Raul Angelo Balbinotti

**Estudo imunohistoquímico das expressões:
hMLH1, hMSH2 e Cox-2 em pólipos do cólon**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.**

**Área de Concentração: Gastroenterologia Clínica
Orientador: Prof. Dr. Paulo Sakai**

São Paulo

2007

Dedico este trabalho a minha amada **Silvana** e
aos meus adorados filhos **Gabriel, Rafael, Miguel e**
Fernanda.

AGRADECIMENTOS

Ao **PROF. DR. PAULO SAKAI**, exemplo de inspiração na minha formação médica, pelo estímulo à pesquisa, pelos ensinamentos indispensáveis, pela dedicação e amizade que sempre demonstrou em todos os momentos de nosso convívio.

Ao **PROF. DR. ULYSSES RIBEIRO JR.** pelo seu dinamismo, seus ensinamentos no decorrer deste projeto, atuando como co-orientador sem medir esforços, sempre disponível com seu ânimo contagiante que ficaria impossível a conclusão deste estudo sem sua participação inestimável.

Ao **PROF. DR. FLAIR JOSÉ CARRILHO**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação da Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo apoio e oportunidade de conviver, novamente com meus inesquecíveis Professores do Departamento de Gastroenterologia.

À **DRA. ADRIANA VAZ SAFATLE-RIBEIRO** pelas sugestões e estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **DR. OSMAR KENJI YAGI** pelas sugestões para esta tese.

Ao **PROF. DR. CELSO PICCOLI COELHO** pela dedicação nos ensinamentos na área de Patologia.

Ao **PROF. DR. WALTER MOTTA** pela orientação metodológica deste projeto.

Ao **PROF. DR. PETRÔNIO FAGUNDES DE OLIVEIRA** pelas horas dedicadas às análises deste estudo.

À **DRA. KARINA SALGADO**, Médica patologista, pela contribuição no processamento do material de pesquisa.

À **DRA. MÁRCIA TREGNANO**, Médica patologista pela disponibilidade das informações no decorrer do estudo.

Às equipes dos **Laboratórios LIM50 e LIM14 da FMUSP** pela colaboração indispensável na realização desta pesquisa.

À **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** por mais esta oportunidade na minha formação.

Aos Professores do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelos ensinamentos e convívio saudável.

Ao **Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital Geral** da Faculdade de Medicina da Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade de desenvolver este estudo.

À Direção do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e ao Departamento de Medicina Clínica da **Faculdade de Medicina da Universidade de Caxias do Sul** pela consideração e estímulo.

À secretária da Pós-Graduação **Sra. Fabiana Renata S. Bispo** pela presteza e por sempre lembrar de minhas obrigações.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	8
3. Revisão de Literatura.....	9
3.1 APC.....	13
3.2 MMR.....	13
3.3 K-ras.....	14
3.4 p53.....	15
3.5 Cox-2.....	16
4. Métodos.....	26
4.1 Colonoscopia.....	27
4.2 Imunohistoquímica.....	35
4.3 Análise Estatística.....	38
5. Resultados.....	39
5.1 Complicações.....	68
6. Discussão.....	69
7. Considerações Finais.....	77
8. Conclusões.....	81

9. Referências.....	82
---------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS – Ácido Acetilsalicílico

APC – Gene da Polipose Adenomatosa Coli

Bat25 – Marcador Mononucleotídeo de MSI

Bat26 – Marcador Mononucleotídeo de MSI

Cox-1 – Enzima Ciclooxygenase 1

Cox-2 - Enzima Ciclooxygenase 2

CD34 – Célula Intersticial Dentrítica

CpG/CIMP – Ilhas de Citosina Fosfoguanosina

DCC – Gene “*Deleted in Colon Cancer*”

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

D2S123 – Marcador de MSI

D5S346 – Marcador Dinucleotídeo de MSI

D17S250 – Marcador Dinucleotídeo de MSI

FAP – Polipose Adenomatosa Familiar

GTBP - Gene “*G/T mismatch-binding protein*”

hMLH1 – Gene de Reparo do DNA (*Gene Human mut-L Homologue 1*)

hMSH2 – Gene de Reparo do DNA (*Gene Human mut-S Homologue 2*)

hMSH3 - Gene de Reparo do DNA (*Gene Human mut-S Homologue 3*)

hMSH6 – Gene de Reparo do DNA (*Gene Human mut-S Homologue 6*)

hPMS1 - Gene de Reparo do DNA (*Mismatch Repair Gene*)

hPMS2 – Gene de Reparo do DNA (*Mismatch Repair Gene*)

HNPCC - Câncer Colorectal Hereditário não Polipóide

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Ki-67 – Anticorpo Monoclonal

K-ras – Oncogene

LOH – Perda da Heterozigose

MCC – Gene “*Mutated in Colon Cancer*”

MMR – “*Mismatch repair genes*”

MSI – Instabilidade de Microssatélite

MSI-H - Alta Instabilidade de Microssatélite

MSI-L - Baixa Instabilidade de Microssatélite

MSS – Estabilidade de Microssatélite

p16 - Gene Supressor Tumoral

p53 – Gene Supressor Tumoral

PBS – Solução Salina Fosfatada e Tamponada

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PGE2 – Prostaglandina E2

PMS1 – Gene de Reparo

PMS2 – Gene de Reparo

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

TS - “*Thymidylate Synthase*” (Enzima Timidilato Sintase)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 homens, estimadas para o ano de 2006, segundo a Unidade da Federação, neoplasia maligna do cólon e reto.....	2
Figura 2 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres, estimadas para o ano de 2006, segundo a Unidade da Federação, neoplasia maligna do cólon e reto.....	3
Figura 3 - Pólipo de sigmóide.....	28
Figura 4 - Adenocarcinoma de ceco.....	29
Figura 5 - Pólipo pediculado de ascendente.....	30
Figura 6 - Pólipo pediculado de sigmóide.....	31
Figura 7 - Pólipo pediculado de descendente.....	32
Figura 8 - Cromoscopia em pólipo séssil de descendente.....	33
Figura 9 - Adenocarcinoma ulcerado de ascendente.....	34
Figura 10 - Pacientes com pólipos e distribuição quanto ao sexo.....	39
Figura 11 - Pacientes e a distribuição por idade.....	40
Figura 12 - Histologia dos adenomas.....	41

Figura 13 - Localização dos adenomas.....	42
Figura 14 - Grau de displasia nos adenomas.....	43
Figura 15 - Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e o sexo dos pacientes.....	45
Figura 16 - Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e a idade dos pacientes.....	47
Figura 17 - Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e a localização dos adenomas.....	49
Figura 18 - Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e a histologia dos adenomas.....	51
Figura 19 - Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e a displasia nos adenomas.....	53
Figura 20 - Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 com mucosa normal, pólipos hiperplásicos, adenomas e adenocarcinomas.....	55
Figura 21 - Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e o tamanho dos pólipos.....	57
Figura 22 - Número de pólipos e aspecto histológico.....	58

Figura 23 - Número de pólipos versus hMLH1.....	59
Figura 24 - Número de pólipos versus hMSH2.....	60
Figura 25 - Número de pólipos versus Cox-2.....	61
Figura 26 - Imunoexpressão positiva para Cox-2 em adenoma.....	62
Figura 27 - Imunoexpressão positiva para Cox-2 em um adenocarcinoma.....	63
Figura 28 - Imunoexpressão negativa para Cox-2 em um adenocarcinoma.....	64
Figura 29 - Imunoexpressão positiva do hMHH1 em um pólipos.....	65
Figura 30 - Imunoexpressão positiva para hMSH2 em um pólipos.....	66
Figura 31 - Imunoexpressão fracamente positiva para hMSH2 em um adenocarcinoma.....	67

RESUMO

Balbinotti, RA. **Estudo imunohistoquímico das expressões: hMLH1, hMSH2 e Cox-2 em pólipos do cólon** [Tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007.

Pólipos adenomatosos colorretais são conhecidos como lesões pré-malignas. Mutações germinativas nas enzimas de reparo (MMR) hMLH1, hMSH2 e hMSH6 são causas reconhecidas de câncer colorretal hereditário não polipóide, induzindo um fenótipo mutante caracterizado por instabilidade de microssatélite (MSI). A MSI também é detectada em cânceres colorretais esporádicos. O Cox-2 é uma enzima induzível que regula a síntese de prostaglandina, sendo fortemente manifestada em locais de inflamação, pólipos adenomatosos colorretais e câncer. Objetivos: Avaliar a imunoexpressão do hMLH1, hMSH2 e Cox-2 em pólipos ressecados através da colonoscopia e associar às características clínico-patológicas (idade, sexo, localização, tamanho, histologia e grau de displasia). Métodos: 138 pacientes com pólipos colônicos, 6 com mucosa colônica normal e 23 pacientes com adenocarcinoma colorretal foram incluídos no estudo. Nenhum paciente apresentava histórico familiar de câncer colorretal. Cento e sessenta e sete amostras foram coletadas e imunocoradas para hMLH1, hMSH2 e Cox-2, usando a técnica ABC-imunohistoquímica e amplificação por tiramida biotinilada. Resultados: A média de idade foi $60,2 \pm 13,8$ (variando de 21 a 90 anos de idade) sendo 77 homens (55,8%) e 61 mulheres (44,2%). Adenomas tubulares estavam presentes em 81,4%,

tubulo-viloso em 15,9%, serrilhados em 1,8% e vilosos em 0,9%. A maioria dos adenomas localizava-se na região retossigmoideana (63,5%), seguido pelo ascendente em 14,2%, descendente em 8,2%, ceco em 7,5% e o transversal em 6,7%. Displasia de alto grau foi detectada em 46 (40,4%) e de baixo grau em 68 (59,6%) dos adenomas. Perda de imunexpressão hMLH1 e hMLH2 foi observada em 20% e 15,5% dos adenomas, respectivamente. O Cox-2 foi positivo em 9% dos adenomas e em 40% dos adenocarcinomas. Além disso, a imunexpressão Cox-2 foi associada à multiplicidade de adenomas no mesmo paciente ($p=0,001$). Não houve associação entre a imunexpressão de marcadores e o sexo, idade, localização, tamanho, histologia ou grau de displasia.

Conclusões: 1. A perda de imunexpressão hMLH1 e hMLH2 em adenomas é relativamente freqüente em pacientes sem histórico familiar de câncer colorretal; 2. O Cox-2 é fortemente manifestado em pólipos adenomatosos e adenocarcinomas colorretais sendo que sua positividade em adenomas pode indicar um risco maior de lesões múltiplas.

Descritores: 1. Adenoma 2. Marcadores genéticos 3. Imunohistoquímica
4. Neoplasias colorretais 5. Genes

SUMMARY

Balbinotti, RA. **Study of immunohistochemical expressions of: hMLH1, hMSH2 and Cox-2 in colon polyps** [Thesis]. São Paulo: “University of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brazil”; 2007.

Colorectal adenomatous polyps are known as premalignant lesions. Mutations in the mismatch repair (MMR) enzymes hMLH1, hMSH2 and hMSH6 are recognized causes of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and act by inducing a mutator phenotype characterized by microsatellite instability (MSI). MSI is also detected in sporadic colorectal cancers. Cox-2 is an inducible enzyme that regulates prostaglandin synthesis and is overexpressed at sites of inflammation, in colorectal adenomatous polyps and cancer. Aims: To evaluate the immunoexpression of hMLH1, hMSH2 and Cox-2 in resected polyps through colonoscopy, and to associate to the clinicopathologic characteristics (age, gender, location, size, histology and grade of dysplasia). Methods: 138 patients with colonic polyps, 6 with normal colonic mucosa and 23 patients with colorectal adenocarcinoma were enrolled in this study. All patients had no familial history of colorectal cancer. The 167 samples were collected and immunostained for hMLH1, hMSH2 and Cox-2 using the ABC-immunohistochemistry technique and amplification by biotinylated tyramide. Results: The mean age was 60.2 ± 13.8 (varying from 21 to 90 years-

old) where 77 (55.8%) were men and 61 women (44.2%). Tubular adenomas were present in 81.4%, tubulovillous in 15.9%, serrated in 1.8%, and villous in 0.9%. The majority of the adenomas were located in the rectosigmoid region (63.5%), followed by ascending in 14.2%, descending in 8.2%, cecum in 7.5% and transverse in 6.7%. High-grade dysplasia was detected in 46 (40.4%) and low-grade dysplasia in 68 (59.6%) of the adenomas. Loss of hMLH1 and hMLH2 immunoreexpression was observed in 20% and 15.5% of the adenomas, respectively. Cox-2 was positive in 9% of the adenomas, and in 40% of the adenocarcinomas. Moreover, Cox-2 immunoreexpression was associated to the multiplicity of adenomas in the same patient, $p=0.001$. There was no association between marker immunoreexpression and gender, age, location, size, histology or grade of dysplasia. Conclusions: 1. Loss of hMLH1 and hMLH2 immunoreexpression in adenomas is relatively frequent in patients without colorectal cancer familial history; 2. Cox-2 is overexpressed in colorectal adenomatous polyps and adenocarcinomas, and its positivity in adenomas may indicate higher risk for multiple lesions.

Descriptors: 1. Adenoma 2. Genetics markers 3. Immunohistochemical
4. Colorectal cancer 5. Genes

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, disponível em: <http://www.inca.gov.br/>, o número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil, em 2006, é de 11.390 em homens e de 13.970 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 12 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2006).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o quarto mais freqüente nas regiões Sul (22/100.000), Sudeste (17/100.000) e Centro-Oeste (10/100.000). Nas regiões Nordeste (4/100.000) e Norte (3/100.000), ocupam a quinta e sexta posição, respectivamente. Para as mulheres é o segundo mais freqüente (21/100.000) na região Sudeste, o terceiro nas regiões Sul (22/100.000), Centro-Oeste (10/100.000) e Nordeste (5/100.000), enquanto na região Norte (4/100.000) ocupa a quinta posição. Figuras 1 e 2, disponível em: <http://www.inca.gov.br/>.

Figura 1. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 homens, estimadas para o ano de 2006, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna de cólon e reto).

FONTE: Ministério da Saúde – INCA (reproduzida sob autorização)

i

Figura 2. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres, estimadas para o ano de 2006, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto)

FONTE: Ministério da Saúde – INCA (reproduzida sob autorização)

No mundo, os tumores malignos que acometem o cólon e o reto somam, a cada ano, cerca de 945 mil novos casos, sendo a quarta causa mais comum de câncer (Greenlee et al. 2001; Parkin 2001; Mitchell 2005; Saad-Hossne et al. 2005). Nos Estados Unidos é a segunda causa de morte por câncer (Walsh e Terdiman, 2003; National Cancer Institute, www.nci.nih.gov/1975-2003). A maior incidência ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas as possibilidades de desenvolvimento já aumentam a partir dos 40 anos. Os principais fatores de risco são: idade acima de 50 anos; história familiar de câncer de cólon e reto; história pessoal pregressa de câncer de ovário, endométrio ou mama; dieta com alto conteúdo de gordura, carne e baixo teor de cálcio; obesidade e sedentarismo (Instituto Nacional do Câncer, 2006). Também são fatores de risco doenças inflamatórias do cólon como Retocolite Ulcerativa Crônica, Doença de Crohn e algumas condições hereditárias como Polipose Adenomatosa Familiar - FAP e Câncer Colorretal Hereditário não Polipoide - HNPCC (Hamilton, 1989; Pohl, 2000; Syngal, 2000b; Kohoutova, 2006). Dieta rica em frutas frescas, vegetais, fibras, cálcio, folato e pobre em gorduras animais são consideradas medidas preventivas (Willett, 2001). A ingestão excessiva e prolongada de bebidas alcóolicas deve ser evitada. Como prevenção recomenda-se, ainda, a prática de exercícios físicos (Willett, 2001).

O câncer colorretal quando detectado em seu estágio inicial possui grandes chances de cura, com baixa taxa de mortalidade associada ao tumor (Instituto Nacional do Câncer, 2006). Pessoas com mais de 50 anos devem se submeter anualmente à pesquisa de sangue oculto nas fezes e, se positiva, realizar

colonoscopia (<http://www.inca.gov.br/>). O prognóstico deste tipo de câncer pode ser considerado de moderado a bom, sendo o segundo tipo de câncer mais prevalente no mundo (depois do câncer de mama), com estimativa de 2,4 milhões de pessoas vivas diagnosticadas nos últimos cinco anos. A sobrevida média mundial estimada é de 44% (<http://www.inca.gov.br/>). A detecção precoce de pólipos adenomatosos colorretais e de tumores localizados não avançados é possível, tendo mostrado efetividade através de pesquisa de sangue oculto nas fezes e de métodos endoscópicos. Entretanto, devido ao custo elevado, têm-se encontrado dificuldades na realização de avaliação diagnóstica com exames endoscópicos em pacientes com presença de sangue oculto nas fezes, impossibilitando a implantação de rastreamento populacional em nosso meio (<http://www.inca.gov.br/>).

A variabilidade na incidência e prevalência destes tumores pode ser devido a fatores ambientais, pois 90% dos tumores colorretais não são decorrentes de causas genéticas e são denominados tumores esporádicos (Lynch e Lynch, 2000). Por outro lado, a maioria dos tumores colorretais hereditários se enquadra na polipose adenomatosa familiar (FAP) e suas variantes e o câncer colorretal hereditário não polipóide (HNPCC) que segue uma via de carcinogênese diferente do adenoma (Lynch e Chapelle, 2003). Na FAP, observa-se alta frequência de perdas alélicas, enquanto no HNPCC observa-se alta instabilidade de microssatélites (Fearon e Gruber, 2001). Microssatélites são pequenas seqüências repetitivas de DNA distribuídas pelo genoma. Instabilidade de microssatélites são alterações de comprimento destas seqüências encontradas nestes tumores, quando comparadas ao tecido normal. A instabilidade de

microssatélites é considerada marcador das alterações em genes de reparo, sendo a instabilidade considerada alta (MSI-H), um forte indicativo de anormalidade em um destes genes (Lynch e Lynch, 2000; Fearon e Gruber, 2001). As mutações germinativas dos genes de reparo são as causas do HNPCC (Marra e Boland, 1995; Kinzler e Volgestein, 1996). Mutações em dois genes de reparo são responsáveis por 60% dos casos de HNPCC: mutações em hMLH1 (*human mut-L homologue*) e em hMSH2 (*human mut-S homologue*) (Marra e Boland, 1995; Fearon e Gruber, 2001). Em menos de 5% dos casos foram descritas mutações nos genes PMS1, PMS2 e hMSH6 (Lynch e Lynch, 2000; Fearon e Gruber, 2001). Em 35% a 40% dos casos a mutação é desconhecida. A instabilidade de microssatélites também é encontrada em 10% a 15% dos tumores esporádicos não hereditários e podem estar associadas a alterações epigenéticas em genes de reparo (Ionov et al., 1993).

Na etiologia dos cânceres colorretais há, portanto, interação entre fatores ambientais e genéticos. Descobertas importantes se desenvolveram no campo molecular. O papel dos pólipos adenomatosos, nesta área, teve significativa contribuição como lesões precursoras tumorais. Na carcinogênese do cólon, a teoria da seqüência adenoma-carcinoma, com mutações gênicas acumuladas, tem sido bem aceita (Hill et al., 1978). Alguns estudos observaram maior risco de desenvolvimento de câncer de cólon nos portadores de adenomas (Lieberman et al. 2000; Winawer et al. 2006). Evidenciou-se, em outros estudos, a diminuição do risco de tumores malignos de cólon, realizando-se polipectomias por via endoscópica (Winawer et al., 1993; Winawer et al., 1997; Sitarda et al., 2001). Em estudos histopatológicos verificaram-se focos de

adenocarcinoma em pólipos adenomatosos, bem como focos de adenomas em espécimes de adenocarcinomas (Crawford et al., 1999).

Em relação à Cox-2, estudos têm demonstrado que a ciclooxigenase-2 possui papel preponderante na carcinogênese do câncer colorretal (Sato et al., 2003a,b). O bloqueio de suas funções pode prevenir o desenvolvimento do câncer colorretal. Há muitas evidências sobre a ligação do consumo de antiinflamatórios não esteróides e a prevenção do câncer colorretal (Labayle et al., 1991; Thun et al., 1991; Giardiello et al., 1993; Giovannucci et al., 1995; Oshima et al., 1996; Hul et al., 1999). Embora o verdadeiro mecanismo anti-neoplásico dos antiinflamatórios não seja conhecido, uma possível rota seria a inibição da ciclooxigenase-2. A Cox-2 é a enzima responsável pela síntese de prostaglandinas (Williams e DuBois, 1996).

Deste modo, no presente estudo foram avaliadas pela imunohistoquímica as expressões do hMLH1, hMSH2 e Cox-2, em 167 pólipos de cólon, 6 amostras de mucosa colônica normal ressecadas por via endoscópica e em 23 adenocarcinomas colorretais, com a finalidade de contribuir com novos conhecimentos neste campo de pesquisa.

2. OBJETIVOS

O material proveniente de exames colonoscópicos com polipectomia em uma população variada quanto ao sexo, idade, etnia e classe social, constituiu-se em objeto deste estudo para:

1. determinar pela imunohistoquímica as expressões do hMLH1, hMSH2 e Cox- 2 em pólipos do cólon ressecados por via endoscópica;

2. relacionar a associação dos resultados imunohistoquímicos com as variáveis clinicopatológicas: sexo, idade, localização, tamanho, número, tipo histológico e grau de displasia.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A identificação de alterações genéticas em neoplasias malignas teve evolução significativa nas últimas três décadas (Fialkow et al., 1979; Fahy e Bold, 1998; Ahlquist et al., 2000; Chung et al., 2000). As alterações incluem deleções, reagrupamentos e mutações para ativação ou inativação de determinados genes (Klein, 1987; Ponder, 1988). No modelo representado pela polipose adenomatosa familiar (FAP), onde múltiplos e pequenos pólipos adenomatosos resultam da mutação inicial do gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*) seguida pela mutação do gene *K-ras* e progressão para o carcinoma, adicionam-se, ainda, a mutação do *p53* e *DCC* (Tetsuji et al., 2001).

O gene *APC* foi identificado e clonado em 1991 (Lal e Gallinger, 2000; Fearon e Gruber, 2001). Trata-se de gene supressor de tumor, sendo a proteína codificada citoplasmática, a qual está envolvida na adesão célula-célula, migração celular e, provavelmente, em apoptose em criptas colônicas (Fearon e Gruber, 2001). Mutação germinativa do gene *APC* é a causa da polipose adenomatosa familiar (Lal e Gallinger, 2000). Adicionalmente, mutações do *APC* estão presentes em 80% dos adenomas e carcinomas esporádicos não hereditários (Fearon e Gruber, 2001). Pode-se afirmar que alterações do *APC* são as anormalidades mais precoces na carcinogênese colorretal (Kinzler e Vogelstein, 1996). Na análise de diferentes alterações gênicas na progressão adenoma-carcinoma, Fearon e Vogelstein propuseram um modelo genético de carcinogênese colorretal (Fearon e Vogelstein, 1990). A alteração mais precoce está

no cromossomo 5q (onde está o gene APC) com alteração inicial em adenomas pequenos e de baixo grau histológico.

As mutações do oncogene *ras* estão presentes em, aproximadamente, 50% dos carcinomas invasivos, 50% dos adenomas com mais de 10 mm e em somente 10% dos adenomas inferiores a 10 mm. Sua alta frequência e seu surgimento precoce no câncer de cólon servem como biomarcador em estágios iniciais. As alterações predominantes, já descritas, incluem deleções, reagrupamentos e mutações, levando à ativação ou inativação de genes específicos (Srivastava et al., 2001). Perdas alélicas em 12q e 18q (DCC) estão relacionadas a fases mais avançadas na progressão dos adenomas (Kinzler e Vogelstein, 1996). Mutações no gene supressor p53 ocorrem em 75% dos carcinomas, mas não são frequentes em adenomas. As mutações em p53 estão associadas à fase final da progressão de adenoma a carcinoma (Fearon e Vogelstein, 1990; Kinzler e Vogelstein, 1996; Srivastava et al., 2001).

Diversos estudos têm sido publicados nos últimos anos definindo as vantagens e limitações nas diferentes opções para o rastreamento do câncer colorretal. A realização de colonoscopia é o melhor método para reduzir a incidência e a mortalidade do câncer de cólon (Bond, 2003; Levin et al., 2005; Lin et al., 2005). Por outro lado, várias limitações impedem seu uso em larga escala. Estudos recentes salientam que o encontro e a ressecção de pólipos adenomatosos previnem o câncer do cólon, sendo este o primeiro objetivo do programa de rastreamento (Kelloff et al., 2004). Outros artigos salientam a importância de novos métodos como a colonoscopia virtual, marcadores fecais e o uso da imunohistoquímica (Bond, 2003; Ringstad et al.,

2006). A evolução no conhecimento da carcinogênese colorretal se deve aos estudos das alterações moleculares verificadas nos pólipos com atipias e em carcinomas colorretais. A identificação e caracterização das alterações genéticas no processo de transformação maligna têm avançado rapidamente nas últimas décadas. Outros marcadores têm sido estudados em pólipos colorretais como o *Ki-67*, verificando-se sua distribuição nas criptas e correlacionando com o potencial de malignidade (Davenport et al., 2003; Ribeiro, 2002). O envolvimento de número limitado de oncogenes em uma ampla variedade de tumores sugere que um número determinado de genes é necessário para a transformação maligna. Desse modo, podem-se desenvolver métodos para detectar estes tumores (Sriravastava et al., 2001). Recentemente, genes não relatados como supressores ou oncogenes têm sido implicados na carcinogênese (Leach et al., 1993; Honchel et al., 1994). Estes genes são referidos como MMR (*mismatch repair genes*) (Fahy et al., 1998). Embora tenham sido encontrados em bactérias e leveduras, descobriram-se dois genes humanos: o hMLH1 e o hMSH2, que são homólogos com os genes MMR das leveduras (Fishel et al., 1993; Chung et al., 2000). Sua descoberta possibilita utilizá-la na detecção de neoplasia precoce, ou mesmo estágios pré-clínicos da neoplasia maligna. O conhecimento da biologia tumoral permite a identificação, com testes específicos, de estágios precoces ou a realização de rastreamento de cânceres. Alterações na genética molecular podem contribuir através da análise de risco. Indivíduos com testes positivos de risco, como os biomarcadores, são candidatos para maior vigilância ou intervenção. Os fatores de riscos mais precoces são, provavelmente, os defeitos genéticos herdados, bem demonstrados no câncer colorretal (Stanbridge et

al., 1990). APC e HNPCC estão associados à mutação na linha germinativa no gene APC e nos genes de reparo, MMR (*mismatch repair genes*) (Syngal et al., 2000a). Os cânceres de cólon, que surgem em indivíduos jovens, são quase 100% em decorrência de mutações no gene APC.

Há incidência significativa de câncer colorretal em indivíduos com pólipos (Grizzle et al., 1999; Lage et al., 2004). Aproximadamente 90% das lesões neoplásicas pré-invasivas do cólon são pólipos ou precursoras de pólipos (*aberrant crypt foci*). Existem evidências de que o câncer colorretal progride de tecido normal para adenoma e, a seguir, para carcinoma através de acúmulos de alterações genéticas (Boland et al., 1998; Baron et al., 2000; Chung et al., 2000). Essas alterações genéticas em adenomas e carcinomas permitem detectar alterações específicas no DNA. No câncer colorretal, o delineamento dos vários estágios, durante a progressão do tumor, oferece a oportunidade de se intervir no processo por determinação da alteração molecular. São conhecidas as mutações e perda da heteroziguidade que afetam oncogenes tais como: *K-ras* e vários genes supressores incluindo *p53*, MCC (*mutated in CRC*), APC e DCC (*deleted in colon cancer*) (Bos et al., 1987; Fearon e Vogelstein, 1990; Hollstein et al., 1991; Kinzler et al., 1991; Groden et al., 1991). Essas alterações gênicas podem ser verificadas e servem como biomarcadores clínicos de câncer colorretal.

3.1 APC

Mutações na linha germinativa do APC são consideradas as alterações mais precoces detectadas no câncer colorretal, porque praticamente 100% dos indivíduos desenvolverão a neoplasia no futuro. Por exemplo, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do cromossoma 5p21-22 (por perda do gene APC) tem sido útil no diagnóstico de morbidade e aconselhamento na FAP. Embora a FAP seja rara, respondendo por menos de 1% de todos os casos de câncer colorretal, mutações no gene APC ocorrem em 60% dos indivíduos com câncer colorretal. A mutação I1307K foi encontrada em aproximadamente 6% da população de judeus Ashkenasi e associado com elevado risco de câncer colorretal (Syngal et al., 2000b). Tais mutações podem ser detectadas por testes específicos utilizando-se PCR (Su et al., 2000).

3.2 MMR

As pesquisas moleculares têm identificado uma nova família de genes comumente conhecida como MMR, os quais predisõem indivíduos ao câncer colorretal. Determinado número de genes estão envolvidos no MMR, tais como: **hMSH2**, **hMLH1**, **hPMS2**, **hMSH3** e **hMSH6** (Grizzle et al., 1999). Por exemplo, o HNPCC, conhecido popularmente com Síndrome de Lynch, tem sido objeto de intensos estudos envolvendo os genes do MMR (Lynch et al., 1991; Lynch et al., 1997).

Mutações destes genes produzem seqüências de instabilidade de microssatélite. A perda da MMR leva a frequência elevada de pontos de mutação (*mutator phenotype*) e instabilidade de microssatélite (MSI). Na maioria dos cânceres colorretais de pacientes com HNPCC ocorrem MSI, as quais são usadas como biomarcadores para detectar a Síndrome de Lynch. O gene **hMLH1** está localizado no cromossoma **3p21-23** em área de importância para os genes envolvidos no câncer colorretal hereditário não polipóide (Lindblom et al., 1993; Nynstrom-Lahti et al., 1994). O gene **hMSH2** está localizado no cromossoma **2p21**, em área inicialmente identificada como região importante para genes envolvidos no câncer colorretal hereditário não polipóide (HNPCC) (Leach et al., 1993; Peltomaki et al., 1993).

3.4 K-ras

Aproximadamente, 50% dos indivíduos com adenocarcinomas de cólon contêm gene alelo mutante do K-ras. O aparecimento precoce e sua alta frequência no câncer colorretal servem como biomarcador na detecção de lesões precoces (Sidransky et al., 1992; Ahlquist et al., 2000; Servomaa et al., 2000). Devido aos bons resultados na detecção de mutações do **ras** em amostras de fezes de pacientes antes da colonoscopia, propõe-se a utilização deste marcador molecular rotineiramente (Sidransky et al., 1992; Ahlquist et al., 2000).

3.5 p53

A identificação do p53 ocorreu há mais de duas décadas e foi considerado inicialmente um oncogene. A proteína foi observada em células de roedores como co-imunoprecipitante com a oncoproteína viral antígeno T SV-40 (Finlay et al., 1989). Vogelstein et al. (1988) foram os primeiros a descobrirem mutações do p53 e a atividade supressora do p53 selvagem. O gene supressor de tumor p53 está localizado no cromossoma 17p, codifica uma proteína nuclear de 53kD e é o mais comumente envolvido em carcinogênese (Finlay et al., 1989; Hollstein et al., 1991). Os exons 5 e 8 são os que sofrem maior número de mutações, uma vez que compreendem regiões altamente conservadas durante a evolução dos vertebrados (Safatle-Ribeiro, 2001). A proteína p53 tem efeito inibitório na proliferação e na transformação celular, mantendo as células em repouso na fase G1 do ciclo celular (Finlay et al., 1989). A menos que a mutação seja herdada, para o p53 a situação é algo diferente do *ras*, no qual um defeito adquirido do p53 ou perda de um alelo tende a ser evento tardio na carcinogênese (Fearon e Vogelstein, 1990). O DNA de 118 pacientes com carcinoma de cólon foi analisado para detectar mutação nos exons 4-8 do gene p53 e codons 12/13 e 61 do gene K-ras. A produção de proteínas p53 e K-ras foi estudada por imunohistoquímica. A frequência de mutação do gene p53 foi de 35% e do gene K-ras foi de 15% (Servomaa, 2000).

3.6 Cox-2

A enzima ciclooxygenase existe em duas formas: a Cox-1 e a Cox-2. A ciclooxygenase-1 se expressa em muitos tecidos e é envolvida na homeostase de várias funções fisiológicas, tais como a proteção da mucosa gástrica e regulação da agregação plaquetária (Jones et al., 1993; DuBois et al., 1994). A Cox-2 é induzida em resposta a fator de crescimento e citocinas, sendo expressa em doenças inflamatórias, lesões pré-malignas e tumores colorretais. A Cox-2 é encontrada em, aproximadamente, 40% dos adenomas colorretais, acima de 90% dos adenocarcinomas, porém não é expressa na mucosa colônica normal (Eberhart et al., 1994). Inibindo a Cox-2 com drogas antiinflamatórias ocorre apoptose, que pode ser o mecanismo da quimioprevenção dos antiinflamatórios (Chan et al., 1998). Os antiinflamatórios têm efeitos antineoplásicos já relatados com a ciclooxygenase-2 (Shiff e Rigas, 1999). A expressão aumentada da Cox-2 tem sido encontrada em pólipos adenomatosos gastrointestinais de modelos animais de polipose adenomatosa, (Oshima et al., 1996; Williams et al., 1996; Chulada et al., 2000; Shattuck-Brandt et al., 2000). Observou-se também, em pacientes de polipose adenomatosa familiar, (Sinicrope et al., 1999; Keller et al., 2001; Khan et al., 2001). Alguns estudos demonstraram que nos adenomas esporádicos, em pacientes humanos, a Cox-2 pode se encontrar alterada (Eberhart et al., 1994; Bamba et al., 1999; Hao et al., 1999; Chapple et al., 2000; Arao et al., 2001). Esses achados sugerem que a enzima tem papel significativo na promoção e

desenvolvimento do câncer colorretal, incentivando o uso dos inibidores seletivos como agentes preventivos do câncer colorretal (Marnett e DuBois, 2002). Entretanto, o mecanismo do envolvimento celular ainda é desconhecido. A localização da Cox-2 nos adenomas tubulares colorretais é nos miofibroblastos subepiteliais e na região periluminal; na mucosa normal e nos pólipos hiperplásicos, a expressão da enzima ocorre nos macrófagos e células endoteliais (Adegboyega et al., 2004). Em adenomas colorretais, a expressão da Cox-2 foi encontrada aumentada em 94%; em carcinomas invasivos, a expressão da enzima estava aumentada na porção adenomatosa do tumor e foi detectada em 62% dos casos. Somente em 23% dos casos de carcinomas invasivos foi detectada a expressão da Cox-2 em células epiteliais malignas (Adegboyega et al., 2004). Em estudo onde se analisou sua expressão em mucosa normal, pólipos hiperplásicos, adenomas e câncer colorretal, verificou-se que a mesma foi elevada em câncer e adenomas. A imunoexpressão da Cox-2 não teve diferença significativa entre mucosa normal e pólipos hiperplásicos, não havendo associação significativa entre a localização ou o estágio do tumor e a expressão da enzima. Maekawa et al. (1998) concluíram que a imunoexpressão da Cox-2 aumentada pode ser evento precoce na carcinogênese do câncer colorretal. Em outro estudo onde se verificou a localização da Cox-2 em adenomas esporádicos do cólon, encontrou-se a expressão da proteína em 77% dos adenomas. A localização, em 75% dos casos, foi nas células intersticiais superficiais. Em 17% dos casos a proteína foi detectada dentro do corpo do adenoma em células intersticiais. Na maioria dos adenomas a Cox-2 não foi observada nas células epiteliais. Entretanto, nas células epiteliais displásicas a expressão da proteína foi

detectada em 29%. Em mucosa normal não houve imunexpressão da proteína (Chapple et al., 2000). Com relação ao tamanho, um estudo demonstrou que nos adenomas pequenos (< que 5 mm) a proporção da expressão da Cox-2 foi de 38% e em adenomas maiores foi de 82% (Elder et al., 2002).

Há muito se conhece a seqüência adenoma-carcinoma, usualmente resultado de mutações no gene da polipose adenomatosa colônica (APC) caracterizando-se por instabilidade cromossomal (Powell et al., 1992; Kinzler e Vogelstein, 1996). Além disso, 10% a 15% dos cânceres colorretais surgem pela via da instabilidade de microsatélite (MSI), (Aaltonen et al., 1993; Ionov et al., 1993; Thibodeau et al., 1993). A mutação no gene APC é incomum nestes tumores e quando presente costuma aparecer após a instabilidade de microsatélites (Huang et al., 1996; Konishi et al., 1996; Perucho, 1996; Olschwang et al., 1997; Somowitz e Slattery, 1997). Em indivíduos com defeitos hereditários dos genes de reparo (HNPCC), os adenomas apresentam perdas focais das proteínas de reparo, sugerindo que elas sejam as lesões precursoras de tumores (Aaltonen et al., 1994; Jacoby et al., 1995; Jass, 1995; Konishi et al., 1996).

Reconhece-se que os pólipos hiperplásicos colorretais podem, de fato, ser lesões pré-neoplásicas, porque eles contêm alterações genéticas igualmente vistas no câncer colorretal, incluindo mutações no *K-ras* e MSI (Jen et al., 1994; Lothe et al., 1995; Konishi et al., 1996; Otori et al., 1997; Williams, 1997). Também tem sido reconhecido que alguns pólipos hiperplásicos apresentam displasia, fenômeno referido como adenoma serrilhado ou como uma associação de pólipos hiperplásicos com

adenomatoso (Longacre e Fenoglio-Preiser, 1990). Mais recentemente, pólipos hiperplásicos do cólon direito têm sido sugeridos como potenciais precursores dos cânceres colorretais esporádicos com MSI (Jass et al., 2000; Jass, 2001). A análise da MSI é realizada pela (PCR) reação em cadeia da polimerase (Hawkins et al., 2000). Os marcadores usados foram: Bat25, Bat26, D5S346, D2S123 e D17S250 (Boland et al., 1998). Considera-se uma lesão apresentando alto grau de instabilidade (MSI-H) se dois ou mais marcadores demonstrarem instabilidade. Tanto os adenomas quanto os pólipos hiperplásicos podem apresentar MSI (MSI-H ou MSI-L) em casos esporádicos, no contexto do HNPCC ou em pacientes com pólipos hiperplásicos (Samowitz e Slattery, 1997; Iino et al., 1999; Hawkins et al., 2000; Iino et al., 2000; Jass et al., 2000; Rashid et al., 2000; Hawkins e Ward, 2001; Rijcken, 2002; Ricciardiello et al., 2003). A instabilidade de microssatélite de alto grau (MSI-H) é rara na ausência de displasia de alto grau, sugerindo ser provável que isso seja um evento tardio, ocorrendo na transição de adenoma para carcinoma. Muitos tumores com MSI, responsáveis por 10% de todos os cânceres colorretais, são esporádicos e causados pela hipermetilação da região do gene hMLH1, levando a perda da expressão da proteína (Kane et al., 1997; Cunningham et al., 1998; Herman et al., 1998; Veigl et al., 1998).

O câncer colorretal é a terceira causa de morte mais comum no mundo com algumas formas hereditárias bem conhecidas (Parkin, 2001; Lynch e De La Chapelle, 2003). Nos Estados Unidos, Canadá e alguns países da Comunidade Européia têm apresentado diminuição da incidência e taxas de mortalidade por câncer colorretal nos últimos anos. Isso se atribui ao diagnóstico precoce, melhor tratamento e mudança

nos hábitos alimentares da população (Gibbons et al., 2001; Willet, 2001; Ranssohoff e Sandler, 2002; Jemal et al., 2004; Levi et al., 2004; Donoso et al., 2006). A instabilidade de microssatélite (MSI) representa uma característica fenotípica marcante do HNPCC, estando presente em 80% a 90% dos tumores nesta síndrome (Dietmaier et al., 1997; Boland et al., 1998). Todavia, chega a ocorrer em até 15% dos cânceres colorretais ditos esporádicos, sendo que a hipermetilação do promotor do gene hMLH1 parece corresponder à principal alteração genética responsável por esta alteração nos tumores esporádicos (Dietmaier et al., 1997; Boland et al., 1998).

A perda da expressão do hMLH1 foi observada em 10 de 13 pacientes com MSI, mas não foi vista em pacientes com MSS. Alguns pólipos hiperplásicos localizados no cólon direito podem provocar câncer colorretal esporádico com MSI. A frequência com que lesões benignas progridem para câncer com MSI é desconhecida (Hawkins e Ward, 2001). A instabilidade de microssatélite foi encontrada em 8% de pólipos hiperplásicos, 54% em focos de displasia e em 73% de amostras de cânceres. Todos os focos de displasia com MSI-alta e também os cânceres apresentaram perda da expressão do hMLH1. A neoplasia pode ser conduzida pela instabilidade do DNA que está presente em MSI-baixa ou MSI-alta. Em nenhuma amostra de MSI-L houve perda da expressão de hMLH1, contrastando com a perda da expressão em todas as amostras com MSI-H. (Jass, et al., 2000a; Rashid, et al., 2000). MSI-H, entretanto, é rara na ausência de displasia de alto grau, sugerindo que seja um evento tardio, ocorrendo durante a transição de adenoma para carcinoma. Pelo menos dois caminhos mutantes conduzem os pólipos hiperplásicos à neoplasia. O papel dos pólipos

hiperplásicos na histogênese do câncer colorretal com MSI deve ser mais pesquisado (Jass et al., 2000a).

Pacientes com HNPCC desenvolvem adenomas mais freqüentemente e com idade mais jovem do que os não portadores de alteração dos genes do MMR (De Jong et al., 2004). A progressão de adenoma para carcinoma invasivo ocorre rapidamente. Em muitos pacientes isso pode ocorrer em menos de 3 anos, contrastando com a média de 15 anos nos pacientes sem HNPCC (Vasen et al., 1989; De Jong et al., 2004). Portadores da mutação do HNPCC desenvolvem seus primeiros adenomas com idade média de 42 a 43 anos (Jarvinen et al., 2000; Lindgren et al., 2002; De Jong et al., 2004). Em comparação com adenomas esporádicos, os adenomas do HNPCC são tipicamente proximais (50% vs. 26%) e apresentam mais displasia de alto grau (Rijcken et al., 2002; De Jong et al., 2004). No estudo de Rijcken (2002), 60% dos adenomas de pacientes com HNPCC são portadores de mutação com perda da expressão do hMLH1 ou hMSH2 e os adenomas que preservam as expressões dos genes são de baixo grau de displasia. Em relação ao tamanho, todos os adenomas de localização proximal do HNPCC são pequenos, (< ou igual a 5 mm) e apresentam alto grau de displasia comparado com 17% dos adenomas esporádicos de localização proximal e com maior diâmetro. A progressão para displasia de alto grau é mais freqüente no cólon proximal do que no distal, indicando rápida transformação para o câncer. A mutação no MMR provavelmente não inicia o desenvolvimento do adenoma, mas está presente nos estágios iniciais da tumorigênese (Rijcken et al., 2002). Alguns adenomas no HNPCC, com diâmetro de até 0,7 cm, apresentam perda da expressão da

proteína do MMR, mas com displasia de baixo grau (De Jong et al., 2004). No estudo de Iino et al. (2000), demonstrou-se MSI em 80% dos pólipos de portadores de HNPCC, porém MSI-H não foi encontrada em pólipos hiperplásicos, sendo 88% MSS e o restante MSI-L. MSI-H foi observada em 53% dos adenomas, os quais também apresentaram 27% de MSI-L. (Iino et al., 2000). Em 17% dos adenomas MSS, 86% dos MSI-L e 100% dos MSI-H havia perda das expressões de hMLH1 ou hMSH2. Além disso, verificaram significativa associação entre MSI-H e displasia de alto grau (Iino et al., 2000). As alterações no MMR ocorrem nos estágios precoces de desenvolvimento dos adenomas de portadores do HNPCC. Desse modo, recomenda-se realizar imunohistoquímica para pesquisa de MSI em adenomas com alto grau de displasia (De Jong et al., 2004). Em pólipos e câncer colorretal esporádico, o mecanismo de MSI é silencioso na promoção da metilação do gene hMLH1, podendo isto ser demonstrado pela perda da expressão da proteína do hMLH1 pela imunohistoquímica (Hawkins e Ward, 2001). Estudos têm demonstrado baixa porcentagem de MSI em adenomas esporádicos. Foi demonstrado que 80% dos adenomas esporádicos são MSS e 18% são MSI-L, em contraste com o câncer colorretal esporádico que apresentam MSI-L em mais de 50% dos casos, enquanto que 16,5% apresentam MSI-H (Samowitz et al., 1995, Samowitz et al., 1997).

Em recente estudo, Gologan e Sepúlveda (2005) sugerem que os pólipos que mais demonstram deficiência do gene do MMR e MSI são os adenomas de maior diâmetro com displasia de alto grau e os adenomas serrilhados. No estudo de Hawkins e Ward (2001) ficou demonstrado que indivíduos com câncer colorretal com

MSI têm maior probabilidade de apresentarem adenomas serrilhados do que pacientes com câncer colorretal com MSS. A perda da expressão do hMLH1 foi observada nos casos de MSI, mas não nos cânceres com MSS.

O estudo de Herman et al. (1998), demonstrou que a hipermetilação das ilhas de citosina fosfoguanosina (CpG) do hMLH1 é encontrada na maioria dos cânceres colorretais esporádicos com MSI e está, quase sempre, associado com a perda da expressão do gene hMLH1. O resultado do estudo sugere que MSI no câncer colorretal esporádico freqüentemente resulta da inativação epigênica do hMLH1 em associação com a metilação do DNA.

A fisiopatologia da seqüência adenoma-carcinoma e a fisiopatologia molecular da carcinogênese do cólon sugerem que a polipectomia de adenomas poderia prevenir substancialmente o câncer colorretal (Winawer et al., 1993). O estudo de Hawkins e Ward (2001) sustenta evidências para afirmar a hipótese que pólipos serrilhados, incluindo hiperplásicos e adenomas, possam ser precursores do câncer colorretal esporádico com MSI. Esses achados indicam que pólipos hiperplásicos e adenomas serrilhados ocorrem mais freqüentemente em indivíduos com câncer colorretal associado à MSI e com freqüente perda focal da expressão do hMLH1. Neste estudo, ainda, essas alterações foram totalmente ausentes nos pólipos serrilhados e adenomas de indivíduos com câncer que apresentavam MSS (Hawkins e Ward, 2001). Além disso, a perda da expressão do hMLH1, que pode preceder o desenvolvimento da displasia, sugere que esta perda da expressão seja evento precoce no processo neoplásico e pode ser um primeiro evento semelhante à mutação do APC nos adenomas

convencionais (Kinzler e Vogelstein, 1997). Tradicionalmente, os pólipos hiperplásicos têm sido observados como "*Cinderellas of colorectal pathology*", sem nenhum potencial maligno e com "*guidelines*", sugerindo que podem ser ignorados, (Winawer et al., 1997). Os achados desse estudo sugerem que o prevalente paradigma deve ser reconsiderado e que os pólipos serrilhados do cólon direito devem ser vistos como potenciais precursores do câncer colorretal. Com esta hipótese, será necessário que os patologistas reavaliem seus relatórios em relação aos pólipos hiperplásicos e aos adenomas serrilhados do cólon direito, uma vez que eles podem ser biomarcadores de um futuro câncer colorretal esporádico com MSI. Além disso, os endoscopistas devem olhar para os pólipos hiperplásicos com a mesma consideração que aplicam aos adenomas (Hawkins e Ward, 2001).

Os adenomas colorretais são considerados precursores de muitos cânceres colorretais, representando importantes alvos da quimioprevenção. Importantes estudos têm demonstrado que a Cox-2 é expressa em altos níveis nos adenocarcinomas colorretais, em 80% a 90% dos casos (Eberhart et al., 1994; Kargman et al., 1995; Sano et al., 1995; Maekawa et al., 1998; Sheehan et al., 1999). Os inibidores seletivos da Cox-2 reduzem a tumorigênese colorretal em diferentes modelos da carcinogênese (Oshima et al., 1996; Reddy et al., 1996; Kawamori et al., 1998).

Sabe-se que o câncer colorretal que apresenta MSI tem a expressão da Cox-2 em percentagem reduzida de casos (Karnes et al., 1998). Isto se deve porque a preferência do câncer colorretal de localização proximal com MMR, caracterizado por MSI, poderia acontecer pelo diferencial na expressão da Cox-2 em

adenomas, demonstrada no estudo (Chapple et al., 2000). Acredita-se que os antiinflamatórios não esteróides reduzem a formação e o desenvolvimento do câncer colorretal pela inibição da enzima ciclooxigenase requerida para a síntese da prostaglandina E2. A prostaglandina E2 promove a proliferação celular e o crescimento tumoral (Marnet, 1992). Os antiinflamatórios podem retardar a carcinogênese pelos efeitos de adesão celular e apoptose (Turini e DuBois, 2002). Acredita-se, ainda, que a Cox-2 seja um mediador da proliferação celular e crescimento tumoral. Desse modo, os inibidores da Cox-2 podem bloquear a formação de adenomas e impedir o desenvolvimento tumoral. Estudos epidemiológicos têm indicado que a administração regular de AAS reduz a incidência e a mortalidade do câncer colorretal. Drogas antiinflamatórias não esteróides podem reduzir o número e o tamanho de pólipos adenomatosos do cólon em modelos animais e pacientes com polipose adenomatosa familiar (Giardiello et al., 1993; Jacoby et al., 2000a; Steinbach et al., 2000; Oshima et al., 2001). Celecoxib, inibidor seletivo da Cox-2, foi efetivo na prevenção e tratamento de adenomas de um modelo animal da FAP (Jacoby et al., 2000b). Embora existam dados que suportam a diminuição da carcinogênese pelos antiinflamatórios, a dosagem e duração do tratamento ainda são desconhecidas, pois o papel dos inibidores seletivos da Cox-2 versus os não seletivos necessita ser melhor analisado e definido (Gatof e Ahnen, 2003).

4. MÉTODOS

Em uma população diversa quanto ao sexo, idade, etnia e classe social, analisaram-se 167 pólipos colorretais encontrados em colonoscopias realizadas em 138 pacientes no período de 2000 a 2004, sendo que todos os exames foram realizados pelo autor desta pesquisa. Utilizaram-se 6 biópsias endoscópicas de cólon com diagnóstico histológico de tecido colônico normal e 23 adenocarcinomas de cólon como grupo controle. As indicações para o exame colonoscópico consistiram de: avaliação de anormalidades em enema opaco, alteração do hábito intestinal, anemia ferropriva a esclarecer, emagrecimento sem causa aparente, perda de sangue nas fezes ou pesquisa de sangue oculto nas fezes positiva. Nenhum paciente tinha história familiar de câncer colorretal.

Os dados clinicopatológicos foram prospectivamente coletados na época da realização da colonoscopia e as variáveis analisadas incluíram: idade, sexo, localização, número, tamanho do pólipos, histologia, grau de displasia e imunohistoquímica.

4.1 COLONOSCOPIA

Todos os pacientes envolvidos nesta análise receberam as informações sobre a necessidade do exame e riscos sobre o procedimento diagnóstico ou terapêutico. A preparação era realizada com a recomendação de dieta sem resíduos por 48 horas que antecedia o procedimento, concomitante com a administração de 10 sachês (13,25g/sachê) do laxativo polietilenoglicol, adicionado a 500 ml de suco ou refrigerante. No terceiro dia, aproximadamente 03 horas antes do procedimento, o paciente ingeria 500 ml de Manitol a 20%, adicionado com 500 ml de suco ou refrigerante. Todos os pacientes eram monitorados com oximetria e tinham acesso venoso durante o exame. A sedação era realizada com midazolam 5mg até um máximo de 15 mg. Eventualmente utilizava-se hioscina simples injetável. O procedimento era realizado com vídeo-colonoscópio da marca Olympus e seus acessórios. Utilizou-se a pinça tradicional para a realização de biópsias. Para as polipectomias, utilizou-se *hot biopsy* ou alça de polipectomia. O material era coletado, fixado em formol e encaminhado ao Laboratório de Patologia para análise. As figuras de 3 a 8 mostram imagens de pólipos e cânceres do cólon.

Figura 3. Pólipo de sigmóide

Figura 4. Adenocarcinoma de ceco

Figura 5. Pólipo pediculado de ascendente

Figura 6. Pólipo pediculado de sigmóide

Figura 7. Pólipo pediculado de descendente

Figura 8. Cromoscopia em pólipó sésil de descendente

i

Figura 9. Adenocarcinoma ulcerado de ascendente

4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

A técnica imunohistoquímica teve como base experiências descritas anteriormente Hsu et al. (1981), Shi et al. (1991), Ribeiro Jr. et al. (1996), Safatle-Ribeiro et al. (1996), Safatle-Ribeiro et al. (1998), Safatle-Ribeiro et al. (2002) e padronizada no Instituto Adolfo Lutz (Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves) e na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - LIM 50 (Prof. Dr. Carlos Eduardo P. Corbett). Resumidamente, a detecção das proteínas envolveu o uso de cortes histológicos com 4 μ de espessura de tecido fixado em formalina e incluído em parafina. Os cortes histológicos foram colocados em estufa a 60 graus C por 24h. As lâminas foram lavadas em xilol e rehidratadas com álcool de várias gradações. Para o rastreamento de possíveis alterações gênicas foi realizada a pesquisa de antígenos hMSH2, hMLH1 mediante incubação com os anticorpos hMSH2 (clone G219-1129), hMLH1 (clone G168-728) (Pharmigen, San Diego, CA, EUA) e Cox-2 (clone CX-294, Dako, Carpinteria, CA, EUA). O método empregado foi o do sistema de amplificação de sinal tiramida livre de biotina (DakoCytomation CSA II, Carpinteria, CA 93013, EUA) (Bobrow MN et al., 1991).

Os cortes histológicos com 4 μ m de espessura foram montados em lâminas cobertas com 3-aminopropil-triethoxisilano (SIGMA -Aldrich Co. St. Louis, USA), desparafinados e hidratados por meio de xilóis e álcoois. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por imersão em peróxido de hidrogênio a 6%

(Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ). Em seguida foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas com soro normal de cavalo a 3% diluído em BSA 1% em PBS (tampão fosfato pH 7,4 (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ) e azida sódica 0,1% (SIGMA-Aldrich Co. St. Louis, USA).

Os anticorpos monoclonais primários nas titulações padronizadas para o hMSH2 1:300, hMLH1 1:150 e Cox-2 1:200 foram diluídos em BSA 1% em PBS (tampão fosfato pH 7,4) e azida sódica 0,1%. Os cortes foram incubados em câmara úmida a 4°C por um período de 16 a 18 horas. A seguir, os tecidos foram lavados em tampão PBS pH 7,4 por 3 vezes, 5 minutos cada troca e incubados com anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 30 minutos a 37°C. Seguiram-se novas lavagens com PBS por 3 vezes, 5 minutos cada troca e foram incubados com o reagente amplificador 30 minutos a 37°C. Após, seguiram-se as lavagens com PBS por 3 vezes, 5 minutos cada troca e incubaram-se os cortes com anticorpo antilfluoresceína, conjugada à peroxidase, por 30 minutos a 37°C. Os cortes foram lavados com PBS por três vezes, 5 minutos cada troca e, em seguida, procedeu-se a etapa da revelação com substrato cromogênico 3'3 diaminobenzidina tetrahydroclorato (SIGMA- Aldrich Co. St. Louis, USA) 1mg/mL com 0,1% (vol/vol) de peróxido de hidrogênio (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ) em tampão fosfato pH 7,4 com a imersão dos cortes por 1 minuto. Logo após, as lâminas foram lavadas em água destilada corrente.

Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, desidratados e, em seguida, procedeu-se a montagem das lâminas com meio de Entellan[®] neu (Merck KGaA-Alemanha).

Cortes histológicos de adenocarcinoma colorretal, previamente conhecidos por expressarem níveis elevados de imunexpressão, para os marcadores descritos, foram usados como controles positivos.

Para garantir a uniformidade das reações, viabilizando a análise imunohistoquímica semiquantitativa, à determinação de cada antígeno foi efetuada em única reação. Os controles negativos corresponderam a cortes histológicos de adenocarcinomas colorretais com a omissão do anticorpo primário que foi substituído por PBS.

As colorações foram classificadas em quatro níveis para intensidade e distribuição de acordo com critérios previamente estabelecidos. Nos indivíduos ou tecidos normais ocorre forte coloração nuclear para o hMLH1 e hMSH2, e coloração citoplasmática para o Cox-2.

Considerou-se resultado positivo para o hMLH1 e hMSH2 quando não houve imunoreatividade no tecido estudado (a perda de imunexpressão traduz alteração de expressão gênica). Para o Cox-2 ocorre o inverso e os corados com maior reatividade, como 3+ ou 4+ são considerados casos positivos.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise foi realizada pela média aritmética, desvio padrão, valores máximo e mínimo, mediana e percentual. A expressão dos marcadores e as demais variáveis foram analisadas por percentuais, tabelas de contingência, prevalência e intervalo de confiança. Utilizou-se o teste do qui quadrado (variante de Pearson) ou o teste exato de Fisher para a significância da associação entre as variáveis, sendo $p < 0,05$ considerado significativo.

Utilizou-se, ainda, programas Excel e Word para tabelas, textos e gráficos. A análise estatística foi realizada pelo programa, SPSS V10.0.

5. RESULTADOS

Setenta e sete eram homens (55,8%) e 61 eram mulheres (44,2%).

Figura 10. Pacientes com pólipos e distribuição quanto ao sexo

A média de idade dos pacientes foi de 60,2 anos, variando de 21 a 90 anos, com desvio padrão de 13,8. Até 40 anos (9,6%), de 41 a 50anos (13,2%), de 51 a 60 anos (26,9%) e acima de 60 anos (50,3%).

F

Figura 11. Pacientes e a distribuição por idade

O estudo histopatológico dos adenomas demonstrou 92 (81,4%) casos de tubulares, 1 (0,9%) de viloso, 18 (15,9%) de túbulo-vilosos e 2 (1,8%) de serrilhados.

Figura 12. Histologia dos adenomas

A localização dos adenomas foi de 7,5% no ceco, 14,2% no ascendente, 6,7% no transverso, 8,2% no descendente e 63,5% no retossigmoide.

Figura 13. Localização dos adenomas

A displasia de baixo grau ocorreu em 68 (59,6%) e a displasia de alto grau em 68 (40,4%) dos adenomas.

Figura 14. Grau de displasia nos adenomas

No sexo masculino, a perda de imunexpressão para o hMLH1 foi observada em 25,6%; perda de imunexpressão para o hMSH2 em 11% e a imunexpressão para o Cox-2 foi fortemente positiva em 15,3% dos adenomas. Em relação ao sexo feminino, houve perda da imunexpressão do hMLH1 em 25,4%; perda da imunexpressão do hMSH2 em 13,6% e a imunexpressão para o Cox-2 foi fortemente positiva em 11,6% dos adenomas. Não houve diferença estatística quanto ao estudo dos marcadores e o sexo.

hMLH1, hMSH2 e Cox-2 vs. SEXO

Figura 15. Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e o sexo dos pacientes

Encontrou-se a perda de imunoeexpressão para o hMLH1 em: 6%, 40%, 19,5% e 28,8% nas faixas etárias abaixo dos 40 anos, entre 41 e 50 anos, entre 51 e 60 anos e acima de 60 anos, respectivamente. Houve a perda de imunoeexpressão para hMSH2 em: 14,3%, 9%, 10% e 13,9% nas faixas etárias abaixo dos 40 anos, entre 41 e 50 anos, entre 51 e 60 anos e acima de 60 anos, respectivamente. Em relação à Cox-2, a imunoeexpressão apresentou-se fortemente positiva em: 14,3% , 9%, 17% e 13% nas faixas etárias abaixo dos 40 anos, entre 41 e 50 anos, entre 51 e 60 anos e acima de 60 anos, respectivamente.

Figura 16. Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e a idade dos pacientes

A perda da imunexpressão do hMLH1 no cólon direito foi de 27%; no cólon esquerdo foi de 27,4% e no retossigmóide foi de 18,4%. A perda da imunexpressão do hMSH2 no cólon direito foi de 11,4%; no cólon esquerdo foi de 14,3% e no retossigmóide 10,8%. Em relação à Cox-2, a imunexpressão foi fortemente positiva em 5,7% dos adenomas no cólon direito; 13% dos adenomas no cólon esquerdo e 12,1% dos adenomas no reto. Não houve diferença estatística na avaliação da localização tumoral com os marcadores avaliados.

Figura 17. Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e a localização dos adenomas

Nos adenomas tubulares houve perda da imunexpressão do hMLH1 em 37,1% e em 14,5% houve perda da imunexpressão do hMSH2. A Cox-2 se mostrou alterada em 7% dos adenomas tubulares. Não houve perda das imunexpressões dos genes hMLH1 e hMSH2 nos adenomas vilosos, porém a imunexpressão da Cox-2 se mostrou fortemente positiva em 100% dos casos. Nos adenomas túbulo-vilosos houve perda da imunexpressão do hMLH1 em 17,6% e perda de 28,6% da imunexpressão do hMSH2. A imunexpressão da Cox-2 foi positiva em 12,5% dos adenomas túbulo-vilosos. Os adenomas serrilhados não apresentaram alterações de hMLH1, hMSH2 e Cox-2.

hMLH1, hMSH2 e Cox-2 vs. Histologia dos adenomas

Figura 18. Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e a histologia dos adenomas

Em relação à displasia de baixo grau, os adenomas mostraram perda da imunexpressão do hMLH1 em 34,8% e perda da imunexpressão do hMSH2 em 18% dos casos. A imunexpressão da Cox-2 se mostrou fortemente positiva em 8,1% dos adenomas. Na displasia de alto grau houve perda da imunexpressão do hMLH1 em 30,2% e perda da imunexpressão do hMSH2 em 17,1% dos casos. A imunexpressão da Cox-2 se mostrou fortemente positiva em 9,1% dos adenomas de alto grau de displasia.

hMLH1, hMSH2 e Cox-2 vs. Displasia

Figura 19. Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e a displasia nos adenomas

Não houve perda das imunoexpressões do hMLH1 e do hMSH2 nas amostras de mucosa normal. A imunoexpressão da Cox-2 foi negativa na mucosa normal.

Nos pólipos hiperplásicos não houve perda da imunoexpressão do hMLH1 e do hMSH2. A imunoexpressão da Cox-2 foi negativa nos pólipos hiperplásicos.

Houve perda da imunoexpressão do hMLH1 e hMSH2 nos adenomas em 20% e 15,5%, respectivamente. A imunoexpressão da Cox-2 se expressou positivamente em 9% dos adenomas.

Houve perda da imunoexpressão do hMLH1 e hMSH2 nos adenocarcinomas em 20% e 10%, respectivamente. A imunoexpressão da Cox-2 se expressou positiva em 40% nos adenocarcinomas.

Figura 20. Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 com mucosa normal, pólipos hiperplásicos, adenomas e adenocarcinomas

Houve perda da imunoexpressão do hMLH1 em 31% adenomas menores que 10 mm e 28,6% naqueles com diâmetro entre 10 mm e 20 mm. Nos adenomas maiores que 20 mm não houve perda da imunoexpressão do hMLH1. Em relação ao hMSH2, houve perda da expressão em 17,2% dos adenomas menores que 10 mm, 8,3% de perda naqueles com diâmetro entre 10 mm e 20 mm e 42,8% dos adenomas com mais de 20 mm. A imunoexpressão da Cox-2 se expressou positivamente em 10,3%, 8,6% e 14,3% nos adenomas com diâmetro até 10 mm, entre 10 mm e 20 mm e nos adenomas com mais de 20 mm, respectivamente.

hMLH1, hMSH2 e Cox-2 vs. Tamanho

Figura 21. Associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e o tamanho dos pólipos

Encontrou-se maior número de pólipos múltiplos em portadores de adenomas em comparação aos portadores de pólipos hiperplásicos.

Figura 22. Número de pólipos e aspecto histológico

Não houve associação entre o hMLH1 e a presença de múltiplos pólipos.

Figura 23. Número de pólipos versus hMLH1

Não houve associação entre o hMSH2 e a presença de múltiplos pólipos neste estudo.

Figura 24. Número de pólipos versus hMSH2

A imunoposição positiva da Cox-2 se relacionou em 88,8% dos casos de pólipos múltiplos, sendo estatisticamente significativo.

Figura 25. Número de pólipos versus Cox-2

Figura 26. Imunoexpressão positiva para Cox-2 em adenoma

Figura 27. Imunoexpressão positiva para Cox-2 em um adenocarcinoma

Figura 28. Imunoexpressão negativa para Cox-2 em um adenocarcinoma

Figura 29. Imunoexpressão positiva do hMLH1 em um pólipó

Figura 30. Imunoexpressão positiva para hMSH2 em um pólipó

Figura 31. Imunoexpressão fracamente positiva para hMSH2 em um adenocarcinoma

5.1 Complicações

Nesta série de casos de polipectomias por via endoscópica, teve-se como complicação uma perfuração no ceco e um caso de síndrome pós-polipectomia. O paciente com perfuração foi encaminhado a tratamento cirúrgico e o com síndrome pós-polipectomia foi realizado tratamento conservador. A *hot biopsy* foi o acessório utilizado em ambos os procedimentos. Não houve casos de hemorragia maciça e tampouco mortalidade com os procedimentos.

6. DISCUSSÃO

Nesta investigação de 167 pólipos ressecados de 138 pacientes, encontraram-se adenomas no ceco em 7,5%, no ascendente em 14,2%, no transverso em 6,7%, no descendente em 8,2%, no sigmóide e reto em 63,5%. A distribuição por idade foi de 9,6% abaixo de 40 anos, 13,2% entre 41 e 50 anos, 26,9% entre 51 e 60 anos e 50,3% nos pacientes acima de 61 anos.

Em relação ao tamanho dos pólipos, 69,5% tinham diâmetro inferior a 10 mm, 29,1% tinham diâmetro entre 10 e 20 mm e 1,4% tinham um diâmetro superior a 20 mm.

Tsai et al. (1995) encontraram 50,3% dos pólipos no retossigmóide, 27,1% no descendente, 11,9% no transverso, 10,7% no ceco e ascendente. Yamaji et al. (2006) estudaram 1255 adenomas e verificaram que 7,2% localizavam-se no ceco, 21,1% no ascendente, 25,4% no transverso, 12,5% no descendente e 33,5% no sigmóide e reto. A distribuição por idade foi de 3,8% abaixo dos 40 anos, 41% entre 40 e 49 anos, 40,5% entre 50 e 59 anos e 14,7% acima dos 60 anos, sendo que destes apenas 2% eram de pacientes com mais de 70 anos. Somente 3,5% dos pólipos tinham diâmetro maior que 10 mm.

Pólipos com diâmetro até 8 mm, em especial quando são sésseis, normalmente são removidos com pinça tipo *hot biopsy*, que permite a remoção com o

auxílio de corrente elétrica monopolar de alta frequência. Pólipos maiores que 8 mm são removidos com alça de polipectomia, em especial quando são pediculados (Mann et al., 1999). A *hot biopsy* deve ser usada com cuidado no ceco, utilizando-se baixa amplitude de potência e curta duração de corrente, pois a parede é delgada e vulnerável à necrose com conseqüente perfuração (Weston et al., 1995).

Na série de casos do presente estudo, observou-se a ocorrência de uma perfuração no ceco, pós-polipectomia com *hot biopsy* e um caso de síndrome pós-polipectomia. A ocorrência de hemorragia que necessitasse hospitalização ou transfusão, não foi observada neste estudo.

O índice de complicações nas colonoscopias terapêuticas é de 1,4% (Jentschura et al., 1994; Nelson et al., 2002). A complicação mais freqüente, pós-polipectomia, é o sangramento seguido da perfuração e da síndrome pós-polipectomia. Na síndrome pós-polipectomia o paciente desenvolve dor abdominal, febre, leucocitose e irritação peritoneal localizada. Este quadro pode ocorrer em até 1% dos casos e é de tratamento clínico (Waye et al., 1993; Waye et al., 1996).

No sexo masculino houve perda da imunoexpressão do hMLH1 em 25,6% dos adenomas, perda da expressão do hMSH2 em 11% e a Cox-2 se expressou positivamente em 15,3%.

No sexo feminino houve perda da imunoexpressão do hMLH1 em 25,4%, perda da expressão do hMSH2 em 13,6% e a Cox-2 se expressou positivamente em 11,6% dos adenomas.

Sato et al. (2003a) demonstraram que a expressão da Cox-2 em adenomas esporádicos está significativamente associada ao grau de displasia. Nos adenomas com displasia moderada e de alto grau a imunoexpressão da Cox-2 foi de 53% e 57%, respectivamente. Sato et al. (2003a) concluíram que o aumento da expressão da Cox-2 pode estar relacionado com o crescimento e transformação dos adenomas na progressão para câncer colorretal. Neste estudo, encontrou-se imunoexpressão da Cox-2 em 8,1% dos adenomas de baixo grau de displasia e 9,1% nos de alto grau. A displasia de baixo grau ocorreu em 59,6% dos adenomas e a displasia de alto grau ocorreu em 40,4%.

Além disso, os adenomas com expressão de Cox-2, são alvos potenciais para o uso de antiinflamatórios inibidores da Cox-2. (Sato et al., 2003b). Adegboyega et al. (2004) observaram a expressão da Cox-2 em 94% dos adenomas e 62% dos adenocarcinomas. Maekawa et al. (1998) demonstraram que a expressão de Cox-2 foi elevada em adenomas e câncer colorretal, mas não em pólipos hiperplásicos.

Oh et al. (2005) observaram perda da expressão do hMSH2 somente em adenomas. Nos pólipos hiperplásicos não houve perda da expressão do hMSH2.

Nesta série de casos não se verificou perda das expressões do hMLH1 e do hMSH2 nas amostras de mucosa normal. A imunoexpressão da Cox-2 foi negativa na mucosa normal. Não houve perda das expressões do hMLH1 e do hMSH2 nos pólipos hiperplásicos e a imunoexpressão da Cox-2 também foi negativa. Tatsu et al. (2005) verificaram que o tamanho do pólipo não teve correlação com a

imunoexpressão da Cox-2, sem levar em conta a histologia. Kim et al. (2004) verificaram que a expressão da Cox-2 foi maior nos adenomas com 10 mm ou mais de diâmetro (75% vs. 41,5%) e a expressão no cólon distal foi de 64,3% vs. 37,9% no cólon proximal. Esta relação com o tamanho, sugere que a expressão da Cox-2 não se manifeste em fase precoce (Kim et al., 2004).

Nesta série estudada, relacionou-se a associação das imunoexpressões hMLH1, hMSH2 e Cox-2 e o tamanho dos pólipos e verificou-se que houve perda da imunoexpressão do hMLH1 em 31% adenomas menores que 10 mm e 28,6% nos adenomas com diâmetro entre 10 mm e 20 mm. Nos adenomas maiores que 20 mm não houve perda da imunoexpressão do hMLH1. Em relação ao hMSH2, houve perda da expressão em 17,2% dos adenomas menores que 10 mm, 8,3% de perda nos adenomas com diâmetro entre 10 mm e 20 mm e 42,8% dos adenomas com mais de 20 mm. A imunoexpressão da Cox-2 se expressou positivamente em 10,3%, 8,6% e 14,3% nos adenomas com diâmetro até 10 mm, entre 10 mm e 20 mm e nos adenomas com mais de 20 mm, respectivamente.

Chapple et al. (2000), no estudo imunohistoquímico, encontraram a expressão da Cox-2 em 77% dos adenomas colorretais esporádicos. Em contraste, no epitélio displásico encontraram apenas 29% de expressão.

Este estudo demonstrou que, em relação à displasia de baixo grau, os adenomas mostraram perda das expressões do hMLH1 em 34,8% e perda da expressão do hMSH2 em 18% dos casos. A Cox-2 se mostrou alterada em 8,1% nos adenomas de baixo grau.

Na displasia de alto grau houve perda da expressão do hMLH1 em 30,2% e perda da expressão do hMSH2 em 17,1% dos casos. A Cox-2 se mostrou alterada em 9,1% dos adenomas de alto grau de displasia. Em relação à localização, os adenomas distalmente à flexura esplênica têm maior expressão da Cox-2 do que os proximais (Chapple et al., 2000). Os dados deste estudo corroboram os achados anteriores da literatura, referentes à localização dos adenomas e as alterações das expressões da Cox-2. Encontraram-se alterações da expressão em 5,7% dos adenomas no cólon direito; 13% no cólon esquerdo e 12,1% no retossigmoíde.

Embora a expressão da Cox-2 seja baixa na mucosa colônica normal, ela se encontra drasticamente aumentada no câncer colorretal. Além disso, a expressão do Cox-2 está aumentada em adenomas colorretais, em especial, nos de maior tamanho (Sato et al., 2003b).

Neste estudo a Cox-2 foi negativa na mucosa normal e a imunoexpressão para Cox-2 se mostrou positiva em 40% dos adenocarcinomas colorretais. Em relação a todos os adenomas, a Cox-2 se expressou positivamente em 9%. Sinicrope et al. (1999) detectaram Cox-2 em 66,6% dos casos de adenomas em HNPCC.

Nesta pesquisa a média de idade dos pacientes foi de 60,2 anos, variando de 21 a 90 anos com desvio padrão de 13,8. A histologia dos adenomas mostrou 81,4% de tubulares, 0,9% de vilosos, 15,9% de túbulo-vilosos e 1,8% de serrilhados. Souques et al. (2006) encontraram 66,7% de adenomas tubulares e 33,3% de adenomas vilosos e túbulo-vilosos.

Encontrou-se perda da expressão do hMLH1 em 6%, 40%, 19,5% e 60% nas faixas etárias abaixo de 40 anos, entre 41 e 50 anos, entre 51 e 60 anos e acima de 60 anos, respectivamente.

Em relação à perda da expressão do hMSH2, encontrou-se 14,3%, 9%, 10% e 13,9% nas faixas etárias abaixo dos 40 anos, entre 41 e 50 anos, entre 51 e 60 anos e acima de 60 anos, respectivamente.

Entretanto, a Cox-2 se mostrou alterada na percentagem de 14,3%, 9%, 17% e 13% nas faixas etárias abaixo de 40 anos, entre 41 e 50 anos, entre 51 e 60 anos e acima de 60 anos, respectivamente.

A perda da expressão do hMLH1 no cólon direito foi de 27%; no cólon esquerdo foi de 27,4% e no retossigmóide foi de 18,4%.

A perda da expressão do hMSH2 no cólon direito foi de 11,4%; no cólon esquerdo foi de 14,3% e no retossigmóide 10,8%.

Em relação à Cox-2, encontramos alterações em 5,7% dos adenomas no cólon direito; 13% no cólon esquerdo e 12,1% no retossigmóide.

Nos adenomas tubulares houve perda das expressões do hMLH1 em 37,1% e em 14,5% houve perda da expressão do hMSH2. A Cox-2 se mostrou alterada em 7% dos adenomas tubulares.

Não houve perda das expressões dos genes hMLH1 e hMSH2 nos adenomas vilosos no único caso desta casuística, porém a Cox-2 se mostrou alterada.

Nos adenomas túbulo-vilosos houve perda das expressões do hMLH1 em 17,6% e perda de 28,6% da expressão do hMSH2. A alteração da Cox-2 nos adenomas túbulo-vilosos foi de 12,5%.

Os adenomas serrilhados não apresentaram alterações de hMLH1, hMSH2 e Cox-2.

Em relação a todos os tipos de adenomas, a perda das expressões do hMLH1 e do hMSH2 foi de 20% e 15,5%, respectivamente. A Cox-2 se expressou positivamente em 9% dos adenomas, em geral.

Encontrou-se maior número de pólipos múltiplos em portadores de adenomas (44 de 113) $p=0,012$ em relação aos portadores de pólipos hiperplásicos. A Cox-2 se expressou positivamente em 88,8% dos casos de pólipos múltiplos com $p=0,001$. Por outro lado, não houve associação entre as imunoexpressões de hMLH1 e hMSH2 e pólipos múltiplos.

Nos adenocarcinomas houve perda das expressões do hMLH1 e do hMSH2 em 20% e 10%, respectivamente. Park et al. (2005), em seu estudo de 402 casos de câncer colorretal sem HNPCC ou Polipose Familiar, encontraram 8,7% de perda da expressão do hMLH1 e 4,7% de perda da expressão do hMSH2. Hammed et al. (2006) em seu estudo de 104 indivíduos com câncer colorretal diagnosticados (com no máximo 45 anos), perceberam que 60% tinham a expressão normal de hMLH1 e hMSH2, encontrando perda da expressão do hMLH1 em 27% e perda da expressão do hMSH2 em 13%.

A imunoexpressão para Cox-2 se mostrou positiva em 40% dos adenocarcinomas colorretais. Sinicrope et al. (1999) detectaram Cox-2 em 92% dos casos de HNPCC e em 67% dos casos de câncer colorretal esporádico.

Dos 23 casos de adenocarcinomas colorretais que foram estudados, 12 eram do sexo feminino (52,1%) e 11 eram do sexo masculino (47,8%). A idade variou de 35 a 88 anos com média de idade de 63,7 anos.

As distribuições das lesões ocorreram no cólon direito: 9 casos (39,1%) e no cólon esquerdo: 14 casos (60,8%). Houve 4 casos (17,3%) no ceco, 3 casos (13%) no ascendente, 2 casos (8,7%) no transversal, 01 caso (4,3%) no descendente, 6 casos (26%) no sigmóide e 7 casos (30,4%) no reto.

Em relação à idade ocorreram 2 casos (8,7%) com menos de 40 anos, 2 casos (8,7%) com menos de 50 anos, 3 casos (13%) entre 51 e 60 anos, 9 casos (39,1%) entre 61 e 70 anos e 7 casos (30,4%) acima de 71 anos.

A realização deste estudo numa população sem história familiar de câncer colorretal talvez explique a baixa incidência dos marcadores estudados de genes de reparo e Cox-2. Deve-se ressaltar, entretanto, a importância desses achados, pois mesmo na população geral, encontraram-se alterações da imunoexpressão desses genes.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A etiologia do câncer colorretal é heterogênea com influências ambientais e envolvimento genético. Aproximadamente, em 80% dos casos de câncer colorretal parece que a doença é esporádica, sem evidência de comprometimento hereditário. Entretanto, permanecem 20% de casos com potencial componente hereditário envolvido. A contribuição genética para o câncer colorretal inclui o aumento do risco em indivíduos com história familiar e famílias com alterações genéticas autossômicas dominantes. A identificação de lesões pré-malignas é um requisito indispensável para o rastreamento e prevenção do câncer colorretal. Sabe-se que muitos cânceres colorretais surgem de adenomas pré-existentes, usualmente como resultado de mutações no gene APC (polipose adenomatosa colônica) caracterizada por instabilidade cromossômica (Powell et al., 1992; Kinzler e Vogelstein, 1996). Entretanto, aproximadamente 10% a 15% dos cânceres colorretais surgem via instabilidade de microssatélite (MSI) e participação de uma variedade genética característica (Aaltonen et al., 1993; Ionov et al., 1993; Thibodeau et al., 1993; Perucho, 1996; Fujiwara et al., 1998; Jass et al., 1998). Mutações no APC são menos comuns nestes tumores e quando ocorrem é após MSI (Huang et al., 1996; Konishi et al., 1996; Perucho, 1996; Olschwang et al., 1997; Samowitz e Slattery, 1997). A lesão precursora em cânceres com MSI não tem sido facilmente identificada. Nos indivíduos com defeitos hereditários herdados (MMR) como HNPCC, os adenomas apresentam perda das proteínas do

MMR, sugerindo que sejam lesões precursoras do câncer colorretal (Aaltonen et al., 1994; Jacoby et al., 1995; Jass, 1995; Konishi et al., 1996). Por outro lado, MSI no câncer colorretal é mais comum que resulte de promoção da metilação silenciosa do gene humano hMLH1 (*human mut-L homologue*) (Kane et al., 1997; Cunningham et al., 1998; Herman et al., 1998). Este é um importante grupo de cânceres colorretais que surgem no cólon direito, proximalmente à flexura esplênica. Há um crescente reconhecimento de que os pólipos hiperplásicos colorretais podem ser lesões neoplásicas, por conter alterações genéticas também encontradas no câncer colorretal, incluindo mutações no *K-ras* e MSI (Jen et al., 1994; Lothe et al., 1995; Konishi et al., 1996; Otori et al., 1997). Também tem sido reconhecido que algumas lesões hiperplásicas típicas podem apresentar displasia, fenômeno referido como variante de adenoma serrilhado ou misto de adenoma serrilhado com hiperplásico (Longacre et al., 1990). Mais recentemente, os pólipos hiperplásicos do cólon direito têm sido referidos como potenciais precursores de câncer colorretal esporádico (Jass et al., 2000b; Jass, 2001). No estudo de Hawkins e Ward (2001) analisaram-se os adenomas tubulares, vilosos, túbulo-vilosos e adenoma de crescimento lateral. Na análise dos pólipos serrilhados, os quais apresentam um padrão histológico misto de adenoma e hiperplásico, verificaram-se perdas das expressões do hMLH1 e hMSH2. Nesse estudo, procurou-se evidenciar a hipótese de que muitos cânceres colorretais esporádicos, com MSI, surgem de lesões pré-existentes como pólipos (Hawkins e Ward, 2001).

Os resultados desta investigação não comprovam esta teoria, desde que todos os pólipos hiperplásicos estudados não apresentaram alteração de imunoexpressão de marcadores.

Ciclooxigenase e seu derivado prostaglandina E2 têm sido apresentados como estimuladores do crescimento de células tumorais e promoverem a angiogênese. No estudo de Shao et al. (2005) foi sugerido outro mecanismo onde a PGE2 pode exercer ação pró-oncogênica através da estimulação das células beta-catenina/T, fator mediador de transcrição, que desempenham um papel na carcinogênese do câncer colorretal. Em outro estudo, Adegboyega et al. (2004) propuseram que os miofibroblastos subepiteliais são a fonte de aumento da imunoexpressão da Cox-2 nos adenomas de cólon, dando suporte para que a Cox-2 inicie precocemente a fase adenomatosa da carcinogênese colorretal.

Devido à prevalência elevada de pólipos acima dos 40 anos de idade, estes marcadores podem ser úteis na diferenciação daqueles pacientes que deverão ser submetidos à colonoscopia com maior frequência.

Este estudo pretende contribuir com informações iniciais sobre as expressões dos genes hMLH1, hMSH2 e da expressão da Cox-2 em adenomas esporádicos de cólon. A imunohistoquímica pode ser método utilizado nos pólipos adenomatosos de cólon no sentido da prevenção e tratamento de afecções a eles associadas. Com os dados da imunohistoquímica pode-se, talvez, modificar o acompanhamento dos pacientes selecionados, promovendo prevenção com exames

colonoscópicos rotineiros. Por outro lado, a expressão da Cox-2 alterada pela imunohistoquímica poderia permitir a intervenção quimioterápica preventiva e terapêutica nestes casos selecionados.

8. CONCLUSÕES

Dentro das condições de realização da presente investigação, pode-se concluir que:

1. As alterações de imunoexpressões de hMLH1 e Cox-2 em adenomas e adenocarcinomas de cólon, em pacientes sem história familiar, são eventos relativamente freqüentes, porém a imunoexpressão do hMSH2 não foi significativa;
2. Não houve alterações de imunoexpressão dos marcadores estudados nos pólipos hiperplásicos, sugerindo a benignidade destas lesões;
3. A imunoexpressão da Cox-2 foi mais freqüente nos adenomas múltiplos e adenocarcinomas colorretais.

9. REFERÊNCIAS

Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993;260:812–16.

Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res*. 1994;54:1645–48.

Adegboyega PA, Ololade O, Saada J, Mifflin R, Di Mari JF, Powell DW. Subepithelial Myofibroblasts Express Cyclooxygenase-2 in Colorectal Tubular Adenomas. *Clinical Cancer Research*. 2004; v.10, 5870-79.

Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, Thibodeau SN, Shuber AP. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology*. 2000;119:1219-27.

Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res*. 1997;57:3920–23.

Arao J, Sano Y, Fujii T, Kato S, Fu KI, Yoshino T, et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in serrated adenoma of the colorectum. *Dis Colon Rectum*. 2001;44: 1319-23.

Bamba H, Ota S, Kato A, Adachi A, Itoyama S, Matsuzaki F. High expression of cyclooxygenase-2 in macrophages of human colonic adenoma. *Int J Cancer*. 1999;83:470-75.

Baron JA, Sandler RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med*. 2000;5:511-23. ‘

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltezer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzini GN, Sriravastava SA. 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;58:5248-57.

Bond JH. Colon polyps and cancer. *Endoscopy*. 2003;35(1):27-35.

Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1998;95:681-86.

Chapple KS, Cartwright EJ, Hawcrot G, Tisbury A, Bonifer C, Scott N, et al. Localization of cyclooxygenase-2 in human sporadic colorectal adenomas. *Am J Pathol*. 2000;156:545-53.

Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, et al. Genetic disruption of Ptg-1, as well as Ptg-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res*. 2000;60:4705-08.

Chung CC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2000;119:854-65.

Citarda F, Tomaselli G, Capocaccia R, Barcherini S, Crespi M; Italian Multicentre Study Group. Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut*. 2001;48(6):812-5.

Crawford JM. The Gastrointestinal Tract. In Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Pathologic Basis of Disease*. WB Saunders Company. 1999;p.802-38.

Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res*. 1998;58:3455-60.

Davenport A, Hale RJ, Hunt CR, Bigley G, McMahon RF. Expression of Ki-67 and cytokeratin 20 in hyperplastic polyps of the colorectum. *J Clin Pathol*. 2003;56(3):200-204.

De Jong AE, Morreau H, Van Puijenbroek M, Eilers PH, Wijnen J, Nagengast FM, Griffioen G, Cats A, Menko FH, Kleibeuker JH, Vasen HF. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology*. 2004;126(1):42-8.

Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair expression. *Cancer Res.* 1997; 57:4749-56.

Donoso A, Villarroel L, Pinedo G. Increase in colon cancer mortality rates in Chile, during the period 1990-2003. *Rev méd Chile.* 2006;v.134, n.2, p.152-58.

DuBois RN, Awad J, Morrow J, Roberts LJ 2nd, Bishop PR. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester. *J Clin Invest.* 1994;93:493–98.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, Dubois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology.* 1994;107:1183-88.

Elder DJ, Baker JA, Banu NA, Moorghen M, Paraskeva C. Human colorectal adenomas demonstrate a size-dependent increase in epithelial cyclooxygenase-2 expression. *J Pathol.* 2002;198(4):428-34.

Fahy B, Bold RJ. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* 1998;7:115-23.

Fearon ER, Gruber SB. Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. In Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA. *The Molecular Basis of Cancer*. WB Saunders Company. 2001;p.289-312.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759-67.

Fialkow PJ. Clonal origin of human tumors. *Annu Rev Med*. 1979;30:135-43.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989;v.57,1083-93.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):1027-38. Erratum in: *Cell*. 1994; Apr 8, 77(1):167.

Fitzgibbons RJ Jr, Lynch HT, Stanislav GV, Watson PA, Lanspa SJ, Marcus JN, et al. Recognition and treatment of patients with hereditary nonpolyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). *Ann Surg*. 1987;206:289-95.

Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, et al. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol*. 1998;153:1063-78.

Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hyland LM, Celano P, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. 1993;328(18):1313–16.

Gibbons L, Mao Y, Ellison L. Trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Health Rep*. 2001;12: 41-55.

Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med*. 1995;333:609–14.

Gologan A, Sepulveda AR. Microsatellite Instability and DNA Mismatch Repair Deficiency Testing in Hereditary and Sporadic Gastrointestinal Cancers. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2005;v.25, n.1.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics. *Cancer J Clin*. 2001;51:15-36.

Grizzle WE, Shibata D, Manne U, Myers RB, Frost AR, Sriravastava S, Hendon DE, Gazdar A. *Molecular Pathology of Early Cancer*. Washington DC, IOS Press, 135-170;1999.

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991;66:589-600.

Hammeed F, Goldberg PA, Hall P, Algar U, Van Wijk R, Ramesar R. Immunohistochemistry detects mismatch repair gene defects in colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2006;8(5):411-17.

Hao X, Bishop AE, Wallace M, Wang H, Willcocks TC, Maclouf J, et al. Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. *J Pathol.* 1999; 187:295-301.

Hawkins NJ, Gorman P, Tomlinson IP, Bullpitt P, Ward RL. Colorectal carcinomas arising in the hyperplastic polyposis syndrome progress through the chromosomal instability pathway. *Am J Pathol.* 2000;157:385–92.

Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93: p.1307-13.

Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci. U S A* – 1998;95(12):6870-75.

Hill MJ, Morson BCC, Bussey HJ. A etiology of adenoma-carcinoma sequence in large-bowel. *Lancet.* 1978;1:245-47.

Hollstein MC, Sidranski D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*.1991;v.253, 49-53.

Honchel R, Halling KC, Schaid DJ, Pittelkow M, Thibodeau SN. Microsatellite instability in Muir-Torre syndrome. *Cancer Res*. 1994;54:1159-63.

Hsu SM, Hsu PL, Nayak RN. Warthin's tumor: an immunohistochemical study of its lymphoid stroma. *Hum Pathol*. 1981;12(3):251-57.

Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1981;29(11):1349-53.

Huang J, Papadopoulos N, Mckinley AJ, Farrington SM, Curtis LJ, Wyllie AH, et al. APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci. U S A* - 1996; 93:9049–54.

Hull MA, Booth JK, Tisbury A, Scott N, Bonifer C, Markham AF, et al. Cyclooxygenase-2 is up-regulated and localized to macrophages in the intestine of Min mice. *Br J Câncer*. 1999;79:1399–405.

Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde. Câncer no Brasil: dados dos registros de câncer de base populacional, volume 3. Rio de Janeiro, Brasil: INCA;2003.[citado em 25 out. 2005]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>.

Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil - 2006. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/epidemiologia>.

Iino H, Jass JR, Simms LA, Young J, Leggett B, Ajioka Y, Watanabe H. DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? *J Clin Pathol*. 1999;52:5-9.

Iino H, Simms L, Young J, Arnold J, Winship IM, Webb SI, et al. DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gut*. 2000;47:37-42.

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993;363:558-61.

Jacoby RF, Cole CE, Tutsch K, Newton MA, Kelloff G, Hawk ET. Chemopreventive efficiency of combined piroxicam and difluoromethylornithine treatment of APC mutant Min mouse adenomas and selective toxicity against APC mutant embryos. *Cancer Res*. 2000a;60:1864-70.

Jacoby RF, Marshall DJ, Kailas S, Schlack S, Harms B, Love R. Genetic instability associated with adenoma to carcinoma progression in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology*. 1995;109:73-82.

Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, Kelloff G, Lubet RA. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 2000b;60:5040-44.

Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen LA, Peltomaki P, De La Chapelle A. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2000;118:829-34.

Jass JR. Colorectal adenomas in surgical specimens from subjects with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Histopathology.* 1995;27: 263–67.

Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut.* 1998;42:673–79.

Jass JR, Iino H, Ruszkiewicz A, Painter D, Solomon MJ, Koorey DJ, et al. Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut.* 2000a;47:43-49.

Jass JR. Serrated route to colorectal cancer: back street or super highway? *J Pathol.* 2001;193:283–85.

Jass JR, Young J, Leggett BA. Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancers of the colorectum. *Histopathology.* 2000b;37:295–301.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004;54: 8-29.

Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res.*1994;54: 5523–26.

Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem.* 1993;268:9049–54.

Jentschura D, Raute M, Winter J, Henkel T, Kraus M, Manegold BC. Complications in endoscopy of the lower gastrointestinal tract: therapy and prognosis. *Surg Endosc.* 1994;8: 672-76.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997;57:808–11.

Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res.*1995;55:2556–59.

Karnes Jr WE, Shattuck-Brandt R, Burgart LJ, DuBois RN, Tester DJ, Cunningham JM, Kim CY, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN. Reduced Cox-2 protein in colorectal cancer with defective mismatch repair. *Cancer Res.*1998;58:5473–77.

Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res.*1998;58:409–12.

Keller JJ, Offerhaus GJ, Drilenburg P, Caspers E, Musler A, Ristimaki A, Giardiello FM. Molecular analysis of sulindac-resistant adenomas in familial adenomatous polyposis. *Clin Cancer Res.*2001;7:4000-07.

Kelloff GJ, Schilsky RL, Alberts DS, Day RW, Guyton KZ, Pearce HL, Peck JC, Phillips R, Sigman CC. A Prototype for the Use of Surrogate End Points in the Development of Cancer Prevention Drugs. *Clin Cancer Res.* 2004;10(11):3908-18.

Khan KN, Masferrer JL, Woerner BM, Soslow R, Koki AT. Enhanced cyclooxygenase-2 expression in sporadic and familial adenomatous polyposis of the human colon. *Scand J Gastroenterol.* 2001;36:865-69.

Kim SH, Lee JH, Kang KH, Park JH, Cho CM, Kweon YO, et al. Cyclooxygenase-2 expression according to size and location of gastric and colorectal tubular adenomas. *Korean J Gastroenterol.* 2004;44(4):206-11.[Abstract, MEDLINE 2004].

Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science.* 1991;25:1366-70.

Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 1997;386:761- 63.

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87:159-70.

Klein G. The approaching era of the tumor suppressor genes. *Science*. 1987;238(4833):1539-45.

Kohoutova M, Stekrova J, Sulova M, Zidkova K, Kleibl Z, Vandrovcova J, et al. Hereditary forms of colorectal adenomatous polyposis. *Cas Lek Cesk*. 2006;145(6):475-9.[Abstract, MEDLINE 2006].

Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, et al. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology*. 1996;111:307–17.

Labayle D, Fischer D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, et al. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. 1991;10:635–39.

Lage P, Cravo M, Sousa R, Chaves P, Salazar M, Fonseca R, et al. Management of Portuguese patients with hyperplastic polyposis and screening of at-risk first-degree relatives: a contribution for future guidelines based on a clinical study. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(9):1779-84.

Lal G, Gallinger S. Familial adenomatous polyposis. *Sem Surg Oncol*. 2000;18:314-23.

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. 1993;75: 1215-35.

Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from Major Cancers in The European Union, including Acceding Countries. *Cancer*. 2004;101:2843-50.

Levin TR, Farraye FA, Schoen RE, Hoff G, Atkin W, Bond JH, Winawer S, et al. Quality in the technical performance of screening flexible sigmoidoscopy: recommendations of an international multi-society task group. *Gut*. 2005;54(6):807-13.

Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, Ahnen DJ, Garewal H, Chejfec G. Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. *N Engl J Med*. 2000;20;343(3):162-8.

Lin OS, Gerson LB, Soon MS, Schembre DB, Kozarek RA. Risk of Proximal Colon Neoplasia with Distal Hyperplastic Polyps. *Arch Intern Med*. 2005;165:382-90.

Lindblom A, Tannergard P, Werelius B, Nordenskjold M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature Genet*. 1993;5:279–82.

Lindgren G, Liljegren A, Jaramillo E, Rubio C, Lindblom A. Adenoma prevalence and cancer risk in familial nonpolyposis colorectal cancer. *Gut*. 2002;50:228-34.

Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med.* 1996;2: 169–74.

Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 1990;14:524–37.

Lothe RA, Andersen SN, Hofstad B, Meling GI, Peltomaki P, Heim S, et al. Deletion of 1p loci and microsatellite instability in colorectal polyps. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995;14:182–88.

Lynch Ht, De La Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(10):919-32.

Lynch HT, Lemon SJ, Karr B, Franklin B, Lynch JF, Watson P, Tinley S, Lerman C, Carter C. Etiology, natural history, management and molecular genetics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes): genetic counseling implications. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1997;6:987-91.

Lynch HT, Lynch JF. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Seminars in Surgical Oncology.* 2000;18:305-13.

Lynch HT, Smyrk TJ, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterol.* 1993;104:1535–49.

Lynch PM, Wargovich MJ, Lynch HT, Palmer C, Lanspa S, Drouhard T, Lynch J. A follow-up study of colonic epithelial proliferation as a biomarker in a Native American family with hereditary nonpolyposis colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* (Bethesda) 1991;83:951-54.

Maekawa M, Sugano K, Sano H, Miyazaki S, Ushiana M, Fujita S, Gotoda T, Uokota T, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol.* 1998;28(7):421-26.

Mann NS, Mann SK, Alam I. The safety of hot biopsy forceps in the removal of small colonic polyps. *Digestion.* 1999;60:74-76.

Marnett LJ. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res.* 1992;52:5575-89.

Marnett LJ, Dubois RN. Cox-2: a target for colon cancer prevention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:55-80.

Marra G, Boland R. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:1114-25.

Mitchell SC. The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps. *Medical Clinics of North America.* 2005; 89 (1).

National Cancer Institute. Colorectal cancer: prevention. Available from: <http://www.nci.nih.gov/1975-2003>.

Nelson DB, McQuaid KR, Bond JH, Lieberman DH, Weiss DG, Lohnston TK. Procedural success and complications of large-scale screening colonoscopy. *Gastrointest Endosc.* 2002;55:307-14.

Nystrom-Lahti M, Sistonen P, Mecklin JP, Pylkkanen L, Aaltonen LA, Jarvinen H, et al. Close linkage to chromosome 3p and conservation of ancestral founding haplotype in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *Proc Natl Acad Sci. U S A* – 1994;91:6054–58.

Oh K, Redston M, Odze RD. Support for hMLH1 and MGMT silencing as a mechanism of tumorigenesis in the hyperplastic–adenoma-carcinoma (serrated) carcinogenic pathway in the colon. *Human Pathology.* v.36, Issue 1, 2005, 101-11.

Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, De Rycke Y, Li YJ, et al. Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci. U S A* - 1997;94:12122–27.

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc^{Δ716} knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Cell.* 1996;87:803–09.

Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, et al. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res.* 2001;61:1733-40.

Otori K, Oda Y, Sugiyama K, Hasebe T, Mukai K, Fujii T, et al. High frequency of K-ras mutations in human colorectal hyperplastic polyps. *Gut.* 1997;40:660–63.

Park IJ, Kim HC, Kim JS, Yu ES, Yu CS, Kim JC. Correlation between hMLH1/hMSH2 and p53 protein expression in sporadic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 2005;52(62):450-54.

Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001; 2:533-43.

Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science.* 1993; 260:810–12.

Perucho M. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med.* 1996;2:630–31.

Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology.* 2000;47(31):57-70.

Ponder B. Cancer. Gene losses in human tumours. *Nature.* 1988; 335(6189):400-02.

Ponz De LM. Descriptive epidemiology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Tumori*. 1996;82:102–06.

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992;359:235–37.

Ransohoff DF, Sandler RS. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2002;346:40–44.

Rashid A, Houlihan PS, Booker S, Petersen GM, Giardiello FM, Hamilton SR. Phenotypic and molecular characteristics of hyperplastic polyposis. *Gastroenterology*. 2000;119:323–32.

Reddy BS, Rao CV, Seibert K. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 1996;56:4566–69.

Ribeiro Jr. U. *Contribuição da imunohistoquímica na avaliação da resposta e do prognóstico do câncer de reto distal tratado com radioterapia e quimioterapia neoadjuvante* [tese de livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2002.

Ribeiro Jr. U, Finkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV, Landreneau RJ, Clarke MR, Bakker A, Swalsky PA, Gooding WE, Posner MC. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer*. 1998;83(1):7–18.

Ribeiro Jr. U, Safatle-Ribeiro AV, Posner MC, Rosendale B, Bakker A, Swalsky PA, Kim R, Reynolds JC, Finkelstein SD. Comparative p53 mutational analysis of multiple primary cancers of the upper aerodigestive tract. *Surgery*. 1996;120(1):45-53.

Ricciardiello L, Goel A, Mantovani V, Fiorini T, Fossi S, Chang DK, et al. Frequent loss of hMLH1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. *Cancer Res*. 2003;63:787-92.

Rijcken FE, Hollema H, Kleibeuker JH. Proximal adenomas in hereditary nonpolyposis colorectal cancer are prone to rapid malignant transformation. *Gut*. 2002;50:382-86.

Ringstad G, Holmquist H, Brabrand K, Aalokken TM, Hauge T. CT colonography: a new method for detecting colorectal cancer and polyps. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2006;126(11):1470-73.[Abstract, MEDLINE 2006].

Saad-Hossne R, Prado RG, Bakonyi Neto A, Lopes OS, Nascimento SM, Santos CRV, Pracucho EM, Chaves FRP, Ioriatti ES, Siqueira JM. Estudo retrospectivo de pacientes portadores de câncer colorretal atendidos na Faculdade de Medicina de Botucatu no período de 2000-2003. *Rev Bras Coloproct*. 2005;25(1):31-37.

Safatle-Ribeiro AV. *Mucosa do coto gástrico análise histológica, imunohistoquímica e gênica* [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr. U, Reynolds JC, Gama-Rodrigues JJ, Iriya K, Kim R, Bakker A, Swalsky PA, Pinotti HW, Finkelstein SD. Morphologic, histologic, and molecular similarities between adenocarcinomas arising in the gastric stump and the intact stomach. *Cancer*. 1996;78(11):2288-99.

Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr. U, Sakai P, Iriya K, Ishioka S, Gama- Rodrigues JJ. Gastric stump mucosa: is there a risk for carcinoma? *Arq Gastroenterol*. 2001;38(4):227-31.

Samowitz WS, Bert RW, Leppert M. Gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med*. 1995;332:1518-20.

Samowitz WS, Slattery ML. Microsatellite instability in colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 1997;112:1515-19.

Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1995;55:3785–89.

Sato T, Yoshinaga K, Okabe S, Okawa T, Higuchi T, Enomoto M, Takizawa T, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 Expression and its Relationship with Proliferation of Colorectal Adenomas. *Jpn J Clin Oncol*. 2003a;33(12) 631–35.

Sato T, Yoshinaga K, Okabe S, Okawa T, Higushi T, Masayuki E. et al. Cyclooxygenase-2 Expression in Colorectal Adenomas. *Dis Colon Rectum*. 2003b;46:786-92.

Servomaa K, Kiuru A, Kosma VM, Hirvikoski P, Rytomaa T. *p53* and *K-ras* gene mutations in carcinoma of the rectum among Finnish women. *Mol Pathol*. 2000;53:24-30.

Shao J, Jung C, Liu C, Sheng H. Prostaglandin E₂ stimulates the β -Catenin/T cell factor-dependent transcription in colon cancer. *J Biol Chem*. 2005;v.280, Issue 28, 26565-72.

Shattuck-Brandt RL, Varilek GW, Radhika A, Yang F, Washington MK, DuBois RN. Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10(–/–) mice. *Gastroenterology*. 2000;118:337-45.

Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, Macsweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA*. 1999; 282:1254–57.

Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Marrow J, et al. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase 2. *J Clin Invest*. 1997;99:2254-59.

Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 1991;39(6):741-48.

Shiff SJ, Rigas B. The role of cyclooxygenase inhibition in the antineoplastic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Exp Med.* 1999;190:445-50.

Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of *ras* oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science.* 1992;256:102-05.

Sinicrope FA, Lemoine M, Xi L, Lynch PM, Cleary KR, Shen Y, Frazier ML. Reduced expression of cyclooxygenase 2 proteins in hereditary nonpolyposis colorectal cancers relative to sporadic cancers. *Gastroenterology.* 1999;117: 350-58.

Souques M, Lassalle M, Guldner L, Asselain B, Barres D, Pavis C, DuBois G, Martin E, Fléjou JF. Colorectal polyps and cancers diagnosed by pathologists in Ile de France Region - Crisapif-Petri Study. *Gastroenterol Clin Biol.* 2006;30:587-93.

Srivastava S, Verma M, Henson DE. Biomarkers for Early Detection of Colon Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2001;7: 1118-26.

Stanbridge EJ. Identifying tumor suppressor genes in human colorectal cancer. *Science.* (Wash. DC), 1990;247:12-13.

Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, et al The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. 2000;342:1946-52.

Su LK, Steinbach G, Sawyer JC, Hindi M, Ward PA, Lynch PM. Genomic rearrangements of the APC tumor-suppressor gene in familial adenomatous polyposis. *Hum Genet*. 2000;106:101-17.

Syngal S, Fox EA, Eng C, Kolodner RD, Garber JE. Sensitivity and specificity of clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer associated mutations in *MSH2* and *MLH1*. *J Med Genet*. 2000a;37(9):641-5.

Syngal S, Schrag D, Falchuk M, Tung N, Farraye FA, Chung D, Wright M, Whetsell A, Miller G, Garber JE. Phenotypic characteristics associated with the *APC* gene I1307K mutation in Ashkenazi Jewish patients with colorectal polyps. *JAMA*. 2000b;16:857-860.

Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H, Niitsu Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med*. 1998;339:1277-84.

Tatsu K, Hayashi S, Shimada I, Matsui K. Cyclooxygenase-2 in sporadic colorectal polyps: immunohistochemical study and its importance in the early stages of colorectal tumorigenesis. *Pathol Res Pract*. 2005;201(6):427-33.

Tetsuji T, Motoh O, Tsuyoshi H. Koji M, Atsushi N, Takaharu N, et al. Analysis of K-ras, APC, and β -Catenin in Aberrant Crypt Foci in Sporadic Adenoma, Cancer and Familial Adenomatous Polyposis. *Gastroenterology*. 2001;121: 599-611.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993;260:816–19.

Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med*. 1991;325:1593–96.

Tsai CJ, Lu DK. Small Colorectal Polyps: Histopathology and Clinical Significance. *Am J Gastroenterol*. 1995; 90(6):988-94.

Turini ME, DuBois RN. Primary prevention: phytoprevention and chemoprevention of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2002;16:811-40.

Vasen HF, Den Hartog Jager FC, Menko FH, Nagengast FM. Screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: A study of 22 kindreds in the Netherlands. *Am J Med*. 1989 86(3):278-81.

Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1998;95:8698-702.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Mnakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development *N Engl J Med*. 1988;v.319, 525-32.

Yamaji Y, Mitsushima T, Ikuma H, Watabe H, Okamoto M, Yoshida H, Kawabe T, Wada R, Omata M. Right-side shift of colorectal adenomas with aging. *Gastrointest Endosc*. 2006;63(3): 453-58.

Walsh JM, Terdiman JP. Colorectal cancer screening: scientific review. *JAMA*. 2003;289:1288-96.

Waye JD. Management of complications of colonoscopic polypectomy. *Gastroenterology*. 1993;1:158-64.

Waye JD, Kahn O, Auerbach ME. Complications of colonoscopy and flexible sigmoidoscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 1996;6: 343-77.

Weston AP, Campbell DR. Diminutive colonic polyps: histopathology, spatial distribution, concomitant significant lesions, and treatment complications. *Am J Gastroenterol*. 1995;90:24-28.

Willett WC. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2001;10(1):3-8.

Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1996; 270:G393-G400.

Williams CS, Luongo C, Radhika A, Zhang T, Lamps LW, Nanney LB, et al. Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. *Gastroenterology*. 1996;111:1134-40.

Williams GT. Metaplastic (hyperplastic) polyps of the large bowel: benign neoplasms after all? *Gut*. 1997;40:691-92.

Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology*. 1997;112:594-642.

Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'Brien MJ, Levin B, et al. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin*. 2006;56(3):143-59; quiz 184-5.

Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *N Engl J Med*. 1993;329:1977-81.

Zhang X, Morham SG, Langenbach R, Young DA. Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo- fibroblasts. *J Exp Med.* 1999;190:451-59.