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
 78. Juhn E, Khachemoune A. Gardner syndrome: skin manifestations, differential diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol*.

- 2010;11(2):117-22.
79. Kaina B, Margison GP, Christmann M. Targeting O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(21):3663-81.
 80. Kim H, D'Andrea AD. Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev*. 2012;26(13):1393-408.
 81. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87(2):159-70.
 82. Knudson A. Alfred Knudson and his two-hit hypothesis. (Interview by Ezzie Hutchinson). *Lancet Oncol*. 2001;2(10):642-5.
 83. Kobayashi J, Iwabushi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takaya M, et al. Current topics in DNA double-strand break repair. *J. Radiat. Res*. 2008;49(2):93-103.
 84. Krausová M, Kořínek V: Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal*. 2014; 26(3): 570-579.
 85. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran - Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Saunders. Philadelphia: Elsevier. 2010.
 86. Langley RR, Fidler IJ. Tumor Cell-Organ Microenvironment Interactions in the Pathogenesis of Cancer Metastasis. *Endocr Rev*. 2007;28(3):297-321.
 87. Latkauskas T, Paskauskas S, Dambrauskas Z, Gudaityte J, Sladziuskas S, Tamelis A, et al. Preoperative chemoradiation vs radiation alone for stage II and III resectable rectal cancer: a metaanalysis. *Colorectal Dis*. 2010;12(11):1075-83.
 88. Legolvan MP, Resnick M. Pathobiology of colorectal cancer hepatic metastases with an emphasis on prognostic factors. *J Surg Oncol*.

- 2010;102(8):898-908.
89. Leslie A, Pratt NR, Gillespie K, Sales M, Kernohan NM, Smith G, et al. Mutations of APC, K-ras, and p53 are associated with specific chromosomal aberrations in colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res* 2003, 63(15):4656-61.
 90. Liao J, Seril DN, Lu GG, Zhang M, Toyokuni S, Yang AL, et al. Increased susceptibility of chronic ulcerative colitis-induced carcinoma development in DNA repair enzyme Ogg1 deficient mice. *Mol Carcinog* 2008;47(8):638-46.
 91. Litman R, Gupta R, Brosh RM Jr, Cantor SB. BRCA-FA pathway as a target for anti-tumor drugs. *Anticancer Agents in Med Chem.* 2008;8(4):426-30.
 92. Livneh Z, Ziv O, Shachar S. Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. *Cell Cycle.* 2010;9(4):729-35.
 93. Longatto-Filho A, Pinheiro C, Ferreira L, Scapulatempo C, Alves VA, Baltazar F, et al. Peritumoural, but not intratumoural, lymphatic vessel density and invasion correlate with colorectal carcinoma poor-outcome markers. *Virchows Arch.* 2008;452(2):133-8.
 94. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009;17(1):9-26.
 95. Matsuda T, Saito Y, Fujii T, Uraoka T, Nakajima T, Kobayashi N, et al. Size does not determine the grade of malignancy of early invasive colorectal. *World J Gastroenterol.* 2009;15(22):2708-13.
 96. Matuo R, Sousa FG, Escarqueil AE, Soares DG, Grivicich I, Saffi J, et al. DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil

- and its active metabolite FdUMP. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(2): 147-153.
97. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2516-25.
 98. Michailidi C, Papavassiliou AG, Troungos C. DNA repair mechanisms in colorectal carcinogenesis. *Curr Mol Med.* 2012;12(3):237-46.
 99. Moraes MC, Neto JB, Menck CF. DNA repair mechanisms protect pur genome from carcinogenesis. *Front Biosci (Landmark ed).* 2012; 17:1362-88
 100. Morán A, Ortega P, De Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute, et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance *World J Gastrointest Oncol.* 2010; 2(3): 151–158.
 101. Mort R, Mo L, McEwan C, Melton DW. Lack of involvement of nucleotide excision repair gene polymorphisms in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2003; 89(2):333–7.
 102. Nambiar PR, Gupta RR, Misra V. An “omics” based survey of human colon câncer. *Mutat. Res.* 2010;693(1-2):3-18.
 103. Nissar S, Lone TA, Banday MZ, Rasool R, Chowdri NA, Parray FQ, et al. Arg399Gln polymorphism of XRCC1 gene and risk of colorectal câncer in Kashmir: A case control study. *Oncol Lett.* 2013;5(3):959–963.
 104. Olinsli R, Siomek A, Rozalski R, Gackowski D, Foksinski M, Guz J, et al. Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol.* 2007;54(1):11-26.

105. Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, Bergkvist L, Berrino F, Van der Brandt PA, et al. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA* 2005;294(22):2849-57.
106. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualized management? *Rev Esp Enferm Dig.* 2011;103(1):29-35.
107. Petermann, E., Keil, C. and Oei, S. L. Roles of DNA ligase III and XRCC1 in regulating the switch between short patch and long patch BER. *DNA Repair (Amst.).* 2006; 5, 544-555.
108. Petreli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Barni S. Cetuximab and panitumumab in KRAS wild-type colorectal cancer: a meta-analysis. *Int J Colorectal Dis.* 2011;26(7):823-33.
109. Piters E, Boudin E, Van Hul W. Wnt signaling: a win for bone. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):112-6. May 15;473(2):112-6.
110. Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res.* 2004;568(2): 275-82.
111. Resnick MB, Routhier J, Konkin T, SABO E, Pricolo VE. Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin. cancer res.* 2004; 10(9):3069-3075.
112. 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):981–993. □

113. Rodel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Bigalke M, Gunther K, Schick C, et al. Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;1;52(2):294-303.
114. Sadanadam A, Lyssiotis CA, Homickso K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*. 2013;19(5):619-25.
115. Sale JE, Lehmann AR, Woodgate R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(3):141-52.
116. Samad AK, Taylor RS, Marshall T, Chapman Ma. A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2005;7(3):204-13.
117. Shen SS, Haupt BX, Ro JY, Zhu J, Bailey HR, Schwartz MR. Number of lymph nodes examined and associated clinicopathologic factors in colorectal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(5):781-6.
118. Shirouzu K, Isomoto H, Kakegawa T, Morimatsu M. A prospective clinicopathologic study of venous invasion in colorectal cancer. *Am J Surg*. 1991;162(3):216-22.
119. Simonelli V, Mazzei F, D'errico M, Dogliotti E. Gene susceptibility to oxidative damage: from single nucleotide polymorphisms to function *Mutat. Res*. 2012; 731 (1–2), pp. 1–13
120. Skjebred CF, Saebo M, Wallin H, Nexø BA, Hagen PC, Lothe IM, et al. Polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XPD genes and risk of

- colorectal adenoma and carcinoma, in a Norwegian cohort: A case control study. *BMC Cancer*. 2006;16:6-67.
121. Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 2003;531:231-51.
122. Sobin DH, Wittekind CH. TNM classification of malignant tumors. 6 th ed. Willey – Liss, 2002.
123. Sobol RW, Watson DE, Nakamura J, Yakes FM, Hou E, Horton JK, Ladapo J, Van Houten B, Swenberg JA, Tindall KR, Samson LD, Wilson SH. Mutations associated with base excision repair deficiency and methylation-induced genotoxic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99:6860–6865.
124. Stallons LJ, McGregor WG. Translesion synthesis polymerases in the prevention and promotion of carcinogenesis. *J. Nucleic Acids*. 2010; 2010.
125. Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. Prognostic indicators of colon tumors: the gastrointestinal tumor study group experience. *Cancer*. 1986;57(9):1866- 70.
126. Tanaka T, Tanaka M, Tanaka T, Ishigamori R. Biomarkers for colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2010;11(9):3209-25.
127. Tiong KL, Chang KC, Yeh KT, Liu TY, Wu JH, Hsieh PH. CSNK1E/CTNNB1 are synthetic lethal to TP53 in colorectal cancer and are markers for prognosis. *Neoplasia*. 2014;16(5):441-50.
128. Tudek B, Speina E. Oxidatively damaged DNA and its repair in colon carcinogenesis. *Mutat Res*. 2012;736(1-2):82-92.

129. Tudek B, Swoboda M, Kowalczyk P, Olinski R. Modulation of oxidative DNA damage repair by the diet, inflammation and neoplastic transformation. *J Physiol Pharmacol*. 2006; 57.
130. Tudek B. Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Mol Aspects Med*. 2007; 28(3-4):258–275.
131. Vasques ALR, Peres MA. Tendência temporal da mortalidade por câncer de cólon e reto em Santa Catarina no período entre 1980 a 2006. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2010;19(2):91-100.
132. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32.
133. Wallace SS. Base excision repair: a critical player in many games. *DNA Repair (Amst)*. 2014;19:14-26.
134. Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal Cancer. *Lancet*. 2005;365(9454):153-65.
135. WORLD HEALTH ORGANIZATION [Internet].
136. Wu X, Khalpey Z, Cascalho M. Cellular physiology of mismatch repair. *Curr Pharm Des*. 2004;10(32):4121-6.
137. Yu J, Mallon MA, Zhang W, Freimuth RR, Marsh S, Watson MA, et al. DNA repair pathway profiling and microsatellite instability in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(17):5104-11.
138. Zaky A, Busso C, Izumi T, Chattopadhyay R, Bassiouny A, Mitra S, et al. Regulation of the human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(5):1555-66.

139. Zharkov, D. Base excision DNA repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008; v. 65, n. 10, p. 1544-1565,
140. Zhuang L, Bai J, Huang H, Tang C, Yang J, Zhou B, et al. Meta-analysis of chemotherapy with irinotecan or oxaliplatin-involved regimen for untreated metastatic advanced colorectal cancer. *Oncol Res*. 2010;18(9):437-44.
141. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2008;61(5):561-9.

6 ARTIGO

O manuscrito foi formatado nas normas da revista *BMC Cancer*.

Manuscript title: Low expression of base excision repair proteins correlates with favourable outcome in sporadic colorectal cancer

Daniel de Barcellos Azambuja^{1,2} (dazambuja@uol.com.br)

Natalia Leguisamo-Meirelles² (nmleguisamo@gmail.com)

Helena de Castro e Gloria² (helenadecastroegloria@gmail.com)

*Jenifer Saffi² (jenifers@ufcspa.edu.br)

Ernani Luis Rhoden^{1, 2} (ernanirhoden@yahoo.com.br)

¹ Division of Proctology, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90050-170, Brazil

² Laboratory of Genetic Toxicology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90050-17, Brazil

*Correspondent author.