

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**"PREVALÊNCIA E VALOR PROGNÓSTICO DE MARCADORES
MOLECULARES EM TUMORES COLORRETAIS ESPORÁDICOS"**

Renata dos Santos Coura

**Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular da UFRGS como
requisito parcial para obtenção do
grau de mestre.**

Orientadora:

Prof. Dra. Patricia Ashton-Prolla

Co-orientador:

Prof. Dr. João Carlos Prolla

Porto Alegre

Março de 2005

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisas Cardiovasculares do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em colaboração com o Serviço de Genética Médica da mesma instituição, e financiada por bolsa de mestrado concedida pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq e por taxa de bancada referente à bolsa Pro-Doc concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) à orientadora deste trabalho. Adicionalmente, este trabalho recebeu auxílio do Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os experimentos apresentados nesta dissertação estão incluídos em projetos de pesquisa que foram aprovados em seus aspectos éticos e metodológicos pelos comitês de ética e pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

ESTRUTURA

Após os itens INTRODUÇÃO e OBJETIVOS esta dissertação apresenta três artigos científicos. Um desses artigos já foi submetido e os outros dois estão em fase final de preparação. Os artigos estão organizados em capítulos no item ARTIGOS CIENTÍFICOS. Material e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se nos próprios artigos. As referências bibliográficas de cada artigo aparecem no formato de cada um dos periódicos a que foram ou serão submetidos.

O item DISCUSSÃO contém interpretações e comentários gerais sobre todos os artigos científicos apresentados e sobre o conjunto deste trabalho. O item CONCLUSÕES contém as conclusões gerais da dissertação.

O item REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS refere-se somente às citações que aparecem no texto da dissertação e não nos artigos.

Em ANEXO encontra-se um artigo de revisão já submetido e dados adicionais do trabalho.

Ao Fabiano, com muito amor.
Pelo carinho com que cuida de mim,
pelo companheirismo, pela amizade,
por ser minha fonte de estímulo e inspiração
e acima de tudo por seu amor.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Patricia Ashton-Prolla, pela oportunidade de crescimento e aprendizado, pela confiança que sempre depositou em mim, pelo seu exemplo, e pela sua valiosa amizade;

Ao Dr. João Carlos Prolla, pelo auxílio constante em todas as etapas deste trabalho e por ser um exemplo a seguir; agradeço também sua amizade, carinho e confiança;

Ao Dr. Mário Antonello Rosito pelas amostras;

À Dra. Luise Meurer, pela microdissecção das amostras e pelos momentos agradáveis de trabalho juntas;

À Dra. Nadine Clausell e ao Laboratório de Pesquisas Cardiovasculares pela colaboração que permitiu a realização deste trabalho;

Ao Dr. Roberto Giugliani, que me deu a primeira oportunidade;

Às minhas queridas amigas Ingrid, Lili e Ede, sem as quais os dias intermináveis de trabalho não seriam tão divertidos; agradeço o imenso carinho e cuidado que têm comigo; a amizade de vocês é muito valiosa;

Aos amigos Ana Paula, Maríndia, Flávia e Rodrigo por caminharem ao meu lado durante esta jornada e por todos os momentos que passamos juntos; vocês são muito importantes e especiais pra mim;

À amiga Louise por tudo, com carinho;

À amiga Ângela pelas “divagações científicas”, mas principalmente pela valiosa amizade que nasceu entre nós;

Ao meu marido Fabiano, pelo seu amor, paciência, carinho, respeito e incentivo constantes; e pela revisão dos artigos e da dissertação;

À minha mãe, avós e irmãos, que sempre foram a base de tudo que eu sou e que faço, e que me fizeram entender que para o amor não há distância; a eles eu dedico não só este trabalho, mas toda a minha vida;

À minha amiga Camila, por tudo que passamos e passaremos juntas, dedico a ela parte de cada conquista de minha vida. Ao meu afilhado Caio, por existir. E ao meu amigo Renato, por cuidar tão bem deles;

Aos amigos Elmo e Ellen, pela ajuda em todos os momentos e pela amizade que nasceu entre nós;

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

“Em vez da monótona labuta de procurar peixe
junto aos barcos de pesca, temos uma razão
para estar vivos! Podemos subtrair-nos à
ignorância, podemos encontrar-nos como
criaturas excelentes, inteligentes e hábeis.
Podemos ser livres!
Podemos aprender a voar!”
(Fernão Capelo Gaiivota - Richard Bach)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Câncer Colorretal e Adenocarcinoma de Reto.....	1
1.2 Fatores Prognósticos no CCR.....	2
1.2.1 Fatores Clínicos.....	3
1.2.2 Fatores Próprios do Tumor.....	3
1.2.3 Fatores Laboratoriais e Outros.....	4
1.3 Genética Molecular do Câncer.....	5
1.4 Genética do Câncer Colorretal.....	6
1.4.1 Oncogenes e Genes Supressores de Tumor envolvidos no CCR.....	9
1.4.2 Genes de Reparo do DNA envolvidos no CCR.....	10
1.4.3 Instabilidade de Microssatélites (IMS)	12
1.4.4 Mutações em genes da família <i>ras</i>	18
1.5 Assinatura Nuclear Digital.....	19
1.6 Marcadores Moleculares e Valor Prognóstico em CCR.....	22
2. Objetivos.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. Artigos Científicos.....	25
3.1 Capítulo I.....	25
3.2 Capítulo II.....	32
3.3 Capítulo III.....	46
4. Discussão.....	56
4.1 Análise populacional do perfil de BAT-25 e BAT-26.....	56
4.2 Análise de IMS e mutações em <i>K-ras</i> em tumores de reto.....	58
5. Conclusão.....	67
6. Perspectivas.....	68
7. Bibliografia.....	69
8. Anexos.....	78
Anexo I- Artigo de Revisão.....	78
Anexo II – Sequenciamento.....	101
Anexo III – Análise de Instabilidade de Microssatélites.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

- CCR** – Câncer colorretal
- CEA** – antígeno carcinoembriogênico (carcinoembryogenic antigen)
- DNA** – ácido desoxirribonucléico (desoxirribonucleic acid)
- APC** – gene da polipose adenomatosa familiar (adenomatous polyposis coli)
- DCC** – gene deletado em câncer colorretal (deleted in colon câncer)
- SMAD2** – “mothers against decapentaplegic homolog 2 (Drosophila)”
- SMAD4** – “mothers against decapentaplegic homolog 4 (Drosophila)”
- P53** – gene supressor de tumor localizado no braço longo do cromossomo 17 (Protein 53 kDa)
- CIN** – instabilidade cromossômica (Chromosome Instability)
- LOH**- perda de heterozigidade (Loss of Heterozigosity)
- HNPCC** – Câncer colorretal hereditário não-polipomatoso (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Câncer)
- IMS** –instabilidade de microssatélites (microsatellite instability)
- IMS-H** – instabilidade de microssatélite de alto grau (microsatellite instability high)
- IMS-L** - instabilidade de microssatélite de baixo grau (microsatellite instability low)
- MSS** – estabilidade de microssatélite (microsatellite stability)
- IMS+** - presença de instabilidade de microssatélites
- IMS-** - ausência de instabilidade de microssatélites
- RER** – fenótipo de erro de replicação de DNA (replication error)
- MMR** – Sistema de reparo de pareamento incorreto (Mismatch Repair System)
- hMLH1** – gene de reparo do DNA (human mutL homolog 1)
- hMSH2** - gene de reparo do DNA (human mutS homolog 2)
- hMSH3** - gene de reparo do DNA (human mutS homolog 3)
- hMSH6** - gene de reparo do DNA (human mutS homolog 6)
- hPMS1**- gene de reparo do DNA (human PMS1 protein homolog 1)
- hPMS2**- gene de reparo do DNA (human PMS2 protein homolog 2)
- PCNA** – fator de transcrição - antígeno nuclear de proliferação celular (Proliferating cell nuclear antigen)

RPA – fator de transcrição – proteína replicadora A (replicative protein A)
RFC - fator de transcrição – fator de replicação C (replication factor C)
EXO1 – exonuclease 1
FEN1 – endonuclease (Flap endonuclease 1)
TGFBR2 – gene do receptor beta II do fator de transformação de crescimento (*Homo sapiens* transforming growth factor, beta receptor II)
IGF-2 – gene do fator de crescimento tipo insulina 2 (Insuline-like Growth Factor 2)
BAX – gene pró-apoptótico
E2F4 – fator de transcrição E2F4
TCF4 – fator de transcrição 4
RIZ – gene da proteína de interação em dedo de zinco do retinoblastoma (the retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene)
CDX2 – proteína homeobox
NCI – Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (National Cancer Institute)
HLA - Antígenos Leucocitários Humanos (Human Leukocyte Antigen)
GTP –guanina trifosfato (guanine triphosphate)
DOT – Densidade ótica total
MutKras – mutação no gene K-ras
ICG-HNPCC – Grupo colaborativo internacional para o estudo do HNPCC (International Collaborative Group in HNPCC)
SSCP – Polimorfismo conformacional de fita simples (Single Strand Conformational Polymorphism)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Seqüência Adenoma-Carcinoma.....	2
Figura 2. Vias de Carcinogênese: Via Supressora e Via Mutante.....	8
Figura 3. Sistema de Reparo de Malpareamento (MMR).....	11
Figura 4. Instabilidade de microssatélites.....	13
Figura 5. Estrutura tridimensional da proteína <i>ras</i>	18
Figura 6. Imagem digital de adenocarcinoma de reto.....	21
Figura 7. Imagem digital de reto normal.....	21
Figura 8. Eletromicrografia de núcleo de reto normal humano.....	21
Figura 9. Eletromicrografia de núcleo de adenocarcinoma de reto humano.....	21
Figura 10. Histograma - Assinatura nuclear (pacientes com CR).....	21
Figura 11. Eletroferograma BAT-25 de amostra normal pelo SSCP.....	102
Figura 12. Eletroferograma BAT-25 de amostra variante pelo SSCP.....	102
Figura 13. Eletroferograma BAT-26 de amostra normal pelo SSCP.....	103
Figura 14. Eletroferograma BAT-26 de amostra variante pelo SSCP.....	103
Figura 15. Gel SSCP - BAT25.....	105
Figura 16. Gel SSCP- BAT 26.....	105
Figura 17. Gel SSCP – D2S123.....	105
Figura 18. Gel SSCP – D5S346.....	105
Figura 19. Gel SSCP – D17S250.....	105
Figura 20. Gel de poliácridamida dos 3 marcadores dinucleotídicos.....	106
Figura 21. SSCP de amostras de sangue e parafina (BAT40 e D17S250).....	106
Figura 22. SCP D1S250 com material de parafina reamplificado.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos marcadores do painel de referência.....	15
Tabela 2. Discordância entre BAT-25 e BAT-26.....	62
Tabela 3. Descrição da Análise de IMS.....	63

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor em frequência e o segundo em mortalidade nos países desenvolvidos. No Brasil, está entre as seis neoplasias malignas mais encontradas e é a terceira em mortalidade. Dentre todos os casos de CCR, cerca de 85% são esporádicos. A avaliação de prognóstico se baseia atualmente apenas em parâmetros clínico-patológicos e morfológicos, uma vez que o valor de marcadores moleculares para o prognóstico ainda precisa ser melhor esclarecido. Mutações em genes de reparo de malpareamento de DNA (MMR) estão associadas principalmente com CCR hereditário, em especial na Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipomatoso (HNPCC), podendo também ser observadas em alguns casos de CCR esporádico. Essas mutações em genes MMR (hMSH2 e hMLH1, principalmente) resultam em falha na correção dos erros de replicação, que como consequência geram instabilidade de microssatélites (IMS). A frequência de IMS é maior que 90% no HNPCC e cerca de 15% em CCRs esporádicos. Tumores com IMS tendem a apresentar melhor prognóstico. Mutações no oncogene *K-ras* estão presentes em alta frequência em CCRs e desempenham um papel importante na patogênese da doença, tendo também sido associadas ao prognóstico. Este trabalho avalia a prevalência e o valor prognóstico de um painel de cinco marcadores para análise de instabilidade de microssatélites e de mutações no códon 12 do gene *K-ras* em tumores de reto. Além disso, também faz uma análise populacional descritiva do perfil dos microssatélites BAT-25 e BAT-26 em duas amostras do Rio Grande do Sul: uma de indivíduos com ascendência africana e outra de doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A frequência de IMS-H nos tumores de reto foi de 7.3%, e a de IMS-L foi de 51.2%. A frequência de mutação no códon 12 do gene *K-ras* foi de 26.8%. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura para tumores colorretais esporádicos. Não houve correlação significativa entre os achados moleculares, e os dados clínicos e histopatológicos. Mutações no códon 12 do gene *K-ras* apresentaram associação com o aspecto da cromatina nuclear e com a circularidade do núcleo. Pacientes com tumores com alto grau de instabilidade (IMS-H) mostraram uma melhor sobrevida. Mutações no códon 12 do gene *K-ras* não apresentaram correlação significativa com o prognóstico. Os locos BAT-25 e BAT-26 são polimórficos na população do Rio Grande do Sul, o que torna necessária a análise comparativa entre tecido normal e tecido tumoral para detecção de IMS. Nossos resultados descrevem o perfil destes dois marcadores moleculares em carcinomas de reto na população do Rio Grande do Sul. Além de sugerirem tendências importantes do seu possível valor prognóstico.

ABSTRACT

Colorectal cancer is the third tumor in frequency and the second in mortality in developed countries. In Brazil, it is one of the six most common cancers and the third in mortality. Prognostic evaluation is currently based only on clinicopathological and morphological parameters, since the prognostic value of molecular markers requires further elucidation. Microsatellite instability (MSI), which is caused by mutations in mismatch repair genes, are found in more than 90% of tumors of HNPCC and in about 15% of sporadic CRC. Mutations in the oncogene *K-ras* are present in a high frequency in CRCs and play an important role in pathogenesis of the disease. In this study we evaluate the prevalence and prognostic value of mutations in codon 12 of *K-ras* gene and of a panel of five markers for MSI analysis in sporadic colorectal tumors. Besides we made a descriptive populational analysis of the BAT-25 and BAT-26 microsatellites profile in two samples from Rio Grande do Sul. We found a high-level instability (MSI-H) frequency of 7.3%. Low-level instability and stability were found in 51.2% and 41.5% of patients, respectively. MSI-H showed significant association with better overall survival. We found a frequency of *K-ras* codon 12 mutations of 26.8%. There was not significant association of *K-ras* mutation with clinicopathological variables. *K-ras* mutation showed significant association with two morphological features: aspect and roundness. BAT-25 and BAT-26 showed polymorphism in the studied samples, what requires the comparative analysis between normal and tumoral tissue to assess IMS status. Our results have described the profile of these two molecular markers in rectal carcinomas in our population. Furthermore, they suggest important tendencies of their possible prognostic value that need to be well elucidated in a larger sample.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal e Adenocarcinoma de Reto

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor em frequência e o segundo em mortalidade nos países desenvolvidos. No Brasil, está entre as seis neoplasias malignas mais encontradas e é a terceira em mortalidade. Dentre todos os casos de CCR, cerca de 85% são esporádicos. A sobrevida média de pacientes com CCR é de 60% em cinco anos (www.inca.org.br).

Cerca de 39% dos tumores malignos colorretais situam-se no reto (Marcello & Schoetz, 1997). O adenocarcinoma, gerado a partir do epitélio glandular, é o tumor maligno mais frequente do intestino grosso, corresponde a 95% dos carcinomas colorretais, sendo 10% do tipo mucoprodutor (Shepherd, 1997). Predomina em idosos, ocorre em ambos os sexos e tem um pico de incidência na sétima década. Em relação aos tumores de intestino grosso, a proporção dos adenocarcinomas de reto tem sido decrescente nas últimas duas décadas, com aumento de casos no cólon proximal. A mortalidade pela doença teve um leve declínio a partir de 1985, mormente em mulheres (Gordon, 1999).

O câncer do cólon e do reto é apresentado na literatura, no conjunto abrangente denominado câncer colorretal no que concerne à epidemiologia, etiologia, fatores de risco e patologia. As diferenças entre os tumores de cólon e reto se dão em relação às características da região anatômica de cada um, o que proporciona variações quanto às modalidades de tratamentos. Apesar de alguns autores acharem que possam ter fatores etiológicos distintos (Beart *et al.*, 1983), os cânceres do cólon e do reto permanecem unidos, sendo separados apenas para facilitar a abordagem terapêutica (Gordon, 1999).

A etiologia do CCR é desconhecida, embora múltiplos fatores ambientais e genéticos estejam implicados (Jass, 1995). A carcinogênese colorretal é um processo complexo, consistindo de uma série de influências de ordem genética, interligadas e influenciadas por fatores ambientais.

O processo da carcinogênese do CCR destacou-se dentre os estudos dos tumores malignos pelos avanços de conhecimentos dos fatores envolvidos, principalmente com a publicação do modelo genético proposto por Fearon e Vogelstein (Fearon & Vogelstein, 1990) na seqüência adenoma-carcinoma (figura 1), a qual é responsável pela maioria dos

casos de CCR esporádico e da polipose adenomatosa familiar (Wilmink, 1997). O acúmulo de mutações ou de alterações genéticas no processo da carcinogênese colorretal tem um papel importante, muito provavelmente maior que cada evento mutacional isoladamente (Fearon & Vogelstein, 1990; Pinho & Rossi., 1999).

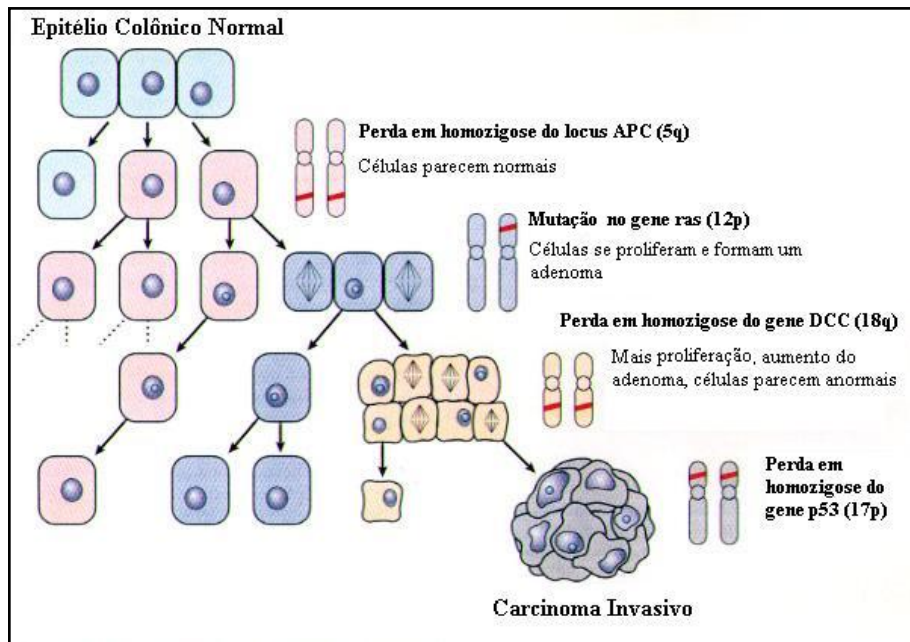


Figura 1. Sequência Adenoma-Carcinoma (adaptado de www.kimmellcancercenter.org)

1.2 Fatores Prognósticos no CCR

Fator prognóstico é uma característica ou marcador que pode ajudar a prever ou mapear o curso ou o término de uma doença ou processo patológico (Lee *et al.*, 2000).

Os fatores de prognóstico do CCR são dependentes de múltiplas variáveis que refletem o estado clínico da doença nos pacientes acometidos pelo tumor. Atualmente, o prognóstico para adenocarcinoma de reto está baseado em parâmetros clínicos e patológicos. Os principais fatores que apresentam valor prognóstico incluem o estágio de Dukes ao diagnóstico (Dukes, 1932) e os aspectos macroscópicos do tumor (tamanho, localização, forma, obstrução e perfuração), dentre outros. A avaliação microscópica de cortes histológicos e dos esfregaços celulares é baseada na experiência diagnóstica do patologista e provê diagnósticos adequados na maioria das situações. Porém, tem limitações e é passível de diferenças de interpretações (Schlemper *et al.*, 1998; Rex *et al.*, 1999).

O estudo do prognóstico do câncer colorretal é de fundamental importância para se esperar resultados mais eficientes em relação a sua abordagem terapêutica. Porém, até o momento, o prognóstico do carcinoma do cólon e do reto continua sendo avaliado quase que unicamente por aspectos histopatológicos.

Há que se ter em conta, para a decisão de tratamento adjuvante, as características próprias do tumor dependentes de sua biologia molecular, que podem influir de maneira dinâmica na evolução da doença, frustrando os índices de sobrevida esperados em determinados casos, baseados somente em parâmetros estáticos clínico-patológicos. No momento do diagnóstico cerca de 25% dos pacientes têm metástases à distância e 50% já têm comprometimento linfonodal regional. Da mesma forma, 50% a 65% desenvolvem metástases metacrônicas e 3% a 32% desenvolvem recidiva locorregional (Nicholls, 1997; Gordon, 1999). Portanto, há necessidade de se buscar parâmetros prognósticos mais precisos, preferencialmente na fase pré-operatória. O estudo das alterações genéticas e o mecanismo de controle do ciclo celular, índices de proliferação celular anormal ou expressão de determinados oncogenes ou genes supressores de tumor em vários tipos de neoplasias humanas, inclusive no carcinoma colorretal, tem sido realizado. Porém, o papel exato destes eventos moleculares oncogênicos e o valor de sua utilização clínica como fator de prognóstico do câncer de reto, ainda está por ser totalmente definido (Lopes *et al.*, 1999; Ferreira & Haddad, 1999).

1.2.1 Fatores clínicos

Dentre os fatores clínicos, a idade, o sexo e a presença de sintomas não se mostraram relevantes quanto ao prognóstico do câncer de reto na maioria dos trabalhos da extensa revisão realizada por Ratto e colaboradores (Ratto *et al.*, 1998) reunindo estudos que utilizavam análise estatística univariada e multivariada. No entanto, Ratto e cols., assim como Rawet (Rawet, 1998), encontraram melhor prognóstico entre as mulheres estudadas, mas não encontraram associação entre a idade e o prognóstico. A presença de sintomas seria mais relacionada à expressão clínica do estadiamento do tumor, refletindo uma maior disseminação (Ratto *et al.*, 1998).

1.2.2 Fatores próprios do tumor

Dentre os fatores de prognóstico dependentes das características do próprio tumor, seriam relacionados: os macroscópicos tais como tamanho, localização, aspecto ou forma do tumor, obstrução e perfuração. E os histopatológicos ou microscópicos como extensão da penetração na parede do reto, invasão da gordura perirretal, comprometimento linfonodal, vinculados ao estadiamento patológico de Dukes (Dukes, 1932), grau de diferenciação histológica, invasão venosa, invasão perineural, invasão de órgãos adjacentes e metástases distantes.

Os fatores histopatológicos da peça operatória, relacionados ao estadiamento baseados na classificação de Dukes (Dukes, 1932), são os fatores prognósticos de maior importância (Ratto *et al.*, 1998) e tem-se repetidamente provado sua correlação com a sobrevida dos pacientes (Deans *et al.*, 1992). São os principais critérios utilizados para a indicação de tratamentos complementares adjuvantes ou neo-adjuvantes.

Tumores operados no estágio A de Dukes (Dukes, 1932), confinados à parede retal e sem metástases linfáticas, usualmente têm um bom prognóstico, com sobrevida em 5 anos de 90% a 100%. No estágio B, entretanto, com tumores estendendo-se além da parede retal e sem metástases linfáticas, a sobrevida esperada em 5 anos é de 75% a 85%. No estágio C, em que aparecem metástases linfáticas, a sobrevida mediana esperada em 5 anos fica entre 30% e 40%. Pacientes com metástases distantes, no estágio D de Dukes-Turnbull (Turnbull *et al.*, 1967), têm sobrevida mediana esperada em 5 anos de somente 5%. A sobrevida mediana esperada em 5 anos é de 51% (Hardy *et al.*, 2001).

1.2.3 Fatores laboratoriais e outros

Outras maneiras de se tentar prognosticar o câncer de reto, com intenção de melhor selecionar os pacientes que poderiam se beneficiar com tratamentos complementares adjuvantes radio-quimioterápicos para obtenção de resultados mais favoráveis, foram testadas. A dosagem sérica pré-operatória do antígeno carcinoembrionário (CEA) foi avaliada para esta finalidade. Altos valores de referência do CEA podem estar relacionados com possibilidades de recorrência da doença (Wanebo *et al.*, 1978) ou com doença oculta não detectada (Wiggers *et al.*, 1988; Wiratkapun *et al.*, 2001). No entanto, os valores pré-operatórios parecem estar mais diretamente relacionados em refletir o estadiamento clínico-patológico de extensão da doença, sendo seu valor prognóstico pré-operatório

independente contestado (Moertel *et al.*, 1986). Esta relação do CEA pré-operatório e o estágio de disseminação do CCR foram encontrados por Gus e colaboradores (Gus *et al.*, 1984) tendo seus níveis proporcionalmente elevados de acordo com os estágios de Dukes-Turnbull (Turnbull *et al.*, 1967).

Novos fatores estão sendo estudados quanto ao seu poder prognóstico no CCR, com resultados ainda incertos no momento, mostrando mais tendências do que certezas e oferecendo perspectivas futuras promissoras. Incluem-se: a medição da atividade proliferativa e índices de apoptose de células tumorais; detecção de antígenos de membrana celular e ativadores e inibidores do plasminogênio. Também há interesse na busca de fatores interligados às anormalidades moleculares genéticas, como detecção de oncogenes, genes supressores de tumor e genes reguladores da estabilidade genômica (Ratto *et al.*, 1998).

As alterações genéticas têm sido reconhecidas em muitos tumores malignos e têm um modelo proposto para o CCR (Fearon & Vogelstein, 1990), com algumas mutações identificadas (Chen *et al.*, 1997). Algumas alterações numéricas de cromossomos determinam mudanças no conteúdo do DNA celular e podem ser reconhecidas com o auxílio da citometria de imagem. A citometria de imagem do DNA tem mostrado associação com a agressividade biológica das metástases hepáticas colorretais e de utilidade como fator de prognóstico após sua ressecção (Riesener *et al.*, 1999). O estudo do grau de ploidia e outros parâmetros citométricos de imagem do DNA mostraram utilidade no prognóstico do CCR (Sampedro *et al.*, 1996; Azúa *et al.*, 1999).

A morfometria nuclear associou a alteração da forma e tamanho dos núcleos de tumores colorretais com a sobrevida dos pacientes (Fernández-López *et al.*, 1999; Rosito *et al.*, 2003) e com pior prognóstico, como fator independente do sexo, idade, grau histológico e classificação de Dukes (Mitmaker *et al.*, 1991).

Os eventos nucleares da transformação neoplásica são de importância ímpar na modificação das estruturas celulares que ocorrem no adenocarcinoma de reto e as pesquisas atuais se concentram em tentar desvendá-los.

1.3 Genética Molecular do Câncer

A susceptibilidade ao câncer pode ser atribuída a fatores genéticos e sob este aspecto existem dois tipos principais de câncer: o familiar ou hereditário e o não-hereditário. No

primeiro caso o indivíduo herda um alelo (de um gene supressor de tumor) mutado de um dos pais e um alelo normal do outro, tornando-se mais predisposto, já que basta ocorrer uma mutação que inative o alelo ainda normal em um determinado tecido para que o câncer se desenvolva no local. No câncer não-hereditário, para que a doença se desenvolva é necessário que ambos os alelos (normais) sejam mutacionalmente ou epigeneticamente inativados em uma mesma célula somática, o que é mais difícil, uma vez que as mutações são eventos raros. Apesar de haver genes que atuam de forma crítica para a ocorrência do câncer, sabe-se que, via de regra, a formação de um tumor é resultado de um acúmulo de mutações, não podendo ser atribuído exclusivamente a uma única alteração em um determinado gene (Huang *et al.*, 1997).

Há dois tipos principais de mutação que estão diretamente envolvidos no desenvolvimento do câncer. Um tipo altera proteínas codificadas pelos genes que regulam a entrada da célula no ciclo de divisão celular, os proto-oncogenes (normal). A ativação destes em oncogenes (“genes do câncer”) determina a divisão contínua e desregulada da célula e constitui uma mutação dominante. O outro tipo é determinante da maioria dos cânceres hereditários e consiste na inativação de genes supressores de tumor, apresentando caráter recessivo (Alberts *et al.*, 2002). Além destes, mutações em genes de reparo do DNA também têm importante contribuição na etiologia de determinados tipos de câncer.

1.4 Genética do Câncer Colorretal

A genética molecular dos carcinomas colorretais é a melhor compreendida dentre as neoplasias humanas (Fujiwara *et al.*, 1998). Os modelos atuais de carcinogênese são baseados em evidências experimentais de que o acúmulo de mutações leva à alteração de genes específicos (oncogenes, genes supressores de tumor e outros genes envolvidos na regulação da proliferação e crescimento celular), resultando em expansão clonal neoplásica (Fearon & Vogelstein, 1990; Cravo *et al.*, 1999).

O câncer colorretal se desenvolve através de um processo com estágios sequenciais reconhecidos ao nível histopatológico pela progressão da mucosa normal para um carcinoma invasivo (seqüência adenoma-carcinoma). Na maioria dos carcinomas colorretais, a inativação do gene *APC* (“*adenomatous polyposis coli*”) inicia o processo levando a uma displasia, em geral na forma de adenoma. A partir daí, à medida que mutações adicionais se acumulam em oncogenes, incluindo *ras* e genes supressores de

tumor nos cromossomos 18q (*DCC*, *SMAD2*, *SMAD4*) e 17q (*p53*) ocorre progressão de adenoma inicial para adenoma intermediário e por fim, para o carcinoma. Estas alterações são encontradas em várias combinações diferentes em cânceres colorretais (Fujiwara *et al.*, 1998).

No entanto, o número de modificações em oncogenes e genes supressores de tumor é muito elevado para ser atribuído apenas à taxa de mutação espontânea. Desta forma, acredita-se que um fenótipo geneticamente instável, que leve ao aumento da taxa de mutação espontânea, seja necessário para o processo de desenvolvimento do tumor (Loeb, 1991; Cravo *et al.*, 1999; Markowitz, 1999).

Sendo assim, duas vias aparentemente distintas de instabilidade genômica podem ser identificadas. A primeira e mais comum, é caracterizada pela inativação seqüencial de genes supressores de tumor (*APC*, *p53*, *DCC*, *SMAD2* e *SMAD4*). Os tumores gerados através desta via “supressora” apresentam instabilidade cromossômica (CIN) com freqüentes anormalidades citogenéticas e perdas alélicas. O mecanismo preciso que direciona o processo de CIN não está bem esclarecido (Goel *et al.*, 2003). Enquanto mutações em oncogenes são geralmente eventos únicos dominantes, a inativação de genes supressores de tumor é dependente da perda funcional de ambas as cópias dos genes relevantes. Enquanto a primeira das duas perdas ocorre mais freqüentemente por mutações gênicas, a segunda delas é mais freqüentemente um evento cromossômico, geralmente uma deleção. Como a deleção geralmente envolve a perda simultânea de *loci* gênicos próximos ao supressor de tumor – e ocasionalmente perda de todo o cromossomo ou de um braço cromossômico – estes eventos são fortemente associados com a perda de heterozigidade (*Loss of Heterozygosity* - LOH) em polimorfismos hipervariáveis (minissatélites e microssatélites) localizados na região deletada (Fuzikawa *et al.*, 1997).

Uma segunda via é característica de tumores em pacientes com câncer colorretal hereditário não-polipomatoso (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* - HNPCC), que é uma condição autossômica dominante que contribui para 2 a 3% de todos os carcinomas colorretais (Vide ANEXO I). A característica desta via “mutante” alternativa é a instabilidade de microssatélites (IMS) difundida pelo genoma. Estudos recentes indicam que a inativação de *hMLH1* por hipermetilação de seu promotor também produz o fenótipo de alta instabilidade em CCRs esporádicos e é responsável pela maioria, senão todos, os casos de CCRs esporádicos com este fenótipo (Goel *et al.*, 2003).

Carcinomas colorretais originados pela via ‘supressora’ e pela via ‘mutante’ (figura 2) diferem em várias características patológicas. Tumores com alta instabilidade de microssatélites (*microsatellite instability high (MSI-H) – IMS-H*), tanto esporádico como associado a HNPCC, desenvolvem-se mais em cólon proximal, demonstram pouca diferenciação celular, são mucoprodutores e apresentam mais infiltração linfocitária do que tumores com baixa instabilidade (*microsatellite instability low (MSI-L) – IMS-L*) ou estáveis (*microsatellite stability – MSS*). Além disso, pacientes com tumores IMS-H apresentam uma sobrevida mais favorável do que pacientes com CCR IMS-L/MSS (Goel *et al.*, 2003; Raut *et al.*, 2004; Popat *et al.*, 2005).

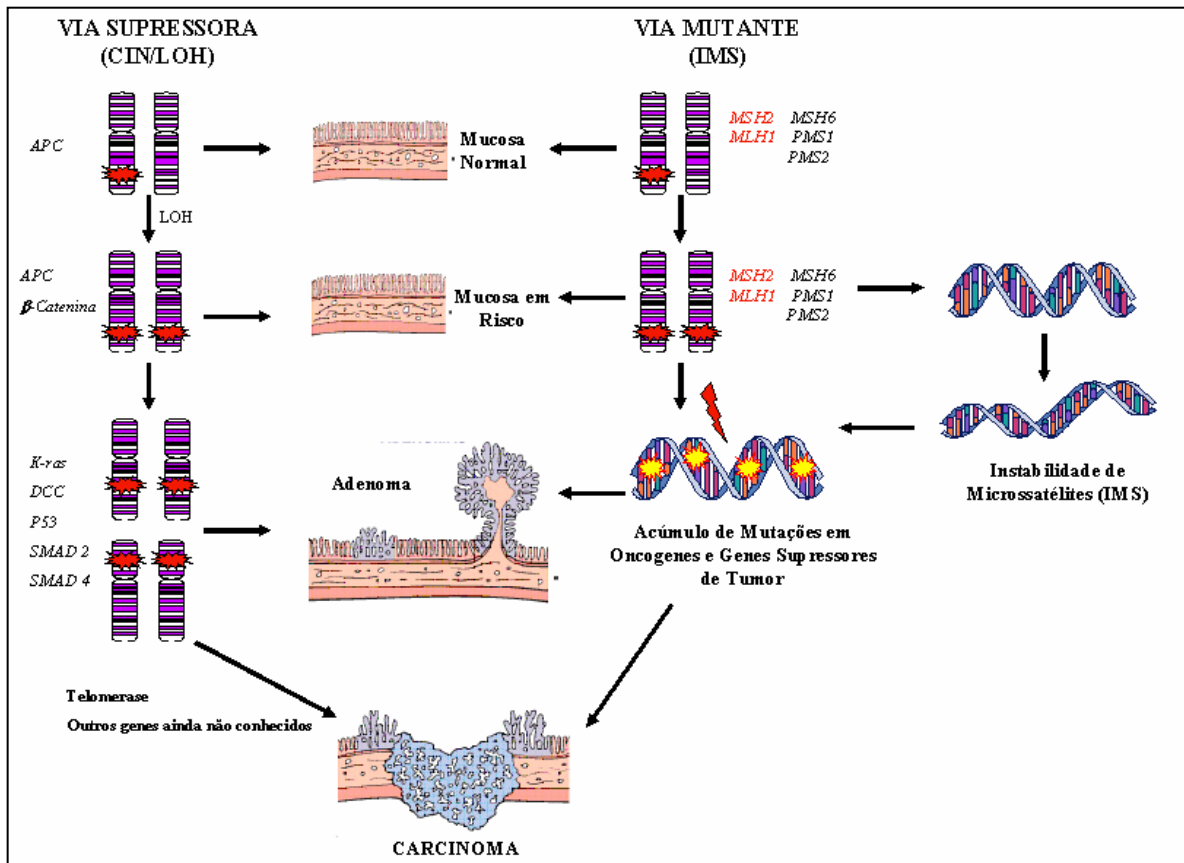


Figura 2. Vias de Carcinogênese: Via Supressora e Via Mutante

Embora estes dois mecanismos de instabilidade genômica possam ser distinguidos por suas características moleculares, evidências sugerem que possa haver algum grau de sobreposição entre eles. Por exemplo, a LOH foi descrita como um mecanismo ocasional de inativação do alelo selvagem de *hMLH1* em alguns tumores IMS-H. Também é possível

que tumores colorretais sejam iniciados por mecanismos que não envolvam IMS ou CIN persistente. Por exemplo, há evidências que indicam que a modificação epigenética pela hipermetilação de regiões promotoras de genes supressores de tumor chave pode desempenhar papel crucial na evolução e progressão de muitos tumores colorretais. Estes dados sugerem que tumores originados pela metilação de promotor não podem progredir independentemente pela via IMS ou CIN. Estes achados também sugerem que a IMS e a CIN podem não representar vias de carcinogênese completamente distintas e que múltiplos mecanismos etiológicos podem coexistir em alguns tumores, desde que as combinações propiciem vantagens adicionais de crescimento (Goel *et al.*, 2003).

Em estados normais, a taxa de mutação cromossômica é maior que a gênica. Portanto, esperam-se encontrar freqüentes deleções cromossômicas em tumores com um sistema de reparo intacto, seguindo a via clássica (supressora) de tumorigênese. Na via “mutante”, as taxas de mutação gênica estão aumentadas em 100 ou 1000 vezes, sendo assim mais provável de ocorrer do que alterações cromossômicas que levem à LOH. Entretanto, não há razão para que ambas, IMS e LOH, não possam ocorrer simultaneamente (Fuzikawa *et al.*, 1997).

1.4.1 Oncogenes e Genes Supressores de Tumor envolvidos no CCR

Duas classes de genes são críticas para o desenvolvimento do câncer: os oncogenes e os genes supressores de tumor. Os primeiros são genes envolvidos na regulação positiva da proliferação celular e pertencem a famílias de genes envolvidos em transdução de sinais, fatores de transcrição, genes anti-apoptóticos entre outros. Mutações de ganho de função em oncogenes levam à proliferação celular indiscriminada, mesmo na ausência de estímulo. Estas mutações são dominantes, ou seja, a mutação em apenas um dos alelos é suficiente para levar ao descontrole da proliferação celular (Alberts *et al.*, 2002).

Os genes supressores de tumor são reguladores negativos da proliferação celular e incluem genes pro-apoptóticos, fatores de transcrição entre outros. Mutações de perda de função nestes genes levam ao descontrole do crescimento celular devido à ausência de inibição da proliferação celular. Estas mutações são recessivas, ou seja, é necessário que ambos os alelos estejam mutados para que haja o descontrole do crescimento celular (Grady & Markowitz, 2002).

As etapas de progressão tumoral podem ser correlacionadas com mutações ativadoras de oncogenes e inativadoras de genes supressores de tumor específicos. Combinações de diferentes mutações em diferentes genes são encontradas em vários tipos de câncer e mesmo em pacientes com o mesmo tipo de câncer, o que reflete a forma aleatória em que as mutações ocorrem (Alberts *et al.*, 2002; Grady & Markowitz, 2002).

No caso do câncer colorretal especificamente, a seqüência de eventos mutacionais que ocorre durante a carcinogênese está bem estabelecida. Na maioria dos CCR a inativação do gene *APC* (“*adenomatous polyposis coli*”; localizado no braço longo do cromossomo 5, 5q) inicia o processo levando a uma displasia, em geral na forma de adenoma. A partir daí, à medida que mutações adicionais se acumulam em oncogenes, incluindo genes da família *ras* e genes supressores de tumor localizados nos cromossomos 18q (*DCC*, *Smad2*, *Smad4*) e 17q (*Tp53*) ocorre a progressão de adenoma inicial para adenoma intermediário e por fim, para o carcinoma. Estas alterações são encontradas em várias combinações diferentes em tumores colorretais (Fujiwara *et al.*, 1998). A figura 1 demonstra a cascata de eventos mutacionais envolvidos na carcinogênese colorretal.

1.4.2 Genes de Reparo do DNA envolvidos no CCR

O sistema de reparo de malpareamento (MMR) consiste em um complexo de proteínas que reconhecem e reparam o malpareamento de bases que ocorre durante a replicação do DNA. A instabilidade de microssatélites (IMS) ocorre como consequência da inativação deste sistema de reparo e é reconhecida por mutações de quadro de leitura em repetições microssatélites localizadas ao longo do genoma. A inativação do sistema MMR devido a defeitos genéticos germinativos é a causa do Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipomatoso (HNPCC) (Peltomäki, 2001; Grady & Markowitz, 2002; de la Chapelle, 2004).

Além disso, a inativação somática do sistema MMR é responsável por aproximadamente 15% dos cânceres colorretais (CCR) esporádicos. Em ambos os casos o tumor resultante apresenta o fenótipo IMS (Peltomäki, 2001; Grady & Markowitz, 2002; Ishikubo *et al.*, 2004).

Alterações em pelo menos 6 genes que codificam proteínas envolvidas no sistema MMR têm sido identificadas em tumores colorretais esporádicos e HNPCC. Estes genes incluem *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hMLH1*, *hPMS1* e *hPMS2*. Estima-se que CCRs

associados ao HNPCC constituem cerca de 3% a 6% de todos os CCRs e mutações germinativas em *hMSH2* e *hMLH1* têm sido encontradas em 45%-70% das famílias que apresentam critérios clínicos de HNPCC. Como a inativação de ambos os alelos de *hMSH2* ou *hMLH1* é necessária para gerar IMS, os tumores que surgem nas famílias com HNPCC freqüentemente apresentam LOH nos *loci* destes genes. Alternativamente, estes tumores podem apresentar mutação somática do alelo selvagem (Grady & Markowitz, 2002).

Estudos dos 15% de CCR esporádicos que apresentam IMS demonstram que estes tumores surgem como resultado de inativação somática de genes MMR e não é devido a mutações germinativas de baixa penetrância em genes MMR. Embora mutações somáticas ocasionais de *hMSH2* e *hMLH1* sejam detectadas, o mecanismo predominante de inativação do sistema MMR é o silenciamento epigenético do promotor de *hMLH1* devido à metilação anormal do mesmo (Grady & Markowitz, 2002; Goel *et al.*, 2003; Ishikubo *et al.*, 2004).

No processo de replicação, os reconhecimentos de malpareamento base-base e alças de inserção/deleção são realizados por um heterodímero formado por hMSH2 e hMSH6 ou hMSH2 e hMSH3 (figura 3). O heterodímero hMSH2-hMSH3 reconhece preferencialmente alças de inserção/deleção e, portanto, não é capaz de compensar a perda de hMSH6. Conseqüentemente, tumores que surgem pela perda de função de hMSH6 apresentam IMS apenas em repetições mononucleotídicas. As proteínas hMLH1, hPMS2 e hPMS1 parecem atuar primariamente no reparo de malpareamentos base-base e alças de inserção/deleção. O heterodímero hMLH1-hPMS2 atua como um “facilitador molecular” e está envolvido no reparo de malpareamento em conjunto com a DNA polimerase δ , fatores de transcrição (PCNA, RPA, RFC), *exo/endonucleases* 5'-3' EXO1 e FEN1, uma *exonuclease* 3'-5' indefinida e helicases (Alberts *et al.*, 2002; Grady & Markowitz, 2002).

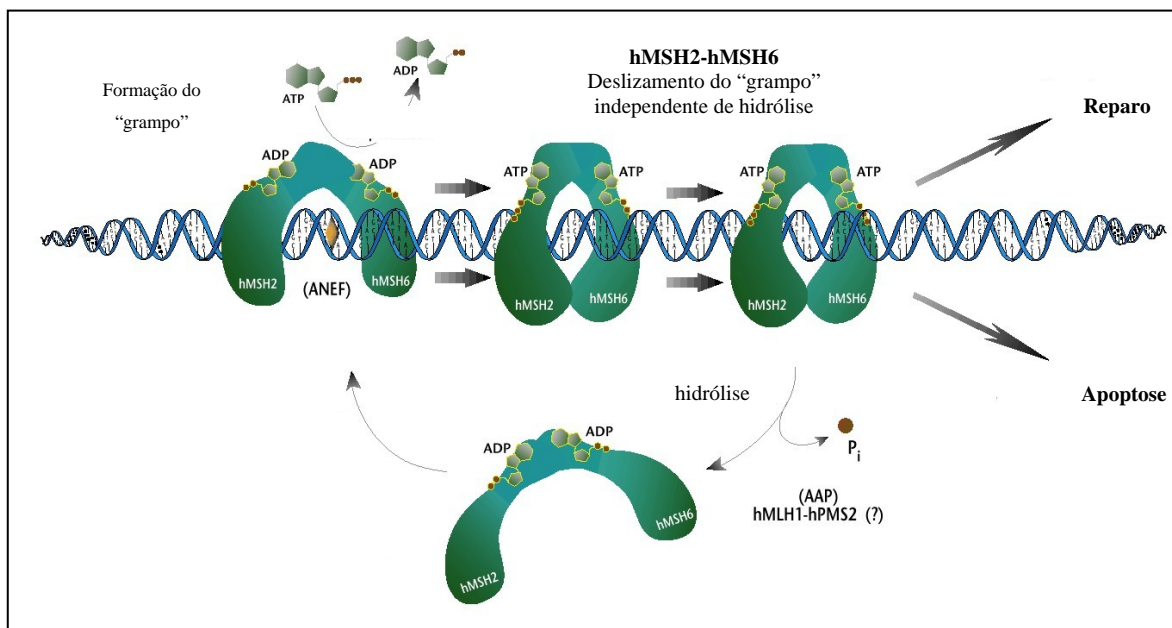


Figura 3. Sistema de Reparo de Malpareamento (MMR) (adaptado de www.kimmelcancercenter.org). Heterodímero formado por hMSH2 e hMSH6 desliza sobre a fita de DNA corrigindo erros de pareamento. Em condições normais, se o reparo não é bem sucedido, a célula sofre apoptose.

A IMS, que resulta da perda de atividade do sistema MMR, afeta predominantemente microssatélites mono-, di- e trinucleotídicos. Entretanto, linhagens celulares destes tumores também apresentam um aumento de mais de 1000 vezes na taxa de mutação em seqüências de gene codificantes. Genes que possuem tais repetições microssatélites em região codificadora parecem ser alvos relevantes para carcinogênese. De fato, freqüentemente, muitos genes que contêm repetições tipo microssatélites estão mutadas em CCRs IMS+ (Grady & Markowitz, 2002; Goel *et al.*, 2003).

Tumores que apresentam múltiplos genes com mutações de inserção/deleção em microssatélites têm um fenótipo microssatélite mutante. Esta via de carcinogênese parece ser distinta da via observada em tumores estáveis. O gene mais freqüentemente mutado nesta via é o gene supressor tumoral *TGFBR2* (receptor de TGF- β tipo II). Outros genes menos freqüentemente afetados incluem o receptor de IGF2; BAX e caspase 5, proteínas que regulam a apoptose; E2F4 e TCF4, fatores de transcrição; MSH3 e MSH6, proteínas de reparo de malpareamento do DNA; RIZ, gene que codifica uma proteína com motivo dedo de zinco que interage com a proteína do retinoblastoma; e CDX2, um fator homeobox intestinal (Fuzikawa *et al.*, 1997; Grady & Markowitz, 2002; Goel *et al.*, 2003; Fernández-Peralta *et al.*, 2005).

A IMS e as subseqüentes mutações em genes alvo parecem ocorrer no decorrer da progressão adenoma-carcinoma. Estudos preliminares têm mostrado que estes eventos ocorrem em fases distintas da progressão tumoral. Portanto, a IMS cria um estado favorável para o acúmulo de mutações em genes vulneráveis que controlam o crescimento e a morte celular e estas alterações levam por fim ao desenvolvimento do CCR (Grady & Markowitz, 2002).

1.4.3 Instabilidade de Microssatélites (IMS)

Um mecanismo de instabilidade genética, que tem sido encontrado em neoplasias de diferentes órgãos, consiste em alterações no comprimento de seqüências repetitivas (microssatélites mono- e dinucleotídicos) existentes ao longo de todo o genoma (Aaltonen *et al.*, 1998). Estas alterações de comprimento são devidas a inserções ou deleções de unidades de repetição em microssatélites no tumor, quando comparado com o tecido normal (Lawes *et al.*, 2003).

Este tipo de instabilidade, chamada instabilidade de microssatélites (IMS), é consequência característica de mutações em genes de reparo de malpareamento de DNA (*hMSH2* e *hMLH1*, principalmente) (figura 4), que resultam em falha na correção dos erros de replicação (RER) (revisto em Percesepe *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 2000; Colombino *et al.*, 2002).

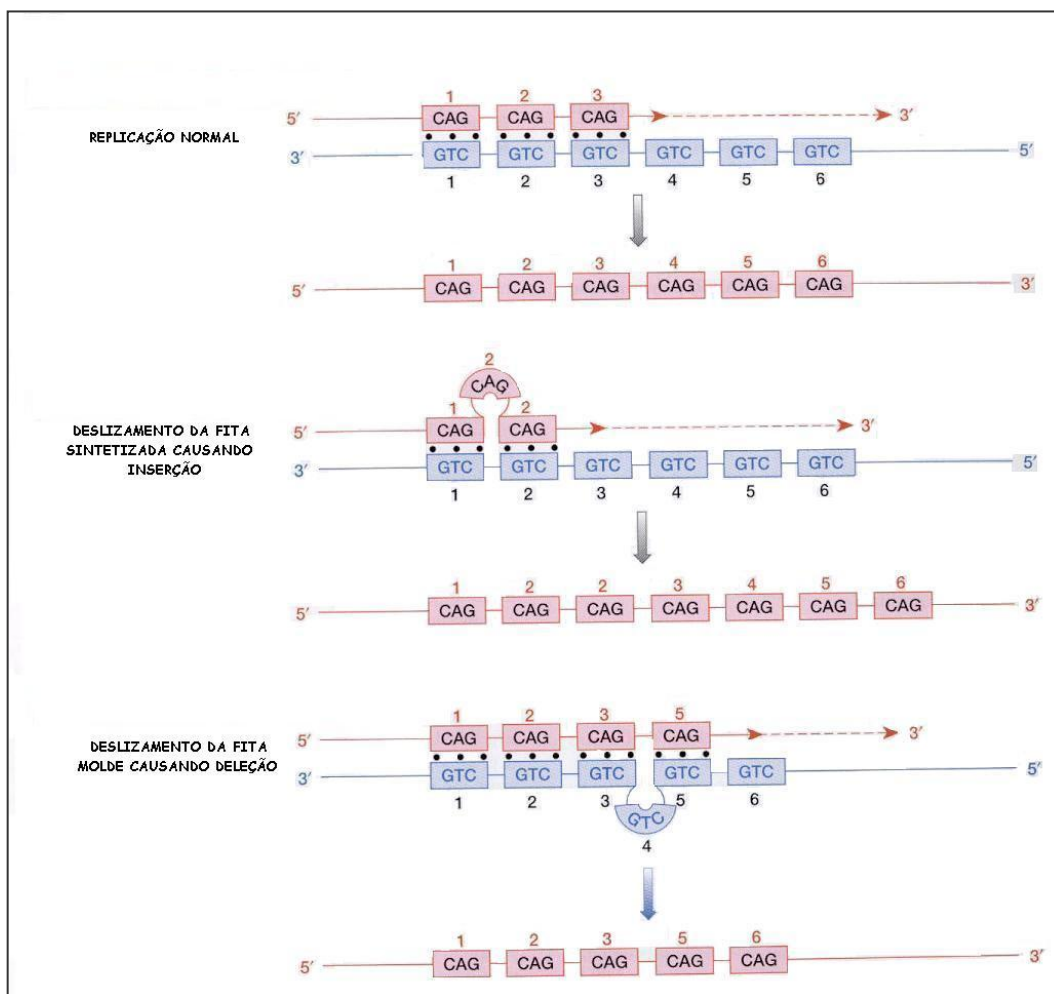


Figura 4. Instabilidade de microssatélites (adaptado de Strachan & Read, 2004). O deslizamento da fita que está sendo sintetizada leva a um aumento do número de repetições (no caso, CAG) na “fita-filha”. Se o deslizamento ocorre na fita molde, a “fita-filha” apresentará um número menor de repetições.

A IMS pode aparecer em três situações diferentes resultando em um tumor com fenótipo IMS⁺. A primeira compreende tumores colorretais esporádicos, ou seja, que acometem pacientes sem história familiar significativa de CCR. Este tipo de CCR esporádico (IMS⁺) geralmente ocorre no cólon ascendente, próximo ao ângulo hepático, apresenta um prognóstico mais favorável do que os tumores IMS⁻ e tende a ser diplóide, ou seja, não apresenta aneuploidia (Liu *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2000; Colombino *et al.*, 2002).

A segunda situação em que tumores podem ser IMS⁺ é a de tumores (cólon, endométrio, ovário entre outros) que constituem a síndrome do câncer colorretal

hereditário não-polipomatoso (HNPCC). Assim como no CCR esporádico, os indivíduos afetados por HNPCC, também apresentam uma tendência para o desenvolvimento de tumores em cólon ascendente e estes tumores geralmente são diplóides e IMS+ (Peltomäki, 2001; de la Chapelle, 2004).

Já o terceiro grupo, inclui vários tipos de tumores como de pulmão, de mama e de pâncreas. Desses três grupos, o segundo (HNPCC) é onde se encontra a maior magnitude e prevalência de IMS, que está em torno de 90%, enquanto no CCR esporádico a IMS é observada em cerca de 20% dos casos (Liu *et al.*, 1995; Colombino *et al.*, 2002). No terceiro grupo a prevalência de IMS é variada, sendo de 0 a 30% para câncer de mama, 68% em alguns tipos de câncer de pulmão e 67% para o câncer pancreático (Lawes *et al.*, 2003).

Embora a IMS tenha sido identificada em uma variedade de tumores humanos, é difícil comparar sua prevalência. Até recentemente, não havia nenhuma definição padrão para tumores IMS positivos. Devido ao grande número de regiões microssatélites no genoma humano, a incidência de IMS varia dependendo de que *loci* estão sendo investigados. Várias combinações de repetições mono-, di-, tri-, tetra- e pentanucleotídicas utilizadas para determinação de IMS influenciam os resultados obtidos. Também existe confusão a cerca do número ideal de *loci* que deve ser investigado e qual proporção deles deve apresentar instabilidade para se classificar um tumor como IMS positivo. De 1% a 3% dos tumores gástricos e colorretais apresentam algum grau de IMS quando mais de 100 *loci* são analisados. Por outro lado, a IMS pode ser identificada em um único *locus* em 33% dos CCR com um sistema MMR funcional. A restrição da classificação de IMS positivo àqueles com IMS em mais de 15% dos *loci* investigados reduz a chance de classificação errônea para 1 em 1000 (Lawes *et al.*, 2003).

Com a descoberta de tumores colorretais com instabilidade de microssatélites e da hipótese de que estes pudessem ter um prognóstico diferente dos tumores IMS-, muitos microssatélites começaram a serem estudados através de diferentes protocolos. No entanto, em 1998, em um “workshop” do Instituto Nacional do Câncer (NCI), que contou com a participação de pesquisadores de todo o mundo, em especial da Europa e dos EUA, desenvolveu-se um critério internacional para determinação de instabilidade de microssatélites em cânceres colorretais (Boland *et al.*, 1998). Dentre estes critérios, estabeleceu-se um painel mínimo de 5 marcadores para diagnosticar o fenótipo IMS+:

BAT25, BAT-26 (repetições mononucleotídicas), D5S346, D2S123 e D17S250 (repetições dinucleotídicas) (tabela 1). Utilizando este painel de referência, tumores com alto nível de instabilidade (IMS-H) são definidos pela presença de dois ou mais marcadores instáveis, enquanto tumores com baixo nível de instabilidade (IMS-L) são definidos pela ocorrência de instabilidade em apenas um dos marcadores. Tumores estáveis (MSS) não apresentam instabilidade em nenhum dos marcadores analisados. Os protocolos adotados como padrão neste “workshop”, para detecção de instabilidade, são os descritos por Dietmeier *et al.* (1997). Além do painel de referência que inclui os 5 marcadores, há marcadores alternativos sugeridos pelo ICG-HNPCC (grupo colaborativo internacional em HNPCC), que incluem BAT-40, MYC, BAT34C4, TGFβ-RII e ACTC.

Tabela 1. Características dos marcadores do painel de referência para detecção de instabilidade de microssatélites (Dietmeier *et al.*, 1997).

Nome (<i>locus</i>)	Localização Cromossômica	Motivo de Repetição
Bat 25 (c-kit)	4q12	TTTT.T.TTTT.(T) ₇ .A(T) ₂₅
Bat 26 (hMSH2)	2p	(T) ₅(A) ₂₆
D2S123 (AFM093xh3)	2p16	(CA) ₁₃ TA(CA) ₁₅ (T/GA) ₇
D5S346 (APC)	5q21/22	(CA) ₂₆
D17S250 (Mfd15CA)	17q11.2-q12	(TA) ₇(CA) ₂₄

Abreviações: T - timina; C – citosina; A – adenina; G - guanina; os pontos representam o número de bases nitrogenadas variáveis entre as repetições; os números subscritos representam o número de repetições.

A identificação de IMS-L pode esclarecer a verdadeira natureza destes tumores. Biológica e histologicamente eles são similares aos tumores MSS, entretanto, apresentam uma prevalência diferente de algumas mutações genéticas, como em *K-ras* e pode constituir um subgrupo de tumores completamente diferente (Lawes *et al.*, 2003).

Os critérios do NCI estão especificamente focados na identificação de CCR com mutações em *hMLH1* ou *hMSH2*, que constituem mais de 90% dos tumores IMS positivos e podem ser menos eficazes na detecção de tumores com mutações em outros genes de reparo de malpareamento. Mutações no gene *hMSH6* podem levar ao desenvolvimento de tumores com IMS-L e não são consideradas nos critérios do NCI (Lawes *et al.*, 2003).

IMS-H é observada em mais de 90% de HNPCC e em 15% de CCR esporádico. Devido à prevalência dos tumores colorretais esporádicos, a maioria dos tumores IMS positivos não é de pacientes com HNPCC. Os tumores IMS positivos, tanto HNPCC como esporádicos, apresentam características histológicas e biológicas similares. Eles ocorrem em idade mais precoce do que os tumores IMS-L ou MSS e têm menor “incidência de doença nodal” ou metástase à distância. Os tumores IMS-H ocorrem mais frequentemente no cólon ascendente com 2/3 de HNPCC e mais de 90% esporádicos ocorrendo nas proximidades do ângulo esplênico. Eles são pouco diferenciados, mucinosos ou apresentam células em anel de sinete, além de frequentemente exibirem extensa infiltração linfocitária, predominantemente de células T-citotóxicas e acúmulo de células B e T ao redor do tumor, semelhante ao que ocorre na doença de Crohn (Lawes *et al.*, 2003).

Muitas teorias têm sido criadas para explicar o fato de que alguns tumores IMS positivos apresentam um melhor prognóstico, a despeito de suas características histológicas “ruins”. Uma teoria sugere que a perda de genes como *DCC/18q*, *17p/p53* e *K-ras* confere um pior prognóstico. Como os tumores IMS positivos raramente demonstram perda de material genético (LOH), estes genes são raramente afetados e pode ser a presença normal destes genes, mais do que a instabilidade, que está relacionada com um melhor prognóstico. Outra teoria sugere que o acúmulo de alterações genéticas nos tumores IMS positivos levam à expressão de proteínas aberrantes. Estas proteínas são reconhecidas pelo sistema imunológico do paciente, levando à destruição das células tumorais. Entretanto, outros autores demonstraram que células com IMS não expressam β_2 microglobulina, um componente vital na citotoxicidade mediada por célula T HLA classe I, sugerindo que células IMS positivas podem escapar da destruição mediada pelo sistema imune. Uma terceira teoria se baseia diretamente no sistema MMR defeituoso. Como as mutações não são reparadas quando o DNA é replicado, a carga mutacional na célula aumenta a cada divisão celular. Isto resulta no acúmulo massivo de mutações que torna a célula incapaz de realizar suas funções básicas, necessárias para a manutenção da célula, o que leva diretamente à sua morte, ou seja, essas células se dividem até causarem sua própria morte (Lawes *et al.*, 2003).

Instabilidade de microssatélites em outros tipos de câncer

A incidência de IMS em câncer de endométrio em pacientes sem mutação germinativa em genes MMR varia de 9% a 45%. A incidência de IMS descrita para carcinoma de ovário é de 3% a 53%, dependendo do tipo e do número de microssatélites analisados (Lawes *et al.*, 2003).

Tumores gástricos na população japonesa apresentam uma incidência de IMS-L que varia de 16% a 39%, caindo para 5% para tumores IMS-H, o que é similar ao descrito para populações ocidentais que apresentam 24% a 84% de IMS-L e 2% a 15% de IMS-H (Lawes *et al.*, 2003).

Em câncer de próstata, a incidência de IMS varia de 2% a 65% e em câncer de bexiga, de 0% a 8%. IMS-L ocorre em 2 % dos carcinomas escamosos do esôfago e em 22% dos adenocarcinomas, bem como em 7% daqueles com esôfago de Barrett sem carcinoma. Isto sugere que a IMS é um evento genético precoce na carcinogênese esofágica e pode ser útil na identificação de pacientes em risco (Lawes *et al.*, 2003).

A incidência de IMS em tumores pancreáticos pode ser maior que 67% embora menos de 4% apresente IMS-H. Já a incidência em tumores de cabeça e pescoço varia de 2% a 30%. A IMS é encontrada em mais de 15% das lesões displásicas de cabeça e pescoço, sugerindo que esta pode ser um marcador útil para detectar pacientes em risco (Lawes *et al.*, 2003).

A informação sobre IMS em câncer de mama é confusa, mas a incidência descrita é de 0% a 30%, com menos de 10% apresentando IMS-H. A IMS não é observada em carcinomas de pequenas células do pulmão, mas é observada em mais de 68% dos carcinomas não de pequenas células do pulmão (Lawes *et al.*, 2003).

Existem poucos estudos na investigação de IMS em sarcomas e geralmente consistem de tipos de tumores similares. Em um estudo com 39 pacientes japoneses apenas 3 apresentaram IMS-L. Embora a IMS em um ou mais *loci* tenha sido identificada em 44% dos pacientes, a IMS-H é incomum. Isto sugere que a IMS não tem um papel importante na patogênese de sarcomas e pode representar um fenômeno secundário (Lawes *et al.*, 2003).

A incidência de IMS descrita para melanomas é de 20% a 25%, com um estudo demonstrando IMS-H em apenas 5%. Alguns autores descrevem uma incidência similar de IMS-L em melanoma maligno, nevo displásico e nevo comum, e sugerem que a IMS pode

ser um fator preditivo útil de progressão maligna. Não existem evidências que sugiram uma correlação entre a IMS e o prognóstico ou a espessura do melanoma.

A IMS foi observada em 89% dos tumores de pacientes que desenvolveram múltiplos tumores, comparado com 11% daqueles que desenvolveram apenas um tumor, embora tumores IMS-L tenham sido incluídos. Alguns autores sugerem que carcinomas IMS-H do cólon descendente (esquerdo) predizem fortemente o desenvolvimento de doença metacrônica (Lawes *et al.*, 2003).

1.4.4 Mutações em genes da família *ras*

Além da instabilidade genética, mutações em genes supressores de tumor e oncogenes também são eventos cruciais no processo de carcinogênese. Dentre estes genes, o oncogene *c-K-ras 2* apresenta-se mutado em alta porcentagem em carcinomas colorretais e apresenta importante papel na patogênese da doença (Albanese *et al.*, 1997).

Os genes da família *ras* codificam proteínas monoméricas de 21 kDa (figura 5) que são capazes de se ligar a moléculas de GTP e hidrolisá-las, agindo como mediadoras na transdução de sinais extracelulares para o citoplasma e núcleo e controlando assim, várias rotas moleculares que afetam crescimento celular, diferenciação celular e apoptose (Ellis & Clark, 2000; Alberts *et al.*, 2002).

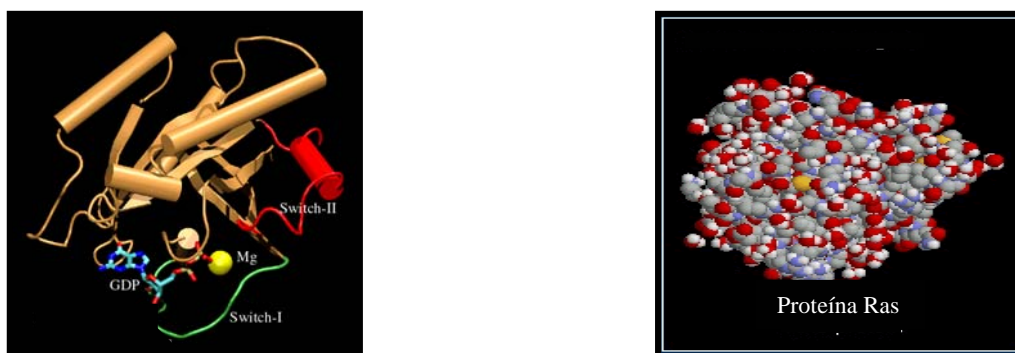


Figura 5. Estrutura tridimensional da proteína *ras* (www.ks.uiuc.edu/research/vmd/gallery).

Os três diferentes tipos de proteínas (*K-ras*, *H-ras* e *N-ras*) dessa família apresentam cerca de 90% de homologia e cada uma é preferencialmente expressa em tecidos específicos. Mutações ativadoras dos genes da família *ras*, que levam à formação de proteínas constitutivamente ativas, disparando a transdução de sinais proliferativos e/ou de diferenciação mesmo na ausência de sinais extracelulares, podem ser observadas em 30% dos tumores humanos em geral e mutações especificamente em *K-ras* estão presentes

em 40% dos CCR. As mutações em genes da família *ras*, *in vivo*, não são igualmente distribuídas entre as suas isoformas, ao contrário, a vasta maioria das mutações encontradas em tumores humanos ocorrem em *K-ras*, sendo raras as mutações em *H-ras*. As razões para esta especificidade das mutações em genes da família *ras* ainda não foram bem esclarecidas (Bos *et al.*, 1987; Bos, 1988; Fearon & Vogelstein, 1990; Olschwang *et al.*, 1997; Ellis & Clark, 2000).

A grande maioria das mutações em *K-ras* é encontrada nos códons 12 e 13 do gene. Estas mutações são quase todas mutações de ponto e aparecem precocemente no processo de carcinogênese, principalmente entre os estágios de adenoma inicial e intermediário, mas mantendo-se constante em adenomas tardios e em carcinomas. Diferentes mutações podem conferir características distintas quanto à atividade proliferativa, independência de estímulos externos e estabilidade do genoma das células tumorais. Algumas mutações específicas dentre aquelas que ocorrem nos códons 12 e 13 parecem ter importante valor prognóstico no CCR (Albanese *et al.*, 1997; Russo *et al.*, 1998; Bazan *et al.*, 2002).

Mais de 80 mutações já foram identificadas, sendo 57% delas encontradas no códon 12 e 43% no códon 13. A mutação mais freqüente no códon 12, encontrada em 37% dos casos, é uma transição G→A, que leva à substituição do códon GGT pelo GAT. No códon 13, a mutação mais freqüente observada em 94% dos casos, também é uma transição G→A, que resulta na substituição do códon GGC pelo GAC. Análises da relação entre estes indicadores biomoleculares e dados clínicos, indicam que as mutações no códon 12 mostram-se associadas apenas com o histotipo produtor de muco, enquanto as mutações do códon 13 apresentam associação significativa com alguns dados clínicos, como estadiamento da doença e ocorrência de metástase para linfonodos. Assim, sugere-se que, principalmente as mutações no códon 13, parecem apresentar um potencial valor prognóstico no CCR (Bazan *et al.*, 2002). Neste trabalho, nós decidimos analisar as mutações do códon 12 por serem mais frequentes e por terem seu valor prognóstico menos esclarecido.

1.5 Assinatura Nuclear Digital

Fatores com valor prognóstico são de grande importância para o acompanhamento e manejo dos pacientes, bem como para o direcionamento de tratamentos mais eficazes.

Atualmente, os principais fatores prognósticos utilizados se baseiam em achados clínicos. No entanto, alterações morfométricas e densitométricas do tumor também têm sido correlacionadas com seu prognóstico. Entre estas, destaca-se a assinatura nuclear digital, um histograma representativo das características de textura da cromatina nuclear obtido por imagem computadorizada (Bartels *et al.*, 1999).

A assinatura digital é um conjunto de características densitométricas baseadas na distribuição da cromatina nuclear (Nowell, 1976), descritos em padrões de características numéricas definidas, das quais algumas são mais representativas (Wied *et al.*, 1968) (figuras 6, 7, 8, 9 e 10).

A análise de imagem digital permite mensurar características celulares e teciduais, como a forma e tamanho do núcleo, distribuição da cromatina e centenas de outras características. A quantificação em patologia acrescenta objetividade na avaliação de casos e utiliza métodos capazes de aumentar a capacidade diagnóstica, prognóstica e possivelmente terapêutica (Bartels, 1994).

Rosito *et al.* (2003), na análise de tumores de reto, descreveram 11 características nucleares da textura da cromatina nuclear mais relevantes: 1. Área do Núcleo; 2. Aspecto; 3. Densidade Média; 4. Circularidade Nuclear; 5. Densidade Óptica Total; 6. Dimensão Fractal; 7. Densidade Mínima; 8. Densidade Máxima; 9. Marginação ou Condensação; 10. Heterogeneidade de Densidade Óptica; 11. Granularidade Nuclear ou Compactação. Uma dentre as 11 características analisadas mostrou maior poder prognóstico – a densidade óptica total (DOT). Isto significa que pacientes no mesmo estágio da doença e com resultados diferentes da DOT podem ter um curso diferente daquele esperado e daquele que atualmente mais se utiliza como preditor da sobrevida. Nestas situações, a assinatura digital poderá ter importância para a indicação de tratamentos adjuvantes complementares ao cirúrgico em pacientes que hoje não seriam candidatos a este tipo de tratamento. Desta maneira, pacientes com fator de risco aumentado para pior prognóstico à assinatura digital, poderiam ser incluídos nos esquemas de tratamentos complementares, que hoje não os contemplam.

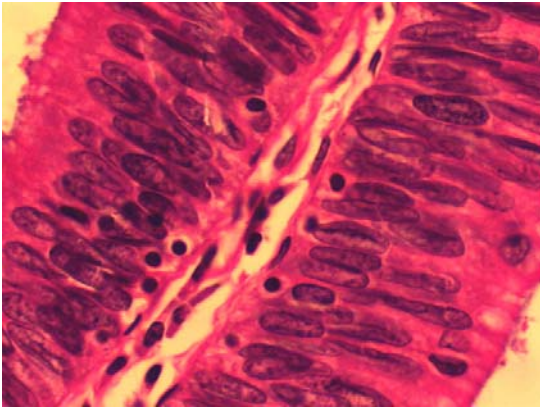


Figura 6. Imagem digital de adenocarcinoma de reto
Adaptado de Rosito et al., 2003

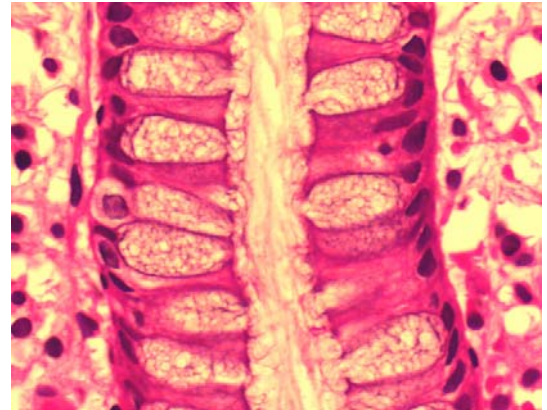


Figura 7. Imagem digital de reto normal
Adaptado de Rosito et al., 2003

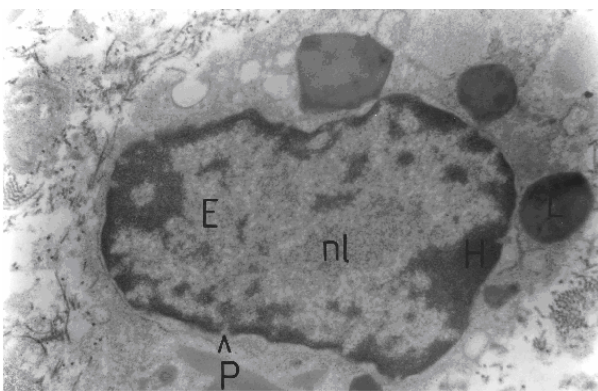


Figura 8. Eletromicrografia de núcleo de reto humano normal;
Aumento: aproximadamente 21.420X
E= Eucromatina; P= Poro nuclear; H= Heterocromatina;
L= Lisossomo; nl = Nucléolo
Adaptado de Rosito et al., 2003

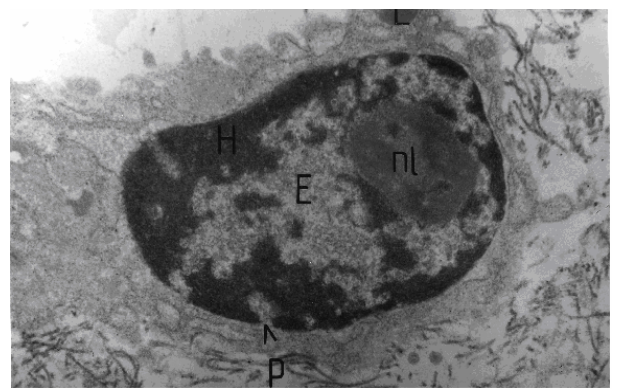


Figura 9. Eletromicrografia de núcleo de adenocarcinoma de reto humano;
Aumento: aproximadamente 21.420X
E= Eucromatina; P= Poro nuclear; H= Heterocromatina;
L= Lisossomo; nl = Nucléolo
Adaptado de Rosito et al., 2003

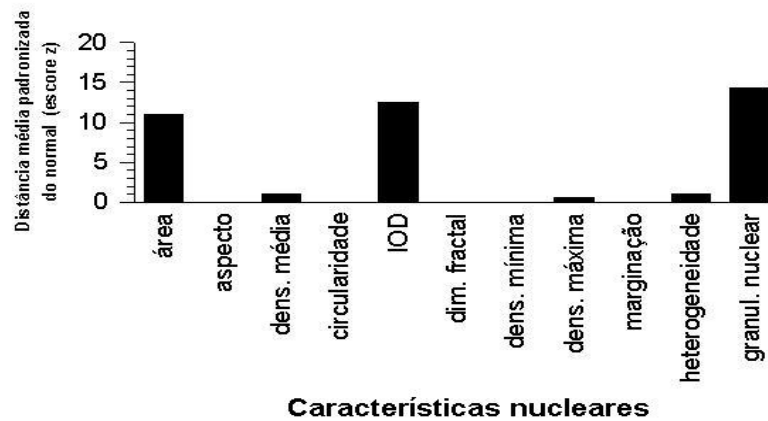


Figura 10. Histograma - Assinatura nuclear (pacientes com CR)
Adaptado de Rosito et al., 2003

1.6 Marcadores Moleculares e Valor Prognóstico em Tumores Colorretais

Além de parâmetros clínicos e morfométricos, os marcadores moleculares associados ao processo de carcinogênese colorretal como IMS e mutações (códons 12 e 13) do gene *K-ras* (*mutK-ras*), têm sido associados ao prognóstico (resposta terapêutica e sobrevida em geral) do CCR (Bazan *et al.*, 2002; Colombino *et al.*, 2002).

Apesar do critério internacional para avaliação de IMS ser o estudo de um painel de 5 marcadores (Boland *et al.*, 1998; Gonzalez-Garcia *et al.*, 2000), alguns trabalhos sugerem o uso de apenas um deles, o BAT-26 (Hoang *et al.*, 1997; Cravo *et al.*, 1999). Este marcador é quasi-monomórfico, apresentando uma pequena variação de apenas 2 pb para mais ou para menos, e constitui uma repetição poli (A) específica localizada em um íntron do gene *hMSH2* e, segundo alguns investigadores, a análise isolada de BAT-26 é suficiente para definir IMS no CCR com eficácia superior a 99% (Cravo *et al.*, 1999).

Embora alguns estudos concentrem-se na identificação de marcadores prognósticos para o CCR individualmente, não há relato de um estudo comparativo entre parâmetros clínicos, morfológicos e moleculares de prognóstico neste tipo de tumor. A padronização de todas as técnicas de identificação destes marcadores, bem como a criação de um painel mínimo de marcadores prognósticos significativos seria de grande utilidade para direcionar melhor o tratamento e acompanhamento de pacientes com câncer colorretal.

Com este estudo esperam-se padronizar as técnicas de detecção de IMS (múltiplos marcadores, incluindo BAT-26) e de mutações no códon 12 do gene *K-ras* no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. A técnica de detecção de IMS poderá ter várias aplicações clínicas posteriores, como por exemplo, rastreamento de indivíduos com suspeita de câncer colorretal não-polipomatoso hereditário (HNPCC ou síndrome de Lynch) e direcionamento da terapêutica no CCR em geral e em outros tumores (Andrew & Peters, 2001; Oda *et al.*, 2002).

Se os marcadores analisados tiverem efetivamente um valor prognóstico significativo, a análise conjunta da assinatura nuclear digital, de IMS e de *mutK-ras* em tumores de reto se constituirá em um painel de prognóstico acessível e de simples execução. Uma vez estabelecido nos tumores de reto, este mesmo painel poderá também ser aplicado e testado em neoplasias de outras localizações no cólon e neoplasias extra-colônicas.

Relatos de marcadores moleculares de prognóstico de ampla aplicabilidade e fácil identificação são escassos. Com o presente estudo, pretende-se testar a associação de parâmetros clínicos, morfológicos e moleculares em um painel de avaliações de baixo custo e complexidade capaz de caracterizar prognosticamente tumores colorretais. A identificação de um painel de marcadores moleculares de prognóstico poderia racionalizar o tratamento e acompanhamento em longo prazo de pacientes com CCR e, possivelmente, outras neoplasias.

Vale ressaltar que a maioria dos tumores em geral é esporádica. E dentre os tumores de reto em particular, a grande maioria não é hereditária. Além disso, a incidência de IMS parece decrescer à medida que a origem do carcinoma se afasta do cólon proximal/transverso em direção ao cólon distal e ao reto, onde a frequência de IMS está descrita em torno de 10%. Assim, espera-se que esta amostra, sendo composta primordialmente por tumores de reto, seja constituída por tumores primariamente esporádicos e, portanto, com baixa incidência de IMS.

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 Objetivo Geral:

Estudar dois marcadores moleculares: instabilidade de microssatélites (IMS) e mutações no códon 12 de *K-ras* em uma amostra de tumores retais quanto à sua frequência e correlacionar a sua presença com marcadores clínicos, cirúrgicos e morfológicos (assinatura nuclear) quanto ao valor prognóstico.

2.2 Objetivos Específicos:

- a) Determinar a frequência de IMS comparando-a com aquela descrita na literatura para tumores colorretais esporádicos;
- b) Determinar a frequência de mutações no códon 12 do gene *K-ras* comparando-a com aquela descrita na literatura para tumores colorretais esporádicos;
- c) Correlacionar os achados dos estudos moleculares com a assinatura nuclear e dados clínicos de seguimento de cada paciente;
- d) Determinar se a caracterização de estabilidade em microssatélites e/ou mutações no códon 12 do gene *K-ras* podem ter influência sobre o prognóstico determinado por variáveis clínicas e de textura da cromatina.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 CAPÍTULO I

An alternative protocol of DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue.

An alternative protocol of DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue ^(#)

R Coura^{1*}, J C Prolla², L Meurer³, P Ashton-Prolla^{1,4}

¹PPG Genética e Biologia Molecular - UFRGS; ²Unidade de Citopatologia - HCPA;

³Serviço de Patologia – HCPA; ⁴Serviço de Genética Médica - HCPA

(*) Correspondence to:

P. Ashton-Prolla

Department of Genetics

Federal University of Rio Grande do Sul

E-mail: pprolla@portoweb.com.br

(#) Manuscrito aceito para publicação no periódico *Journal of Clinical Pathology* em 27 de janeiro de 2005.

Manuscript Acceptance

Ref: JCP/2004/021352 - An alternative protocol of DNA extraction from formalin-fixed and paraffin- embedded tissue.

Dear Dr. Coura

I am pleased to inform you that your manuscript entitled 'An alternative protocol of DNA extraction from formalin-fixed and paraffin- embedded tissue.' has been accepted for publication as a(n) Short Reports in Journal of Clinical Pathology.

The Licence for Publication statement should already be included in your manuscript - please let us know if not, as it will delay the production of your paper.

If you have any queries please contact the Editorial Office at jclinpath@bmjgroup.com

Thank you for submitting to Journal of Clinical Pathology.

Yours sincerely,

Professor Runjan Chetty
Journal of Clinical Pathology

Toll free link

We are now able to offer you a TOLL FREE link to your article as soon as it is published online. This will allow you to read the full text of your article and download and print the PDF version of the paper for personal and research use (maximum 50 copies). You may share this PDF with your co-authors and colleagues. This PDF replaces the complementary paper copy of the journal usually sent to the corresponding author.

Press releases

Please note that the BMJPG regularly issues press releases on articles/editorials/letters taken from BMJ Journals. Yours might be one of them. Click here for guidance on procedure and policy:

<http://jmg.bmjournals.com/misc/ifora/proofsetc.shtml#press%20releases>

Background: DNA extraction from PET requires special protocols, and most described methods report an amplification success of 60-80%.

Aims: To propose a simple and inexpensive protocol which consists of xylene-ethanol deparaffinisation, followed by a kit-based extraction.

Method: Xylene-ethanol deparaffinisation was followed by a long rehydration step and a kit-based DNA extraction.

Results: With this method we obtained a 100% amplification success of fragments of 121 to 227 bp for tamponated formalin-fixed PET.

Conclusion: These results suggest that this protocol, cost-effective and not laborious, can be useful to successfully extract DNA from tamponated formalin-fixed PET and should facilitate the molecular analysis of a large number of archival specimens in retrospective studies.

Tissues removed from the human body for diagnostic or treatment purposes can be fixed, paraffin-embedded, and stored for years. These specimens are an endless source of material for research. There are several protocols described for DNA extraction from fresh tissue, blood and cells in culture, but extraction from paraffin-embedded tissue (PET) requires special protocols¹⁻⁷.

Obtaining good quality PCR products from DNA extracted from PET is a difficult task, since this material is in general scarce, degraded and often contains remnants of certain substances, such as formalin, that inhibit the amplification reaction², and xylene that inhibits proteinase K used in the extraction procedure.

In this work we sought an alternative procedure that is simpler and cheaper than the usually described methods, and that shows great amplification success (AS) with good quality amplification products from little amounts of tamponated formalin-fixed PET.

Materials and Methods

DNA was extracted from a total of 79 PET derived from the Pathology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil, and from 3 private laboratories. Samples from HCPA consisted of 42 surgical specimens of rectal carcinoma, which were fixed in 4% tamponated formalin for 24 hours and then submitted to 95% ethanol and xylene washes before being embedded in paraffin. The archival material had a mean of 11.83 years of

storage (8 to 16 years). Samples from one of the private laboratories consisted of 15 surgical specimens fixed and paraffin-embedded like HCPA ones. The 22 samples from the other two laboratories were fixed in non-tamponated formalin.

- One 20 µm slice of PET was collected and manually microdissected with sterile scalpels under an inverted optical microscope to separate normal from tumoral tissue.
- The sections were deparaffinised with two xylene washes (30 minutes at 55 °C each), two 100% ethanol washes, two 70% ethanol washes and two distilled water washes. Each step was performed for 5 minutes at 55 °C.
- Samples were then rehydrated with TE 1X (Tris-EDTA) for 5 minutes at 55 °C and Tris (1M, pH 7.5) overnight at 55 °C.
- After rehydration, samples were digested with proteinase K (20mg/ml) at 55 °C for 1 to 3 hours;
- DNA was extracted with the Ultraclean bloodspin kit (MoBio Laboratories, Inc., USA) and resuspended in TE (200µl).

Amplification of fragments of 121 to 227 bp (microsatellites BAT-25, BAT-26, D2S123 and D17S250) was obtained by polymerase chain reaction (PCR) containing 5 µl of DNA (mean of 84 ng/µl), 50mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8.4, 400µM of each deoxyribonucleotriphosphate, 20pmol of each primer⁴ and, after testing different concentrations, 5mM MgCl₂ and 2.5U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) in a final volume of 25 µl. PCR was performed using a DNA thermal cycler (MiniCycler™ MJ Research PTC150) with 35 amplification cycles at annealing temperatures of 58°C and 60°C (D2S123). PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels.

Results and Discussion

Figure 1 depicts a typical agarose gel. The amplification products were suitable for microsatellite instability determination by SSCP (data not shown).

We had a 100% AS in the range of 121 to 227 bp (Table 1) for the samples fixed in tamponated formalin, in contrast with 60-88% AS described using other methods. However, all PET samples fixed in non-tamponated formalin did not amplify and showed

only a smear which likely corresponds to degraded DNA. A previous study comparing a few different methods reported better results with the use of a Qiagen extraction kit (AS of about 60%)³. Another study reported best results with a simple boiling method (88%) followed by a phenolchloroform extraction method (85%) and by a Qiagen extraction kit (53%)². Further studies report 70 to 88% AS with deparaffinisation only⁵ or deparaffinisation and protease digestion^{6,7} with the sections or lysates used directly for PCR. The procedure described here, allows the efficient amplification of DNA extracted from archival PET fixed in tamponated formalin. The main difference in our protocol is the long rehydration step, which probably contributed to the better extraction performance.

This simple procedure, cost-effective and not laborious, should facilitate molecular analysis of a large number of archival specimens in retrospective studies.

The authors thank Drs. Mario Antonello Rosito, Marcia Graudenz and Geraldo Geyer for suppling the PET samples.

1. Wright DK, Manos MM. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, *et al*, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. London: Academic Press, 1990:153–158.
2. Cao W, Hashibe M, Rao J-Y, Morgenstern H and Zhang Z-F. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect. Prev* 2003; **27**:397-404.
3. Coombs NJ, Gough AC and Primrose JN. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**(16):e12.
4. Dietmaier W and Hofstädter F. Detection of microsatellite instability by real time PCR and hybridization probe melting point analysis. *Lab. Invest.* 2001; **81**:1453-1456.
5. Torlakovic E, Cherwitz DL, Jessurun J, Scholes J and McGlennen R. B-cell gene rearrangement in benign and malignant lymphoid proliferations or mucosa-associated lymphoid tissue and lymphnodes. *Hum Pathol* 1997; **28**:166-173.
6. Ritter JH, Wick MR, Adesokan PN, Fitzgibbon JF, Zhu X and Humphrey PA. Assessment of clonality in cutaneous lymphoid infiltrates by polymerase chain reaction analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997;**108**:60-68.
7. Inghirami G, Szabolcs MJ, Yee HT, Corradini P, Cesarman E and Knowles DM. Detection of immunoglobulin gene rearrangement of B cell NonHodgkin's lymphomas and leukemias in fresh, unfixed and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction. *Lab.Invest.*1993; **68**:746-757.

Table 1 – PCR amplification of different-sized DNA fragments after extraction from tamponated formalin-fixed paraffin-embedded tissue.

Microsatellite Marker	PCR product (fragment size in bp)	Total number of samples amplified	PCR Amplification Success (One-round PCR)
BAT 25	123	114	100%
BAT 26	121	84	100%
D2S123	227	114	100%
D17S250	162	84	100%

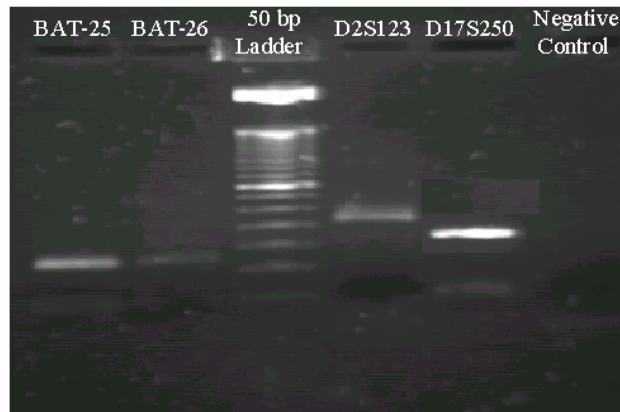


Figure 1 - 2% agarose gel staining with Ethidium bromide, showing the PCR products of the four markers analyzed.

3.2 CAPÍTULO II

Microsatellite Instability and codon 12 *K-ras* mutation in Rectal Carcinomas: Prevalence and Prognostic Value

**Microsatellite Instability and codon 12 *K-ras* mutation in Rectal Carcinomas:
Prevalence and Prognostic Value^(#)**

Coura R¹, Cossio SL², Meurer L³, Rosito MA⁴, da Silva VD⁵, Prolla JC⁶, Ashton-Prolla
P^{1,2}

¹PPG Genética e Biologia Molecular - UFRGS; ²Serviço de Genética Médica - HCPA;

³Serviço de Patologia – HCPA; ⁴Serviço de Proctologia – HCPA; ⁵ Instituto de Pesquisas
Biomédicas –PUCRS; ⁶Unidade de Citopatologia – HCPA

(*) Correspondence to:

P. Ashton-Prolla

Department of Genetics

Federal University of Rio Grande do Sul

E-mail: pprolla@portoweb.com.br

(#) Manuscrito em etapa final de revisão, a ser submetido para publicação no periódico
Annals of Oncology.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third tumor in frequency and the second in mortality in developed countries. In Brazil, it is one of the six most common cancers and the third in mortality (<http://www.inca.org.br>). Among all cases of CRC, about 85% are sporadic. Mean survival rate for affected patients in five years is 60%. Prognostic evaluation is currently based only on clinicopathological and morphological parameters, since the prognostic value of molecular markers is not well established.

Rectal carcinoma (RC) in particular accounts for approximately 10% of new CRC cases each year. It occurs in both sexes at nearly the same rate, generally in the age range from 50 to 80 years, with an age-dependent rise in incidence (Colombino *et al.*, 2002).

Colorectal tumorigenesis is thought to occur by a sequential accumulation of genetic alterations. Several studies have implicated mutational inactivation of tumor suppressor genes as well as activation of oncogenes in CRC pathogenesis, in a pathway known as the *suppressor pathway* (Fearon & Vogelstein, 1990). *K-ras* is the only oncogene reproducibly found mutated in a high percentage of CRC. The most common mutations found in this gene are point mutations in the first or second positions of codons 12 and 13 or, more rarely, 61, and they seem to occur early in colorectal carcinogenesis, usually before adenoma formation (Albanese *et al.*, 1997; Bouzourene *et al.*, 2000). Distinct *ras* mutations may confer different phenotypes to the tumor cells in terms of proliferative activity, independence from external stimuli and stability of the genome (Albanese *et al.*, 1997). Furthermore, some studies indicate that mutations in this gene correlate with poor prognosis (Bouzourene *et al.*, 2000).

Another molecular mechanism involved in the development and progression of some human malignancies, including CRC, is represented by defective replication fidelity (*mutator pathway*). Mutations that result in a non-functional mismatch repair system (MMR) lead to a specific type of genomic instability, called microsatellite instability (MSI). MSI has been defined as an alteration of any length in the genome due to small insertions or deletions of repeating units within short tandem repeats in a tumor when compared with the corresponding normal tissue (Aaltonen *et al.*, 1998). MSI is present in more than 90% of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and occurs in 10 to 20% of sporadic CRCs (Lynch & de La Chapelle, 2003).

The microsatellite stability status of colorectal tumors has been traditionally been evaluated using five molecular markers at both mono- and dinucleotide microsatellites (Boland *et al.*, 1998). Tumors that show instability in only one marker are considered MSI low (MSI-L), those that show instability in two or more markers are considered MSI high (MSI-H), and those without instability are called microsatellite stable (MSS). HNPCC tumors are usually classified as MSI-H (Dietmeier *et al.*, 1997).

In rectal carcinomas, MSI has been observed at a very low rate. The incidence of MSI seems to be dependent of tumor location, being more frequent in carcinomas of the proximal/transverse colon and less frequent in those of the distal colon and rectum, where frequency of MSI-H has been found to be less than 10% (Tsao *et al.*, 2000).

A few studies have made a correlation between MSI and tumor prognosis in colorectal and gastric cancer. Results of these studies have indicated that patients with MSI-H tumors have a better outcome, but increased survival of patients with MSI-H CRC has been demonstrated only in those cases with Dukes' stage B and Dukes' stage C disease receiving adjuvant chemotherapy (reviewed in Colombino *et al.*, 2002).

In addition to molecular markers, tumor morphometric and densitometric alterations have also been correlated with prognosis. These alterations can be analyzed by digital nuclear signature, which constitutes an assembly of densitometric characteristics based on the nuclear chromatin distribution and results in a representative histogram of the nuclear chromatin texture characteristics, obtained by digital image (Bartels *et al.*, 1999).

Reports on the use of molecular markers for prediction of prognosis that have wide applicability and are easily identifiable in rectal carcinomas, are rare. Thus, the aim of this study was to investigate further both the prevalence and the prognostic value of *K-ras* codon 12 mutations and MSI in rectal carcinoma, as well as characterize the clinicopathological and chromatin texture features of RC patients with and without MSI and/or *K-ras* mutation in search of a specific pattern that might be representative of distinctive tumor behavior.

Materials and Methods

We investigated 41 rectal carcinomas for the presence of mutations in codon 12 of the *K-ras* gene and MSI. All carcinomas were formalin-fixed paraffin-embedded tumor specimens obtained from 1988-1996 from surgical specimens at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil). Clinical, histopathological and chromatin texture analysis of the same tumors have been described earlier (Rosito *et al.* 2003). Positive control of MSI was kindly supplied by Drs. Otavia Caballero and André Vettori from the Cancer Hospital AC Camargo (São Paulo, Brazil), and positive control of *K-ras* mutation by Dr. Marcia Kubrusly from the University of São Paulo (São Paulo, Brazil). The DNA extraction was performed according to Coura *et al.* (in press).

K-ras codon 12 mutations were analyzed by PCR-RFLP as described by Kubrusly *et al.* (2002). Microsatellite stability status was determined using a panel of five microsatellite markers (BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346 and D17S250) as suggested by the National Cancer Institute workshop (Boland *et al.*, 1998; Umar *et al.*, 2004). Amplification primer sequences were described by Dietmeier *et al.* (1997).

PCR conditions for microsatellites amplification were described in a previous work (Coura *et al.*, in press). For SSCP analysis, the PCR product was denatured into single-stranded DNA by heating in formamide loading buffer (95%formamide, 10mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) for 5 minutes at 94°C and then separated on a mini-gel apparatus using non-denaturing 15% acrylamide (60:1, acrylamide:bisacrylamide) gels containing 5% of glycerol. Gels were run at room temperature for 2 h at 170V. After silver staining, gels were visualized under fluorescent light.

Samples classified as MSI-H (instability in at least 2 markers) were submitted to imunohistochemistry for detection of *hMSH2* and *hMLH1* gene products and promoter hypermethylation analysis.

We consider some clinicopathological and histological features, such as sex, age, Dukes' stage, cellular differentiation, histotype and therapy, as well as chromatin texture characteristics, in order to evaluate possible correlations with molecular findings. The association of the molecular findings with these features was assessed by univariate analysis using the Fisher's exact test and the Mann-Whitney test.

Results

Clinical, surgical and histopathologic features of the patients are presented in table 1. Eleven (26.8%) of the 41 RC patients analyzed were heterozygous for mutations in codon 12 of the *K-ras* gene. Results of *K-ras* codon 12 mutation analysis (figure 1) are shown in table 2. Univariate analysis did not show significant differences between patients with and without mutation in relation to the clinical and histopathological variables. In relation to morphological features, the presence of *K-ras* mutations was associated with two features of the nuclear digital signature: aspect and roundness ($p < 0.05$).

Results of the MSI analysis (figure 2) are shown in table 3. Three (7.3%) of the 41 patients exhibited high-level MSI, 21 (51.2%) showed low-level MSI, and 18 (41.5%) were stable (MSS). All MSI-H patients showed BAT-26 instability, confirming the previously described positive predictive value of this marker for detection of MSI-H. Univariate analysis, comparing those patients with MSI-H with the others, showed a significant association of MSI-H with better overall survival ($p = 0.001$). In addition, 32 (81.6%) patients with MSI-L or MSS did not receive post-surgical adjuvant therapy, which is significantly different from the MSI-H patients group, where 66.7% received some form of adjuvant therapy ($p < 0.05$).

Discussion

In this study we performed an analysis of microsatellite stability status and *K-ras* mutation status at the codon 12 in an unselected sample of rectal carcinomas to further investigate the prevalence and the role of these molecular markers in this disease.

Four of the 5 microsatellite markers determined by the NCI were successfully analyzed, but one of them, D17S250 showed an amplification pattern of poor quality and a lot of amplified products were of weak intensity. The quality of the PCR products hampered the SSCP interpretation. Reamplification of these samples lead to a SSCP electrophoretic pattern with a high number of non-specific amplification bands. As a result, most samples could not be scored accurately and consistently for this marker, and this was quite different from that observed for the other markers. Nash *et al.* (2003) have already reported that, among the five microsatellite markers, D17S250 shows the greatest frequency of instability, which probably reflects false-positive data. For this reason we decided not to consider this marker in our analysis.

As expected from previous reports, we found a low frequency of MSI-H tumors (7.3%) and a high frequency of MSI-L (51.2%) tumors in our sample of rectal carcinomas. In contrast with MSI-H tumors, MSI-L tumors do not have loss of *hMSH2* and *hMLH1* function and recent evidence indicates that they represent a third pathway of colorectal carcinogenesis (Whitehall *et al.*, 2002; Halford *et al.*, 2003).

Phenotypically, MSI-L tumors seem to be indistinguishable from MSS tumors (Umar *et al.*, 2004). MSI-L has been described as a frequent characteristic of CRCs. Halford *et al.* (2003) found a frequency of 35% of MSI-L in colorectal cancers.

The analysis of MSI-L is difficult because as an increasing number of microsatellites is investigated, there is also an increase in the MSI-L group of tumors (Halford *et al.*, 2003). The prevalence of MSI described here, is in agreement with that reported by other investigators for CRC (Tsao *et al.*, 2000; Fernebro *et al.*, 2002).

Some reports indicate that mononucleotide markers have greater sensitivity and specificity for MMR deficiency than dinucleotide markers (Perucho *et al.*, 1999; Nash *et al.*, 2003); our results in part confirm this conclusion, since all of the MSI-H tumors were BAT-26 unstable.

Many investigators have proposed that the study of BAT-26 alone may be sufficient to identify MSI-H (Buhard *et al.*, 2004; Brennetot *et al.*, 2005). However, no single marker is likely to have perfect accuracy for identifying CRCs with deficiency in MMR genes (Aaltonen *et al.*, 1998; Suraweera *et al.*, 2002). In our sample, 1 of 4 (25%) tumors that showed instability at the BAT-26 locus was not highly unstable, that is, did not show instability in any other marker.

When we correlated microsatellite status with prognosis, we found a better overall survival for patients with MSI-H tumors. This result is in agreement with previous reports in the literature (Colombino *et al.*, 2002; Raut *et al.*, 2004; Popat *et al.*, 2005). We did not find a significant association of microsatellite status with other clinicopathological features neither with chromatin texture ones.

Mutations at codon 12 of the *K-ras* gene were observed in 11 of 41 (26.8%) rectal carcinomas. The frequency reported for such mutations in CRCs varies from 20 to 50% (Fearon & Vogelstein, 1990; Albanese *et al.*, 1997; Russo *et al.*, 1998; Bouzourene *et al.*, 2000; Bazan *et al.*, 2002). Such a wide range of observed mutation frequency might be due to several factors such as tumor storage method, the different techniques used for assessing

the presence of mutations, tumoral heterogeneity, or the specific features of the patients included in the study, such as Dukes' stage at diagnosis, grading, site of the tumor among others (Slattery *et al.*, 2000). The observed mutation frequency of less than 50% indicates again that there is likely at least one other alternative pathway in rectal carcinogenesis (Bazan *et al.*, 2002).

We found no relationship between the presence/absence of *K-ras* mutations and the patients' age or sex, or any of the clinicopathological and biological features of the tumors. Other investigators have found an association of codon 12 mutations only with mucinous histotype (Albanese *et al.*, 1997; Bazan *et al.*, 2002). In relation to prognosis, several studies have reported a reduced survival rate in patients with *K-ras* mutated tumors (Bouzourene *et al.*, 2000), while others have found no association with prognosis (Hirvikoski *et al.*, 1999; Esteller *et al.*, 2001). In fact, some authors have demonstrated a prognostic value for codon 13 mutations only, and failed to demonstrate it for codon 12 mutations (Russo *et al.*, 1998; Bazan *et al.*, 2002).

The absence of correlation between digital nuclear signature features and MSI is not unexpected if we consider the different pathways of colorectal carcinogenesis. Mutator pathway, characterized by MSI, is associated with mutations in the MMR system, and have not been associated with chromatin alterations. On the other hand, the suppressor pathway, that is characterized by CIN, is caused by sequential mutations in tumor suppressor genes and oncogenes and commonly shows chromatin alterations. This can explain the association found between codon 12 mutations of *K-ras* and some morphometric characteristics of digital nuclear signature – roundness and aspect – that are indirectly related with physical distribution of nuclear chromatin.

In conclusion, our data describes the profile of these two molecular markers in rectal carcinomas in sample of our population and suggest important tendencies of their possible prognostic value. Further prospective studies on larger patient series must be performed in order to clarify the possible clinicobiological implications of these observations and to evaluate the prognostic significance of MSI status and *K-ras* alterations in colorectal carcinomas.

References

1. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998; 338 (21): 1481-1487.
2. Albanese I, Rinaldo CD, Alberti M, et al. ras and myc analysis in primary and metastatic colorectal carcinomas: specific ras mutations are associated with Dukees' D stage and mucinous histotype. *Int J Oncol* 1997; 10: 293-300.
3. Bartels PH, Montironi R, Duval da Silva V et al. Tissue architecture analysis in prostate cancer and its precursors: An innovative approach to computerized histometry. *Eur Urol* 1999; 35:484-491.
4. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I et al. Specific codon 13 *K-ras* mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 *K-ras* mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol* 2002; 13: 1438-1446.
5. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5248-5257.
6. Bouzourene H, Gervaz P, Cerottini J-P et al. p53 and Ki-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36:1008-1015.
7. Brennetot C, Buhard O, Jourdan F et al. Mononucleotide repeats BAT-26 and BAT-25 accurately detect MSI-H tumors and predict tumor content: implications for population screening. *Int J Cancer* 2005; 113:446-450.
8. Buhard O, Suraweera N, Lectard A et al. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers* 2004; 20:251-257.
9. Colombino M, Cossu A, Manca A et al. Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13:1447-1453.
10. Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol of DNA extraction from formalin-fixed and paraffin- embedded tissue. *J Clin Pathol*, *in press*.
11. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T et al. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997; 57: 4749-4756.
12. Disponível de: URL: <http://www.inca.org.br>
13. Esteller M, Gonzalez S, Risques RA et al. *K-ras* and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19:299-304.
14. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
15. Fernebro E, Halvarsson B, Baldetorp B et al. Predominance of CIN versus MSI in the development of rectal cancer at young age. *BMC Cancer* 2002; 2: 25-32.
16. Halford SE, Sawyer EJ, Lambros MB et al. MSI-low, a real phenomenon which varies in frequency among cancer types. *J Pathol* 2003; 201:389-394.
17. Hirvikoski P, Auvinen A, Servomaa K et al. *K-ras* and p53 mutations and overexpressions as prognostic factors in female rectal carcinoma. *Anticancer Res* 1999;19: 685-91.

18. Kubrusly MS, Cunha JEM, Bacchella T et al. Detection of *K-ras* point mutation at codon 12 in pancreatic diseases: a study in a Brazilian Casuistic. *J Pancreas* 2002; 3:144-151.
19. Lynch HT, de La Chapelle A. Genomic medicine: hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348 (10): 919-932.
20. Nash GM, Gimbel M, Shia J et al. Automated, multiplex assay for high-frequency microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3105-3112.
21. Perucho M. Correspondence re: C.R. Boland *et al.*, A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58: 5248-5257, 1998. *Cancer Res.* 1999; 59:249-256.
22. Popat S, Hubner R and Houlston RS Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23:609-618.
23. Raut CP, Pawlik TM and Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathological features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mut Res* 2004; 568: 275-282.
24. Rosito MA, Damin DC, Moreira LF et al. Nuclear chromatin texture in rectal carcinoma. Prognostic value. *Anal Quant Cytol Histol* 2003a; 25(4):215-20
25. Russo A, Migliavacca M, Bazan V et al. Prognostic significance of proliferative activity, DNA-ploidy, p53 and ki-ras point mutations in colorectal liver metastases. *Cell Prolif* 1998; 3:139-153.
26. Slattery ML, Curtin K, Anderson K et al. Associations between dietary intake and Ki-ras mutations in colon tumors: a population-based study. *Cancer Res* 2000; 60:6935-6941.
27. Suraweera N, Duval A, Reperant M et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002; 123:1804-1811.
28. Tsao JL, Yatabe Y, Salovaara R et al. Genetic reconstruction of individual colorectal tumor histories. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:1236-1241.
29. Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:261-268.
30. Whitehall VL, Wynter CV, Walsh MD et al. Morphological and molecular heterogeneity within nonmicrosatellite instability-high colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; 62:6011-6014.

Table 1. Patients Characteristics

Characteristics	N° of Patients	%
<i>Total analyzed</i>	41	
<i>Males/Females</i>	17/24	41.5/58.5
<i>Age (years)</i>		
≤ 55	12	29.3
> 55	29	70.7
Average	61.54	
Range	37-82	
<i>Dukes'</i>		
A	9	21.95
B	9	21.95
C	18	43.90
D	5	12.20
<i>Cellular differentiation</i>		
Well differentiated	6	14.6
Moderately differentiated	34	83.0
Poorly differentiated	1	2.4
<i>Mucinous histotype</i>	4	9.8
<i>Therapy</i>		
Follow-up only	32	78.0
CHT only	2	4.9
RT/RT plus CHT	4/3	9.8/7.3

CHT – chemotherapy; RT - radiotherapy

Table 2. Results of *K-ras* mutation analysis. Correlation between number of rectal carcinoma cases with and without mutation and several clinicopathological features

Characteristics (patients)	<i>K-ras</i> mutation (+) n (%)	<i>K-ras</i> mutation (-) n (%)
<i>Total patients (n =41)</i>	11 (26.8)	30 (73.2)
<i>Males (17)/females (24)</i>	4 (23.5)/ 7 (29.2)	13 (76.5)/ 17 (70.8)
<i>Age (years)</i>		
≤ 55 (12)	4 (33.3)	8 (66.7)
> 55 (29)	7 (24.1)	22 (75.9)
Average	61.6	61.5
Range	40-82	37-81
<i>Dukes'</i>		
A (9)	2 (22.2)	7 (77.8)
B (9)	3 (33.3)	6 (66.7)
C (18)	5 (27.8)	13 (72.2)
D (5)	1 (20)	4 (80)
<i>Cellular differentiation</i>		
Well (6)	3 (50)	3 (50)
Moderately (34)	8 (23.5)	26 (76.5)
Poorly (1)	0 (0)	1 (100)
<i>Mucinous histotype (4)</i>	2 (50)	2 (50)
<i>Therapy</i>		
Follow-up only (32)	9 (28.1)	23 (71.9)
CHT only (2)	0 (0)	2 (100)
RT (4)/RT plus CHT (3)	1 (25)/ 1(33.3)	3 (75)/ 2 (66.7)
<i>Medium 5 years-Overall</i>	40.4	43.5
<i>Survival (months)</i>		

CHT – chemotherapy; RT - radiotherapy

Table 3. Results of MSI analysis. Correlation between number of rectal carcinoma cases with and without MSI-H and several clinicopathological features

Characteristics (patients)	MSI-H (+) n(%)	MSI-H (-) n(%)
<i>Total patients (n =41)</i>	3 (7.3)	38 (92.7)
<i>Males (17)/females (24)</i>	2 (11.8)/ 1 (4.2)	15 (88.2)/ 23 (95.8)
<i>Age (years)</i>		
≤ 55 (12)	1 (8.3)	11 (91.7)
> 55 (29)	2 (6.9)	27 (93.1)
Average	56.7	61.7
Range	41-67	37-82
<i>Dukes'</i>		
A (9)	0 (0)	9 (100)
B (9)	1(11.1)	8 (88.9)
C (18)	2 (11.1)	16 (88.9)
D (5)	0 (0)	5 (100)
<i>Cellular differentiation</i>		
Well (6)	1 (16.7)	5 (83.3)
Moderately (34)	2 (5.9)	32 (94.1)
Poorly (1)	0 (0)	1 (100)
<i>Mucinous histotype (4)</i>	1(25)	3 (75)
<i>Therapy</i>		
Follow-up only (32)	0 (0)	32 (100)
CHT only (2)	0 (0)	2 (100)
RT (4)/RT plus CHT (3)	1 (25)/ 1 (33.3)	3 (75)/2 (66.7)
<i>Medium 5 years-Overall Survival (months)</i>	57.7	41.5

CHT – chemotherapy; RT - radiotherapy

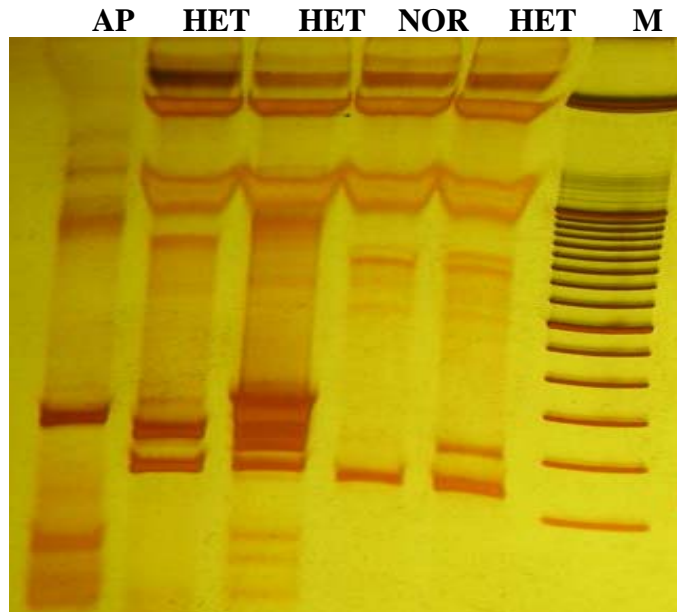


Figure 1. Polyacrylamide gel - RFLP analysis of codon 12 of *K-ras*
 AP – amplification product; not enzyme digested
 HET – heterozygous; NOR – normal;
 M – molecular weight marker

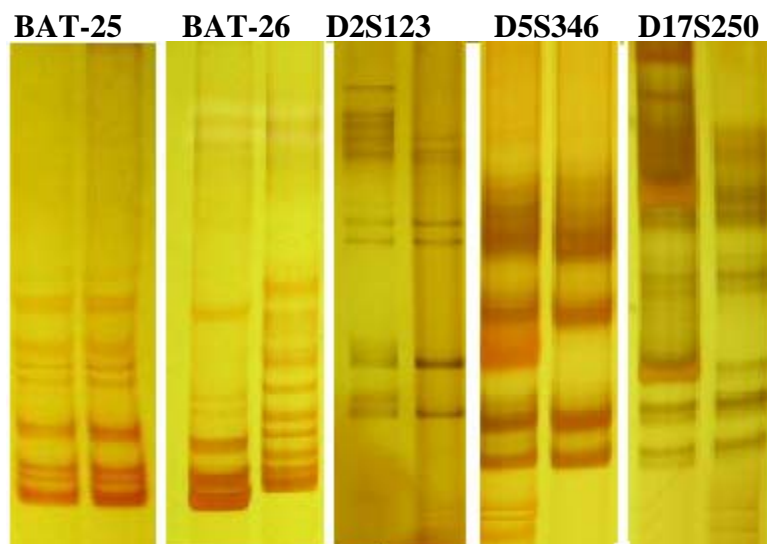


Figure 2. SSCP gel of the panel of 5 markers
 BAT-25, D5S346 and D17S250 – normal;
 BAT-26 – MSI; D2S123 - LOH

3.3 CAPÍTULO III
BAT-25 and BAT-26 microsatellite profile in samples of Afro-descendants and Blood
Donors from Rio Grande do Sul, Brazil

BAT-25 and BAT-26 microsatellite profile in samples of Afro-descendants and Blood Donors from Rio Grande do Sul, Brazil (#)

Coura R¹, Cossio SL², Bortolini MC³, Giugliani R², Ashton-Prolla P^{1,2,3}

¹PPG Genética e Biologia Molecular - UFRGS; ²Serviço de Genética Médica - HCPA;

³Departamento de Genética - UFRGS

(*) Correspondence to:

P. Ashton-Prolla

Department of Genetics

Federal University of Rio Grande do Sul

E-mail: pprolla@portoweb.com.br

(#) Manuscrito em etapa final de revisão, a ser submetido para publicação no periódico *American Journal of Pathology*

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third in frequency and the second in mortality in developed countries. In the USA, CRC is the second type of cancer and its frequency in African Americans is 1.5-fold higher than in Caucasians ^[1]. In Brazil, CRC is one of the six more common cancers and is the third in mortality ^[2]. Currently, the determination of disease prognosis is mainly based on several clinical, pathological and morphological parameters.

Furthermore, molecular markers have also been associated with prognosis, especially in relation to therapeutic response and overall survival rates. Among them, microsatellite instability (MSI) is remarkable. It reflects genomic instability caused by a deficiency in the DNA mismatch repair system (MMR), which leads to the progressive accumulation of mutations, especially in mono- and dinucleotide microsatellites. Tumours that show microsatellite instability (MSI+) tend to be associated with better prognosis ^[3,4,5].

In general, microsatellite stability (MS) status analysis is performed by the comparison between normal and tumoral tissues from the same patient and instability is characterized by the difference in the amplification profile of specific markers between these tissues. MS status can be evaluated by a panel of five markers: two mononucleotide (BAT-25 and BAT-26) and three dinucleotide (D2S123, D5S346 and D17S250) markers ^[6,7]. The presence of instability in two or more markers defines a tissue as MSI high (MSI-H), but if just one of them shows instability, the tumour is classified as MSI low (MSI-L); the absence of instability in all five markers defines a tissue as microsatellite stable (MSS) ^[7].

MSI is present in more than 90% of colorectal tumours from hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC) patients and in only about 15% of sporadic colorectal tumours. The majority of tumours from HNPCC are MSI-H, since they are caused by germinative mutations in MMR genes, specially in *hMSH2* and *hMLH1* ^[8].

The dinucleotide markers used to define MS status are polymorphic, but the mononucleotide ones are considered quasi-monomorphic in populations of Caucasian origin, exhibiting little repeat size variation ^[9].

Thus, analysis of only tumoral tissue without comparison with the corresponding normal tissue has been considered sufficient for instability detection in patients at risk for

HNPCC ^[10]. In addition, since small unstable alleles can be easily distinguished from normal ones by SSCP or sequencing, and BAT-26 is highly sensitive to detect MSI-H tumors, some investigators have considered that analysis of BAT-26 alone can determine MS status in CRCs with greater than 99% accuracy ^[11]. Therefore, many published reports have determined MS status using only tumoral tissue and the two markers BAT-25 and BAT-26 instead of the pannel of 5 markers originally recommended by the NCI ^[9, 12, 13]. However, a populational study with African-american individuals that showed a high frequency of allelic variation for these two markers ^[14] raises a question of the frequency of this type of allelic variation in other populations. Most importantly, this observation raises a concern regarding accuracy of the analysis when only tumoral tissue is used to determine MS status. To reinforce these concerns, a previous study that analysed MSI in endometrial adenocarcinomas, already suggested a possible polymorphic profile of BAT-25 and BAT-26 ^[15]. Therefore, it is evident that allelic variation of these markers in specific populations can be an important factor of confusion in MSI studies, and should therefore be determined before a decision is made on the most reliable protocol for this type of study.

A few reports of MS status in sporadic and hereditary CRC in Brazilian patients have been published ^[16]. The Brazilian population is characterized by a high level of ethnical admixture and has an important percentage of individuals of African descendance. Therefore, characterization of the profile of these two markers in healthy individuals in the local population may be relevant to determine the most accurate protocol for the determination of MS status in order to avoid false-positive results.

The present study reports a descriptive analysis of BAT-25 and BAT-26 microsatellites in two samples of individuals from Rio Grande do Sul, Brazil's southernmost state, in order to determine whether these markers are indeed monomorphic (or quasimonomorphic).

Material and Methods

Two samples of individuals from Rio Grande do Sul were analysed. One of them consisted of DNA of 100 healthy blood donors from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The other group was composed by DNA of 116 Afro-descendent individuals that

were previously enrolled in genetic studies and was kindly provided by Department of Genetics from the Federal University of Rio Grande do Sul ^[17].

Microsatellite sequences at the loci BAT-25 and BAT-26 were amplified using previously reported primers ^[7]. Amplifications were performed in a 25µl reaction mixture containing 50 mM KCl, 20 mM Tris HCl pH 8.4, 5 mM MgCl₂, 400µM of each deoxyribonucleotriphosphate (dNTPs), 20 pmol of each primer, and 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, California, USA). The amplification reaction itself involved 35 cycles of denaturation at 94 °C for thirty seconds, annealing at 58 °C for thirty seconds, extension at 72 °C for thirty seconds, preceded by one denaturation cycle at 94 °C for three minutes. The last cycle was followed by a final extension step for three minutes at 72 °C. PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels and Ethidium Bromide staining.

MSI analysis was performed by single-strand conformational polymorphism (SSCP) as described by Iacopetta and Hamelin ^[11]. Briefly, SSCP was carried out with the addition of 7-9 µl of loading dye (95% formamide, 10mmol/L EDTA, 0.1% bromophenol blue and 0.1% xylene cyanol) to an equal volume of amplification product. Then, samples were denatured for 5 minutes at 96 °C and kept on ice until loaded onto a 15% nondenaturing acrylamide gel (60:1 acrylamide:bisacrylamide) containing 5% of glycerol on a mini-gel electrophoresis apparatus. Gels were run for 2 h at 170 V at room temperature and without cooling.

Samples that showed allelic variation were sequenced to allow allele characterization and allelic size determination.

Results

Figures 1 and 2 depict a SSCP gel, where normal and unstable profiles of BAT-25 and BAT-26 can be seen. All 116 samples of Afro-descendent individuals were successfully amplified for both markers. We found 6.03% and 6.90% of allelic variation in BAT-25 and BAT-26, respectively. In the sample of blood donors, DNA samples of 99 and 100 individuals were successfully amplified for BAT-25 and BAT-26, respectively. We found 8.08% and 5.00% of allelic variation for each marker respectively. None of the samples presented simultaneous allelic variation at both *loci*. The comparison between our

data and those obtained previously for Afro-Americans^[14] showed a significant difference only for BAT-25 ($p < 0.05$).

Discussion

MSI analysis has been an important tool in the study of colorectal tumors. Therefore, a standard panel of five microsatellite markers to detect MSI in colorectal tumors was established by the International Collaborative Group in HNPCC and by the National Cancer Institute (USA). The profile of these microsatellites is currently well established in Caucasians, Asians and Africans, but little is known about their behavior in the Brazilian population^[6,7, 18].

This panel of five markers established for the analysis of MSI in CRC is composed by three polymorphic (D2S123, D5S346 and D17S250) and two monomorphic microsatellite markers, BAT-25 and BAT-26. These latter have been described in the literature as quasi-monomorphic in Caucasian individuals, but there are studies that reported the presence of polymorphism in a significant proportion of individuals in African and African American samples^[14]. In clinical practice, this panel of microsatellite markers is used for diagnosis of the hereditary cancer predisposition syndrome HNPCC (hereditary non-polyposis colon cancer) and BAT-26, in particular, is highly sensitive to detection of MSI-H colorectal tumors^[6, 7, 15, 18].

The Brazilian population shows a high level of race admixture that varies in the proportions of the three main ethnic groups that compose it (Caucasians, Africans and Native Indians)^[19]. Thus, the determination of BAT-25 and BAT-26 profiles in this population is very important, since it might be unique and different from that of the individual populations which have contributed to its formation.

The International Workshop of Microsatellite Instability and RER phenotypes in Cancer Detection and Familiar Predisposition recommended that all studies that include BAT-26 in the analysis of MSI should compare its pattern in normal and tumoral tissue, since this marker can show a different allelic profile (i.e. constitutional polymorphism) according to the ethnical background of the population under study^[6, 20]. Despite this recommendation, however, the majority of studies that have used BAT-25 and BAT-26 in CRC, including those performed with Brazilian individuals, consider these two markers monomorphic and do not compare the amplification profile of tumoral and normal tissue of

the same individual to determine MSI. Failure to do so may constitute an important confusion factor if the population studied is indeed polymorphic at these loci, leading to misclassification of the tumor and ultimately to inappropriate management of the patient.

There are several evidences in the literature that suggest that BAT-26 has considerable allelic variation. Weber and Rodrigues Bigas reported a 10 pb deletion in this *locus*^[21]. In the same way, Perucho has described that 2 to 4% of the population, especially African Americans, can show a short BAT-26 allele^[reviewed in 6]. Pyatt *et al.*^[14], in a populational study with 103 African American individuals, reported allelic variation of 12,6% and 18,4% in BAT-26 and BAT-25, respectively. Allelic variation simultaneously in both *loci* was observed in 2,9% of individuals. Finally, Alazzoozi *et al.*^[22] described that BAT-26 shows lengths ranging from 21 to 27 adenines in healthy people.

The present study showed that there is allelic variation in the *loci* BAT-25 and BAT-26 in healthy individuals, and this constitutional allelic variation could be misclassified as MSI.

Comparisons between the allelic variation frequencies in both markers of the two samples did not show significant difference. This result suggests that the Brazilian population is miscigenated to such a degree that the allelic variation frequency is the same in a less heterogeneous sample, like that of Afro-descendants, or in a more heterogeneous one, as that of blood donors, not selected for ethnical group.

With regard to the definition of different ethnic groups, it is necessary to evaluate the results with great care. In population genetics, race is defined as a group of organisms in a species that presents more genetic similarities between each other than with other members of the same species. Therefore, populations that have undergone some degree of genetic divergence qualify as races^[23]. Since almost all local populations are different from others in at least some allele frequencies, the concept of race does not contain a clear biological distinction and is dependent on analysis convenience. Because of this, the term is prone to misunderstanding or misuse^[23,24]. Furthermore, in a population such as the Brazilian, which presents a high level of racial admixture, the ranking of ethnic groups becomes even more complex. Racial classification based on phenotypic traits, which is commonly used, is usually subjective and inaccurate and it is not satisfactory to make safe conclusions about the influence of this factor in the allelic and genotypic distribution of genetic

polymorphisms. In fact, earlier studies have demonstrated that skin color and other phenotypic traits can be poor predictors of genomic ancestry^[25,26].

Results described here suggest that BAT-25 and BAT-26 are polymorphic in the Brazilian population and reinforce the concept that the degree of racial admixture is so high in most human populations that there is no sense in dividing or classifying them in races. In addition, the results reported here indicate that a comparison between normal and tumoral tissue for MSI analysis in tumors of Brazilian patients is imperative to determine the MS status accurately and avoid false-positive results.

References

1. Ashktorab H, Smoot DT, Carethers JM, Rahmanian M, Kittles R, Vosganian G, Doura M, Nidhry E, Naab T, Momen B, Shakhani S, Giardiello FM. High incidence of microsatellite instability in colorectal cancer from African Americans. *Clin Cancer Res* 2003;9(3):1112-7.
2. Disponível de: URL: <http://www.inca.org.br>
3. Papat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23:609-618.
4. Raut CP, Pawlik TM and Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathological features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mut Res* 2004; 568: 275-282.
5. Wright CM, Dent OF, Barker M *et al.* Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg* 2000; 87:1197-1202.
6. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR *et al.* A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5248-5257.
7. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R and Rüschoff J (1997) Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 57: 4749-4756.
8. Colombino M, Cossu A, Manca A, Dedola MF, Giordano M, Scintu F, Curci A, Avallone A, Comella G, Amoroso M, Margari A, Bonomu GM, Castriota M, Tanda F, Palmieri G. Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13:1447-1453.
9. Cravo M, Lage P, Albuquerque C, Chaves P, Claro I, Gomes T, Gaspar C, Fidalgo P, Soares J and Nobre-Leitão C (1999) BAT-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes. *J Pathol* 188: 252-257.
10. Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M, Lothe RA, Gleeson CM, Russell SE, Muzeau F, Flejou JF, Hoang-Xuan K, Lidereau R, Thomas G, Hamelin R. Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21:101-107.

11. Gonzalez-Garcia I, Moreno V, Navarro M *et al.* Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst*; 2000; 92:544-549.
12. Hoang J-M, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G and Hamelin R (1997) BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 57: 300-303.
13. Iacopetta B and Hamelin R (1998) Rapid and nonisotopic SSCP-based analysis of the BAT-26 mononucleotide repeat for identification of the replication error phenotype in human cancers. *Hum Mutat* 12:355-360.
14. Pyatt R, Chadwick RB, Johnson CK, Adebamowo C, de la Chapelle A and Prior TW. Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. Implications for microsatellite instability testing. *Am J Pathol*; 1999; 155(2):349-353.
15. Yu H-JA, Lin KM, Ota DM, Lynch HT. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: preventive management. *Cancer Treat Rev* 2003;29(6):461-70.
16. Fuzikawa AK, Hadad LA, da-Cunha-Melo JR, Brasileiro-Filho G and Pena SDJ. Utilization of microsatellites for the analysis of genomic alterations in colorectal cancers in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30(8): 915-921.
17. Bortolini MC, Silva-Jr WA, Castro de Guerra D, Remonato Gg, Mirandola R, Hutz M, Weimer TA, Zago MA, Salzano FM. African-derived South American populations: a history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi and uniparental genetic markers. *American Journal of Human Biology* 1999; 11: 551-563.
18. Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, Mecklin JP, Launonen V, Aaltonen LA. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001; 61(11):4545-9.
19. Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME, Hutz MH. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol* 2003;15(6):824-34.
20. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomäki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HFA, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN and Srivastava S (2004) Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96:261-268.
21. Disponível de: URL: [http:// www.nfdht.nl](http://www.nfdht.nl) (MSH2 database).
22. Alazzouzi H, Domingo E, González S, Blanco I, Armengo M, Espín E, Plajal A, Schwartz S, Capella G, Jr. Schwartz S. Low levels of microsatellite instability characterize MLH1 and MSH2 HNPCC carriers before tumor diagnosis. *Hum Mol Genetics* 2005; 14:235-239.
23. Hartl DL & Clark AG. 1997. Principles of population genetics. 3ª Edição. Ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
24. Suzuki DT; Griffiths AJF; Miller JH; Gelbart WM & Lewontin RC. 2002. Introdução à genética. 7ª Edição, Guanabara Koogan, Rio De Janeiro, Brasil.
25. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM & Pena SD. 2003. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1): 177-182.
26. Bortolini MC. 1999. Breve visão sobre a gênese e a evolução das populações Latino-americanas. In: *Genética Para Que Te Quero?* Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

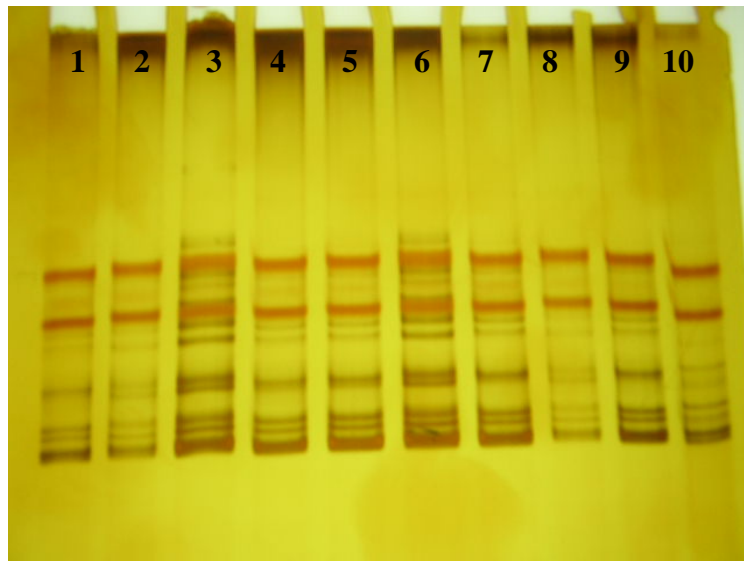


Figure 1. SSCP gel of BAT-25
Lanes 1, 2, 4, 5, 7, 8 and 9: normal pattern
Lanes 3, 6 and 10: allelic variant

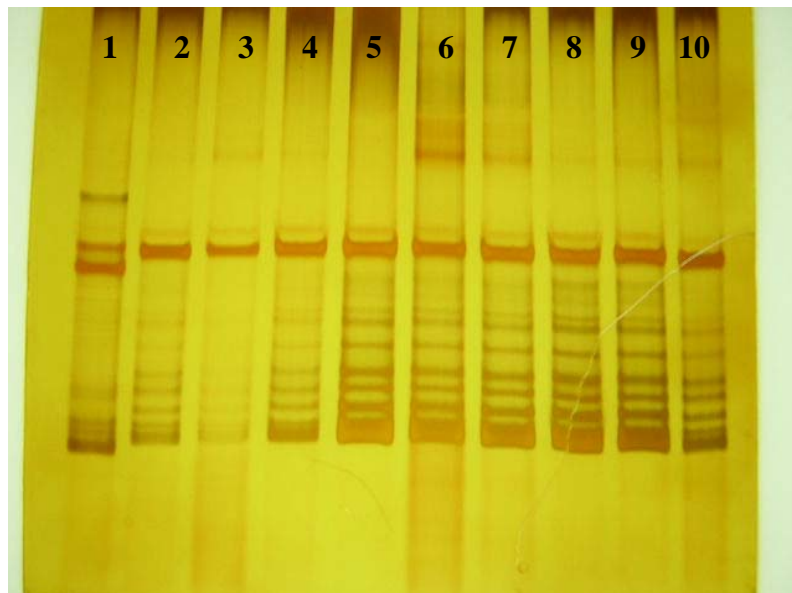


Figure 2. SSCP gel of BAT-26
Lane 1 – allelic variant; Lanes 2 to 10 – normal pattern

4. DISCUSSÃO

4.1 Análise populacional do perfil de BAT-25 e BAT-26

A análise de IMS, que constitui uma importante ferramenta no estudo de tumores colorretais e alguns outros tipos de tumores, é feita através de um painel de 5 marcadores definidos pelo ICG-HNPCC (Boland *et al.*, 1998). Dentre estes marcadores, dois (BAT-25 e BAT-26) são considerados quasi-monomórficos em populações caucasianas (Dietmeier *et al.*, 1997; Boland *et al.*, 1998; Loukola *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003). Por isso, alguns trabalhos sugerem que não é necessário comparar o tecido tumoral com o normal para detectar IMS, bastando utilizar apenas um controle negativo externo (Iacopetta & Hamelin, 1998; Zhou *et al.*, 1998).

No entanto, no início do desenvolvimento deste projeto nos deparamos com um trabalho que relatava a existência de polimorfismo em BAT-25 e BAT-26 em uma amostra da população Afro-Americana (Pyatt *et al.*, 1999). Novos levantamentos nos levaram a outras evidências que sugerem a existência de considerável variação alélica em BAT-26. Weber & Rodrigues Bigas (www.nfdht.nl) descreveram uma deleção de 10 pb neste *locus*. Do mesmo modo, Perucho descreveu que 2 a 4% da população, principalmente Afro-Americanos, podem apresentar um alelo menor de BAT-26 (revisado em Boland *et al.*, 1998). Alazzouzi *et al.* (2005) descreveu que BAT-26 apresenta uma variação no tamanho de repetição de 21 a 27 adeninas em pessoas saudáveis.

Estes achados nos levaram a crer que seria importante avaliar o perfil destes dois marcadores na população brasileira, tendo em vista o seu alto grau de miscigenação (Callegari-Jacques *et al.*, 2003). Além disso, sabe-se que estes marcadores apresentam um perfil alélico diferente dependendo da composição étnica da população (Dietmeier *et al.*, 1997; Boland *et al.*, 1998; Loukola *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003). Por isso, torna-se muito importante o conhecimento do perfil destes marcadores em cada população a fim de se evitar a classificação errônea do CCR e, em última análise, ao manejo inadequado dos pacientes.

Sendo assim, nós selecionamos duas amostras do Rio Grande do Sul a fim de avaliar o perfil de BAT-25 e BAT-26 nesta população. Uma das amostras foi de doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), os quais não foram selecionadas por nenhum tipo de classificação étnica. Esta amostra etnicamente heterogênea foi escolhida por acreditarmos ser similar a dos pacientes assistidos no HCPA,

os quais constituem a amostra estudada nesta dissertação. A outra amostra foi de indivíduos Afro-descendentes (Bortolini *et al.*, 1992), uma vez que a existência de polimorfismo foi descrita em indivíduos de origem Africana e que a população brasileira apresenta importante contribuição deste grupo étnico na sua formação (Callegari-Jacques *et al.*, 2003).

Nossos resultados mostraram que existe variação alélica nos *loci* BAT-25 e BAT-26 em indivíduos saudáveis da nossa população, que pode ser erroneamente classificada como IMS. De 116 indivíduos Afro-descendentes, 6.03% e 6.9% apresentaram variação alélica em BAT-25 e BAT-26, respectivamente. Em relação aos doadores de sangue, 8.08% apresentaram variação alélica para BAT-25 e 5.0% para BAT-26. A variação no tamanho alélico observada sugere que, em nossa população, existe uma variação polimórfica normal nestes *loci*.

Comparações entre as frequências de variação alélica das duas amostras (Afro-descendentes e doadores de sangue) não mostraram diferença significativa para ambos os marcadores. Este resultado sugere que a população Brasileira é tão miscigenada que a frequência de variação alélica é a mesma tanto em uma amostra menos heterogênea, como a de Afro-descendentes, como em uma mais heterogênea como a de doadores de sangue, não selecionada para grupo étnico. Ou em uma abordagem diferente: o critério de seleção da amostra de Afro-descendentes foi fenótipo, esse resultado reforça a teoria de que cor da pele não é um bom indicador e que mesmo a amostra de Afro-descendentes deve ter contribuição importante de diversos grupos étnicos. Por outro lado, comparações dos nossos resultados, para ambas as amostras, com aqueles descritos para Afro-Americanos (Pyatt *et al.*, 1999) mostraram diferença significativa apenas para BAT-25.

O sequenciamento das amostras que apresentaram variação alélica é bastante importante para a descrição e caracterização molecular dos diferentes alelos. Algumas tentativas de sequenciamento já foram realizadas, mas ainda não conseguimos padronizar a reação, uma vez que o sequenciamento de regiões microssatélites apresenta certo grau de dificuldade (vide eletroferogramas no Anexo II). A caracterização dos alelos variantes será feita por análise de tamanho de fragmento a seguir e, se necessário, sequenciamento *a posteriori*. As alternativas seriam a análise de tamanho alélico por sequenciador e/ou a clonagem dos alelos individuais para posterior sequenciamento.

Os resultados aqui descritos sugerem que BAT-25 e BAT-26 são polimórficos na amostra estudada, o que provavelmente se estende à população Brasileira, embora mais estudos sejam necessários para se confirmar esta hipótese. Nossos dados reforçam a idéia de que o grau de miscigenação das populações humanas é tal (Callegari-Jacques *et al.*, 2003), que não há sentido em sua divisão racial, fato que fica evidente na população Brasileira. Além disso, uma vez que detectamos a existência de polimorfismo nestes *loci*, ao contrário do descrito para Caucasianos, reforçamos a necessidade da análise comparativa entre tecido normal e tecido tumoral do mesmo indivíduo para determinar a presença de IMS nestes marcadores mononucleotídicos em tumores colorretais, e, assim, evitar resultados falso-positivos.

4.2 Análise de IMS e mutações em *K-ras* em tumores de reto

Neste estudo nós realizamos a análise de instabilidade de microssatélites e de mutações no códon 12 do gene *K-ras* em carcinomas de reto, não selecionados para história familiar, a fim de investigar a prevalência e o papel destes marcadores moleculares nesta doença. Os resultados encontrados no estudo populacional reforçaram nossa decisão de comparar tecido normal e tumoral para todos os marcadores na análise de IMS.

Nosso protocolo alternativo de extração de DNA de tecido embocado em parafina e fixado em formalina (Coura *et al.*, in press) possibilitou um sucesso de amplificação de 100%. Testes em blocos não fixados em formalina não foram bem sucedidos.

Inicialmente nós analisamos o painel de 5 marcadores propostos pelo ICG-HNPCC (Boland *et al.*, 1998) através de SSCP em mini-gel não-desnaturante (Iacopetta & Hamelin, 1998). Geralmente a análise de IMS é realizada em gel grande e desnaturante, pois não é possível a detecção acurada da mesma em gel não-desnaturante. Mesmo os géis desnaturantes apresentam variação na capacidade de detecção da IMS, dependendo da presença ou ausência de formamida (Santos *et al.*, 1999).

No entanto, Iacopetta & Hamelin (1998) descreveram um protocolo mais simples e rápido de análise do marcador mononucleotídico BAT-26 por SSCP em mini-gel não-desnaturante. Para os demais marcadores não há relatos de análise de IMS por esta técnica.

Sendo assim, neste trabalho nós padronizamos a técnica descrita por Iacopetta & Hamelin (1998) para a análise dos 5 marcadores. Todas as amostras foram analisadas em duplicata para todos os marcadores. Ao repetirmos as análises pela segunda vez,

observamos que os resultados para todos os marcadores eram concordantes, exceto para o D17S250, para o qual algumas amostras primeiramente classificadas como estáveis passaram a apresentar padrão instável e vice-versa. A frequência de instabilidade em D17S250 foi muito mais alta (41.5%) do que aquela observada nos outros marcadores. Por outro lado, a qualidade da amplificação das amostras para este marcador foi muito inferior se comparada a dos outros marcadores utilizados (Anexo III – figura 24), com bandas muito fracas, impossibilitando uma interpretação segura do SSCP para este marcador. Ao reamplificarmos essas amostras no intuito de aumentar a quantidade de material para viabilizar a análise, observamos um padrão de bandas não muito nítido, com muitas bandas inespecíficas, o que também dificultou uma análise confiável da presença de instabilidade neste *locus*. Nós tentamos ainda analisar o D17S250 em um gel não-desnaturante maior, mas não houve diferença em relação à qualidade do mini-gel.

Independente da qualidade da amostra, Nash *et al.* (2003) já haviam mostrado que dentre os 5 marcadores, o D17S250 é o que apresenta a maior frequência de instabilidade, o que provavelmente representa resultados falso-positivos.

Além disso, um padrão eletroforético de SSCP com bandas inespecíficas pode ser explicado por alguns fatores. Um deles é que estas bandas inespecíficas podem ser resultado de taxas de migração diferenciais de formas conformacionalmente diferentes da mesma molécula de DNA, originadas como consequência de um processo incompleto de desnaturação durante a eletroforese. Outra explicação pode ser o deslizamento da polimerase durante a PCR, que leva à formação de bandas de diferentes tamanhos (Santos *et al.*, 1999).

No nosso caso, porém, a qualidade e a quantidade da amostra talvez explique melhor este fenômeno. Em amostras controle de DNA obtido de sangue periférico conseguimos observar um padrão de bandas bem mais nítido, mas em amostras de parafina, a escassez de material prejudicou a qualidade de amplificação deste marcador e tornou difícil a visualização das bandas, sendo necessária a reamplificação do material. No entanto, o excesso de material, tanto em sangue quanto em material reamplificado de parafina, leva a um padrão eletroforético difícil de ser analisado, com muitas bandas inespecíficas (vide Anexo III).

Segundo Santos *et al.* (1999), a análise de microssatélites deve ser feita utilizando condições técnicas que permitam a visualização de não mais que duas bandas principais na

análise, correspondendo aos dois alelos normais no tecido normal. Portanto, se a amplificação do microssatélite resulta em múltiplas bandas sem uma banda principal evidente dentro do tamanho alélico esperado, o uso de gel com uréia e formamida pode ajudar a conseguir uma melhor separação do DNA, possibilitando a análise do *status* alélico mais facilmente.

Devido a tudo isto, nós excluímos o marcador D17S250 das análises de IMS e tentamos incluir um outro marcador mononucleotídico, o BAT-40, que é indicado pelo ICG-HNPCC como um marcador alternativo para a análise de IMS. No entanto, apesar do sucesso na padronização das condições de amplificação para este marcador e obtenção de um bom padrão de amplificação em amostras controles de DNA obtido a partir de sangue periférico, não conseguimos reproduzir essa amplificação nas nossas amostras de DNA normal e tumoral que degradaram com o passar do tempo (Anexo III). Por isso as análises de IMS foram feitas considerando-se apenas os outros 4 marcadores.

Os tumores com alto grau de instabilidade (IMS-H) geralmente são resultado de mutação germinativa em genes MMR, o que é característico de tumores hereditários (HNPCC) (Lawes *et al.*, 2003). Já os tumores esporádicos via de regra apresentam um processo de carcinogênese que envolve a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor, não sendo comum a IMS-H nestes tumores (Fuzikawa *et al.*, 1997; Grady & Markowitz, 2002; Goel *et al.*, 2003). No entanto, cerca de 15% desses tumores podem apresentar instabilidade devido à inativação somática de genes MMR, o que ocorre geralmente por hipermetilação do promotor desses genes (Kuismanen *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2001; Kámory *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Lawes *et al.*, 2003).

A amostra em estudo é composta de carcinomas de reto, não-selecionados para história familiar, o que sugere que a maioria destes tumores sejam casos esporádicos, já que os tumores hereditários são menos freqüentes e geralmente ocorrem em cólon ascendente (Aaltonen *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2003). Assim, como esperado, nós encontramos uma baixa freqüência de IMS-H (7.3%) e uma alta freqüência de IMS-L (51.2%). No entanto, vale lembrar, que a IMS pode estar presente no tumor, mas não ser detectada.

Esta proporção de carcinomas de reto IMS-H pode ser explicada por inativação somática (metilação do promotor) de genes MMR, especialmente *hMLH1* (Ishikubo *et al.*, 2004). Existem evidências de que fatores genéticos podem predispor a metilação do DNA.

Isto pode resultar num agrupamento familiar de CCR IMS-H, em que o mecanismo precursor é a metilação de *hMLH1* e não mutações germinativas (Jass, 2004). Este fato torna a análise molecular ainda mais importante para a diferenciação entre HNPCC e CCR esporádico.

Ao contrário dos tumores IMS-H, os tumores IMS-L não apresentam perda de *hMSH2* e *hMLH1* (Lindor *et al.*, 2002) e, recentemente, têm surgido evidências de que eles representam uma terceira via de carcinogênese colorretal (Kolodner *et al.*, 1999; Whitehall *et al.*, 2001; Kambara *et al.*, 2001; Whitehall *et al.*, 2002; Halford *et al.*, 2003; Pawlik *et al.*, 2004). Fenotipicamente, os tumores IMS-L parecem não diferir dos tumores estáveis (Thibodeau *et al.*, 1998; Umar *et al.*, 2004). A IMS-L tem sido descrita como uma característica freqüente dos CCRs. Laiho *et al.* (2002) descreveram a IMS-L como um evento genético comum em CCRs precoces com invasão limitada à submucosa e Halford *et al.* (2003) encontraram uma freqüência de IMS-L de 35% em tumores colorretais.

Calabrese *et al.* (2004) e Alazzouzi *et al.* (2005) sugeriram ainda que a IMS-L pode caracterizar portadores de HNPCC ainda não afetados e que essa instabilidade pode surgir bem antes do desenvolvimento tumoral. Uma das possíveis explicações para isso seria a haploinsuficiência de genes MMR.

A análise de IMS-L é difícil porque quanto maior o número de microssatélites analisados maior a freqüência de IMS-L (Laiho *et al.*, 2002; Halford *et al.*, 2003). A prevalência de IMS aqui descrita está de acordo com o descrito na literatura para tumores esporádicos (Nilbert *et al.*, 1999; Tsao *et al.*, 2000; Elsaleh *et al.*, 2001; Fernebro *et al.*, 2002).

Alguns autores indicam que os marcadores mononucleotídicos têm maior sensibilidade e especificidade para detecção de deficiência no sistema de reparo MMR do que os marcadores dinucleotídicos (Bocker *et al.*, 1997; Perucho, 1999; Nash *et al.*, 2003). Por este motivo, muitos consideram que a análise de BAT-26 somente é suficiente para identificação de IMS-H (Hoang *et al.*, 1997; Loukola *et al.*, 2001; Buhard *et al.*, 2004; Brennetot *et al.*, 2005). Entretanto, é provável que nenhum marcador isolado tenha acurácia perfeita para identificar CCRs com deficiência em genes MMR (Hoang *et al.*, 1997; Aaltonen *et al.*, 1998; Samowitz *et al.*, 1999; Loukola *et al.*, 2001; Suraweera *et al.*, 2002). Em nossa amostra, 1 dos 4 (25%) tumores que apresentaram instabilidade em BAT-

26 não foi IMS-H, ou seja, não apresentou instabilidade em nenhum outro marcador (tabela 2); ressalva seja feita que D17S250 não foi incluído na análise.

Tabela 2. Discordância entre BAT-25 e BAT-26

Pacientes	BAT-25	BAT-26	D2S123	D5S346	D17S250
1	e	i	e	i	i
2	i	i	e	e	e
3	e	i	e	e	i
4	e	i	e	i	i
5	i	e	e	e	i
6	i	e	e	e	e

Abreviações: i, instabilidade; e, estabilidade.

Com relação ao valor prognóstico da IMS, encontramos uma maior sobrevida global para os pacientes com tumores IMS-H. Este resultado está de acordo com a literatura que indica que a IMS é um indicador independente de melhor prognóstico (Cravo *et al.*, 1999; Colombino *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2003, Raut *et al.*, 2005; Popat *et al.*, 2005). Nós não encontramos associação significativa com outras variáveis clínico-patológicas nem com características de textura da cromatina. Apesar de não encontrarmos nenhuma associação significativa ao comparar os três grupos de IMS (IMS-H, IMS-L e MSS) quanto ao valor prognóstico e associação com variáveis clínico-patológicas, a avaliação das diferenças de prognóstico entre estes três grupos pode ser importante (Clark *et al.*, 2004).

A perda de heterozigosidade (LOH) foi observada em 33% (1 de 3) dos tumores IMS-H, 33% (7 de 21) dos tumores IMS-L e 47% (8 de 17) dos tumores MSS. Considera-se que ocorreu LOH quando a amostra tumoral apresenta ausência completa ou quase completa de um dos alelos observados no tecido normal, ao contrário da IMS que é caracterizada pela presença de bandas extras no tecido tumoral, que não estão presentes no tecido normal (Fuzikawa *et al.*, 1997).

A IMS foi menos freqüente nos marcadores mononucleotídicos do que nos dinucleotídicos (15% v 41.5% dos tumores, respectivamente). Duas amostras instáveis para BAT-25 e uma instável para BAT-26 apresentaram IMS-L. A presença de LOH também foi menos freqüente em tumores com instabilidade nos marcadores mononucleotídicos, comparados com aqueles com instabilidade apenas em dinucleotídicos (2,4% v 26,8%). Em 3 de 41 dos tumores (7%) com instabilidade em um marcador dinucleotídico observou-se a presença de LOH e IMS no mesmo *locus* (tabela 3).

Ao contrário da IMS, a LOH confere um pior prognóstico, estando associada a um elevado potencial metastático de tumores colorretais (Chang *et al.*, 2005). Em nossa amostra não avaliamos o valor prognóstico da LOH.

Tabela 3. Descrição da Análise de IMS

	IMS-H (%)	IMS-L (%)	Frequência total de instabilidade (%)	LOH (%)	IMS+LOH (%)
BAT-25	1 (33.3)	2 (66.7)	3 (7.3)	0 (0)	0 (0)
BAT-26	3 (75)	1 (25)	4 (9.8)	0 (0)	0 (0)
D2S123	0 (0)	5 (100)	5 (12.2)	6 (14.6)	0 (0)
D5S346	2 (16.7)	10 (83.3)	12 (29.3)	3 (7.3)	3 (7.3)
D17S250	2 (11.8)	10 (58.8)	17 (41.5)	1 (2.4)	3 (7.3)

Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura para tumores esporádicos (Fuzikawa *et al.*, 1997; Fernebro *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2003). Fernebro *et al.* (2002) observaram que a IMS-H é rara em tumores de reto de início precoce, sendo a via clássica, incluindo aneuploidia e mutações em oncogenes e genes supressores de tumor, mais comum nestes casos. Goel *et al.* (2003) descreveram uma sobreposição das duas vias, mutante e clássica, em 3.4 % dos casos. Segundo estes autores, a principal causa de aquisição de mutação nos tumores esporádicos IMS-H não está associada com perdas em *loci* MMR e que os raros eventos LOH associados são causados por uma instabilidade genômica geral que é típica destas neoplasias.

Nossos resultados corroboram a idéia de que tumores de reto, que via de regra são esporádicos, não apresentam carcinogênese predominantemente pela via mutante (IMS). Devido à elevada frequência de tumores IMS-L, os resultados aqui descritos também confirmam a hipótese de que estes tumores podem representar uma terceira via de carcinogênese que ainda precisa ser esclarecida. Além disso, nossos dados também confirmam que as diferentes vias carcinogênicas (LOH, IMS-H e IMS-L) podem se sobrepor.

A disponibilidade de um teste de IMS que seja rápido e preciso na identificação da presença ou ausência de deficiência em genes MMR em tumores colorretais é crucial para o uso bem-sucedido do teste de IMS tanto no âmbito clínico como na pesquisa.

As aplicações clínicas incluem a triagem de pacientes com CCR de início precoce, com história familiar de CCR ou com CCR associado a outros tipos de tumores para

testagem de mutação germinativa, a fim de confirmar o diagnóstico de HNPCC; bem como a individualização do prognóstico para todos os pacientes com CCR. As aplicações de pesquisa são muitas e incluem estudos de sobrevida, quimioprevenção, progressão do câncer, perfil molecular e terapia adjuvante (Nash *et al.*, 2003).

Mutações no códon 12 do gene *K-ras* foram observadas em 11 (26.8%) dos 41 pacientes. Esta frequência está de acordo com Samowitz *et al.* (2001) que descreve uma maior porcentagem de mutação em *K-ras* em CCR proximal do que em CCR distal, cuja frequência foi de 22.1%. A frequência de tais mutações descrita na literatura varia de 20% a 50% (Bos *et al.*, 1987; Fearon & Vogelstein, 1990; Albanese *et al.*, 1997; Russo *et al.*, 1998; Bouzourene *et al.*, 2000; Samowitz *et al.*, 2001; Bazan *et al.*, 2002). Esta ampla variação pode ser devida a vários fatores como: método de armazenamento do tumor, diferença nas técnicas utilizadas para detectar a presença de mutação, heterogeneidade tumoral, ou características específicas dos pacientes incluídos no estudo, como estadiamento de Dukes, localização do tumor entre outros (Breivik *et al.*, 1994; Slattery *et al.*, 2000). O fato de a taxa de mutação em *K-ras* não exceder 50%, sugere a existência de uma via alternativa na carcinogênese colorretal (Bazan *et al.*, 2002).

Não foi observada relação entre a presença/ausência de mutações em *K-ras* com idade ou sexo dos pacientes, ou com características clinico-patológicas e biológicas dos tumores. Alguns trabalhos mostram associação de mutações no códon 12 apenas com a produção de muco (Laurent-Puig *et al.*, 1991; Albanese *et al.*, 1997; Bazan *et al.*, 2002). Com relação ao prognóstico, vários estudos têm descrito uma taxa de sobrevida reduzida em pacientes com tumores positivos para mutação em *K-ras* (Lee *et al.*, 1996; Ahnen *et al.*, 1998; Bouzourene *et al.*, 2000; Andreyev *et al.*, 2001), enquanto outros não encontraram associação com prognóstico (Tortola *et al.*, 1999; Hirvikoski *et al.*, 1999; Esteller *et al.*, 2001). Na verdade, alguns autores têm demonstrado valor prognóstico apenas para mutações no códon 13 do gene, mas não para mutações do códon 12 (Russo *et al.*, 1998; Bazan *et al.*, 2002).

Vários fatores podem ser considerados para explicar estes resultados contraditórios com relação ao valor prognóstico de mutações no gene *K-ras*. A principal dificuldade na interpretação dos dados da literatura é o uso de diferentes sistemas de estadiamento ou o uso de pequenos grupos de diferentes estágios. Além disso, os detalhes da terapia dos pacientes frequentemente não estão descritos de forma adequada nos estudos de

marcadores prognósticos (McLeod & Murray, 1999). McLeod & Murray (1999) descreveram que geralmente os estudos restritos a estágios específicos da doença não encontram associação com o prognóstico. Por outro lado, aqueles trabalhos que descrevem um papel de mutações em *K-ras* no prognóstico frequentemente incluem tumores de todos os estágios (Dukes A a D). Além disso, há uma grande heterogeneidade mutacional de *K-ras* nos tumores colorretais (Bouzourene *et al.*, 2000), o que também pode contribuir para a dificuldade na avaliação do valor prognóstico deste marcador.

Samowitz *et al.* (2001) descreveram uma correlação inversa entre IMS e mutação em *K-ras*, com uma frequência maior de mutação ocorrendo em tumores estáveis. Oliveira *et al.* (2004) mostraram que dependendo do mecanismo genético/epigenético que leva à IMS-H o resultado em termos de ativação de oncogenes pode ser diferente, indicando que HNPCC, CCR esporádico IMS-H e CCR MSS podem afetar quinases distintas na via RAS/RAF/MAPK. Nossos resultados apresentam uma tendência que se aproxima dos achados de Samowitz *et al.* (2001), embora não tenhamos encontrado significância estatística. Nenhum dos tumores IMS-H apresentou mutação em *K-ras* e a frequência de mutação em tumores IMS-L e MSS foi de 29% em cada um.

A ausência de correlação entre as características da assinatura nuclear digital e a IMS não é inesperada se levarmos em consideração as diferentes vias de carcinogênese propostas para o câncer colorretal. A via mutante caracterizada pela IMS está relacionada com mutações em genes MMR, não tendo sido associada com alterações da cromatina. Por outro lado, a via supressora que se caracteriza pelo acúmulo de mutações sequenciais em genes supressores de tumor e oncogenes, comumente apresenta alterações de cromatina. Isto pode explicar a associação encontrada entre mutações no códon 12 do gene *K-ras* e algumas características morfométricas da assinatura nuclear digital - circularidade e aspecto - que estão relacionadas indiretamente com a distribuição física da cromatina nuclear.

Nossos dados descrevem o perfil destes dois marcadores moleculares em carcinomas de reto na nossa população e sugerem tendências importantes de seu possível valor prognóstico. Uma análise futura de mutações em outros códons do gene *K-ras*, especialmente o códon 13, pode ser de grande valia para uma melhor avaliação do papel deste marcador no CCR. Estudos prospectivos adicionais em uma série maior de pacientes devem ser realizados para esclarecer as possíveis implicações clínico-biológicas destes

achados e para melhor avaliar o valor prognóstico da IMS e das alterações em *K-ras* nos carcinomas colorretais.

5. CONCLUSÃO

- a) A frequência de IMS-H nos tumores de reto foi de 7.3% e de IMS-L foi de 51.2%. Esta frequência está de acordo com o descrito na literatura para tumores colorretais esporádicos;
- b) A frequência de mutação no códon 12 do gene *K-ras* foi de 26.8%, o que está de acordo com os dados da literatura para tumores colorretais esporádicos;
- c) Não houve correlação significativa entre os achados moleculares, tanto IMS quanto *mutKras*, com os dados clínicos e histopatológicos;
- d) Não houve correlação significativa entre IMS e os dados de textura da cromatina nuclear;
- e) Mutações no códon 12 do gene *K-ras* apresentaram associação com o aspecto da cromatina nuclear, o qual mede a distribuição da densidade ótica do núcleo; e com a circularidade do núcleo.
- f) Pacientes com tumores com alto grau de instabilidade (IMS-H) mostraram uma melhor sobrevida;
- g) Mutações no códon 12 do gene *K-ras* não apresentaram correlação significativa com o prognóstico.
- h) Nossos dados sugerem uma correlação negativa entre IMS-H e a presença de mutação no códon 12 do gene *K-ras*;
- i) Os *loci* BAT-25 e BAT-26 são polimórficos na população do Rio Grande do Sul, o que torna necessária a análise comparativa entre tecido normal e tumoral para detecção de IMS;

6. PERSPECTIVAS:

- Caracterização detalhada dos alelos variantes de BAT-25 e BAT-26 (amostras de doadores de sangue e de indivíduos de origem Africana);
- Análise das amostras de câncer de reto IMS-H por imunohistoquímica para verificar expressão dos genes *hMSH2* e *hMLH1* e por avaliação de metilação de promotor do gene *hMLH1*;
- Estudo prospectivo de IMS em casos suspeitos de HNPCC pela história familiar e em controles;
- Ampliação do tamanho amostral de tumores retais para expandir as análises de IMS e mutações em *K-ras*, incluindo análise do códon 13;
- Preparação de artigo sobre a correlação entre mutações em *K-ras* e as características da assinatura nuclear digital - análise de discriminantes; análise de amostras de câncer de pâncreas; comparação entre os achados para câncer de reto e pâncreas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomäki P, Chadwick RB, Kääriäinen H, Eskelinen M, Järvinen H, Mecklin J-P and de la Chapelle A (1998) Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 338 (21): 1481-1487.
- Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA Jr, Stemmerman G, Wells JD, Macdonald JS and Meyskens FL Jr (1998) Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 58: 1149-1158.
- Alazzouzi H, Domingo E, González S, Blanco I, Armengo M, Espín E, Plaja1 A, Schwartz S, Capella G and Jr. Schwartz S (2005) Low levels of microsatellite instability characterize MLH1 and MSH2 HNPCC carriers before tumor diagnosis. *Hum Mol Genetics* 14:235-239.
- Albanese I, Rinaldo CD, Alberti M, Bazan V, Russo A, Migliavacca M, Bazan P, Dardanone G, Tomasino RM and La Farina M (1997) Ras and myc analysis in primary and metastatic colorectal carcinomas: specific ras mutations are associated with Dukes' D stage and mucinous histotype. *Int J Oncol* 10:293-300.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD (2002) *Biologia Molecular da Célula*. 4a edição. Artes Médicas, Porto Alegre, Brasil.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent-Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Zietz C, Troungos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JW, Croke CT, O'Donoghue DP, Giaretti W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesener R, de Goeij AF, Arends JW, Andersen SN, Lovig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OP, De Angelis PD, Meling GI, Rognum TO, Smith R, Goh HS, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubb VJ, Piris J, Cruickshank NR, Morton D, Fox JC, Al-Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K and Urosevic N (2001) Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 85:692-696.
- Andrew SE and Peters AC (2001) DNA instability and human disease. *Am J Pharmacogenomics* 1:21-28.
- Azúa J, Romeo P, Morales M, Castiella T and Azúa J Jr (1999) DNA quantification as a prognostic factor in colorectal adenocarcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 21: 468 – 472.
- Bartels PH (1994) Quantitation in histopathology: Objectives, origins, digital image analysis and unresolved issues. In: Machevsky AM, Bartels PH (eds) *Image analysis: a primer for pathologists*. New York: Raven Press, pp 1–28.
- Bartels PH, Montironi R, Duval da Silva V, Hamilton PW, Thompson D, Vaught L and Bartels HG (1999) Tissue architecture analysis in prostate cancer and its precursors: An innovative approach to computerized histometry. *Eur Urol* 35:484-491.
- Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, La Farina M, Albanese I, Dardanoni G, Salerno S, Tomasino RM, Labianca R, Gebbia N and Russo A (2002) Specific codon 13 *K-ras* mutations are predictive of clinical outcome in

- colorectal cancer patients, whereas codon 12 *K-ras* mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol* 13:1438-1446.
- Beart RW, Melton JL, Maruta M, Dockerty MB, Frydenberg HB and O'Fallon M (1983) Trends in right and left-sided colon cancer. *Dis Colon Rectum* 26: 393–398.
- Bocker T, Diermann J, Friedl W, Gebert J, Holinski-Feder E, Karner-Hanusch J, von Knebel-Doerberitz M, Koelble K, Moeslein G, Schackert H-K, Wirtz H-C, Fishel R and Rüschoff J (1997) Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res* 57: 4739-4743.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN and Srivastava S (1998) A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58:5248-5257.
- Bortolini MC, Weimer TA, Franco MH, Salzano FM, Layrisse Z, Schneider H, Schneider MP and Harada ML (1992) Genetic studies in three South American black populations. *Gene Geogr* 6:1-16.
- Bos JL (1988) The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res* 195:255-271.
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ and Vogelstein B (1987) Prevalence of ras mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327:293-297.
- Bouzourene H, Gervaz P, Cerottini J-P, Benhattar J, Chaubert P, Saraga E, Pampallona S, Bosman FT and Givel J-C (2000) p53 and *Ki-ras* as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer* 36:1008-1015.
- Breivik J, Meling GI, Spurkland A, Rognum TO and Gaudernack G (1994) *K-ras* mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br J Cancer* 69:367-71.
- Brennetot C, Buhard O, Jourdan F, Flejou JF, Duval A and Hamelin R (2005) Mononucleotide repeats BAT-26 and BAT-25 accurately detect MSI-H tumors and predict tumor content: implications for population screening. *Int J Cancer*, 113:446-450.
- Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A and Hamelin R (2004) Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers*, 20:251-257.
- Calabrese P, Tsao JL, Yatabe Y, Salovaara R, Mecklin JP, Jarvinen HJ, Aaltonen LA, Tavare S and Shibata D (2004) Colorectal pretumor progression before and after loss of DNA mismatch repair. *Am J Pathol* 164:1447-1453.
- Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME and Hutz MH (2003) Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol* 15:824-834.
- Chang S-C, Lin J-K, Lin T-C, Liang W-Y (2005) Loss of heterozygosity: An independent prognostic factor of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 11: 778-784.
- Chen WS, Chen JY, Liu JM, Lin WC, King KL, Whang-Peng J and Yang WK (1997) Microsatellite instability in sporadic-colon-cancer patients with and without liver metastases. *Int J Cancer* 74: 470–474.
- Clark AJ, Barnetson R, Farrington SM and Dunlop MG (2004) Prognosis in DNA mismatch repair deficient colorectal cancer: are all MSI tumours equivalent? *Fam Cancer* 3:85-91.

- Colombino M, Cossu A, Manca A, Dedola MF, Giordano M, Scintu F, Curci A, Avallone A, Comella G, Amoroso M, Margari A, Bonomu GM, Castriota M, Tanda F and Palmieri G (2002) Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol* 13:1447-1453.
- Cravo M, Lage P, Albuquerque C, Chaves P, Claro I, Gomes T, Gaspar C, Fidalgo P, Soares J and Nobre-Leitão C (1999) BAT-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes. *J Pathol* 188: 252-257.
- de la Chapelle A (2004) Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature Rev Cancer* 4: 769-780.
- Deans GT, Parks TG, Rowlands BJ and Spence RA (1992) Prognostic factors in colorectal cancer. *Br J Surg* 79: 608–613.
- Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R and Rüschoff J (1997) Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 57: 4749-4756.
- Dukes CE (1932) The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 35: 323–332.
- Ellis CA and Clark G (2000) The importance of being *K-ras*. *Cell Signal* 12: 425-434.
- Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grieu F, Grant R, Joseph D and Iacopetta B (2001) P53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:1343-1349.
- Esteller M, Gonzalez S, Risques RA, Marcuello E, Mangués R, Germa JR, Herman JG, Capella G and Peinado MA (2001) *K-ras* and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 19:299-304.
- Fearon ER and Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell* 61:759-767.
- Fernández-López F, Paredes-Cotré JP, Fortaleza-Vila J, Path MRC, Puente-Domínguez JL and Potel-Lesquereux J (1999) Prognostic value of nuclear morphometry in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 42: 386-392.
- Fernández-Peralta AM, Nejda N, Oliart S, Medina V, Azcoita MM and González-Aguilera JJ (2005) Significance of mutations in *TGFRB2* and *BAX* in neoplastic progression and patient outcome in sporadic colorectal tumors with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Genet Cytogenet* 157:18-24.
- Fernebro E, Halvarsson B, Baldetorp B and Nilbert M (2002) Predominance of CIN versus MSI in the development of rectal cancer at young age. *BMC Cancer* 2: 25-32.
- Ferreira FO and Haddad FJ (1999) Estado atual da Biologia molecular dos tumores. In: Rossi BM e Pinho M (eds) *Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião*. São Paulo, pp 214-249.
- Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, Booker S, Lynch HT, Jass JR, Green JS, Kim H, Jen J, Vogelstein B and Hamilton SR (1998) Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 153 (4): 1063-1078.
- Fuzikawa AK, Hadad LA, da-Cunha-Melo JR, Brasileiro-Filho G and Pena SDJ (1997) Utilization of microsatellites for the analysis of genomic alterations in colorectal cancers in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 30(8): 915-921.
- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM and Boland CR (2003)

- Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 63: 1608-1614
- Gonzalez-Garcia I, Moreno V, Navarro M, Marti-Rague J, Marcuello E, Benasco C, Campos O, Capella G and Peinado MA (2000) Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 92:544-549.
- Gordon PH (1999) Malignant neoplasms of the colon. In: Gordon PH & Nivatvongs S (eds) *Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum and Anus*. 2nd ed. St.Louis, pp 575-717.
- Grady WM and Markowitz SD (2002) Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3: 101-128.
- Gus P, Müssnich JFX, Rosito MA, Seben RL, Fraga JCS and Kraemer ES (1984) Antígeno Carcinoembriônico (CEA) pré-operatório em câncer colorretal. Diagnóstico e prognóstico. *Rev HCPA* 4: 41-46.
- Halford SE, Sawyer EJ, Lambros MB, Gorman P, Macdonald ND, Talbot IC, Foulkes WD, Gillett CE, Barnes DM, Akslen LA, Lee K, Jacobs IJ, Hanby AM, Ganesan TS, Salvesen HB, Bodmer WF, Tomlinson IP and Roylance RR (2003) MSI-low, a real phenomenon which varies in frequency among cancer types. *J Pathol* 201:389-394.
- Hardy RG, Meltzer SJ and Jankowski JA (2001) Clinical Review. ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risks factors. *BMJ* 321: 886-889.
- Hirvikoski P, Auvinen A, Servomaa K, Kiuru A, Rytomaa T, Makkonen K and Kosma VM (1999) *K-ras* and p53 mutations and overexpressions as prognostic factors in female rectal carcinoma. *Anticancer Res* 19: 685-91.
- Hoang J-M, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G and Hamelin R (1997) BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 57: 300-303.
- Huang DP; Ng, MHL; Lo, KW and Lee, JCK (1997) Molecular basis of cancer. *Hong Kong Med J* 3 (2): 186-194.
- Iacopetta B and Hamelin R (1998) Rapid and nonisotopic SSCP-based analysis of the BAT-26 mononucleotide repeat for identification of the replication error phenotype in human cancers. *Hum Mutat* 12:355-360.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA), <http://www.inca.org.br>
- Ishikubo T, Nishimura Y, Yamaguchi K, Khanswan U, Arai Y, Kobayashi T, Ohkura Y, Hashiguchi Y, Tanaka Y and Akagi K (2004) The clinical features of rectal cancers with high-frequency microsatellite instability (MSI-H) in Japanese males. *Cancer Lett* 216:55-62.
- Jass JR (1995) Tumors of the small and large intestines. In: Fletcher CD editor. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. New York, pp 243-274.
- Jass JR (2004) HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer* 3:93-100.
- Kambara T, Matsubara N, Nakagawa H, Notohara K, Nagasaka T, Yoshino T, Isozaki H, Sharp GB, Shimizu K, Jass J and Tanaka N (2001) High frequency of low-level microsatellite instability in early colorectal cancer. *Cancer Res* 61: 7743-7746.
- Kámory E, Kolacsek O, Ottó S and Csuka O (2003) hMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res* 9: 236-241.

- Kim HC, Kim CN, Yu CS, Roh SA and Kim JC (2003) Methylation of the hMLH1 and hMSH2 promoter in early-onset sporadic colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Int J Colorectal Dis* 18: 196-202.
- Kimmel Cancer Center, <http://www.kimmeltcancercenter.org>
- Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, Wahlberg S, Fox EA, Peel D, Ziogas A, Garber JE, Syngal S, Anton-Culver H and Li FP (1999) Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 59:5068-5074.
- Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la Chapelle A and Peltomäki P (2000) Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol* 156: 1773-1779.
- Laiho P, Launonen V, Lahermo P, Esteller M, Guo M, Herman JG, Mecklin J-P, Järvinen H, Sistonen P, Kim K-m, Shibata D, Houlston RS and Aaltonen LA (2002) Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res* 62: 1166-1170.
- Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O, Validire P, Melot T, Mosseri V, Salmon RJ and Thomas G (1991) Association of Ki-ras mutation with differentiation and tumor-formation pathways in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 49: 220-223.
- Lawes DA, SenGupta S and Boulos PB (2003) The Clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *EJSO* 29:201-212.
- Lee JC, Wang ST, Lai MD, Lin YJ and Yang HB (1996) *K-ras* gene mutation is a useful predictor of the survival of early stage colorectal cancers. *Anticancer Res* 16: 3839-3844.
- Lee JS, Jung JJ, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Oh BR and Moon JD (2000) Value of morphometric nuclei image analysis using the Feulgen reaction in renal cell carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 22: 31-36.
- Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, Walsh-Vockley C, Petersen GM, Walsh MD, Leggett BA, Young JP, Barker MA, Jass JR, Hopper J, Gallinger S, Bapat B, Redston M and Thibodeau SN (2002) Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 20:1043-1048.
- Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JKV, Parsons RE, Jen J, Papadopoulos N, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Kinzler KW and Vogelstein B (1995) Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 9: 48-55.
- Loeb LA (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51(12):3075-3079.
- Lopes A, Nakagawa WT and Mello CAL (1999) Oncogenes e Genes Supressores de Tumor: Um equilíbrio necessário. In: Rossi BM e Pinho M (eds) *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo, pp 125–142.
- Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, Mecklin JP, Launonen V and Aaltonen LA (2001) Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 61:4545-4549.
- Marcello PW and Schoetz DJ Jr (1997) Surgery for colonic carcinoma. In: Nicholls JR and Dozois RR (eds) *Surgery of the colon & rectum*. New York, pp 411–426.
- Markowitz S (1999) DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. *J Clin Oncol* 56-61.
- McLeod HL and Murray GI (1999) Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 79:191-203.

- Mitmaker B, Begin LR and Gordon P (1991) Nuclear shape as a prognostic discriminant in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 34: 249–259.
- Moertel CG, O'Fallon JR, Go VLW, O'Connell MJ and Thynne GS (1986) The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging and prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 58: 603–610.
- Mori Y, Selaru FM, Sato F, Yin J, Simms LA, Xu Y, Olaru A, Deacu E, Wang S, Taylor JM, Young J, Leggett B, Jass JR, Abraham JM, Shibata D and Meltzer SJ (2003) The impact of microsatellite instability on the molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer Res* 63:4577-4582.
- MSH2 database, [http:// www.nfdht.nl](http://www.nfdht.nl)
- Nakagawa H, Nuovo GJ, Zervos EE, Jr. Martin EW, Salovaara R, Aaltonen LA and de la Chapelle A (2001) Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. *Cancer Res* 61:6991-6995.
- Nash GM, Gimbel M, Shia J, Culliford AT, Nathanson DR, Ndubuisi M, Yamaguchi Y, Zeng ZS, Barany F and Paty PB (2003) Automated, multiplex assay for high-frequency microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21: 3105-3112.
- Nicholls RJ (1997) Surgery for rectal carcinoma. In: Nicholls JR & Dozois RR (eds) *Surgery of the colon & rectum*. New York, pp 427-474.
- Nilbert M, Planck M, Fernebro E, Borg A and Johnson A (1999) Microsatellite instability is rare in rectal carcinomas and signifies hereditary cancer. *Eur J Cancer* 35:942-945.
- Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28.
- Oda S, Maehara Y, Sumiyoshi Y and Sugimachi K (2002) Microsatellite instability in cancer: what problems remain unanswered ? *Surgery* 131(Suppl1): S55-62.
- Oliveira C, Westra JL, Arango D, Ollikainen M, Domingo E, Ferreira A, Velho S, Niessen R, Lagerstedt K, Alhopuro P, Laiho P, Veiga I, Teixeira MR, Ligtenberg M, Kleibeuker JH, Sijmons RH, Plukker JT , Imai K, Lage P , Hamelin R, Albuquerque C, Schwartz Jr S, Lindblom A, Peltomäki P, Yamamoto H, Aaltonen LA, Seruca R and Hofstra RMW (2004) Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum Mol Genetics* 13: 2303-2311.
- Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, De Rycke Y, Li Y-J, Muzeau F, Girodet J, Salmon R-J and Thomas G (1997) Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12122-12127.
- Pawlik TM, Raut CP and Rodriguez-Bigas MA (2004) Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers* 20:199-206.
- Peltomäki, P (2001) DNA mismatch repair and cancer. *Mut Res* 488: 77-85.
- Percesepe A, Kristo P, Aaltonen LA, Ponz de Leon M, de la Chapelle A and Peltomäki P (1998) Mismatch repair genes and mononucleotide tracts as mutations targets in colorectal tumors with different degrees of microsatellite instability. *Oncogene* 17: 157-163.
- Perucho M (1999) Correspondence re: C.R. Boland *et al.*, A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58: 5248-5257, 1998. *Cancer Res* 59:249-256.
- Pinho M and Rossi BM (1999) Conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal. *Rev Bras Coloproct* 19: 57-60.

- Popat S, Hubner R and Houlston RS (2005) Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 23:609-618.
- Pyatt R, Chadwick RB, Johnson CK, Adebamowo C, de la Chapelle A and Prior TW (1999) Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. Implications for microsatellite instability testing. *Am J Pathol* 155: 349-353.
- Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Doglietto GB and Crucitti F (1998) Prognostic factors in colorectal cancer. Literature review for clinical application. *Dis Colon Rectum* 41: 1033–1049.
- Raut CP, Pawlik TM and Rodriguez-Bigas MA (2004) Clinicopathological features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mut Res* 568: 275-282.
- Rawett V (1998) Carcinoma Colorretal: estadiamento e parâmetros prognósticos. PhD Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Rex DK, Alikhan M, Cummings O and Ulbrighth TM (1999) Accuracy of pathologic interpretation of colorectal polyps by general pathologists in community practice. *Gastroint Endosc* 50: 468- 474.
- Riesener KP, Füzesi L, Biesterfeld S, Götzen A, Kasperk R and Schumpelick V (1999) Prognostic value of DNA image cytometry in resected colorectal hepatic metastases. *Analyt Quant Cytol Histol* 21: 311–318.
- Rosito MA, Damin DC, Moreira LF, da Silva VD and Prolla JC (2003) Nuclear chromatin texture in rectal carcinoma. Prognostic value. *Anal Quant Cytol Histol* 25(4):215-220
- Russo A, Migliavacca M, Bazan V, Maturi N, Morello V, Dardanoni G, Modica G, Bazan P, Albanese I, La Farina M and Tomasino RM (1998) Prognostic significance of proliferative activity, DNA-ploidy, p53 and ki-ras point mutations in colorectal liver metastases. *Cell Prolif* 3:139-153.
- Samowitz WS, Holden JA, Curtin K, Edwards SL, Walker AR, Lin HA, Robertson MA, Nichols MF, Gruenthal KM, Lynch BJ, Leppert MF and Slattery ML (2001) Inverse relationship between microsatellite instability and *K-ras* and *p53* gene alterations in colon cancer. *Am J Pathol* 158:1517-1524.
- Samowitz WS, Slattery ML, Potter JD and Leppert MF (1999) BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *Am J Pathol* 154:1637-1641.
- Sampedro A, Urdiales G, Martinez-Nistal A, Riera J and Hardisson D (1996) Prognostic value of DNA image cytometry in colorectal carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 18: 214–220.
- Santos AC, Yamaoka Y, Graham DY and Sepulveda AR (1999) Variability in the interpretation of microsatellite patterns with different electrophoretic conditions. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 52: 302-304.
- Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, Sipponen P, Stolte M and Watanabe H (1998) Differences in the diagnostic criteria used by japanese and western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer* 82: 60-69.
- Shepherd NA (1997) Pathology. In: Nicholls JR & Dozois RR (eds) *Surgery of the colon & rectum*. New York, pp 349–363.
- Slattery ML, Curtin K, Anderson K, Ma KN, Edwards S, Leppert M, Potter J, Schaffer D and Samowitz WS (2000) Associations between dietary intake and Ki-ras mutations in colon tumors: a population-based study. *Cancer Res* 60:6935-6941.
- Strachan T and Read A (2004) *Human Molecular Biology*. 3ª edição. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, Inglaterra.

- Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B and Hamelin R (2002). Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterol* 123:1804-1811.
- Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Michels VV, Farr GH Jr and O'Connell MJ (1998) Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 58:1713-1718.
- Tortola S, Marcuello E, Gonzalez I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, Sancho FJ, Peinado MA and Capella G (1999) p53 and *K-ras* gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 17: 1375-1381.
- Tsao JL, Yatabe Y, Salovaara R, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Aaltonen LA, Tavare S and Shibata D (2000) Genetic reconstruction of individual colorectal tumor histories. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1236-1241.
- Turnbull RB Jr, Kyle K, Watson FR and Spratt J (1967) Cancer of the colon: the influence of no-touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg* 166: 420–427.
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomäki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HFA, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN and Srivastava S (2004) Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96:261-268.
- Visual Molecular Dynamics (VMD), <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/gallery>
- Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG, Stearns M, Schwartz MK and Oettgen HF (1978) Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N Engl J Med* 299: 448–451.
- Whitehall VL, Walsh MD, Young J, Leggett BA and Jass JR (2001) Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res* 61:827-30.
- Whitehall VL, Wynter CV, Walsh MD, Simms LA, Purdie D, Pandeya N, Young J, Meltzer SJ, Leggett BA and Jass JR (2002) Morphological and molecular heterogeneity within nonmicrosatellite instability-high colorectal cancer. *Cancer Res* 62:6011-6014
- Wied GL, Bartels PH, Bahr GF and Oldfield DG (1968) Taxonomic intra-cellular analytic system (TICAS) for cell identification. *Acta Cytol* 12: 180-204.
- Wiggers T, Arends JW and Volovics A (1988) Regression Analysis of prognostic factors in colorectal cancer after curative resections. *Dis Colon Rectum* 31: 33–41.
- Wilmink ABM (1997) Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 40: 483-493.
- Wiratkapun S, Kraemer M, Seon-Choen F, Hong Ho Y and Eu KW (2001) High preoperative serum carcinoembryonic antigen predicts metastatic recurrence in potentially curative colonic cancer: results of a five-year study. *Dis Colon Rectum* 44: 231-235.
- Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, Young JP, Leggett BA, Jass JR and Macdonald GA (2000) Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg* 87:1197-1202.

- Yu H-JA, Lin KM, Ota DM and Lynch HT (2003) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: preventive management. *Cancer Treat Rev* 29:461-470.
- Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M, Lothe RA, Gleeson CM, Russell SE, Muzeau F, Flejou JF, Hoang-Xuan K, Lidereau R, Thomas G and Hamelin R (1998) Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer* 21:101-107.

8. ANEXOS
Anexo I: Artigo de Revisão

HNPCC: predisposição hereditária, diagnóstico e prevenção ^(#)

Coura R¹, Prolla JC², Ashton-Prolla P^{1,3,4}

¹PPG Genética e Biologia Molecular - UFRGS; ²Serviço Citopatologia - HCPA; ³Serviço de Genética Médica - HCPA; ⁴Departamento de Genética - UFRGS

(*) Correspondence to:

P. Ashton-Prolla

Department of Genetics

Federal University of Rio Grande do Sul

E-mail: pprolla@portoweb.com.br

(#) Manuscrito submetido para publicação no periódico *Arquivos de Gastroenterologia*.

RESUMO - O câncer colorretal é o terceiro tumor em frequência e o segundo em mortalidade nos países desenvolvidos. No Brasil, está entre as seis neoplasias malignas mais encontradas e é a terceira em mortalidade. Cerca de 20% dos tumores colo-retais têm etiologia hereditária. Este trabalho apresenta uma revisão sobre aspectos genéticos e clínicos, bem como diagnóstico, tratamento e prevenção na Síndrome do Câncer Colo-retal Hereditário Não-Polipomatoso (HNPCC), que representa a forma mais frequente de câncer colo-retal hereditário. A importância dessas abordagens se deve principalmente à possibilidade de manejo, prevenção e rastreamento específicos para indivíduos em risco para HNPCC que conferem um aumento considerável na sobrevivência desses pacientes e seus familiares em risco.

DESCRIPTORIOS – HNPCC, predisposição hereditária, câncer colo-retal hereditário não-polipomatoso.

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor em frequência e o segundo em mortalidade nos países desenvolvidos. No Brasil, está entre as seis neoplasias malignas mais comuns e é a terceira em mortalidade em ambos os sexos ⁽¹⁵⁾. A sobrevivência média de pacientes com CCR é de 60% em cinco anos e os principais fatores prognósticos utilizados atualmente se baseiam em achados clínicos ⁽⁵⁾.

O câncer pode ser diferenciado em três tipos, que muitas vezes se confundem: o câncer esporádico, o familiar e o hereditário. O câncer esporádico é aquele que ocorre pela integração de mutações gênicas somáticas com fatores ambientais que geralmente ocorre como um caso isolado na família e em idade mais tardia. O câncer familiar é aquele que se observa aglomerado em famílias, nas quais, no entanto, não se detectam mutações germinativas que provavelmente ocorre por exposição a fatores de risco ambientais comuns, ou até mesmo pela presença de mutações em genes de susceptibilidade. Já o câncer hereditário é aquele em que se detecta uma mutação germinativa que é transmitida para descendência e geralmente tem alta penetrância. A presença de uma mutação germinativa de alta penetrância segregando na família pode levar à ocorrência de múltiplos casos de câncer de ocorrência em idade precoce. A caracterização de cada tipo nem sempre é clara, uma vez que a história familiar muitas vezes não é capaz de fornecer as informações necessárias para a diferenciação entre estes três tipos.

O reconhecimento do caráter hereditário da neoplasia intestinal é de grande importância, uma vez que se estima que em torno de 20% dos tumores colorretais tenham etiologia hereditária e as síndromes de predisposição hereditária ao câncer geralmente predisõem à ocorrência de mais de um tipo de câncer em um mesmo indivíduo. Além disso, atualmente existem ferramentas disponíveis para se fazer um diagnóstico precoce e, assim, poder direcionar o tratamento de forma a melhorar os índices de sobrevivência e prevenir o desenvolvimento de outros tumores associados às síndromes de câncer colo-retal hereditário (CCRH) ^(1, 53).

A forma mais frequente de CCRH é o câncer colo-retal hereditário não-polipomatoso (HNPCC), previamente denominado Síndrome de Lynche que tem uma prevalência de 2-5 indivíduos em 1000 nos Estados Unidos ⁽⁴⁹⁾. No Brasil, não existem dados sobre a incidência ou prevalência de HNPCC ⁽⁴²⁾. Caracteriza-se por uma condição autossômica dominante de alta penetrância (cerca de 80-90%) em que se observa o desenvolvimento de CCR em idade precoce e ocorrência de tumores extra-colônicos (endométrio, ovário, estômago, intestino delgado entre outros) nas famílias afetadas. A remoção em tempo hábil de tumores benignos e malignos reduz significativamente a morbidade e a mortalidade da doença ^(6, 53).

EPIDEMIOLOGIA

Em famílias HNPCC típicas, observam-se múltiplas gerações afetadas por câncer colo-retal (CCR) em idade precoce (por volta dos 45 anos) com predominância de CCR proximal ao ângulo hepático (cólon ascendente) ($\approx 70\%$). Há um excesso de CCRs sincrônicos e metacrônicos ^(5, 6). Embora pacientes afetados possam apresentar pólipos, quando presentes estes geralmente aparecem em número menor que 50. As características histopatológicas dos tumores colo-retais no HNPCC são frequentemente distinguíveis, embora não sejam patognomônicas. Estas incluem carcinomas mucinosos com pouca diferenciação celular, presença de células em anel de sinete, infiltração linfocitária peritumoral, reação Crohn-símile (formação de agregados linfóides ao redor do tumor) e infiltração de linfócitos no tecido tumoral ⁽²⁸⁾.

Indivíduos com HNPCC têm um risco aumentado para ocorrência de vários tumores extra-colônicos: endométrio (o mais frequente depois do CCR), ovário, estômago, intestino delgado, pâncreas, trato hepatobiliar, cérebro e trato uroepitelial superior. A

associação de CCR com tumores sebáceos benignos ou malignos constitui a síndrome de Muir-Torreea associação de câncer colo-retal não-polipóide com glioblastoma multiforme constitui a síndrome de Turcot.

Comparando-se com o CCR esporádico, os tumores no HNPCC são mais freqüentemente localizados no cólon proximal, são mais indiferenciados, com excesso de muco e células em anel de sinete. Os adenomas no HNPCC tendem a ser vilosos e são mais displásicos ao diagnóstico do que os detectados na população em geral, apresentando um processo de carcinogênese acelerado (“teoria do adenoma agressivo”). Sendo assim, um pequeno adenoma colônico pode chegar a um carcinoma em 2 ou 3 anos, enquanto na população geral este processo leva, em média, 8 a 10 anos. O prognóstico é melhor no HNPCC do que nos casos de CCR esporádico (maior sobrevida) e decorre de melhor resposta terapêutica à quimioterapia e menor potencial para a ocorrência de metástases ⁽⁹⁾ .29, 32, 34, 53)

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O fator de risco mais comum para o CCRH é uma história familiar positiva. Vários estudos epidemiológicos de CCR em diversos países mostraram que um indivíduo que tenha um ou mais familiares de primeiro grau com CCR tem um risco empírico 2 a 3 vezes maior para a doença. No entanto, a interpretação da história familiar em famílias pequenas é bastante limitada ⁽²⁷⁾ .

A primeira diretriz de diagnóstico clínico do HNPCC, desenvolvida em reunião de consenso internacional, foi a dos Critérios de Amsterdã (1991). Naquela época, os genes associados ao HNPCC e suas funções ainda não tinham sido identificados e caracterizados, por isso as diretrizes elaboradas se basearam unicamente na história familiar e na idade ao diagnóstico do tumor (tabela 1) ⁽⁵⁰⁾ .

Apesar de muito útil, esta diretriz é bastante rigorosa e muitas famílias com mutação associada ao HNPCC não preenchem todos os seus critérios. Sendo assim, em 1998 os critérios de Amsterdã foram revisados, originando os Critérios de Amsterdã II, que passaram a incluir os tumores extracolônicos associados ao HNPCC ⁽⁴⁹⁾ . Os critérios de Amsterdã também foram modificados para permitir a avaliação de famílias pequenas ⁽⁴⁹⁾ .

Com a descoberta dos genes envolvidos no HNPCC e com a possibilidade da utilização de testes genéticos para confirmar uma suspeita clínica, surgiu a necessidade de

novas diretrizes. Assim, em 1997 desenvolveu-se a Diretriz de Bethesda, com o objetivo de determinar quando um indivíduo que não satisfaça os Critérios de Amsterdã deve ser submetido ao teste genético ⁽⁴¹⁾. Em 2003 os critérios da diretriz de Bethesda também foram revisados ^(48, 49).

BIOLOGIA MOLECULAR

A genética molecular dos carcinomas colo-retais é a melhor compreendida dentre as neoplasias humanas ⁽¹⁹⁾. Os modelos atuais de carcinogênese são baseados em evidências experimentais de que o acúmulo de mutações leva à alteração de genes específicos (oncogenes, genes supressores de tumor e outros genes envolvidos na regulação da proliferação e crescimento celular), resultando em expansão clonal neoplásica ^(12, 18).

O câncer colo-retal se desenvolve através de um processo com estágios sequenciais reconhecidos ao nível histopatológico pela progressão da mucosa normal para um carcinoma invasivo (seqüência adenoma-carcinoma) (Figura 1). Na maioria dos carcinomas colo-retais, a inativação do gene *APC* (“adenomatous polyposis coli”; localizado no braço longo do cromossomo 5, 5q) inicia o processo levando a uma displasia, em geral na forma de adenoma. A partir daí, à medida que mutações adicionais se acumulam em oncogenes, incluindo genes da família *ras* genes supressores de tumor localizados nos cromossomos 18q (*DCC*, *Smad2*, *Smad4*) e 17q (*Tp53*) ocorre a progressão de adenoma inicial para adenoma intermediário e por fim, para o carcinoma. Estas alterações são encontradas em várias combinações diferentes em tumores colo-retais ⁽¹⁹⁾.

No entanto, o número de modificações em oncogenes e genes supressores de tumor é muito alto para ser atribuído apenas à taxa de mutação espontânea. Sendo assim, acredita-se que um fenótipo geneticamente instável, que leve ao *aumento* da taxa de mutação espontânea, seja necessário para o processo de desenvolvimento do tumor ^(12, 26, 30).

Sendo assim, duas vias aparentemente distintas de instabilidade genômica podem ser identificadas. A primeira e mais comum, é caracterizada pela inativação sequencial de genes supressores de tumor (*APC*, *p53*, *DCC*, *SMAD2* e *SMAD4*). Os tumores gerados através desta via “supressora” apresentam instabilidade cromossômica (CIN) com freqüentes anormalidades citogenéticas e perdas alélicas. O mecanismo preciso que dirige

o processo de CIN não é bem entendido ⁽²¹⁾. Enquanto mutações em oncogenes são geralmente eventos únicos dominantes, a inativação de genes supressores de tumor é dependente da perda funcional de ambas as cópias dos genes relevantes. Enquanto a primeira das duas perdas ocorre mais freqüentemente por mutações gênicas, a segunda delas é mais freqüentemente um evento cromossômico, geralmente uma deleção. Como a deleção geralmente envolve a perda simultânea de *loci* gênicos próximos ao supressor de tumor – e ocasionalmente perda de todo o cromossomo ou de um braço cromossômico – estes eventos são fortemente associados com a perda de heterozigosidade (LOH) em polimorfismos hipervariáveis (minissatélites e microssatélites) localizados na região deletada ⁽²⁰⁾.

Uma segunda via é característica de tumores de pacientes com HNPCC. A característica desta via “mutante” alternativa é a instabilidade de microssatélites (IMS) difundida pelo genoma. Estudos recentes indicam que a inativação do gene *hMLH1* por hipermetilação de seu promotor também produz o fenótipo de alta instabilidade em CCRs esporádico e é responsável pela maioria, senão todos, os casos de CCRs esporádicos com este fenótipo ⁽²¹⁾.

Embora estes dois mecanismos de instabilidade genômica possam ser distinguidos por suas características moleculares, várias evidências sugerem que há algum grau de sobreposição entre eles. Por exemplo, a LOH foi descrita como um mecanismo ocasional de inativação do alelo selvagem de *hMLH1* em alguns tumores com alta IMS. Também é possível que tumores colo-retais sejam iniciados por mecanismos que não envolvam IMS ou CIN persistente. Por exemplo, há evidências que indicam que esta modificação epigenética caracterizada pela hipermetilação de regiões promotoras de genes supressores de tumor chave pode desempenhar papel crucial na evolução e progressão de muitos tumores colo-retais. Estes dados sugerem que tumores originados pela metilação de promotor não podem progredir independentemente pela via IMS ou CIN. Estes achados também sugerem que a IMS e a CIN podem não representar mecanismos completamente distintos e que múltiplos mecanismos podem coexistir em alguns tumores, desde que as combinações propiciem vantagens adicionais de crescimento ⁽²¹⁾.

Em situações normais, a taxa de mutação cromossômica é maior que a gênica. Portanto, espera-se encontrar freqüentes deleções cromossômicas em tumores com um sistema de reparo intacto, seguindo a via clássica (supressora) de tumorigênese. Na via

“mutante”, as taxas de mutação gênica estão aumentadas em 100 ou 1000 vezes, sendo assim mais provável de ocorrer do que alterações cromossômicas que levem à LOH. Entretanto, não há razão para que ambas, IMS e LOH, não possam ocorrer simultaneamente ⁽²⁰⁾.

A instabilidade de microssatélites (IMS), é uma característica decorrente de mutações em genes de reparo de malpareamento de DNA (*hMSH2* e *hMLH1*, principalmente), que resultam em falha na correção dos erros de replicação (RER). No caso do HNPCC, um alelo de um destes genes de reparo apresenta uma mutação germinativa e o outro alelo é inativado ou perdido por uma mutação somática, levando a um acúmulo de erros na replicação do DNA, ao aumento de mutações e, por fim, à aceleração do processo de carcinogênese ^(11, 35, 52, 53).

Cerca de 70% das famílias com HNPCC apresentam mutação germinativa em um dos genes de reparo de malpareamento (MMR) conhecidos: *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hPMS1* ou *hPMS2*. Como consequência, a maioria dos tumores do HNPCC (80%) é IMS+, enquanto apenas 20% dos tumores esporádicos são IMS+ ⁽¹¹⁾. Dentre estas mutações em genes MMR, aquelas que ocorrem nos genes *hMSH2* (localizado em 2p) e *hMLH1* (localizado em 3p) são as mais frequentes, sendo encontradas em 90% das famílias HNPCC com mutação identificada ^(29, 52).

Em geral, as mutações descritas para esses dois genes são inserções, deleções, alterações nos sinais de processamento do pré- RNA mensageiro e mutações sem sentido. A maioria das mutações em *hMSH2* consiste em mudança de quadro de leitura e mutação sem sentido. Por outro lado, mutações em *hMLH1* incluem mudanças de quadro de leitura e troca de sentido, muitas ainda sem papel patológico estabelecido. Alterações de sítio de processamento são comuns em *hMLH1* e menos frequentes em *hMSH2*. Além disso, mutações em *hMSH2* ocorrem aleatoriamente ao longo da seqüência codificadora, ao passo que em *hMLH1* nota-se uma concentração de mutações nos éxons 15 e 16 ⁽³²⁾.

Mutações em outros genes como *hGTBP* (2p16) e *hMLH3* (14q24.3) também têm sido associadas ao HNPCC ⁽³³⁾. Além disso, mutações em regiões específicas do gene *RII*, que codifica o receptor de TGF β II (fator transformante de crescimento tipo II), estão presentes em mais de 90% dos tumores de cólon com fenótipo RER, sejam eles esporádicos ou hereditários. Mutações nesses genes são consistentes com o modelo de supressão tumoral (teoria de Knudson) ^(14, 33).

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Teste Genético

Com a descoberta de tumores colo-retais IMS (+) e com a hipótese de que estes pudessem ter um prognóstico diferente dos tumores IMS (-), muitos microssatélites começaram a ser estudados através de diferentes protocolos. No entanto, em 1998, em um “workshop” do Instituto Nacional do Câncer (EUA), desenvolveu-se um critério internacional para determinação de IMS em tumores colo-retais ⁽⁶⁾. Dentre estes critérios, estabeleceu-se um painel mínimo de 5 marcadores para diagnosticar o fenótipo IMS+: BAT25, BAT-26 (repetições mononucleotídicas), D5S346, D2S123 e D17S250 (repetições dinucleotídicas). Utilizando este painel de referência, tumores com alto nível de instabilidade (IMS-H de “high”) são definidos pela ocorrência de instabilidade em dois ou mais marcadores, enquanto tumores com baixo nível de instabilidade (IMS-L de “low”) são definidos pela ocorrência de instabilidade em apenas um dos marcadores. Tumores estáveis (MSS) não apresentam instabilidade em nenhum dos marcadores analisados. Os protocolos adotados para detecção de instabilidade como padrão neste “workshop” são os descritos por Dietmeier e cols. ⁽¹³⁾. A análise de IMS é feita através da comparação entre as seqüências de microssatélites no tecido normal e no tecido tumoral de um mesmo indivíduo. A IMS é caracterizada pela diferença de seqüência entre estes dois tecidos ⁽⁵³⁾.

A IMS, quando determinada adequadamente, apresenta alta sensibilidade para tumores mutação-positivos em genes MMR. No entanto, a especificidade do teste é mais baixa, principalmente porque uma grande proporção de todos os tumores IMS+ é causada por metilação do promotor do gene *hMLH1* (silenciamento epigenético), que constitui um evento somático ^(30, 45). Em um estudo populacional realizado na Finlândia observou-se que de 535 indivíduos com CCR, não selecionados para história familiar, 66 (12%) apresentavam IMS e 18 (3,4%) apresentavam mutação germinativa em *hMLH1* ou *hMSH2* ⁽⁴⁵⁾. Outro estudo, também com indivíduos afetados com CCR e não selecionados para história familiar, mostrou que 15% dos pacientes analisados apresentavam IMS-H ⁽¹⁸⁾.

Ademais, o teste de IMS pode ter resultados falso-negativos, tanto por razões técnicas como pela escassez de material dos espécimes analisados. Uma das possíveis explicações para esses resultados falso-negativos é que grandes deleções no gene *hMSH2* podem contribuir para mais de 10% de todas as mutações e não estão associados a IMS ⁽³⁰⁾.

⁴⁵⁾. Todos estes dados sugerem que há uma subestimativa da incidência de HNPCC, uma vez que os métodos disponíveis ainda apresentam baixa especificidade, há mutações ainda não conhecidas e alguns casos considerados esporádicos, quando triados adequadamente, apresentam IMS e mutação germinativa detectável ⁽⁴⁵⁾. É importante ressaltar que a análise de IMS é um teste de rastreamento e não um teste diagnóstico.

Um outro método de detecção da expressão alterada de genes associados com HNPCC consiste no uso de anticorpos monoclonais produzidos contra os produtos protéicos destes genes – a imunohistoquímica (IHQ). Estudos preliminares mostraram uma expressão diminuída das proteínas codificadas pelos genes *hMSH2* e *hMLH1* em mais de 90% dos casos com mutações germinativas e fenótipo RER+ e também na maioria dos casos com fenótipo RER+ mas sem mutações detectáveis. Não há relatos de decréscimo de expressão protéica em casos sem fenótipo RER nem mutação. O decréscimo da expressão em proteínas codificadas pelo gene *hMLH1* também pode ser explicado por metilação de regiões promotoras, já que pode ocorrer em tumores de cólon esporádico com fenótipo RER, mas sem mutações em regiões codificadoras ^(14, 33). A maioria dos casos de CCR esporádico com alta IMS é devida à metilação do promotor de *hMLH1*. Alguns trabalhos sugerem um papel do gene *hMLH6* no processo de carcinogênese colo-retal e apontam para a importância da inclusão deste gene nas análises moleculares e imunohistoquímicas ^(38, 45). A IHQ é uma técnica simples e barata que pode ser utilizada para indicar que gene deve ser rastreado para mutação, nos casos em que a proteína correspondente não é expressa no tumor ⁽³⁸⁾. No entanto, no caso de mutações que apenas levam à truncagem da proteína e não à sua ausência, esta técnica não é capaz de indicar em que gene está a alteração. Apesar do teste para IMS ainda permanecer sendo fundamental ^(9, 25, 37,43) para avaliar o fenótipo do tumor quanto à inativação de genes MMR, a imunohistoquímica, pelo menos para *hMLH1* e *hMSH2*, é um método sensível, rápido e custo-eficaz ^(40, 46).

Além disso, a presença de mutações germinativas em um dos genes de reparo sabidamente envolvidos na carcinogênese colo-retal pode ser diretamente analisada por dHPLC (cromatografia líquida desnaturante de alta performance) e sequenciamento. No entanto, o rastreamento prévio através da análise de IMS e/ou imunohistoquímica é muito importante para indicar o provável gene mutado, direcionando a análise a um gene específico e minimizando os custos e o tempo de análise ⁽⁵³⁾. A metilação da região

promotora de genes MMR (*hMLH1* principalmente) também pode ser investigada, através de PCR (reação em cadeia da polimerase) específico.

Os dois problemas principais acerca do diagnóstico de HNPCC são a detecção de grandes deleções e erros de processamento de RNA mensageiro e a interpretação de mutações de troca de sentido, principalmente nos genes *hMLH1* e *hMSH6*. Estas questões contribuem mais para a ausência de diagnóstico do que a falta de sensibilidade dos testes de IMS ou IHQ⁽⁴⁸⁾.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Além do HNPCC, existem várias outras síndromes hereditárias que predisõem ao CCR. A polipose adenomatosa familiar (FAP) é uma síndrome autossômica dominante rara (incidência: 1 em 7.000-8.000), caracterizada pela presença de centenas a milhares, de pólipos colônicos, que aparecem na infância/adolescência ou no início da idade adulta e que progridem para câncer de cólon em virtualmente todos os casos. Se não for realizada colectomia profilática, virtualmente todos os pacientes afetados pela FAP chegam ao óbito por volta dos 50 anos, sendo que 37% dos afetados morrem ainda por volta dos 37 anos^(3, 5). Outras manifestações clínicas em pacientes com FAP incluem pólipos de trato gastrointestinal (duodeno, papila duodenal e fundo gástrico), osteomas mandibulares ou maxilares e espessamento cortical dos ossos longos. A hipertrofia do epitélio pigmentar da retina é um achado característico e acomete cerca de 80% dos portadores já ao nascimento. Há ainda variantes dessa síndrome como a FAP atenuada, a síndrome de Gardner e a síndrome de Turcot, que se caracterizam por síndromes clínicas distintas, cada qual causada por mutações específicas no gene *APC* (5q21)⁽⁵⁾.

Por apresentar características histopatológicas e clínicas bem definidas, geralmente o diagnóstico de FAP pode ser feito com base apenas nos achados clínicos e esta entidade geralmente é facilmente distinguível do HNPCC.

No entanto, existe uma variante da FAP com fenótipo mais leve, a polipose adenomatosa familiar atenuada (AFAP), caracterizada por poucos adenomas colônicos (50-100), a maioria deles localizados no cólon proximal. Observam-se frequentemente lesões no trato gastrointestinal superior, especialmente adenomas duodenais e pólipos nas glândulas fúndicas. A maioria dos pacientes com AFAP desenvolve CCR, mas a idade de início é mais tardia (\approx 55 anos) se comparada com a FAP (\approx 39 anos). As mutações do

gene *APC* associadas com esta síndrome estão localizadas nas extremidades 5' e 3' do gene ⁽²³⁾. Do ponto de vista clínico, o diagnóstico diferencial entre HNPCC e AFAP pode não ser tão simples. Desta forma, o diagnóstico molecular passa a ser de grande importância, assim como para outras síndromes de predisposição hereditária ao CCR como por exemplo:

a) Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ) é uma síndrome autossômica dominante de predisposição hereditária ao câncer, caracterizada por pigmentação melânica mucocutânea e polipose intestinal (em especial do intestino delgado, mas pode ocorrer no estômago e no intestino grosso). Os pólipos são do tipo hamartoma (com componentes de tecido conjuntivo, muscular e epitelial). Raramente podem ocorrer tumores extra-intestinais nos ovários, cérvix uterina, testículos, pâncreas e mama. O gene responsável *LKBI* localiza-se no braço curto do cromossomo 19 (19p13.3). Existe uma definida tendência à malignização do componente epitelial dos hamartomas na SPJ, mas as etapas da carcinogênese ainda não estão bem definidas.

b) Síndrome de Cowden é uma síndrome autossômica dominante, com ocorrência de múltiplos hamartomas, principalmente mucocutâneos e gastro-intestinais. Carcinoma de mama e de tireóide são as duas neoplasias malignas mais comumente descritas na síndrome. Cerca de 80% das famílias afetadas tem mutações germinativas do gene *PTEN/MMAC1*.

c) Síndrome da Polipose Juvenil é uma síndrome autossômica dominante de câncer hereditário, caracterizada por múltiplos (cerca de 200 a 500) pólipos juvenis com localização predominante no intestino grosso. O gene responsável por alguns casos, *SMAD4*, localiza-se no braço longo do cromossomo 18 (18q21.1). Sua histopatologia apresenta uma bizarra estrutura polilobulada. A ocorrência de CCR está descrita em 30-40% dos casos e o câncer gástrico em 10-15% dos casos de localização gástrica. Na infância, pode ocorrer uma forma mais grave, fatal, com quadro clínico de diarreia, anemia e hipoalbuminemia.

DIRETRIZES DE RASTREAMENTO

As diretrizes de rastreamento e prevenção para pacientes com HNPCC estão detalhadas na tabela 2.

Segundo o Grupo Colaborativo Internacional em HNPCC, pacientes que preenchem os critérios de Amsterdã ou que são portadores de mutação germinativa devem iniciar colonoscopia aos 21 anos ou 5 anos mais cedo do que o caso mais precoce na família e realizar este procedimento a cada 1-2 anos^(28, 53). Preconiza-se uma boa preparação para a colonoscopia, a qual deve consistir de exame minucioso de toda a mucosa colo-retal. Ainda assim, os pacientes devem ser advertidos de que a colonoscopia não é um procedimento de triagem perfeito e devem ser informados sobre a possibilidade de realizar colectomia profilática como uma opção. O risco de mortalidade no caso de colectomia profilática é baixo, mas não há evidências suficientes de que a cirurgia profilática seja mais eficaz do que o rastreamento periódico por colonoscopia em aumentar a sobrevivência. Pacientes colectomizados devem fazer continuamente endoscopia da mucosa retal restante, pois o risco de desenvolvimento de câncer nesta região é de cerca de 1% por ano⁽²⁸⁾.

Mulheres em risco devem fazer rastreamento para câncer de endométrio e ovário, que são as neoplasias extra-colônicas mais comuns. Os procedimentos sugeridos incluem aspirado de endométrio, ultra-sonografia pélvica transvaginal para análise de endométrio e Anexos, exame citopatológico cérvico-uterino e exame pélvico a cada 1-2 anos a partir dos 30 anos^(7, 39, 51). Além disso, alguns investigadores sugerem que todos os indivíduos em risco para HNPCC, independentemente do sexo, façam rastreamento para os demais tumores extra-colônicos se houver uma história familiar positiva para aquele tipo de tumor. Para tumores de estômago e trato biliar, procedimentos como esofagogastroduodenoscopia, biópsia gástrica (escovado), ultra-sonografia transabdominal hepatobiliar e testes de função hepática são indicados a cada 1-2 anos a partir dos 30 anos. Para tumores renais, de uretra e bexiga, o rastreamento preconizado, também a cada 1-2 anos, inclui ultra-sonografia, cistoscopia, citologia de urina e exame de urina^(47, 53). É importante salientar que não há um consenso para as diretrizes de prevenção dos tumores extra-colônicos distintos de tumores de endométrio e ovário.

Além do rastreamento clínico, os pacientes podem ser rastreados para a presença de mutações germinativas em genes MMR. Indivíduos afetados por CCR podem ser testados quanto a IMS (figura 2).

CONDUTAS DE PREVENÇÃO

A colectomia abdominal total com anastomose íleo-retal deve ser considerada com uma opção para pacientes com HNPCC, os quais deverão fazer rastreamento anual para câncer de reto. A justificativa para este procedimento é a alta incidência de cânceres metacrônicos (25% a 40%) em pacientes submetidos à colectomia segmentar. A proctocolectomia também pode ser considerada para pacientes com câncer, dependendo do estágio em que a doença ao diagnóstico. Pacientes com múltiplos pólipos à colonoscopia ou que são sabidamente portadores de mutação podem ser encaminhados para colectomia profilática, embora os benefícios desta conduta ainda não estejam bem esclarecidos⁽²⁰⁾. Em mulheres com CCR deve-se considerar a histerectomia profilática e a salpingo-ooforectomia bilateral no momento da colectomia, especialmente se a mulher já constituiu família e se apresenta história familiar positiva para pelo menos um destes tumores.

Há evidências *in vitro* de que a IMS em células de CCR que são deficientes em um dos genes MMR (hMLH1, hMSH2 e hMSH6) é notadamente reduzida após exposição à aspirina ou sulindac⁽²⁸⁾. Por interferir em eventos moleculares, a quimioprevenção pode inibir ou reverter o desenvolvimento de adenomas ou a progressão de adenoma para carcinoma⁽⁴⁴⁾. A aspirina e outras drogas antiinflamatórias não-esteróides (AINEs) são os compostos mais atrativos e mais amplamente estudados para a quimioprevenção do CCR. Eles inibem tanto a ciclo-oxigenase 1 (COX-1) quanto a ciclo-oxigenase 2 (COX-2), que são enzimas catalíticas envolvidas na síntese de prostaglandinas, através de acetilação irreversível e inibição competitiva, respectivamente. Se comparado com tecido normal, a expressão de COX-2 encontra-se aumentada em carcinomas colorretais esporádicos e hereditário adenomas. O tratamento de roedores com sulindac, um AINE que inibe COX-1 e COX-2, mostra redução de mais de 90% no número de adenomas intestinais e mais de 52% no volume total de tumores colorretais. No entanto, a aspirina e outros AINEs podem atuar através de mecanismos COX-independentes, como pela inibição da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) ou pela interferência na ligação do receptor ativado de proliferador de peroxissomo δ (PPAR δ) ao DNA^(23, 42). Estas intervenções têm evidenciado um efeito protetor em pacientes com FAP (nível de evidência V), mas o impacto do uso profilático de AINEs em outras síndromes de predisposição hereditária ao câncer colo-retal (como HNPCC) ainda precisa ser determinado.

Além da quimioprevenção, uma abordagem nutricional também tem sido levada em consideração em termos de prevenção para o CCR esporádico. Há indícios de que algumas substâncias como folato, cálcio, estrogênios e antioxidantes possam ter um efeito protetor contra o processo de carcinogênese. Por outro lado, vitaminas (com exceção do ácido fólico) e fibras parecem não apresentar efeito protetor contra o desenvolvimento seja de adenomas ou de carcinomas colo-retais ⁽²³⁾. Estudos adicionais devem ser feitos para determinar o impacto dessas medidas preventivas sobre o risco de câncer em indivíduos com predisposição hereditária.

IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO CLÍNICO E MOLECULAR DE INDIVÍDUOS E FAMÍLIAS COM HNPCC

A identificação de indivíduos em risco para CCR hereditário é importante por várias razões. Primeiro, porque indivíduos afetados apresentam risco cumulativo vital muito superior ao da população para vários tipos de câncer. Segundo, porque outros familiares de um indivíduo afetado podem estar em risco aumentado para o câncer (como essa doença genética segue herança autossômica dominante, 50% dos irmãos e 50% dos filhos de um afetado podem ser portadores da mesma mutação). Terceiro, porque medidas de rastreamento intensivo e intervenções preventivas se mostraram eficazes em reduzir significativamente o risco de câncer em portadores de mutação. A eficácia do rastreamento para CCR em famílias com HNPCC foi avaliada por Jarvinen e cols.⁽²³⁾ em um ensaio clínico controlado de 15 anos. Este e outros estudos mostraram que o rastreamento diminui o risco de CCR a mais da metade e diminui a mortalidade global em cerca de 65%, através da identificação precoce e remoção de pólipos hiperplásicos e atípicos⁽³⁸⁾.

A tecnologia atualmente nos permite diagnosticar uma mutação genética muito antes do aparecimento dos sintomas. No caso da predisposição hereditária ao câncer de cólon, que é uma doença de início na vida adulta, o diagnóstico pré-sintomático e preditivo de um indivíduo afetado tem um enorme potencial para redução do risco de câncer. Por outro lado, a identificação precisa de um indivíduo não afetado em uma família de risco, permite a sua tranquilização e elimina os gastos e complicações de rastreamento e intervenções preventivas desnecessárias. Além disso, os testes genéticos possibilitam a identificação de vários indivíduos em risco ainda assintomáticos na família. Sendo assim, a

utilização de testes genéticos pode contribuir tanto para a redução da mortalidade quanto da incidência de CCR e tumores extracolônicos em famílias com HNPCC.

Fundamental nesse contexto é o encaminhamento de famílias e/ou indivíduos com a suspeita diagnóstica de HNPCC para aconselhamento genético. Durante o processo de aconselhamento genético, será confirmada a hipótese diagnóstica pela análise criteriosa da história familiar (heredograma) e serão discutidas as opções para confirmação desta hipótese clínica pelas diferentes modalidades de teste genético. É importante antecipar o significado e as opções terapêuticas frente aos possíveis resultados do teste genético, bem como é importante discutir com o indivíduo as implicações para demais familiares em risco (filhos, irmãos, etc) ⁽⁵³⁾. Uma análise criteriosa dos casos suspeitos de HNPCC e o correto seguimento das diretrizes diagnósticas e de manejo preventivo têm imenso potencial de redução do risco de câncer ao longo da vida para esses pacientes, resultando em sobrevida e qualidade de vida muito próximas ao normal.

BIBLIOGRAFIA

1. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomäki P, Chadwick RB, Kääriäinen H, Eskelinen M, Järvinen H, Mecklin J-P, de la Chapelle A. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998; 338 (21): 1481-1487.
2. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Jarvinen HJ. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 1995; 64 (6):430-433.
3. Andrew SE, Peters AC. DNA instability and human disease. *Am J Pharmacogenomics* 2001; 1:21-28.
4. Ashton-Prolla P. Genética do Câncer Ginecológico e Mamário. In: Silveira GG. *Ginecologia Baseada em Evidências*. São Paulo: Atheneu; 2004.
5. Bartels PH, Montironi R, Duval da Silva V, Hamilton PW, Thompson D, Vaught L, Bartels HG. Tissue architecture analysis in prostate cancer and its precursors: An innovative approach to computerized histometry. *Eur Urol* 1999; 35:484-91.
6. Bartels PH. Quantitation in histopathology: Objectives, origins, digital image analysis and unresolved issues. In: Machevsky AM, Bartels PH (eds) *Image analysis: a primer for pathologists*. New York: Raven Press; 1994.
7. Blackburn GL, Giardiello FM. Developing strategies for intervention/prevention trials of individuals at risk of hereditary colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 1995; 17: 107-110.
8. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5248-5257.

9. Chapusot C, Martin L, Puig PL, Ponnelle T, Cheynel N, Bouvier AM, Rageot D, Roignot P, Rat P, Faivre J and Piard F. What is the best way to assess microsatellite instability status in colorectal cancer? Study on a population base of 462 colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:1553-1559.
10. Chung DC, Rustgi AK. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med* 2003; 138:560-570.
11. Colombino M, Cossu A, Manca A, Dedola MF, Giordano M, Scintu F, Curci A, Avallone A, Comella G, Amoroso M, Margari A, Bonomu GM, Castriota M, Tanda F, Palmieri G. Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13:1447-1453.
12. Cravo M, Lage P, Albuquerque C, Chaves P, Claro I, Gomes T, Gaspar C, Fidalgo P, Soares J, Nobre-Leitão C. BAT-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes. *J Pathol* 1999; 188: 252-257.
13. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997; 57: 4749-4756.
14. Disponível de: URL: <http://www.cmgs.org> (acessado 03 de maio de 2004)
15. Disponível de: URL: <http://www.inca.org.br> (acessado 03 de maio de 2004)
16. Disponível de: URL: <http://www.mdanderson.org> (acessado 03 de maio de 2004)
17. Edmonston TB, Cuesta KH, Burkholder S, Barusevicius A, Rose D, Kovatich AJ, Boman B, Fry R, Fishel R, Palazzo JP. Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol* 2000; 31(12):1506-1514.
18. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
19. Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, Booker S, Lynch HT, Jass JR, Green JS, Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1998; 153 (4): 1063-1078.
20. Fuzikawa AK, Hadad LA, da-Cunha-Melo JR, Brasileiro-Filho G, Pena SDJ. Utilization of microsatellites for the analysis of genomic alterations in colorectal cancers in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30(8): 915-921.
21. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 2003; 63: 1608-1614.
22. Ivanovich JL, Read TE, Ciske DJ, Kodner IJ, Whelan AJ. A practical approach to familial and hereditary colorectal cancer. *Am J Med* 1999; 107: 68-77.
23. Jänne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342 (26): 1960-1968.
24. Järvinen HJ, Mecklin J-P, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1995; 108: 1405-1411.
25. Kievit W, de Bruin JH, Adang EM, Severens JL, Kleibeuker JH, Sijmons RH, Reurs TJ, Nagengast FM, Vasen HF, van Krieken JH, Ligtenberg MJ and

- Hoogerbrugge N. Cost effectiveness of a new strategy to identify HNPCC patients. *Gut* 2005; 54:97-102.
26. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51(12):3075-9.
 27. Lynch HT, Lynch JF. Genetics of Colonic Cancer. *Digestion* 1998; 59: 481-492.
 28. Lynch HT, de La Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36: 810-818.
 29. Lynch HT, de La Chapelle A. Genomic medicine: hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348 (10): 919-932.
 30. Markowitz S. DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. *J Clin Oncol* 1999; 56-61.
 31. Ministério da Saúde, Secretaria de Assistência à Saúde, Instituto Nacional de Câncer. Falando sobre câncer de intestino. Rio de Janeiro: INCA, 2003.
 32. Nagorni A. Genetics of colorectal cancer. *Med & Biol* 2002; 9(2):142-149.
 33. Offit K. Clinical cancer genetics: risk counseling and management. New York: Wiley-Liss; 1998.
 34. Peltomäki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mut Res* 2001; 488:77-85.
 35. Percesepe A, Kristo P, Aaltonen LA, Ponz de Leon M, de la Chapelle A, Peltomäki P. Mismatch repair genes and mononucleotide tracts as mutations targets in colorectal tumors with different degrees of microsatellite instability. *Oncogene* 1998; 17: 157-163.
 36. Ramsey SD, Clarke L, Etzioni R, Higashi M, Berry K, Urban N. Cost-effectiveness of microsatellite instability screening as a method for detection hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2001; 135:577-588.
 37. Raut CP, Pawlik TM and Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathological features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mut Res* 2004; 568: 275-282.
 38. Renkonen-Sinisalo L, Aarnio M, Mecklin J-P, Järvinen HJ. Surveillance improves survival of colorectal cancer in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Det & Prev* 2000; 24(2):137-142.
 39. Rijcken FEM, Mourits MJE, Kleibeuker JH, Hollema H, van der Zee GJ. Gynecologic screening in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecologic Oncol* 2003; 91: 74-80.
 40. Ringau V, Sebbagh N, Olschwang S, Paraf F, Mourra N, Parc Y, Flejou J-F. Microsatellite instability in colorectal cancer: the comparison of immunohistochemistry and molecular biology suggests a role for hMLH6 immunostaining. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:694-700.
 41. Rodriguez-Bigas MA *et al.* A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *Journal of the National Cancer Institute* 1997; 1758-1762.
 42. Rossi BM, Pinho M. Tumores colorretais hereditários. In: Rossi BM, Pinho M (eds). *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. Lemar, São Paulo, 173-200; 1999.
 43. Saha A, Bairwa NK and Bamezai R. Microsatellite instability: an indirect assay to detect defects in the cellular mismatch repair machinery. *Methods Mol Biol* 2005; 291:293-302.

44. Saletti P, I. Edwin D, Pack K, Cavalli F, Atkin WS. Microsatellite instability: application in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Annals of Oncology* 2001; 12: 151-160.
45. Salovaara R, Loukola A, Kristo P, Kääriäinen H, Ahtola H, Eskelinen M, Härkönen N, Julkunen R, Kangas E, Ojala S, TuliKoura J, Valkamo E, Järvinen H, Mecklin J-P, Aaltonen LA, de la Chapelle A. Population-based molecular detection of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18 (11): 2193-2200.
46. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, Markowitz AJ, Gerald WL and Ellis NA (2005) Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 29:96-104.
47. Thorson AG, Knezetic JA, Lynch HT. A century of progress in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Disease of the Colon and Rectum* 1999; 42 (1): 1-9.
48. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomäki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HFA, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:261-268.
49. Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett, JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nature Reviews* 2004; 4: 153-158.
50. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Disease of the Colon and Rectum* 1991; 34:424-425.
51. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116:1453-1456.
52. Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, Young JP, Leggett BA, Jass JR, Macdonald GA. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg* 2000; 87:1197-1202.
53. Yu H-JA, Lin KM, Ota DM, Lynch HT. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: preventive management. *Cancer Treatment Reviews* 2003; 29:461-470.

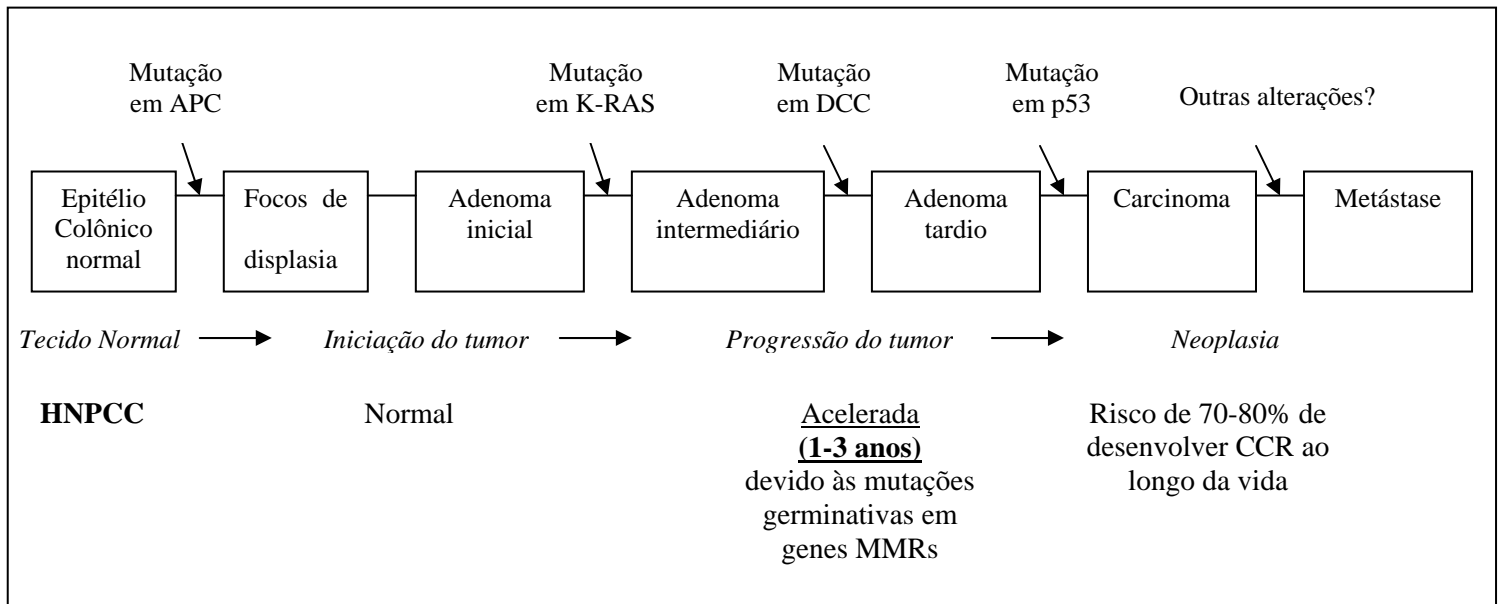


Figura 1. Seqüência adenoma-carcinoma em CCR esporádico e no HNPCC (adaptado Fearon & Vogelstein, 1990).

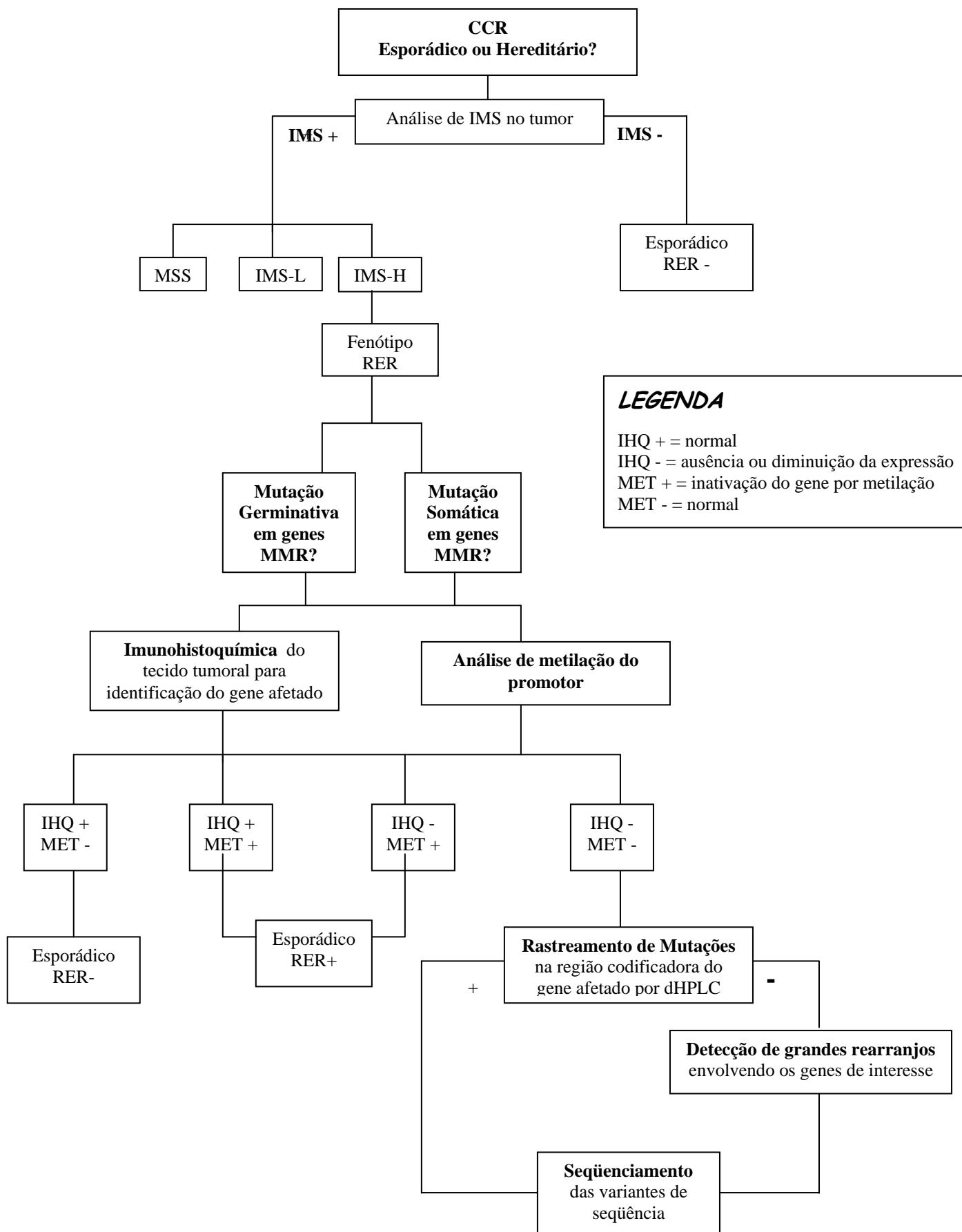


Figura 2 - Fluxograma do Diagnóstico Laboratorial

Tabela 1–Diferentes modelos para diagnóstico de HNPCC segundo critérios clínicos⁽⁴⁰⁾.

MODELO	CRITÉRIOS	Nº CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO	S	E
Amsterdã (*)	<ul style="list-style-type: none"> Famílias com três casos de CCR em que dois dos indivíduos afetados são parentes em 1o. grau do terceiro; Famílias com casos de CCR em no mínimo duas gerações; Famílias com um caso de CCR diagnosticado antes dos 50 anos de idade. 	Todos os critérios devem ser preenchidos para fazer o diagnóstico	61 %	67 %
Amsterdã Modificado (**)	<ul style="list-style-type: none"> (1) Se a família fôr muito pequena pode ser considerado critério a presença de dois afetados parentes em primeiro grau; deve haver pelo menos 2 gerações afetadas e um ou mais casos de CCR devem ter sido diagnosticados antes dos 55 anos de idade OU (2) Em famílias com dois parentes em primeiro grau afetados com CCR, a presença de um terceiro familiar com câncer de endométrio ou outra neoplasia de diagnóstico precoce é suficiente. 	O preenchimento de todos os aspectos de apenas um item é suficiente para o diagnóstico	72 %	50 %
Amsterdã II	<ul style="list-style-type: none"> Três familiares com neoplasia associada a HNPCC, sendo um parente em primeiro grau dos outros dois, envolvendo pelo menos 2 gerações e com um ou mais casos diagnosticados antes dos 50 anos de idade; Exclusão do diagnóstico de FAP; Os tumores devem ser verificados por exame patológico. 	Todos os critérios devem ser preenchidos para fazer o diagnóstico	78 %	61 %
Bethesda (**)	<ul style="list-style-type: none"> (1) Indivíduos que preenchem os critérios de Amsterdam; (2) Indivíduos com 2 tumores associados a HNPCC (colônicos ou extra-colônicos); (3) Indivíduos com CCR e um parente de 1o. grau com tumor colônico e/ou extra-colônico associado a HNPCC e/ou adenoma colo-retal (tumor diagnosticado antes dos 45 e adenoma antes dos 40 anos de idade); (4) Indivíduos com um ou mais casos de CCR ou de endométrio diagnosticados antes dos 45 anos de idade; (5) Indivíduos com CCR proximal e padrão histopatológico pouco diferenciado (ou tipo “anel de sinete”) antes dos 45 anos de idade; (6) Indivíduos com adenomas diagnosticados antes dos 40 anos de idade. 	O preenchimento de todos os aspectos de apenas um item é suficiente para o diagnóstico	94 %	25 %
Bethesda Modificado (**)	<ul style="list-style-type: none"> CCR diagnosticado antes dos 50 anos; CCRs sincrônicos ou metacrônicos ou outro tumor HNPCC-relacionado independente da idade; CCR com IMS-H antes dos 60 anos; Indivíduos com CCR e um ou mais parentes em 1º grau também afetados com CCR ou outro tumor HNPCC-relacionado, sendo um deles diagnosticado antes dos 50 anos; Indivíduos com CCR e dois ou mais parentes com CCR ou outro tumor associado a HNPCC independente da idade. 	O preenchimento de todos os aspectos de apenas um item é suficiente para o diagnóstico	96%	27%

LEGENDA: CCR = câncer colo-retal; FAP = polipose adenomatosa familiar; IMS-H = alta instabilidade de microssatélite; S=sensibilidade; E=especificidade

(*) Todos critérios devem ser preenchidos para fazer o diagnóstico;

(**) O preenchimento de todos aspectos de um item apenas é suficiente para o diagnóstico.

Tabela 2 - Recomendações de rastreamento e prevenção de câncer em portadores(as) de mutação em genes associados a HNPCC ⁽⁴⁾.

Tipo de câncer	Recomendação	Intervalo	Nível de Evidência (†)	Constitui Consenso
Cólon	Colonoscopia total (até o ceco)	Anual ou bi-anual a partir dos 20-25 anos	2-3	Sim
	Colectomia profilática	Discutir como profilaxia e/ou ao diagnóstico de pólipos	3	Não
	Rastreamento endoscópico retal pós-colectomia (*)	Anual após colectomia se reto preservado	3	Sim
Endométrio	Exame pélvico	Anual a partir dos 25-35 anos	5	Sim
	Aspirado de endométrio	Anual a partir dos 25-35 anos	5	Sim
	Ultra-sonografia transvaginal	Anual a partir dos 25-35 anos	5	Sim
	Histerectomia (panhisterectomia)	Discutir como opção após constituir família	5	Não
Ovário (**)	Ultra-sonografia transvaginal + CA 125 sérico	Anual a partir dos 25-35 anos	5	Não
Trato urinário (**)	EQU + citologia urinária	Anual a partir dos 25 anos	5	Não
Estômago (**)	Endoscopia digestiva alta	Anual ou bi-anual a partir dos 35 anos	5	Não

(*) O rastreamento endoscópico retal é mandatório em pacientes submetidos a colectomia profilática com anastomose ileo-retal devido à alta incidência de tumores metacrônicos retais pós-colectomia (25-40%).

(**) Somente em indivíduos de famílias com HNPCC e diagnóstico destes tumores em pelo menos um familiar (e que possa ser associado à síndrome)

(†) De acordo com Physician Data Query (PDQ) Screening and Prevention Statement Levels of Evidence.

Anexo II: Dados Sequenciamento

Anexo III: Análise de Instabilidade Microssatélites

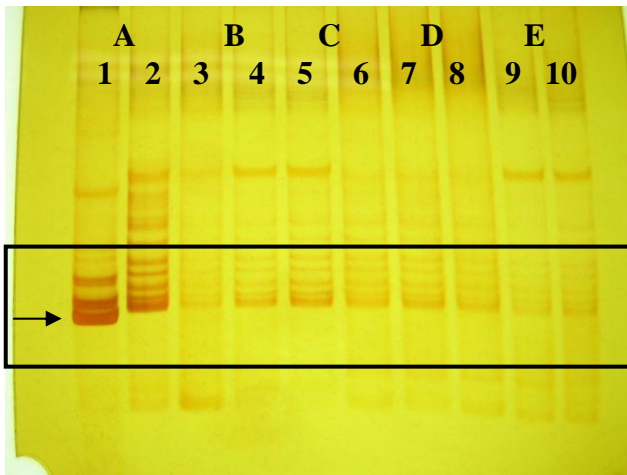


Figura 15. Gel SSCP - BAT25

Amostras 1, 3, 5, 7 e 9: tecido tumoral
 Amostras 2, 4, 6, 8, 10: tecido normal
 Paciente A: instável; Pacientes B, C, D e E: normais

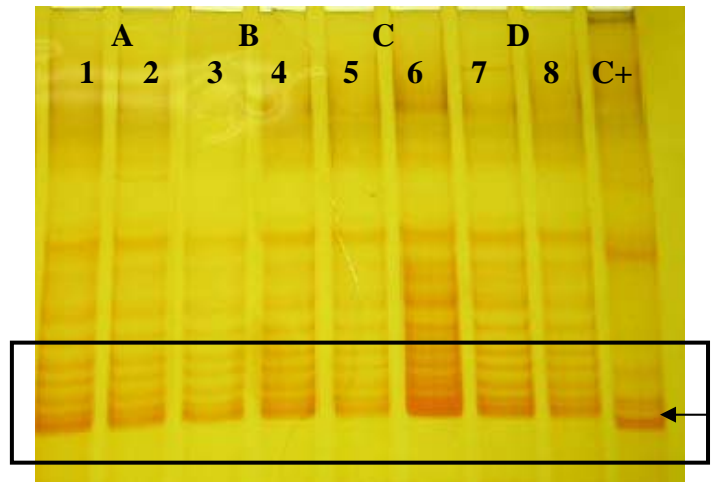


Figura 16. Gel SSCP- BAT 26

Amostras 1, 3, 5 e 7: tecido normal
 Amostras 2, 4, 6 e 8: tecido tumoral
 C+: controle positivo; Todos os pacientes: normais

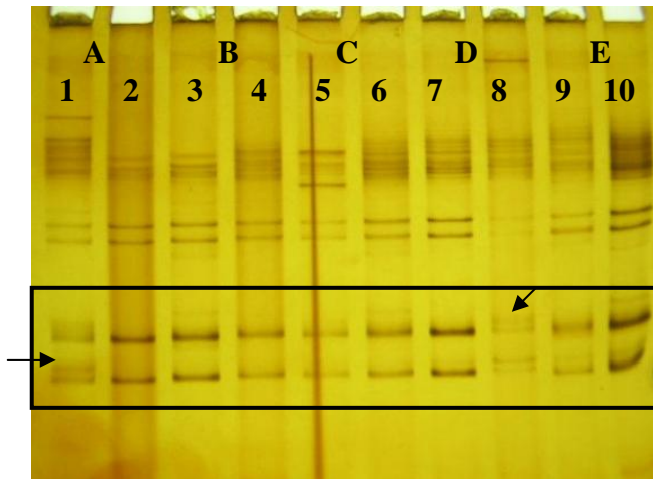


Figura 17. Gel SSCP – D2S123

Amostras 1, 3, 5, 7 e 9: tecido normal
 Amostras 2, 4, 6, 8, 10: tecido tumoral
 Paciente A: LOH; Paciente D: instável; Pacientes B, C e E: normais

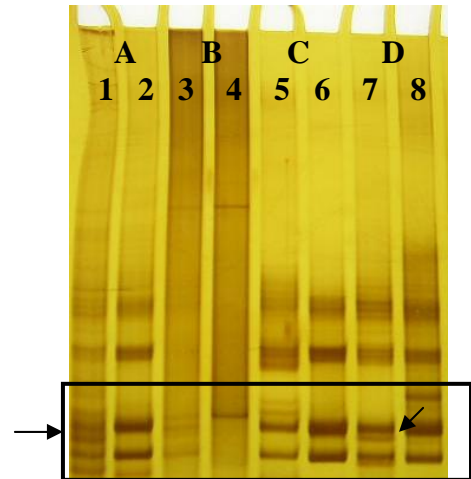


Figura 18. Gel SSCP – D5S346

Amostras 1, 3, 5 e 7: tecido normal
 Amostras 2, 4, 6 e 8: tecido tumoral
 Pacientes A e D: LOH; Paciente B: indetectável; Pacientes C: normal

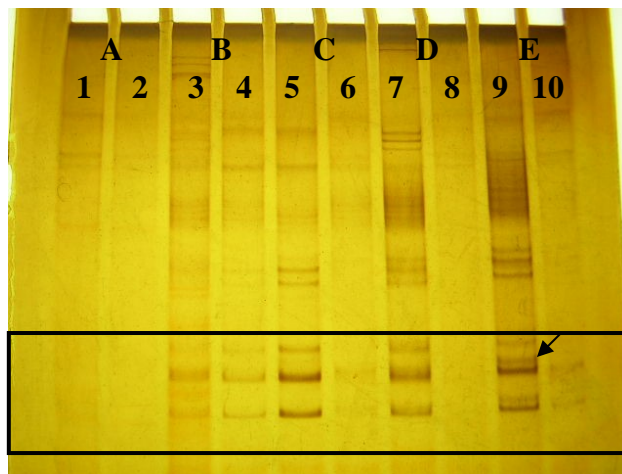


Figura 19. Gel SSCP – D17S250

Amostras 1, 3, 5, 7 e 9: tecido normal
 Amostras 2, 4, 6, 8, 10: tecido tumoral
 Paciente A: indetectável; Pacientes B, C e D: normais
 Paciente E: LOH

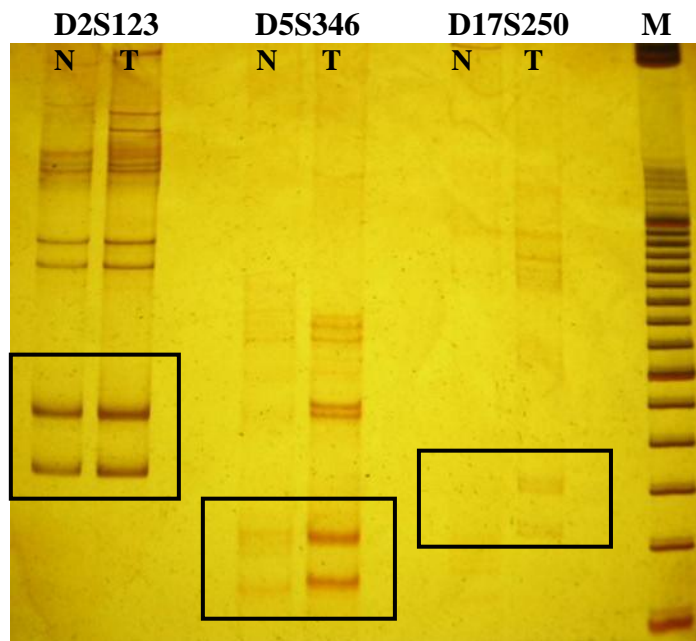
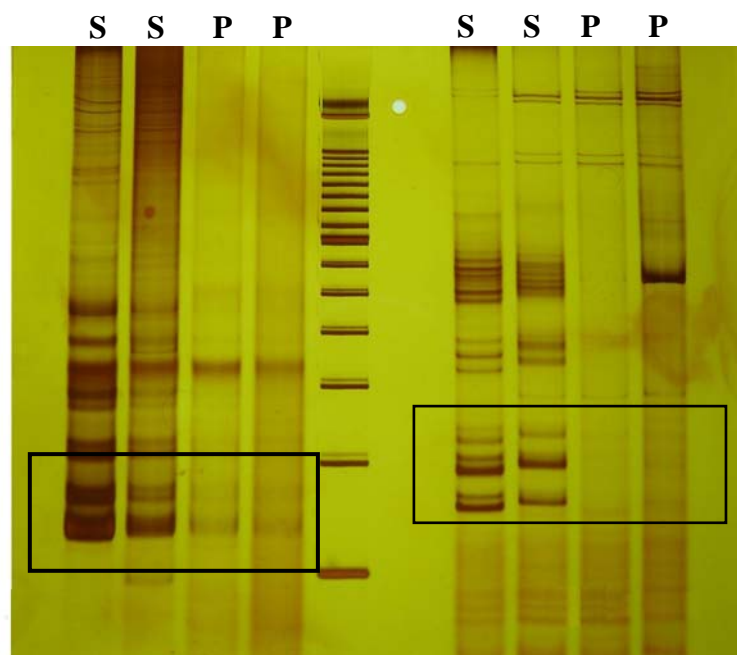


Figura 20. Gel de poliacrilamida de uma mesma amostra (tecidos normal e tumoral) amplificada para os 3 marcadores dinucleotídicos analisados



Gel SSCP – BAT 40
S- sangue; P -parafina

Gel SSCP – D17S250
S- sangue; P -parafina

Figura 21. Comparação entre o SSCP de amostras de sangue e parafina para os marcadores BAT40 e D17S250

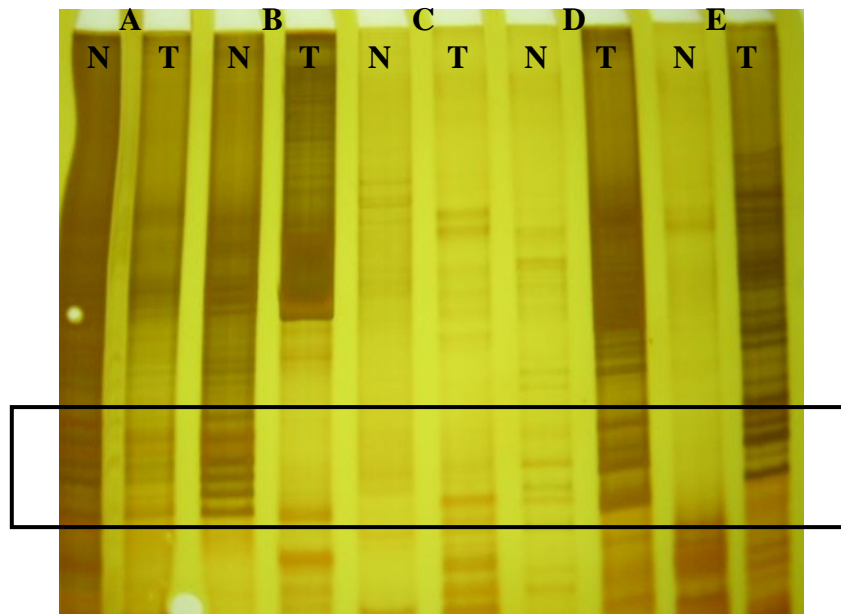


Figura 22. SSCP D17S250 com material de parafina reamplificado