UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Análise de Instabilidade de Microssatélites em pacientes com
Câncer Colo-Retal (CCR) : correlação do fenótipo RER (+)
com os aspectos clínicos e histopatológicos**

Claudia Muraro de Carvalho

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Dr. Bernardo Garicochea

São Paulo
2002

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C331a Carvalho, Claudia Muraro de
Análise de instabilidade de microssatélites em pacientes com
câncer colo-retal (CCR) : correlação do fenótipo RER (+) com os
aspectos clínicos e histopatológicos / Claudia Muraro de Carvalho. --
São Paulo, 2002.
115p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Garicochea, Bernardo

1. Câncer : Medicina 2. Biologia molecular 3. Genética
I. T. II. Garicochea, Bernardo, orientador.

616.994 CDD

Claudia Muraro de Carvalho

**Análise de Instabilidade de Microssatélites em pacientes com
Câncer Colo-Retal (CCR) : correlação do fenótipo RER (+)
com os aspectos clínicos e histopatológicos**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Dr. Bernardo Garicochea
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais,

Wanderley Gonçalves de Carvalho e Vera Lúcia Muraro de Carvalho,

pela dedicação, compreensão e apoio em todos os momentos

da minha vida, cujo exemplo foram as bases da minha formação.

Ao meu irmão,

Ricardo Muraro de Carvalho, pelo

apoio, incentivo e colaboração.

Ao meu noivo, **Alexandre Vignoli**,
pelo constante apoio, incentivo e
compreensão nos melhores e piores
momentos da minha vida.

Ao ***Dr. Bernardo Garicochea***, pela
orientação e oportunidade para o
desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu diretor, Prof. Tit. Seizi Oga.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de concluir mais uma etapa da minha carreira.

Ao Dr. Luiz Heraldo da Câmara-Lopes e à Dra. Kátia Ramos Moreira Leite, patologistas admiráveis do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do Hospital Sírio Libanês, que sempre me incentivaram e me ajudaram na revisão das amostras e na interpretação dos exames moleculares.

Ao Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do Hospital Sírio Líbanês, pelo fornecimento dos materiais e amostras de pacientes envolvidas neste trabalho.

Ao Prof Associado Mário Hiroyuki Hirata e à Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata, pelo apoio e incentivo constante durante a realização deste trabalho e que me acolheram carinhosamente ao Departamento de Bioquímica Clínica e Biologia Molecular da Universidade de São Paulo e me ensinaram os primeiros passos no mundo da Biologia Molecular.

A Sra. Elaine Darini, pelo companheirismo e ajuda na execução e interpretação dos exames moleculares.

Ao Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, professor e pesquisador admirável, que me muito me ajudou com suas idéias e atenção para com este trabalho.

Ao Dr. Israel Bendit, que me recebeu carinhosamente no Laboratório de Biologia Tumoral do Hospital das Clínicas de São Paulo e permitiu que eu fizesse uso de seu laboratório para realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Vinícius Vieira Vignoli, pela ajuda constante neste trabalho, nas correções e sugestões.

Aos amigos Luis Antonio Salazar Navarrete, Cora Pereira Hors e Adriana Natsue Ozaki pelo constante apoio e incentivo para realização deste trabalho.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do Hospital Sírio Libânes, pela competência e fraternidade.

À bibliotecária Rita Ortega, pela revisão bibliográfica.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

PÁGINA

LISTA DAS FIGURAS

LISTA DAS TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Desenvolvimento do CCR	1
1.1.1. Aspectos patológicos e histológicos do CCR	3
1.1.2. Aspectos moleculares do CCR	3
1.1.2.1. Alterações de oncogenes em CCR	6
1.1.2.2. Alterações em genes supressores de tumor	6
1.1.2.3. Alterações nos genes de reparo do DNA	9
1.1.2.4. Instabilidade de microssatélites (MSI)	16
1.2. Câncer colo-retal hereditário não relacionado a polipose-HNPCC	17
1.2.1. Histórico	17
1.2.2. Critérios clínicos para classificação do HNPCC	18
1.2.3. Características Clinicopatológicas	21
1.2.4. Aspectos moleculares do HNPCC	22
1.3. Diagnóstico com auxílio de técnicas moleculares	23
2. OBJETIVOS	28
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
3.1. Casuística	29
3.1.1. Caracterização das amostras com Critérios de Bethesda	30
3.1.2. Caracterização das amostras sem Critérios de Bethesda	30
3.2. Métodos	33

3.3. Análise molecular	34
3.3.1. Extração de DNA de material parafinado	34
3.3.2. Técnica de microdissecção	36
3.3.3. Quantificação do DNA genômico	36
3.3.4. Amplificação das regiões microssatélites pela reação em cadeia de polimerase (PCR)	37
3.3.4.1. Otimização da técnica de PCR	39
3.3.5. Caracterização dos produtos de amplificação	40
3.3.5.1. Otimização da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	40
3.3.5.2. Coloração por nitrato de prata	43
3.3.6. Análise dos <i>loci</i> com microssatélites	44
3.3.7. Análise estatística	45
 4. RESULTADOS	 46
4.1. Otimização da extração do DNA de material parafinado	46
4.2. Otimização do PCR para as regiões microssatélites	46
4.3. Avaliação dos produtos de amplificação em gel de poliacrilamida	49
4.4. Análise dos <i>loci</i> contendo microssatélites	54
4.5. Associação entre a presença dos critérios de Bethesda e o fenótipo de erro de replicação (RER)	64
4.6. Associação entre o sexo e os casos agrupados de acordo com a idade e os critérios anatomopatológicos	67
4.7. Caracterização da amostra quanto ao tipo histológico do tumor e multicentricidade	68
4.8. Associação entre a localização da neoplasia, estadiamento deDUKES e os critérios anatomopatológicos	69
4.9. Associação entre a histologia, estadiamento de DUKES e critérios anatomopatológicos	71
4.10. Associação entre o Estadiamento de DUKES e critérios anatomopatológicos	72
4.11. Associação entre a multicentricidade e o padrão mucinoso	72

5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
8. ANEXOS	109

LISTA DE FIGURAS	PÁGINA
1. Representação esquemática do modelo molecular para a progressão de tumores de cólon	5
2. Esquema simplificado da ação do sistema de reparo mutHLS em <i>E. coli</i> .	12
3. Distribuição dos pacientes quanto à idade	31
4. Distribuição dos casos de CCR quanto ao grau histológico	32
5. Distribuição dos casos de CCR quanto ao estadiamento do tumor	32
6. Análise dos microssatélites BAT 26 e BAT 40 em gel de poliacrilamida com diferentes concentrações de MgCl ₂	47
7. Análise dos microssatélites BAT 26 e BAT 40 em gel de poliacrilamida com diferentes concentrações de DMSO e formamida	48
8. Análise dos produtos de PCR de regiões microssatélites em gel de poliacrilamida com diferentes concentrações de uréia	50
9. Análise dos produtos de PCR de regiões microssatélites com géis de poliacrilamida pelo sistema de eletroforese GenePhor	51
10. Géis de poliacrilamida com diferentes concentrações de uréia	52
11. Géis de poliacrilamida desnaturantes realizados no sistema V16-2	53
12. Instabilidade de microssatélites nos loci D2S123, D5S346, BAT25 e BAT26	55
13. Análise da perda de heterozigose (LOH) nos loci D17S250 e D5S346	56
14. Frequência da instabilidade de cada um dos microssatélites analisados entre os pacientes MSI-H e MSI-L no grupo total de pacientes	58
15. Distribuição dos grupos RER (+) e RER (-) de acordo com o número de critérios estudados, considerando o total de casos	64

LISTA DE TABELAS	PÁGINA
1. Homologia dos genes de reparo do DNA em bactérias, leveduras e humanos	13
2. Principais complexos protéicos envolvidos no sistema de reparo do DNA	14
3. Critérios para o diagnóstico clínico de HNPCC	20
4. Genes de reparo do DNA associados a HNPCC	23
5. Sequência dos oligonucleotídeos e características dos microsatélites analisados	38
6. Condições para as reações de PCR	40
7. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos marcadores microsatélites em relação ao fenótipo de erro de replicação (RER)	59
8. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos marcadores microsatélites associados dois a dois em relação ao RER	61
9. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos critérios em relação ao RER	62
10. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos critérios associados dois a dois em relação ao RER	63
11. Razões de chance em intervalos de confiança de 95% para fenótipo RER positivo de acordo com os critérios de Bethesda, sexo e estadiamento de DUKES	65
12. Associação entre sexo, idade e os critérios anatomopatológicos dos pacientes com CCR.	67
13. Associação entre a idade, estadiamento de DUKES e os critérios anatomopatológicos	68
14. Associação entre a localização da neoplasia, estadiamento de DUKES e os critérios anatomopatológicos	70
15. Associação entre histologia, estadiamento de DUKES e critérios anatomopatológicos	71

16. Associação entre o estadiamento de DUKES e os critérios anatomopatológicos	72
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Gene da polipose adenomatosa familiar

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CCR – Câncer Colo-Retal

CCRH - Câncer Colo-Retal Hereditário

CHRPE – Câncer Hereditário

DCC – gene deletado em Câncer Colo-Retal (deleted in colon cancer)

DGGE – Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (Denature Gradient Gel Electrophoresis)

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxiribonucleico

dNTPs – deoxinucleotídeos trifosfato

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

FAP – Polipose Adenomatosa Familiar (Familial Adenomatous Poliposys)

Gtp – guanosina tri-fosfato

GDP – guanosina di-fosfato

HNPCC – Câncer colo-retal hereditário não relacionado a polipose (Hereditary Non-Poliposys Colon Câncer)

ICG-HNPCC – Grupo Colaborativo Internacional para o estudo do HNPCC (International Collaborative Group)

LOH – perda de heterozigose (Loss of Heterozigosity)

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MLH1 – gene de reparo do DNA (“mutL homolog 1”)

MSH2 – gene de reparo do DNA (“mutS homolog 2”)

MMR - Sistema de reparo do pareamento incorreto (Mismatch Repair System)

MSI – Instabilidade de microssatélites (Microsatellite instability)

MSI-H –Instabilidade de microssatélites de alto grau (Microsatellite Instability High)

MSI-L –Instabilidade de microssatélites de baixo grau (Microsatellite Instability Low)

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida (Polyacrilamide Gel Electrophoresis)

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)

PSA – Persulfato de amônia

RER – Fenótipo de erro de replicação do DNA

Ssb – Proteína de ligação a fita simples

SSCP – Polimorfismo conformacional da simples fita (Single Strand Conformation Polymorphism)

TA – Temperatura Ambiente

TBE – Tampão Tris/ Borato/ EDTA

TEMED – N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina

TE – Tampão Tris – HCl /EDTA

Tris – HCl – Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto

Tween 20 – Mono laurato de polioxietileno sorbitan (Polyoxyethylene sorbitan mono-laurate)

RESUMO

A síndrome do câncer de colo-retal hereditário não relacionado a polipose (HNPCC) foi caracterizada na década de 60 e por volta dos anos 90 os critérios de Amsterdam para o diagnóstico clínico de HNPCC foram estabelecidos, envolvendo história familiar em duas gerações sucessivas, com três indivíduos apresentando acometimento do cólon e/ou reto e um dos indivíduos diagnosticados abaixo dos 45 anos. A instabilidade de microssatélites (MSI) começou a ser descrita em 1993 em pacientes portadores do HNPCC, mas é comum em outras neoplasias esporádicas. Em 1996 os critérios de Bethesda, que envolvem o acometimento preferencial do cólon proximal, histologia indiferenciada ou mucosecretora, presença de tumores síncrônicos e metacrônicos ou associação a tumores extracólicos, além da história familiar, foram propostos pelo Grupo Internacional Colaborativo para o estudo do HNPCC (ICG-HNPCC), com o intuito de rastrear maior número de pacientes suspeitos de serem portadores da síndrome.

A MSI é caracterizada pela perda ou ganho de unidades repetitivas em regiões do DNA contendo mono, di, tri ou tetranucleotídeos dispostos seguidamente no genoma.

No presente estudo, nosso objetivo foi analisar a frequência de instabilidade de microssatélites (MSI) pela análise de 7 regiões microssatélites (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250, BAT40, TP53), correlacionando os dados obtidos com algumas características clinicopatológicas dos pacientes.

O DNA de 106 pares de amostras de tecido normal e tumor provenientes de portadores de carcinoma colo-retal (CCR), foi estudado mediante a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR), seguida pela análise em gel de poliacrilamida desnaturante. Os pacientes foram divididos em dois grupos, um com 75 pacientes com pelo menos um dos critérios de Bethesda (tumor no cólon proximal, histologia pouco diferenciada, padrão indiferenciado ou mucinoso, idade igual ou inferior a 45

anos, sincronicidade ou metacronicidade dos tumores) e 31 pacientes sem nenhum desses critérios. Dos 106 casos, 14,1% (15/106) apresentaram MSI em 30% ou mais dos marcadores analisados, sendo classificados com instabilidade de microssatélite de alto grau (MSI-H), 17,9% (19/106) dos casos foram classificados com instabilidade de microssatélite de baixo grau (MSI-L) e 67,9% (72/106) com estabilidade de microssatélites (MSS). Se considerarmos apenas a análise do grupo com pelo menos um dos critérios de Bethesda considerados, observamos que 18,6% (14/75) dos casos apresentaram MSI-H, 18,6% (14/75) foram MSI-L e 62,6% (47/75) MSS. No grupo sem nenhum dos critérios de Bethesda analisados, 3,2% (1/31) apresentaram MSI-H, enquanto 16,1% (5/31) e 80,6% (25/31) foram MSI-L e MSS respectivamente.

Quando consideramos os marcadores propostos pelo Grupo Colaborativo Internacional para o estudo do HNPCC – ICG-HNPCC (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250) observamos que no grupo sem critérios de Bethesda passamos a ter apenas casos classificados como MSI-L e MSS. No grupo com pelo menos um dos critérios passamos a ter 21,3% (16/75) dos casos classificados com MSI-H e 14,7% (11/75) de casos MSI-L. Os marcadores mais sensíveis para a análise de MSI-H foram BAT25 e BAT26, enquanto os marcadores D17S250 e TP53 foram os mais frequentes no casos MSI-L.

Ao considerarmos os casos com pelo menos um dos critérios de Bethesda e apenas o painel proposto pelo ICG-HNPCC, o marcador BAT25 identificou os casos MSI-H com 100% de sensibilidade e 96,6% de especificidade, enquanto o BAT26 apresentou 93,7% e 98,9% de sensibilidade e especificidade respectivamente.

A avaliação dos critérios de Bethesda considerados neste estudo mostrou que a localização proximal do tumor se correlacionou com os casos MSI-H.

ABSTRACT

The Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer Syndrome (HNPCC) was characterized in the 60's, and the Amsterdam criteria for the clinical HNPCC diagnosis were established in the 90's involving the family history of two successive generations with three individuals having their colon and/or rectum affected, one of them having been diagnosed when under 45 years of age. The microsatellite instability (MSI) was first described in 1993 in bearers of HNPCC, but it is common in other sporadic tumors. In 1996, the Bethesda criteria, which include the preferential involvement of the proximal colon, undifferentiated or mucosecretory histology, presence of synchronous and metachronic tumors or association to extracolonic tumors, besides family history, were proposed by the International Collaborative Group for the study of HNPCC (ICG-HNPCC) with the purpose of tracking a higher number of bearers of that syndrome.

The MSI is characterized by the loss or gain of repetitive units in DNA regions containing mono-, di-, tri- or tetranucleotides sequentially arranged in the genome.

The aim of this paper was to evaluate the frequency MSI by analyzing 7 microsatellite regions (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250, BAT40, TP53), and correlating the data so obtained with clinicopathologic characteristics of the patients.

The DNA of 106 pairs of samples taken from normal tissues and colorectal carcinomas (CRC) was studied through the polymerase chain reaction (PCR) followed by analysis in denaturing polyacrylamide gel. The patients were separated into two groups, one consisting of 75 patients with at least one of the Bethesda criteria (tumor in the proximal colon, poorly differentiated histology, undifferentiated or mucinous pattern, age equal to or below 45 years, tumor synchronicity or metachronicity) and 31 patients without any of such criteria. From the 106 cases, 14.1% (15/106) exhibited MSI in 30% or more of the markers, then classified as having high microsatellite instability (MSI-H); 17.9% (19/106) were classified as low microsatellite instability (MSI-L) and 67.9% (72/106) as having microsatellite

stability (MSS). If we consider only the analysis of the group with at least one of the Bethesda criteria, we observe that 18.6% (14/75) of the cases showed MSI-H, 18.6% were MSI-L and 62.6% (47/75) were MSS. In the group without any of the Bethesda criteria, 3.2% (1/31) showed MSI-H, while 16.1% (5/31) and 80.6% (25/31) were respectively MSI-L and MSS.

When we consider the markers proposed by the International Collaborative Group for the study of HNPCC – ICG-HNPCC (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250), we observe, in the group without Bethesda criteria, only cases which were classified as MSI-L and MSS. In the group with at least one of the Bethesda criteria we find 21.3% (16/75) of the cases classified as MSI-H and 14.7% (11/75) as MSI-L. The most sensitive markers for MSI-H were BAT25 and BAT26, whereas the markers D17S250 and TP53 were the most frequent in MSI-L cases.

When the cases with at least one of the Bethesda criteria, were evaluated only with the panel proposed by ICG-HNPCC, the BAT25 marker identified MSI-H cases with 100% sensitivity and 96.6% specificity, while the BAT26 exhibited respectively 93.7% and 98.9%.

The evaluation of the Bethesda criteria considered in this paper showed that the proximal location of the tumor correlated significantly with the cases of MSI-H.

1 – INTRODUÇÃO

As bases moleculares do desenvolvimento do câncer têm sido cada vez mais estudadas, permitindo um maior conhecimento dos processos de crescimento e diferenciação celulares associados ao processo carcinogênico. Estes estudos levaram à identificação do câncer como uma doença genética, na qual as alterações atingindo o material genético, são as responsáveis pelo desenvolvimento da neoplasia (BISHOP, 1987). Estas alterações também podem ser identificadas no câncer de cólon e reto (CCR) sendo induzidas somaticamente por agentes ambientais ou herdadas através das células germinativas (CAWKWELL & QUIRKE, 1996).

Neste contexto, os CCRs podem ser classificados de acordo com o padrão de herança em: **(1)** câncer esporádico, que tem representado mais de 90% dos casos de CCR, caracterizado pelo aparecimento esporádico, sem evidências de padrões ou síndromes de herança familiar; **(2)** câncer colorretal hereditário (CCRH), neste grupo podemos subdividir em CCRH sem polipose, também denominado de CCR não relacionado a polipose, HNPCC (do inglês, Hereditary Non Polyposis Colon Cancer) ou síndrome de Lynch, responsável por cerca de 3 a 5% dos casos e constituindo o câncer mais comum de predisposição hereditária; e CCRH com polipose, câncer que ocorre na polipose adenomatosa familiar (do inglês, FAP – familial adenomatous polyposis), síndrome de predisposição hereditária bem definida que consta de cerca de 0,5% dos casos de cânceres colo-retais (POWELL, 1995, FEARON, 2001) e **(3)** CCR com agregação familiar, grupo que envolve portadores de CCR que possuem outros membros da família afetados mas que não cumprem os critérios para FAP ou HNPCC. Indivíduos com história familiar de CCR em um parente de primeiro grau, mas que não apresentam características clínicas ou uma história consistente com uma síndrome de CCR com alta penetrância como a FAP e o HNPCC, tem aproximadamente duas vezes mais chances de desenvolver um CCR durante sua vida do que a população geral (FEARON, 2001).

Winawer *et al.* (1991), estipularam uma chance de 6,0% de ocorrer CCR na população geral durante a vida (WINAWER *et al.*, 1999). Apesar do CCR constituir um exemplo de neoplasia onde a taxa de mortalidade poderia ser afetada por meio de estratégias de detecção e tratamento precoces (JARVINEN *et al.*, 1995), aproximadamente 160.000 casos novos surgem a cada ano e 60.000 pessoas ainda morrem com o câncer de cólon e suas complicações nos EUA (WILLENT, *et al.*, 1990).

No mundo, o CCR é, em geral, a terceira neoplasia mais letal em homens, e a quarta em mulheres, apresentando mortalidade estimada em 437.000 indivíduos com CCR, com número similar de mortes entre homens e mulheres (PISANI, 1999). Estudos realizados em diferentes países mostram uma incidência variável para o CCR. Nos EUA, é a terceira neoplasia mais comum, a mais freqüente do trato gastrointestinal (WU, *et al.*, 2000). Na Inglaterra e país de Gales, é a segunda neoplasia mais comum, com mais de 24.000 novos casos e 17.000 mortes anualmente (SALETTI, *et al.*, 2001). No Brasil, similarmente ao resto do mundo, está entre as cinco primeiras causas de mortalidade por câncer depois do carcinoma de pele não melanoma (basocelular e epidermóide), próstata, estômago e pulmão, respectivamente, em homens e, mama, pele não melanoma, e colo do útero, entre as mulheres. O número de casos novos esperados para 2001 é de 16.165, e o número de óbitos esperados, de 7.230. O Estado de São Paulo é responsável pela maioria dos casos relatados, seguido pelo Estado do Rio de Janeiro (BRASIL, 2002).

A sobrevida de pacientes portadores de CCR foi pouco afetada nas últimas décadas, mas essa condição começou a modificar-se com avanços terapêuticos. A identificação cada vez mais precisa dos mecanismos biológicos que participam na gênese e progressão desta doença, podem refletir em avanços significativos na prevenção e controle da mesma. Mesmo que a detecção precoce de CCR não se correlacione em uma etapa inicial com a redução da incidência, em grupos selecionados de indivíduos estes esforços podem levar no futuro a diminuição da mortalidade (JARVINEN *et al.*, 1995; WU *et al.*, 2000).

1.1 - DESENVOLVIMENTO DO CCR

1.1.1 – Aspectos patológicos e histológicos do CCR

O modelo histológico clássico de tumorigênese considera a transição de células normais para células neoplásicas e carcinoma invasivo, passando por um estágio intermediário de diferentes graus de displasia celular. Nas fases iniciais a lesão tende a formar grupamentos celulares reconhecidos como lesões adenomatosas e progredir para tumor invasivo com rompimento da membrana basal. O tumor invasivo progride eventualmente para disseminação sangüínea ou linfática produzindo metástases (ALBERTS *et al.*, 1997).

O epitélio normal do cólon sofre renovação completa a cada 6 dias pela proliferação e diferenciação das células das criptas. A maquinaria de mitose, migração, diferenciação e maturação das células ocorre de forma organizada, até a morte celular (CARETHERS, 1996). As primeiras lesões neoplásicas identificáveis são crescimentos que se projetam a partir do epitélio do cólon designados como pólipos (FEARON, 2001). Os pólipos neoplásicos são denominados adenomas ou lesões adenomatosas (CARETHERS, 1996), e são considerados um estágio fenotípico precursor das lesões neoplásicas invasivas (FEARON & GRUBER, 2001).

Os pólipos adenomatosos surgem do epitélio glandular, onde a seqüência normal de desenvolvimento mostra-se alterada. Há aumento da atividade mitótica e perda da diferenciação celular, de forma que o compartimento proliferativo pode envolver toda a cripta; essas criptas displásicas podem ser encontradas como sendo a primeira manifestação histológica do desenvolvimento da lesão (CARETHERS, 1996, ILYAS *et al.*, 1999). O grau de displasia e o tamanho do adenoma podem aumentar e eventualmente ocorrer progressão para o CCR (CAWKWELL *et al.*, 1996).

1.1.2. Aspectos Moleculares do CCR

O CCR tem representado um dos modelos mais usados para a compreensão molecular da carcinogênese. (RÜSCHOFF *et al.*, 1995). Uma das dificuldades em estudá-lo é a diversidade de fenótipos encontrados. Na

medida em que CCR é uma doença genética, uma das estratégias mais promissoras na sua investigação é a identificação dos vários genes envolvidos no processo de progressão tumoral, visando o desenvolvimento de métodos para prevenção, diagnóstico clínico e terapia desta doença.

A progressão morfológica do epitélio normal a câncer invasivo pode levar de cinco a vinte anos e ser influenciado por fatores hereditários ou somáticos, sendo os fatores hereditários proveniente de células germinativas, presentes em todas as células do indivíduo com uma única cópia funcional do gene; ou somente através de mudanças genéticas somáticas, onde é necessário que ocorram mutações em ambos alelos para que a progressão à câncer invasivo seja favorecida, e estas alterações não são transmitidas de uma geração à outra, sem, portanto, correlação com hereditariedade (LIOTTA & LIU, 1999).

Assim, a formação do CCR pode ser considerada um processo de múltiplos passos envolvendo sucessivas alterações genéticas nas células epiteliais da mucosa cólica, como a ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor (BISHOP, 1987; WEINBERG, 1989; FEARON & VOGELSTEIN, 1990). Além desses, outra classe de genes que apresenta envolvimento neste processo são os genes de reparo do DNA, que, quando mutados, contribuem para o aumento das alterações em vários genes (ILYAS *et al.*, 1999). O processo de aquisição sequencial de algumas das mutações pode ser observado na **figura 1**.

Noventa por cento dos CCR apresentam duas ou mais mutações, e perdas alélicas em outros genes, como por exemplo, TP53 e DCC, ocorrem em 25 a 70% deles (FEARON & VOGELSTEIN, 1990).

Figura 1. Representação esquemática do modelo molecular para a progressão de tumores de cólon. Proposto por VOGELSTEIN; adaptado de WEINBERG & HANAHAN, 1996.

1.1.2.1. Alterações de Oncogenes em CCR

Proto-oncogenes são genes que estão envolvidos no controle da proliferação e diferenciação das células normais (MILLER, *et al.*, 1990). Podem ser classificados em fatores de crescimento, receptores de fator de crescimento, proteínas quinase, proteínas de transdução de sinal e fatores de transcrição.

No CCR, os principais proto-oncogenes envolvidos são: *ras* (K-*ras*, N-*ras*, H-*ras*), *myc*, *myb*, ciclina D1, c-*erbB*-2 e β -catenina (FEARON & VOGELSTEIN, 1990, FEARON & GRUBER, 2001). Estes, ao serem ativados em decorrência das mutações, parecem apresentar efeito dominante, tornando-se hiperativos como estimuladores da proliferação celular. Passam, então, a serem chamados de oncogenes (THOMPSON & THOMPSON, 1993).

Alterações somáticas em outros proto-oncogenes, incluindo amplificações do *myc*, do *myb*, da ciclina D1, do c-*erbB*-2 e da β -catenina tem sido encontradas em cerca de 5% dos casos de CCR (FEARON & GRUBER, 2001).

O proto-oncogene *ras* desempenha importante função em muitos cânceres humanos. São divididos em três tipos celulares: K-*ras*, H-*ras* e N-*ras*. Os genes *ras* codificam proteínas com função importante na transdução de sinal. Mutações promovem ativação inapropriada da transdução de sinal e conseqüentemente podem contribuir para a transformação neoplásica. O oncogene *ras* codifica uma proteína monomérica de 21 KD com homologia às proteínas G. Como estas proteínas, a proteína *ras* pode se ligar a GTP e catalisar sua hidrólise a GDP. *ras* é ativado quando se liga ao GTP; a hidrólise a GDP leva a sua inativação. Em células com *ras* mutado há maior proporção de GTP-*ras* do que GDP-*ras*, havendo constante sinalização, podendo assim contribuir para a progressão neoplásica (KINZLER & VOGELSTEIN, 1998). Mutações nos genes *ras* podem ser identificadas em cerca de 50% dos CCR. As mutações nos códons 12 e 13 são as mais freqüentes, 70% delas estão presentes no códon 12 e 20% no códon 13. Uma pequena fração de mutações também ocorrem no códon 61 (FEARON,

1996; FEARON & GRUBER, 2001). As mutações em N-ras são infrequentes e não há evidências com respeito ao oncogene H-ras em CCR (FEARON, 2001).

Alterações somáticas em outros proto-oncogenes podem ser verificadas mas com uma frequência menor. Amplificações dos oncogenes *myc*, *myb*, ciclina D1, ciclina E e c-erbB-2 tem sido encontradas em pequena percentagem (< 5%). Mutações com ganho de função no gene da β -catenina tem sido encontrada em 2 - 8% dos casos de CCR (FEARON, 2001; FEARON & GRUBER, 2001).

1.1.2.2. Alterações em Genes supressores de tumor

Genes supressores de tumor são responsáveis pela inibição da proliferação celular e desenvolvimento à neoplasia maligna, contribuindo para a transformação das células normais a neoplásicas apenas quando a função de ambos os alelos são perdidas (BISHOP & WEINBERG, 1996). Esses genes podem ser inativados por mutações pontuais e deleções. Muitas deleções incluem perdas parciais de braços de cromossomos ou de cromossomos inteiros. Através da comparação dos alelos retirados de tecido tumoral e de tecido normal, foi possível a identificação dessas deleções como perda de heterozigose, importante evento que parece ser uma característica dos genes supressores de tumores humanos, principalmente em tumores sólidos (KINZLER & VOGELSTEIN, 1998).

Os genes supressores de tumor que aparecem mais comumente alterados no desenvolvimento do CCR são o gene *APC* no cromossomo 5q, *DCC* no cromossomo 18q e *TP53* no cromossomo 17p.

Alterações do gene *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) estão associadas com o desenvolvimento de displasia. Este gene está localizado no cromossomo 5q21 e apresenta uma frequência de mutação de 60 a 80% nos carcinomas esporádicos (ILIAS, 1999). Este gene também está associado à FAP, doença autossômica dominante onde os pacientes estão propensos ao desenvolvimento de centenas a milhares de adenomas coloretais e, conseqüentemente, a carcinomas em idade jovem. (FEARON,

2001). Frequência semelhante de mutação parece estar presente em todos os estágios da neoplasia, sugerindo que um dos eventos iniciais no desenvolvimento de CCR é a perda de função desse gene (KINZLER & VOGELSTEIN, 1998). Mais de 95% das mutações conhecidas levam a síntese de proteína truncada não funcional (FEARON, 2001).

Perdas alélicas no gene *TP53* também ocorrem na evolução dos adenomas para carcinomas e mais provavelmente acontecem antes das metástases (ILIAS *et al.*, 1999). O gene foi mapeado no cromossomo 17p e parece a região mais afetada por perda de heterozigose em CCR. Perdas alélicas são observadas em 70 a 75% dos CCR, mas são infreqüentes em qualquer estágio do adenoma (FEARON & VOGELSTEIN, 1990). O gene codifica uma proteína nuclear com função de fator de transcrição (FEARON, 2001) e está envolvida na regulação do ciclo celular, síntese e reparo do DNA, diferenciação celular e apoptose. Quando o DNA é danificado, a proteína é ativada, promovendo a transcrição de vários genes que interrompem o ciclo celular em G1, permitindo a ação dos genes de reparo, evitando, assim, que cópias do DNA alteradas sejam perpetuadas para as novas gerações. Quando os danos são grandes e irreparáveis, a proteína ativa genes que induzem a apoptose. Perda da expressão deste gene supressor resulta em perda do controle do ciclo celular (CARETHERS, 1996; MECKLIN & PELTOMAKI, 2000; FEARON & GRUBER, 2001).

Outro gene supressor cuja deleção tem papel no CCR foi mapeado no cromossomo 18q21, conhecido como DCC ou *gene deletado em CCR* (deleted-in-colon-cancer). Há perdas alélicas deste cromossomo em 70% dos carcinomas, e em 50% dos adenomas tardios ou adenomas III (FEARON & VOGELSTEIN, 1990; LEIS & LIVINGSTON, 1996) e codifica uma proteína transmembrana com uma seqüência muito similar às moléculas de adesão das células neurais e outras glicoproteínas de superfície celular (FEARON, 1990, FEARON, 1996). Um estudo da expressão do DCC revelou que em cânceres não metastáticos a sua expressão mantém níveis normais, enquanto em cânceres metastáticos, a proteína foi indetectável (ZETTER, 1993).

Além de mutações pontuais ou perdas alélicas nos genes supressores de tumor, outro mecanismo que pode resultar na inativação desses genes é a metilação do DNA. A metilação do DNA é um fator importante na regulação da expressão gênica e organização da cromatina, apresentando papel relevante na progressão do epitélio normal até carcinoma (GOELZ *et al.*, 1985). A expressão de muitos genes é controlada pela metilação da região promotora e a hipometilação poderia ativar um oncogene enquanto a hipermetilação poderia inativar um gene supressor de tumor (SINGAL & GINDER, 1999). Estudos mostram que, em CCR há diminuição generalizada no nível total de metilação do DNA, quando se comparou células neoplásicas com células de tecidos normais; esta hipometilação também tem sido encontrada em pólipos adenomatosos (FEARON & GRUBER, 2001).

1.1.2.3. Alterações nos genes de reparo do DNA

Os genes que “Cuidam do Genoma” ou “caretaker genes” estão envolvidos no reparo e manutenção da integridade do DNA; ao serem afetados, podem causar falhas no sistema de reparo, propiciando o acúmulo de mutações e aberrações cromossômicas. Essas alterações podem afetar genes importantes no desenvolvimento do câncer (POWELL, 1995).

Mecanismos celulares para reparar e preservar a informação genética foram primeiramente reconhecidos quando cepas bacterianas que propiciavam um aumento na proporção de mutações em seu ambiente foram isoladas. Genes que reparavam danos ou corrigiam o pareamento incorreto no DNA foram reconhecidos como sendo essenciais para a manutenção da integridade do genoma (LOEB, 1989; LOEB, 1991; MODRICH, 1991).

Tanto em organismos procariotos quanto eucariotos, bases não pareadas ou incorretamente pareadas na dupla fita de DNA, podem surgir por vários processos, incluindo erros durante a replicação, recombinação gênica, deaminação da 5-metilcitosina, e ação de agentes mutagênicos. Sistemas biológicos tais como a atividade de correção “proofreading” da enzima DNA polimerase, e reparo do pareamento incorreto estão envolvidos no sistema de reparo (PROLLA, 1998).

O termo “mismatch repair system”, sistema de reparo do pareamento incorreto ou MMR foi inicialmente criado para referir-se à atividade celular capaz de reconhecer pares de bases pareadas incorretamente e corrigir a seqüência em uma das fitas, visando recuperar um pareamento A-T ou C-G normal. Esta atividade foi também associada à correção de seqüências de bases não pareadas que resultam de inserção ou deleção de nucleotídeos em uma das duas fitas de DNA, ocasionando a formação de alças, que surgem como consequência do deslizamento (“slippage”) da DNA polimerase durante a fase de replicação do DNA, e que se não forem corrigidos pela “proofreading”, levam a produção de mutações do tipo “frameshift” (ou mutações com alteração na seqüência de leitura) (MODRICH, 1991; AQUILINA & BIGNAMI, 2001; PELTOMÄKI, 2001).

O reparo dos erros que ocorrem durante a replicação do DNA é uma função celular altamente conservada na escala evolutiva. Em bactérias, o sistema MMR desempenha duas funções no genoma, tanto protegendo contra mutações durante a replicação do DNA, quanto prevenindo a recombinação com regiões não homólogas do DNA (SALETTI *et al.*, 2001).

Os conhecimentos sobre o sistema MMR se devem a muitos estudos em *Escherichia coli*, onde a disponibilidade de cepas bacterianas com deficiência neste sistema tem ajudado na identificação e caracterização bioquímica das proteínas envolvidas neste processo. Em *E.coli* foram descritos vários fatores que podem ser divididos em dois grupos: 1) aquele em que estão envolvidas as proteínas de reparo do pareamento incorreto pós-replicativo, MutS, MutH e MutL, e 2) aquele que apresenta proteínas recrutadas secundariamente no reparo do DNA, MutU (DNA helicase II), Ssb (proteína que liga no DNA de fita simples bacteriana - “Single strand binding protein”, exonucleases 3’- 5’ e 5’- 3’, como RecJ e ExoVII, ExoI e ExoX, uma holoenzima DNA polimerase III e uma DNA ligase (KOLODNER, 1995; FISHEL & KOLODNER, 1995; JIRICNY, 1998).

Essas proteínas atuam reconhecendo e reparando todos os erros de pareamento de bases únicas e pequenas inserções incorretas, não reconhecendo aquelas que tem mais de 4 bases não pareadas

(KOLODNER, 1995). Para garantir a eficiência de reparo no sistema MutHLS (pós-replicativo) de *E.coli*, a bactéria utiliza a metilação do DNA como um mecanismo de sinalização que permite distinguir o DNA molde das fitas recém sintetizadas. Na bactéria, a metilação ocorre na adenina dos sítios GATC pela ação da enzima DNA adenina metilase (Dam), que adiciona grupos metil de forma específica. Depois da replicação, as fitas filhas ficam temporariamente não metiladas, sendo o tempo suficiente para que o sistema de reparo identifique a fita não metilada e repare o erro quando necessário (FISHEL & KOLODNER, 1995; KOLODNER, 1995), garantindo a fidelidade da replicação.

O sistema MutHLS depende da interação seqüencial das várias proteínas. Assim, o primeiro elemento a agir é um homodímero MutS. Este identifica e liga-se ao erro de pareamento, recruta, em seguida, a proteína MutL, também na forma de homodímero. A formação deste complexo leva a ativação de uma endonuclease latente associada a proteína MutH, que é responsável pela incisão inicial na fita recém sintetizada, reconhecida na seqüência GATC não metilada da fita filha. MutL aumenta a translocação de MutS, dependente da hidrólise de ATP, por todo o DNA à procura do próximo sítio GATC não metilado ligado por MutH. A reação de excisão, que depende de MutS, MutL, MutH e da ação cooperativa da DNA helicase II (MutU/UvrD), com uma exonuclease apropriada (ExoI, recJ, ExoVII ou ExoX), remove a porção da fita recém sintetizada incluindo o sítio GATC e o despareamento. Como resultado tem-se uma fenda na fita de DNA, e essa fita exposta é estabilizada e protegida da degradação pela proteína Ssb, sendo ressintetizada pela holoenzima DNA polimerase III. Para encerrar o processo, os espaços restantes são unidos pela DNA ligase (MODRICH, *et al.*, 1991; FISHEL & KOLODNER, 1995; JIRICNY, 1998; PROLLA, 1998; JIRICNY, 2000; JACOB & PRAZ, 2002). O processo pode ser visualizado na **Figura 2**.

Figura 2. Esquema simplificado da ação do sistema de reparo mutHLS em *E. coli*. Adaptado de JACOB & PRAZ, 2002.

Os genes de reparo descritos em leveduras apresentam homologia com os identificados em *E. coli*. *Saccharomyces cerevisiae* emprega homólogos das proteínas MutS e MutL bacteriana, indicando que a maquinaria básica do MMR foi conservada durante a evolução, garantindo assim, a fidelidade de replicação do DNA e a sobrevivência das diversas espécies. Os homólogos aos genes de reparo bacterianos para leveduras e humanos são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Homologia dos genes de reparo do DNA em bactérias, leveduras e humanos.

BACTÉRIA (<i>E. coli</i>)	LEVEDURAS (<i>S.cerevisiae</i>)	HUMANOS (<i>H. sapiens</i>)
	MSH1 (reparo mitocondrial) ¹	-
	MSH2 (reparo nuclear) ^{1,3}	MSH2 ¹
MutS	MSH3 ¹	MSH3 ¹
	MSH4 ⁶	MSH4 ⁶
	MSH5 ⁶	MSH5 ⁶
	MSH6 ¹	GTBP – 160 (MSH6) ^{1, 2}
Mut L	MLH1 ¹ /PMS2	MLH1 ¹
	MLH2 ⁴	PMS1 ⁶
	MLH3 ⁴	MLH3 ⁵
	PMS1 ¹	PMS2 ⁶
	-	PMS3-8 ¹
	-	PMSR1-7 ¹

¹PELTOMÄKI *et al.*, 1993; ²ACHARYA *et al.*, 1996; ³PELTOMÄKI & de la CHAPELLE, 1997; ⁴HARFE *et al.*, 2000; ⁵LIPKIN *et al.*, 2000; ⁶JACOB & PRAZ, 2002.

Assim como em leveduras, as funções de MutS e MutL também apresentam-se conservadas em células humanas. Dois complexos protéicos formados pelos homólogos MutS, hMutS α e hMutS β , executam o

reconhecimento de erros de replicação em células humanas. Ambos contêm hMSH2, que interage com a proteína ligante de G-T ou GTBP (do inglês, G-T binding protein) no complexo hMutS α ou com hMSH3 em hMutS β . Estudos *in vitro* indicaram que hMutS α preferencialmente reconhece pareamento incorreto de bases únicas e alças formadas por 1 base, enquanto alças originadas pela inserção ou deleção de 2 a 8 bases fora da hélice de DNA são reconhecidas pelo complexo hMutS β (AQUILINA & BIGNANI, 2001). Como a nomenclatura para os heterodímeros pode, muitas vezes, causar confusão, a **tabela 2** mostra os principais complexos protéicos envolvidos no reparo do DNA.

Tabela 2 – Principais complexos protéicos envolvidos no sistema de reparo do DNA.

BACTÉRIA (<i>E. coli</i>)	FUNGOS (<i>S.cerevisiae</i>)	HUMANOS (<i>H. sapiens</i>)
MutS	yMSH2/yMSH6 (MutS α)	hMSH2/hMSH6 (hMutS α)
	yMSH2/yMSH3 (MutS β)	hMSH2/hMSH3 (hMutS β)
MutL	yMLH1/yPMS1 (MutL α)	hMLH1/hPMS2 (hMutL α)
	yMLH1/yMLH3 (MutL β)	hMLH1/hMLH3 (hMutL β)

O passo subsequente no processo de reparo é direcionado pela atividade ATPase intrínseca, codificada pela metade carboxi-terminal, altamente conservada em todos os homólogos MutS (FISHEL & KOLODNER, 1995). A ligação ao ATP é requerida para a atividade de MutS bacteriana e eucariótica na correção do pareamento incorreto (BLACKWELL *et al.*, 1998).

Tem sido proposto um novo mecanismo para o reparo do pareamento incorreto em humanos, onde o heterodímero hMutS α liga-se ao ATP e promove mudanças conformacionais que convertem o heterodímero para a formação de um grampo deslizante ou “sliding clamp” no DNA, deixando o mesmo em uma forma ativada. Essa ligação promove a redução na afinidade da proteína pelo local de pareamento incorreto e ativa os sítios de ligação secundários no DNA que são subsequentemente usados para o

deslizamento do complexo protéico ao longo da hélice de DNA (GRADIA, *et al.*, 1997; BLACKWELL, *et al.*, 1998). Na ausência de proteínas para fazer o reparo ou quando há grande quantidade de erros presentes na dupla fita, o complexo ativado pelo ATP sinaliza, recrutando a maquinaria para apoptose (FISHEL, 1999). O complexo hMutL α pode servir como uma proteína que acelera a atividade da ATPase, induzindo a hidrólise do ATP e liberação do heterodímero hMutS α , envolvido novamente no reparo. Depois que o complexo MutS α -ADP reconhece o erro e inicia o deslizamento sobre a fita, o ADP solta-se do heteroduplex (IACCARINO *et al.*, 1998; FISHEL, 1999; JIRICNY & NYSTRÖM-LAHTI, 2000; AQUILINA & BIGNANI, 2001; FISHEL, 2001).

Finalmente, o DNA pareado incorretamente é reparado pela excisão da fita simples de DNA, pela DNA helicase, contendo o erro de pareamento ou a base modificada, e ocorre a síntese de uma fita de DNA complementar através da ação de enzimas como nucleases, polimerases, e ligases, que usam a fita de DNA intacta como molde (RHYU, 1996; TOFT, 1998; JIRICNY & NYSTRÖM-LAHTI, 2000).

Quanto ao sinal de discriminação das fitas, a degradação da fita recém sintetizada e o reparo da mesma, são caminhos bem menos caracterizados em eucariotos quando comparado com *E.coli*. Enquanto *E.coli* usa a metilação de seqüências GATC como sinal para distinguir a fita molde da fita recém sintetizada, parece não haver sinalização equivalente em eucariotos.

Estudos realizados a partir de 1993 demonstraram que pequenas seqüências de DNA repetitivas e altamente polimórficas conhecidas como microsatélites podem apresentar alterações em doenças humanas (AALTONEN *et al.*, 1993, IONOV *et al.*, 1993, THIBODEAU *et al.*, 1993, LOTHE *et al.*, 1993; RISINGER *et al.*, 1993, BRENTNALL *et al.*, 1995, NAKASHIMA *et al.*, 1995). Mesmo em células normais com processos de replicação normais do DNA, as DNAs polimerases causam numerosos erros como mutações causadas por inserções ou deleções devido ao deslizamento e mutações por substituições de base derivadas de

incorporação incorreta. Entretanto, a função de checagem das DNA polimerases e o sistema de reparo do pareamento incorreto removem quase todos os erros provenientes das replicações (MAEHARA, *et al.*, 2001). O mau funcionamento desse sistema, pode resultar em uma forma de instabilidade genômica que acarreta em acúmulo de mutações, particularmente em regiões de microssatélites, que levam a um fenótipo denominado de fenótipo de erro de replicação (RER), ou instabilidade de microssatélites (MSI) (SIMPSON, 1997) .

1.1.2.4. Instabilidade de Microssatélites (MSI)

Os microssatélites, também conhecidos como pequenas repetições em “tandem” ou “short tandem repeats” (STR), encontram-se distribuídos randomicamente por todo o genoma humano, podendo ocorrer aproximadamente a cada 50.000 a 100.000 pares de base. Embora estas seqüências sejam extremamente polimórficas na população, elas são herdadas e conservadas de uma geração para a outra, e podem, assim, ser utilizados como marcadores polimórficos, identificados tanto em tecidos normais quanto tumorais. O tamanho das seqüências varia de um a seis nucleotídeos, que se repetem em fileira por poucas dezenas de vezes (WEBER & MAY, 1989). Os tipos mais comuns de repetição são $(A)_n$, $(T)_n$, $(CA)_n$ e $(GT)_n$, mas podem aparecer também como trinucleotídeos ou como tetranucleotídeos (MARRA & BOLAND, 1996; DEBRAUWERE *et al.* , 1997).

As alterações encontradas nessas regiões, envolvendo deleção ou inserção dessas pequenas unidades repetitivas, caracterizam a instabilidade de microssatélites. Essas seqüências não codificam proteínas e sua exata função permanece desconhecida. Ao que parece elas podem atuar diretamente na regulação do gene ou indiretamente como “hot spots” de instabilidade no processo de recombinação (WHEELER *et al.*, 1999; SALETTI *et al.*, 2001).

Estudos realizados em *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* também revelaram que deficiências no sistema MMR alteram essas seqüências, resultando na instabilidade de microssatélites (LEVINSON,

1987; STRAND, 1993). Estudos realizados a partir de 1993 mostraram que essas regiões também poderiam exibir alterações de tamanho em CCRs. A freqüente associação de tais regiões com formas hereditárias da doença foi a chave para a identificação dos genes alterados na linhagem germinativa de indivíduos com HNPCC (FISHEL *et al.*, 1993; LEACH *et al.*, 1993; PAPADOUPOLOS *et al.*, 1994; BRONNER *et al.*, 1994; NICOLAIDES *et al.*, 1994).

A MSI é uma marca registrada encontrada em alguns CCRs. Oitenta e cinco a 90% dos CCRs hereditários (HNPCC) apresentam MSI, enquanto ocorre apenas em 10 -15 % dos CCRs esporádicos (AALTONEN *et al.*, 1993; IONOV *et al.*, 1993; THIBODEAU *et al.*, 1993) .

1.2. CÂNCER COLO-RETAL HEREDITÁRIO NÃO RELACIONADO A POLIPOSE – HNPCC

1.2.1. Histórico

Em 1895, Aldred Scott Warthin, professor de Patologia da Universidade de Michigan, observou que a incidência de alguns tipos de cânceres em agregados familiares era muito freqüente e que as pessoas afetadas morriam em idade jovem. Estas observações levaram Dr. Warthin a investigar várias famílias e seus achados foram publicados em 1913 (WARTHIN, *et al.*, 1913). Uma das famílias por ele descritas, chamada “família G” incluía dez indivíduos com câncer de útero, sete com câncer gástrico e alguns familiares mais tarde descritos com CCR (WARTHIN, *et al.*, 1930).

Em 1971, o modelo de herança foi demonstrado como sendo autossômico dominante e foi inicialmente denominado como Síndrome do Câncer Familiar (SCF) (LYNCH, *et al.*, 1971; BABA, 1997).

A “família G” tornou-se o protótipo para a SCF mais tarde investigada por Henry Lynch e colegas. Com a continua investigação da família G e outras famílias similares, Lynch e colegas concluíram que estavam estudando duas síndromes. Em 1984, o termo síndrome de Lynch I , CCR

familiar local-específico (CCRFLE), e Lynch II, SCF acometendo vários órgãos como endométrio, estômago, cérebro, ovário, entre outros, foram propostos por Boland e Troncale com base na ausência ou presença de malignidades extracólicas (BOLAND & TRONCALE, 1984).

O uso de várias terminologias e diferentes critérios para diagnosticar esta síndrome levou os pesquisadores a tentativas mais satisfatórias de compreender a síndrome. Em 1991, o Grupo Colaborativo Internacional para pesquisa do câncer colo-retal hereditário não relacionado a polipose (ICG-HNPCC) reuniu-se em Amsterdam e definiu os Critérios de Amsterdam para o diagnóstico clínico do HNPCC (VASEN, HF *et al.*, 1991). O objetivo inicial deste evento foi estabelecer critérios na tentativa de se identificar as famílias suspeitas de serem portadoras da síndrome; mas estes eram critérios rígidos e incompletos. Observando a necessidade de ampliar os critérios de investigação para analisar maior número de famílias, em 1996 o grupo se reuniu em Bethesda e assim foram estabelecidos os critérios de Bethesda, mais abrangentes e flexíveis (RODRIGUEZ-BIGAS, *et al.*, 1997). Os Critérios de Amsterdam e de Bethesda serão apresentados a seguir.

1.2.2. Critérios clínicos para classificação do HNPCC

Em 1991, de acordo com o ICG-HNPCC, foram definidos critérios mínimos, também conhecidos como Critérios de Amsterdam I, para identificar prováveis portadores dos genes e diagnosticar a síndrome de HNPCC. Em 1999 este mesmo grupo revisou os critérios e sugeriu uma nova classificação, denominados de critérios de Amsterdam II (VASEN, 1991; VASEN, 1999). Os critérios estão relacionados na **tabela 3**.

Os critérios de Amsterdam são restritivos pois, usando apenas esses critérios para identificar indivíduos que apresentam suspeita para HNPCC, podemos nos deparar com situações em que não há história de câncer comprovada na família; outra situação é observada nos casos de famílias com história não verificada, onde o paciente afetado não sabe ou não tem idéia da causa *mortis* de seus pais e parentes mais próximos, dificultando, assim, o diagnóstico.

Em 1996, outros critérios mais amplos, denominados de Critérios de Bethesda foram definidos durante um Workshop International denominado “A Intersecção da Patologia e da Genética na Síndrome do Câncer Colo-Retal Hereditário Não-Polipose”. O objetivo era o de identificar o maior número possível de famílias em risco de CCRH, extendendo os cuidados profiláticos e de detecção precoce ao maior número possível de indivíduos em risco na população; outro objetivo era o de identificar os CCRs que podem ser testados quanto à instabilidade de microssatélites ou fenótipo de erro de replicação (RER), podendo, assim, determinar os familiares portadores da síndrome HNPCC (RODRIGUEZ-BIGAS, *et al.*, 1997).

A determinação do fenótipo RER tem utilidade potencial como marcador de pacientes e famílias que necessitam de estudos mais detalhados sobre as mutações germinativas do DNA. As pessoas caracterizadas com alto risco necessitam iniciar o aconselhamento genético e realizar exames de triagem para o diagnóstico dos cânceres relacionados com a síndrome em questão. Os Critérios de Bethesda, relacionados na **tabela 3**, podem identificar 15 a 20% do total dos CCRs.

Tabela 3 – Critérios para o diagnóstico clínico de HNPCC (VASEN, *et al.*, 1991; RODRIGUEZ-BIGAS, *et al.*, 1997; VASEN, *et al.*, 1999)

Critérios de Amsterdam I (1991)

- 1- Três casos de CCR familiar em que dois dos indivíduos afetados são parentes de primeiro grau do terceiro;
- 2- CCR ocorrendo em pelo menos duas gerações;
- 3- CCR diagnosticado antes dos 50 anos.

Critérios de Bethesda (1997)

- 1- Indivíduos com câncer familiar que preencham os Critérios de Amsterdam;
- 2- Indivíduos com dois casos de cânceres relacionados com síndrome do HNPCC relatados, incluindo CCR sincrônicos e metacrônicos, ou associados a cânceres extracólicos*;
- 3- Indivíduos com CCR em um parente de primeiro grau também com CCR e/ou câncer extracólico relacionado com síndrome do HNPCC e/ou adenoma colo-retal. Um dos cânceres deve ser diagnosticado abaixo dos 45 anos e o adenoma abaixo dos 40 anos;
- 4- Indivíduos com CCRH ou câncer de endométrio diagnosticado abaixo dos 45 anos;
- 5- Indivíduos com câncer de cólon direito, e padrão histopatológico indiferenciado com menos de 45anos**;
- 6- Indivíduos com CCR do tipo células em anel de sinete***;
- 7- Indivíduos com adenomas diagnosticados abaixo dos 40 anos.

Critérios de Amsterdam II (1999)

- 1- Pelo menos três parentes com um câncer associado ao HNPCC (CCR, câncer de endométrio, intestino delgado, ureter ou pélvis renal);
- 2- Um deve ser parente em primeiro grau dos outros dois;
- 3- Pelo menos duas gerações sucessivas afetadas;
- 4- Pelo menos um deve ser diagnosticado abaixo dos 50 anos;
- 5- FAP deve ser excluída nos casos de CCR;
- 6- Tumores devem ser verificados pelo exame patológico.

* Endométrio, ovário, estômago, hepatobiliar, intestino delgado, carcinoma de células de transição da pelve renal ou ureter.

** Forma cribriforme sólida definida como carcinoma pouco diferenciado composto por colunas irregulares sólidas de grandes células eosinofílicas e contendo pequenos espaços glandulares.

*** composto por mais de 50% de células em anel de sinete.

1.2.3. Características Clinicopatológicas

Estima-se que a frequência do HNPCC na população é de 3 a 7% de todos os casos de CCRs.

O câncer colo-retal hereditário não-polipose (HNPCC) é uma doença de herança autossômica dominante com penetrância incompleta de 80 a 85% com características clínicas e patológicas causadas por erros de reparo de DNA (LYNCH, 1996). Os membros afetados das famílias HNPCC desenvolvem câncer colo-retal em idade média de 45 anos onde os tumores são encontrados normalmente proximais à flexura esplênica, sendo que aproximadamente 70% estão localizados nesta região, merecendo exames colonoscópicos completos, que podem ser iniciados aos 25 anos. Há também uma tendência para ocorrência de lesões sincrônicas e metacrônicas, com frequência de aproximadamente 45% dentro dos 10 anos após ressecção cólica parcial (BABA, 1997; LYNCH *et al.*, 1997; LYNCH & LYNCH, 2000). Estes fatores caracterizam a Síndrome de Lynch tipo I. Mas, quando, além disso, os indivíduos afetados apresentam alta incidência de carcinomas de endométrio, ureter e pelve renal, ovário, estômago, intestino delgado, pâncreas e trato biliar, estes são caracterizados como Síndrome de Lynch tipo II (LYNCH *et al.*, 1990; WATSON *et al.*, 1993; AARNIO *et al.*, 1995; LYNCH *et al.*, 1995; LYNCH *et al.*, 1997; LYNCH & LYNCH, 2000; SALETTI *et al.*, 2001).

O HNPCC se distingue do CCR esporádico por suas características patológicas que incluem tumores pouco diferenciados, com uma grande frequência de carcinomas mucinosos e com células em anel de sinete. Adenomas cólicos são encontrados em aproximadamente 20% dos cólons de pacientes HNPCC com CCR. Jass e Stewart (1992) identificaram adenomas na síndrome de Lynch ocorrendo precocemente e sendo maiores e mais vilosos, apresentando maior grau de displasia que aqueles encontrados na população geral, sendo estes achados consistentes com a hipótese que adenomas em HNPCC apresentam carcinogênese mais acelerada que adenomas esporádicos (LYNCH & LYNCH, 2000).

Tem-se sugerido que a avaliação do padrão de MSI em HNPCC parece ter importância prognóstica, já que vários estudos demonstraram melhor sobrevida entre os pacientes cujo teste para MSI apresentaram resultados positivos (THIBODEAU *et al.*, 1993; JERNVALL *ET AL.*, 1999; GRYFE *et al.*, 2000).

Além disso, agentes quimioterápicos candidatos na quimioprevenção do CCR em HNPCC tem sido estudados (FINK *et al.*, 1998; ELSALEH *et al.*, 2000), com o intuito de identificar várias opções de tratamentos, assim como verificar a resistência a drogas, buscando novas alternativas terapêuticas para melhor conduzir o tratamento dos pacientes portadores da síndrome (LYNCH & LYNCH, 2000).

1.2.4. Aspectos Moleculares do HNPCC

O HNPCC resulta de mutação na linhagem germinativa em pelo menos um dos cinco diferentes genes de reparo do DNA: hMSH2 ("human mutS homolog 2") (FISHEL, 1993), hMLH1 ("human mutL homolog 1") (LEACH *et al.*, 1993; PAPADOPOULOS *et al.*, 1994), hPMS1 e hPMS2 (genes humanos de segregação pós-meiótica 1 e 2) (NICOLAIDES *et al.*, 1994) e o hMSH6 (G-T binding protein) (PALOMBO *et al.*, 1995). hMLH3 também parece estar envolvido com a síndrome (LIPKIN *et al.*, 2000). A **tabela 4** mostra a localização cromossômica de cada gene de reparo e a porcentagem de mutações encontradas.

Tabela 4 – Genes de reparo do DNA associados a HNPCC

Gene	Localização cromossômica	Estrutura Genômica	Número de mutações encontradas (2002)
MSH2	2p15-16	16 exons	125 (38%)
MLH1	3p21.3	19 exons	164 (49%)
PMS1	2q31-q33	13 exons	1 (0,3%)
PMS2	7p22	15 exons	5 (~2%)
GTBP/MSH6	2p15-16	11 exons	30 (9%)
MSH3	5q11-q12	27 exons	0 (0%)
MLH3	14q24.3	(desconhecida)	7 (2%)

Segundo PELTOMÄKI, 2001

1.3. Diagnóstico com auxílio de técnicas moleculares

Diversas técnicas têm sido usadas na triagem ou detecção de mutações em genes de reparo de DNA humano. Uma técnica muito utilizada para detecção de mutações é o Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism). Esta consiste na desnaturação de fragmentos de DNA para a análise das fitas simples mediante a eletroforese em gel de acrilamida. O resultado é avaliado através da diferença de migração entre as fitas simples, resultante de alterações de conformação adquirida pelas fitas do DNA. A técnica depende de boa otimização, apresentando sensibilidade que pode variar de 35 a 100% na análise das seqüências nucleotídicas. Esta técnica apresenta a vantagem de ser rápida e menos dispendiosa, com sensibilidade questionável (FRAZIER *et al.*, 2000).

A eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), depende das diferenças nas características desnaturantes da seqüência de interesse. O princípio da técnica baseia-se em diferenças na mobilidade eletroforética de moléculas de DNA. Ela permite que diferentes produtos de PCR sejam desnaturados à

fita simples de DNA frente a diferentes concentrações de uréia (WESTERMEIER, *et al.*, 1997).

Outra técnica que também pode ser utilizada é o teste de truncagem de proteínas (PTT) ou teste da proteína sintetizada *in vitro*, que consiste em converter pequenos fragmentos de DNA em RNA que então serão traduzidos à uma proteína. Se o gene não está expressando a proteína funcional, então a proteína traduzida será menor e pode ser detectada, pois migra mais rapidamente quando submetida à eletroforese (LUCE, *et al.*, 1996). No caso de pesquisa de mutações em MSH2 e MLH1, esta técnica pode apresentar problemas, principalmente porque o RNA de muitos alelos mutantes truncados para os genes de reparo do DNA é instável, mediando um fenômeno conhecido como decaimento mediado por mutação sem-sentido ou “nonsense”, que não ocorre em todos os genes, nem em todas as mutações truncadas (FRAZIER, *et al.*, 2000).

Nas análises de ligação, se as amostras de DNA de vários membros afetados de uma família forem avaliadas, então é possível excluir a possibilidade de alguns genes estarem mutados. Os *loci* microssatélites, que estão localizados próximos aos genes de interesse, proporcionam marcadores altamente polimórficos que podem ser usados para determinar se um desses marcadores são co-segregados com a doença. Se não, então não é provável que este *locus* seja mutado. Se um marcador polimórfico é co-herdado com a doença, então genes nesta região poderiam ser candidatos à mutação (FRAZIER, *et al.*, 2000).

O seqüenciamento é a técnica padrão para identificar mutações gênicas. Embora a análise de seqüências nucleotídicas tenha sido considerada de custo elevado, eles tem diminuído de acordo com o desenvolvimento da automatização de tecnologias. (MARRA & BOLAND, 1996).

Para a classificação de pacientes com HNPCC também está sendo muito usada a técnica de imunohistoquímica que consiste na pesquisa da expressão das proteínas envolvidas no reparo do DNA fazendo-se uso de anticorpos. Os anticorpos mais pesquisados são MSH2 e MLH1, enquanto

MSH6, PMS1 e PMS2 ainda estão sendo avaliados. Técnicas padrão são usadas, requerendo preparo especial com os tecidos e lâminas, sendo variável entre os diferentes laboratórios. Com o uso da imunohistoquímica pode também haver casos onde o gene está mutado, mas a proteína defeituosa ainda reage com um anticorpo (FRAZIER, *et al.*, 2000). Ela se mostra como uma técnica boa, tem a vantagem de usar amostras fixadas em formol e embebidas em parafina, além de ser rápida e barata, mas é pouco sensível.

A pesquisa de MSI tem-se mostrado importante no auxílio a triagem e diagnóstico de RER e pode ser realizada pelo estudo de regiões microsatélites. Em 1997 com o objetivo de encontrar um painel ideal para o estudo do RER, Dietmaier e colaboradores estudaram 31 marcadores incluindo repetições de mono, di, tri, tetra e pentanucleotídeos, sendo esse o primeiro trabalho em que um grande espectro de repetições microsatélites foi sistematicamente analisado. Foi observado que repetições mononucleotídicas foram freqüentemente mais afetadas pela MSI, seguida pelas repetições dinucleotídicas. Os microsatélites com repetições tri, tetra e pentanucleotídicas mostraram menor freqüência de instabilidade dos que os anteriormente citados (DIETMAIER, *et al.*, 1997). Essa maior suscetibilidade a instabilidade que as repetições mononucleotídicas apresentaram frente ao estudo de MSI já havia sido observada por Ionov e colaboradores (IONOV, *et al.*, 1993). A partir de estudos como esse começaram a aparecer sugestões de painéis reduzidos para análise de CCR, particularmente HNPCC (DIETMAIER, *et al.*, 1997; BOCKER, *et al.*, 1997; THIBODEAU, *et al.*, 1998). Dietmaier e colaboradores sugeriram um painel com 10 marcadores escolhidos por apresentarem maior sensibilidade e especificidade, enfatizando que a combinação de repetições mono, di e trinucleotídicas, foi capaz de detectar todos os tumores instáveis. Os casos foram classificados como MSI-H quando mais de 40% dos marcadores analisados apresentassem instabilidade; MSI-L quando menos de 40% estivessem instáveis e MSS se nenhum marcador instável estivesse presente no caso (DIETMAIER, *et al.*, 1997; BOCKER, *et al.*, 1997).

Um painel com cinco marcadores microssatélites, BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S250, foi então recomendado em um workshop do Instituto Nacional do Câncer (NCI), sendo considerados marcadores eficazes para detecção de MSI (RODRIGUES-BIGAS, *et al.*, 1997; BOLAND, *et al.*, 1998). Com base nesse painel, os tumores podem ser identificados apresentando instabilidade de microssatélites de alto grau (MSI-H) se dois ou mais desses cinco marcadores demonstrarem instabilidade (ou seja, ter inserções ou deleções nas regiões dos microssatélites); instabilidade de microssatélites de baixo grau (MSI-L), se pelo menos uma das regiões apresentar instabilidade, e estabilidade de microssatélites (MSS), quando nenhuma das regiões apresenta-se alterada. Outros marcadores podem ser usados adicionalmente para a pesquisa de instabilidade de microssatélites em CCR quando estes não conferem resultados seguros e, embora MSI seja um achado não apenas em CCR, mas também em malignidades extracólicas e alguns cânceres esporádicos, as recomendações para o uso deste painel são pertinentes apenas para CCR. Se mais de 5 marcadores forem usados para identificar outros fenótipos tumorais, então, nestes casos, o padrão para classificação de MSI é modificado, sendo que quando mais de 30% dos marcadores apresentassem instabilidade, o caso seria MSI-H, se menos de 30 % apresentar-se instável, MSI-L e se nenhum apresentasse alteração, o caso seria MSS (BOLAND, *et al.*, 1998). O fenótipo de erro de replicação (RER) é definido com base no resultado de MSI, onde os casos MSI-H são classificados como RER(+).

Essa técnica também tem sido utilizada antes de se partir para o seqüenciamento dos genes, sendo o primeiro passo para sugerir a identificação de mutações germinativas em genes de reparo do pareamento incorreto (FRAZIER, *et al.*, 2000). No caso de famílias típicas HNPCC, ou seja, que preenchem os critérios de Amsterdam I, a indicação é para seqüenciamento direto.

A sugestão que certos marcadores deveriam ser utilizados como padrão para a análise de MSI, ainda é controversa. Alguns marcadores parecem altamente relacionados ao HNPCC, como BAT25, BAT26 e BAT40,

enquanto outros são mais inespecíficos, podendo ser detectados com frequência em carcinomas esporádicos.

Além disso, a classificação do paciente com um fenótipo RER(+) ou RER(-) pode ajudar o clínico no direcionamento do tratamento, assim como para o aconselhamento genético das famílias com esse fenótipo (LYNCH & LYNCH, 2000). Pacientes RER(+) estão associados com melhor sobrevida, independente do estágio do câncer, e apresentam, geralmente, menor probabilidade de metastatizar, tanto em linfonodos regionais, quanto em órgãos distantes (GRYFE, *et al.*, 2000).

Este trabalho procura tentar responder a questão sobre que painel mínimo de marcadores seria mais informativo no auxílio à classificação do fenótipo RER. Para tanto, procurou-se correlacionar cada fator clínico (Critérios de Bethesda) com os marcadores mais utilizados. Alternativamente, buscou-se a identificação de que fatores clínico-patológicos, facilmente verificáveis, estariam mais associados com RER e que, portanto, deveriam ser mais valorizados pelo clínico.

2. OBJETIVOS

2.1 - Identificar a frequência de instabilidade de microssatélites (MSI) a partir de amostras de arquivo anátomo-patológico de um grupo de pacientes portadores de câncer colo-retal

2.2 – Avaliar dentre os marcadores moleculares usados, qual o painel que melhor identifica os portadores de tumor com fenótipo RER(+);

2.3 – Analisar a possível associação dos resultados de MSI com idade, sexo e dados anátomo-patológicos dos pacientes;

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

No presente trabalho foram utilizadas amostras de DNA de tumores e de tecido normal de 106 pacientes com CCR. Com exceção de duas amostras provenientes de outros serviços, que foram recebidas como lâminas e blocos de tecido parafinado, as demais amostras eram provenientes dos arquivos de pacientes operados no Hospital Sírio Libanês (HSL), por uma mesma equipe cirúrgica, e estavam arquivadas no Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do HSL. Os pacientes estudados foram submetidos a ressecções parciais ou totais do intestino grosso no período de janeiro de 1994 a março de 2001. Neste período um total de 525 pacientes foram operados. A partir deste grupo, pesquisados apenas com base nos dados obtidos de laudos anátomo-patológicos (excluindo-se, portanto, a história familiar), selecionamos aqueles que preenchiam pelo menos um dos critérios de Bethesda (RODRIGUEZ-BIGAS *et al.*, 1997). Cento e trinta pacientes com CCR preenchiam pelo menos um dos critérios. Devido à má qualidade de alguns materiais para extração do DNA, 75 pacientes puderam ser analisados. Neste grupo a idade média foi de 51,08 anos, mediana de 49 anos (23 - 88). Além disso, foram analisados 31 pacientes que não preenchiam nenhum dos critérios de Bethesda, sendo considerados como controle, para comparação com o grupo apresentando os critérios. A média de idade neste grupo foi de 63,9 anos, mediana de 62 anos (47 – 91).

A presente pesquisa foi aprovada pela comissão de Ética do Hospital Sírio Libanês e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (ANEXOS A e B).

3.1.1. Caracterização das amostras com Critérios de Bethesda

A distribuição das idades dos pacientes envolvidos no estudo pode ser observada na **figura 3**. Trinta e dois pacientes (42,7%) tinham 45 anos ou menos, enquanto 43 casos (57,3%) concentraram-se no grupo acima de 45 anos.

Dentre os pacientes, trinta e nove (52%) eram do sexo masculino e trinta e seis (48%) do sexo feminino.

Das amostras com localização determinada (73), 41 casos (56,2%) apresentaram a lesão no cólon direito, enquanto 32 pacientes (43,8%) mostraram a lesão no cólon esquerdo.

A **figura 4** mostra a distribuição das amostras quanto ao grau histológico, enquanto a **figura 5** mostra a distribuição das mesmas quanto ao estadiamento de Dukes.

Dos 75 casos analisados, 12 pacientes (16,0%) apresentaram padrão mucinoso e apenas um paciente (1,3%) apresentou padrão indiferenciado. Sete pacientes (9,3%) apresentaram tumores sincrônicos,

3.1.2 Caracterização das amostras sem Critérios de Bethesda

Dos 31 pacientes considerados como grupo controle nenhum deles apresentava qualquer um dos critérios de Bethesda, nenhum tinha idade abaixo de 45 anos, nem tumor proximal ou lesões com padrão mucinoso ou indiferenciado e nenhum apresentava sincronicidade. Os pacientes neste grupo tinham idade acima de 45 anos, foram diagnosticados com lesão tumoral no cólon distal; todas sem características mucinosas. As lesões apresentavam histologia bem diferenciada (3,2%) ou moderadamente diferenciada (96,8%). Quanto a classificação de Dukes, 7 casos (22,6%) foram classificados como A, 11 casos (35,5%) como B, 10 casos (32,3%) como C e 3 casos (9,68%) como D.

Figura 3 – Distribuição dos pacientes quanto à idade. Pacientes portadores de CCR e com idade igual ou inferior a 45 anos preenchem um dos critérios de Bethesda.

Figura 4 – Distribuição dos casos de CCR quanto ao grau histológico.

Figura 5 – Distribuição dos casos de CCR quanto ao estadiamento do tumor.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. EXAME MACROSCÓPICO E MICROSCÓPICO

Os exames macroscópico e microscópico foram processados de acordo com a rotina do laboratório de patologia cirúrgica e molecular do HSL.

Resumidamente, os espécimens cirúrgicos foram fixados em formalina 10%, por um período de 4 a 16 horas. Foram considerados tumores de cólon proximal os que acometiam o ceco, cólon ascendente ou cólon transverso e os de cólon distal os que acometiam o cólon descendente, sigmóide e reto.

O procedimento foi realizado seguindo-se recomendações previamente descritas por ROSAI (1995); após a medição do espécimen cirúrgico provindo de colectomia parcial ou total, a peça foi aberta e o tumor seccionado, considerando-se seu tamanho. Estes espécimens foram representados por um corte para cada centímetro de lesão, analisando suas diversas áreas. Os linfonodos foram classificados em três níveis: nível I, corresponde a porção mesentérica e mesocólica proximal ao tumor; nível II, corresponde ao tecido fibroadiposo da região mesocólica, ressecado subjacente ao tumor e abrangendo uma área de, no máximo, 2,5 cm em relação aos limites da lesão; e nível III, o tecido fibroadiposo mesocólico distal a neoplasia. As margens distal e proximal foram representadas com um corte de cada.

No exame microscópico, foram analisados os seguintes parâmetros: tipo histológico, estadiamento de Dukes (ROSAI, 1995), grau de diferenciação (HAMILTON & AALTONEN, 2001).

Com relação ao tipo histológico, foram considerados adenocarcinomas que apresentavam característica mucinosa (com mais de 50% de formação de mucina ou tumores constituídos por “células em anel de sinete”), e aqueles que apresentavam padrão indiferenciado (citoarquitetura do tumor com aspecto trabecular ou sólido e ausência de glândulas).

Quando foram avaliados pelo grau de diferenciação, os casos foram considerados como bem diferenciados (grau I), moderadamente diferenciados (grau II), pouco diferenciados (grau III) e indiferenciados (grau IV), dependendo da porcentagem de formação de túbulos, onde grau I apresenta mais de 95% de estruturas glandulares, grau II mostra 50-95%, grau III com 5-50% e grau IV com menos de 5% de estruturas glandulares.

Para o estadiamento de Dukes, são considerados: Estadio A, tumores envolvendo apenas a mucosa e submucosa; Estadio B, tumores que penetram a camada muscular; Estadio C, tumores que apresentam envolvimento de linfonodos e Estadio D, tumores com metástases em locais distantes.

Além disso, alguns tumores puderam ser caracterizados de acordo com o tempo de manifestação de um segundo tumor, sendo classificados como sincrônicos, aqueles que apresentaram duas lesões no cólon que se desenvolveram ao mesmo tempo ou com a segunda lesão desenvolvendo-se em um período de até 6 meses; ou metacrônicos, quando aparece a primeira lesão e depois de 6 meses uma segunda lesão é encontrada, não necessariamente na mesma região (ROSAI, 1995) .

Os espécimens fixados em formol foram submetidos a processamento automatizado com banhos de formol, etanol e xilol, seguido por inclusão em parafina.

De cada bloco de parafina foram realizados cortes de 4 a 6 μ m de espessura, colocados em lâmina de vidro, corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina, e analisados em microscópio óptico.

3.3 ANÁLISE MOLECULAR

3.3.1. Extração do DNA de material parafinado

O DNA dos espécimens cirúrgicos preservados em parafina foi isolado mediante a extração com proteinase K e purificação com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico de acordo com Volkenandt *et al.* (1993), com algumas modificações. Espécimens cuja composição celular tumoral foi

inferior a 75% foram submetidos a técnica de microdissecção, como descrito adiante.

Resumidamente, cortes de 10 µm foram realizados do bloco contendo o fragmento de tumor e do bloco contendo fragmento da margem distal ou proximal para representar o controle normal do respectivo paciente. Este material foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, estéreis (Axigen Scientific, Califórnia, EUA).

A desparafinização dos tecidos foi realizada com três lavagens de xilol, sendo que este foi previamente aquecido a 80°C. A cada microtubo foi adicionado 1,0 ml de xilol quente e a amostra foi incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida, os microtubos foram submetidos a centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos a 25°C em centrífuga refrigerada (JOUAN, modelo MR 1822, França). Este procedimento foi repetido duas vezes.

A seguir, duas lavagens com 0,5 ml de etanol absoluto foram realizadas à temperatura ambiente (TA). As centrifugações foram a 13.000 rpm por 5 minutos e 4°C, sempre desprezando o sobrenadante. Após a última centrifugação as amostras foram incubadas a 37°C por 16 horas com tampão de digestão contendo Tris-HCl 1,0 M, pH 8,0 (Tris Ultra Pure™, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), EDTA 0,5 M, pH 8,0 (USB, Cleveland, Ohio) e Tween 20 a 0,25 M (polyoxiethylene sorbitan mono-laurate, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), adicionando-se 0,6mg/ml (pelo menos 12U/mg) de proteinase K (USB).

Após o período de incubação, as amostras foram submetidas a aquecimento, a 95°C durante 10 minutos, para inativação da proteinase K. A seguir, 0,5 ml de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1 - v/v – USB) foi adicionado a cada tubo, agitando-se vigorosamente por aproximadamente 1 minuto. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi transferido para microtubo estéril e novamente submetido a purificação com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Após agitação e centrifugação o sobrenadante foi transferido

para outro microtubo esterilizado e o DNA precipitado com 40 µl de acetato de sódio 3,0 M (pH 5,2) (MERCK, Alemanha) e 2,5 volumes de etanol absoluto previamente refrigerado a 4°C. Os tubos foram mantidos por 30 minutos a -20°C e as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado contendo DNA foi seco à TA. O DNA foi ressuspensionado em 50 µl de tampão contendo Tris-HCl 1,0M (pH8,0); EDTA 0,5M (pH8,0); RNase 1mg/ml (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Suécia) e armazenado a - 20 °C até o momento do uso.

3.3.2. Técnica de microdissecção

Em alguns casos houve a necessidade de realizar microdissecção para garantir 75% de tumor na amostra e, como normal, foram utilizados cortes da margem proximal ou distal a lesão. Nesses casos examinou-se a lâmina corada por hematoxilina-eosina e a região de interesse foi marcada, servindo como “gabarito” para a delimitação de área homóloga aos cortes histológicos não corados procedentes do mesmo fragmento de tecido. Em seguida, 7 a 10 cortes de 10 µm foram realizados dos respectivos blocos e colocados em lâmina de vidro limpas e devidamente identificadas.

A demarcação foi feita pela sobreposição das lâminas de vidro com os cortes. A seguir, as áreas delimitadas foram retiradas com lâmina de bisturi estéril e transferidas para microtubos de 1,5 ml devidamente identificados. Assim, para cada microtubo com tumor havia outro microtubo com tecido normal.

3.3.3. Quantificação do DNA genômico

A quantificação do ácido nucléico extraído foi realizada através da leitura da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro GeneQuant (Amersham Pharmacia Biotech), utilizando o comprimento de onda (λ) de 260 nm. As amostras a serem quantificadas foram diluídas 1:25 (20,0 µl da solução contendo o DNA diluído em 480,0 µl de água destilada). A pureza

do DNA presente na amostra foi obtida pela relação $\lambda_{260}/\lambda_{280}$, sendo que a DO a λ_{280} indica a concentração de proteína. Um grau adequado de pureza é aquele obtido para a relação $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ igual ou superior a 1,6. (SAMBROOK *et al.*, 1989). As amostras de DNA apresentaram pureza média de 1,626 e foram diluídas para uma concentração de uso de 100 ng/ μ l.

3.3.4. Amplificação das regiões microssatélites pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Amostras de DNA, correspondentes ao tecido normal (N) e tumor (T), foram submetidas a amplificação em tubos de microcentrifuga de 0,2 ml (GIBCO BRL), empregando-se a técnica da PCR. Foram amplificadas 7 regiões de microssatélites: BAT25, BAT26, D2S123, BAT40 e TP53 (DIETMAIER *et al.*, 1997), D5S346 (SPIRIO *et al.*, 1991), D17S250 (WEBER *et al.*, 1990), cujas características são apresentadas na **tabela 5**.

Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos e características dos microssatélites analisados.

Oligonucleotídeo	Localização Cromossômica	Tipo de Repetição	Sequências dos primers S - 5'para 3' / A - 3'para 5'	Tamanho do amplificado (pares de bases)
BAT-26 ¹	2p	Mononucleotídeo	S - TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC A - AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C	80-100
BAT-40 ¹	1p13.1	Mononucleotídeo	S - ATT AAC TTC CTA CAC CAC AAC A - GTA GAG CAA GAC CAC CTT G	80-100
BAT-25 ¹	4q12	Mononucleotídeo	S - TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT A - TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC	80-100
D5S346 ^{1,2} (APC)	5q21/22	Dinucleotídeo	S - ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG A - AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T	96-122
AFM093xh3 ¹ (D2S123)	2p16	Dinucleotídeo	S - AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA A - GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC	197-227
Mfd15CA ³ (D17S250)	17q11.2-q12	Dinucleotídeo	S - GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT A - GTC GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC	162
TP53.PCR15.1 ¹	17p13.1	Dinucleotídeo	S - AGG GAT ACT ATT CAG CCC GAG GTG A - ACT GCC ACT CCT TGC CCC ATT C	103-135

¹DIETMAIER *et al.* , 1997; ² SPIRIO *et al.* , 1991; ³ WEBER *et al.* , 1990

S – sense; A - antisense

3.3.4.1. Otimização da técnica

Foram testadas concentrações crescentes de DNA (50 a 200 ng); DMSO (Dimetilsulfóxido - Sigma), e formamida (Gibco – BRL) de 1,25 a 5 % do volume total da reação, substâncias utilizadas para otimização, com o objetivo de melhorar a reação, aumentando a especificidade (SARKAR *et al.*, 1990). As reações foram realizadas com 25 e 50 µl de volume final, apresentado tampão para PCR - 1X (KCl 5,0 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 1,0 mM, pH 9,0), 200 a 400 µM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Amersham Pharmacia Biotech), 300 a 400 nM de cada oligonucleotídeo, 1,25 a 2,5 U de enzima *Taq* DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech) e água deionizada estéril. A concentração final de cloreto de magnésio foi de 2,25 mM.

Todos os oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões microssatélites foram sintetizados pela empresa Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, Estados Unidos).

As condições de amplificação para cada região avaliada são apresentadas na **tabela 6**.

Os tubos com os reagentes e o DNA foram agitados e colocados para amplificação nos termocicladores: Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 (Branchburg, EUA) ou PTC 100TM Programmable Thermal Controller (M.J.Research, Inc, USA).

Trinta ciclos de amplificação foram realizados nas amostras com as temperaturas e tempos especificados na **tabela 6**. A desnaturação inicial foi a 95°C por 5 minutos para todos os iniciadores.

Tabela 6. Condições para as reações de PCR. Temperatura e tempo das fases de desnaturação, hibridação e extensão que caracterizam a reação da PCR utilizadas para a amplificação das regiões microsatélites.

Marcador	BAT-25, BAT-26,	D17S250	D2S123	TP53.PCR.15.1
Microsatélite	BAT-40, D5S346			
Desnaturação	95°C / 1'	95°C / 1'	95°C / 1'	95°C / 1'
Hibridação	58°C / 1'	52°C / 1'	60°C / 1'	68°C / 1'
Extensão	72°C / 1'	72°C / 1'	72°C / 1'	72°C / 1'

Todos os ciclos foram seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos e ao final dos ciclos a reação foi interrompida por resfriamento a 4°C.

Para evitar contaminação na extração de DNA e na PCR utilizamos apenas ponteiros com barreira de 1,0 a 40 µl e de 20,0 a 200 µl, modelo Diamond DF 200 tipack da Gilson (Emeryville, CA, EUA) e da LABCON (San Rafael, CA, EUA).

3.3.5. Caracterização dos produtos de amplificação

3.3.5.1. Otimização da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A análise dos produtos da PCR foi realizada em gel de poliacrilamida:

- em condições não desnaturantes;
- em condições desnaturantes.

Em condições não desnaturantes, foram utilizados géis de poliacrilamida nas concentrações de 10 e 15%. Tanto os géis a 10% como aqueles a 15% foram realizados no sistema de eletroforese vertical modelo S2 (Gibco-BRL) e não apresentaram boa separação das bandas.

Alternativamente, foram também usados dois tipos de “kits” para eletroforese em poliacrilamida não desnaturante (Amersham Pharmacia

Biotech), seguindo as recomendações do fabricante. Um deles apresenta concentração a 12,5% (Kit GeneGel Excel 12.5/24) de poliacrilamida e o outro, 15% (Kit GeneGel Clean 15/24). No caso dos produtos de amplificação analisados por estes géis, a melhor resolução foi obtida com a utilização do Kit GeneGel Excel 12.5/24. Estes foram preparados na unidade eletroforética automatizada GenePhor (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram aplicadas utilizando-se 4 µl do produto amplificado e 4 µl de tampão desnaturante de aplicação. Cada amostra foi desnaturada a 95°C por 10 min e em seguida mantida em gelo por mais 10 min. O sistema para colocação do gel de acrilamida foi montado usando-se 0,7 ml de querosene na base do equipamento para evitar a formação de bolhas entre o gel e a superfície da unidade eletroforética. Aplicaram-se 6 µl das amostras preparadas e 1,0 µl de padrão de peso molecular de DNA de 50 bp . As condições de eletroforese foram 600V, 15mA, 9W e 15°C, com duração aproximada de 1h e 15 min.

Para os géis desnaturantes, utilizamos a uréia junto com a poliacrilamida, visando manter condições de desnaturação durante todo o período de eletroforese. Para isso, foram utilizadas as concentrações de 6% de poliacrilamida com uréia a 5,3 M (Amersham Pharmacia Biotech), 8% e 10 % de poliacrilamida com uréia a 7,0 M. A concentração da poliacrilamida foi aumentada para melhorar a resolução das regiões microssatélites.

Após a otimização, todos os produtos amplificados foram re-analisados nas condições que permitiram a melhor separação das bandas (10%, 7,0 M). Para a eletroforese, foi utilizado o sistema de eletroforese vertical modelo S2. O gel de poliacrilamida foi preparado utilizando-se uma solução de poliacrilama 40% (acrilamida a 40% e de metileno bis-acrilamida a 0,8%; Amersham Pharmacia Biotech), tampão TBE 1X (Tris/Borato/EDTA - Tris-HCl 0,089 M, ácido bórico 0,089 M e EDTA 2 mM, pH 8,0), uréia a 7,0 M , glicerol a 50% (Amersham Pharmacia Biotech), persulfato de amônio 10%, TEMED (Gibco-

BRL) e água estéril. Após polimerização do gel, foi realizada uma pré-corrida durante 30 minutos, a 480 V utilizando-se uma fonte para eletroforese modelo PS 3002 (Life Technologies).

Ao volume de 10 µl de produto amplificado, adicionou-se 5 µl de tampão desnaturante de aplicação, contendo formamida 95%, azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% (Fluka Chemie AG, Suíça), glicerol a 50%, e EDTA a 10 mM (pH 8,0) (Gibco-BRL) (SAMBROOK *et al.*, 1989), sendo esta mistura aquecida a 95°C por 15 minutos para desnaturação da dupla fita de DNA. Em seguida, os produtos desnaturados foram imediatamente colocados em gelo por 10 minutos. Aplicou-se 10 µl desta mistura no gel de poliacrilamida. Também foi aplicado padrão de peso molecular de DNA de 50 bp (Gibco-BRL), diluído em tampão de aplicação. Em cada gel foi colocado um marcador de peso molecular. A separação eletroforética foi realizada a 480 V por aproximadamente 16 horas à TA.

Os produtos amplificados foram também analisados em gel PAGE desnaturante preparado no sistema de eletroforese vertical modelo V16-2 (Life Technologies Inc.). Neste sistema foram usadas diferentes concentrações de poliacrilamida: 7%, 8%, 10% e 15%. Além da uréia, foi utilizado outro agente desnaturante, a formamida, para avaliar se a resolução dos géis aumentava. Assim, as concentrações de uréia utilizadas foram de 2,7, 3,0, 5,6 e 7,0 M, e a formamida foi analisada entre 32 e 36% (SANTOS *et al.*, 1999) com relação ao volume final.

Após a otimização nesse sistema, os produtos foram analisados em géis a 10 % de poliacrilamida com 3,0 M de uréia, sem formamida. Utilizou-se solução de poliacrilamida 40%, tampão TBE 1X, uréia a 3M, glicerol a 50%, persulfato de amônio 10%, TEMED e água estéril. As amostras foram preparadas misturando-se 3 µl do produto amplificado e 5 µl de tampão desnaturante de aplicação. Essa mistura foi aquecida a 95°C por 10 min. e colocada a -20°C por 10 min. Essa etapa de aquecimento/resfriamento foi

repetida mais uma vez. A seguir, 4 μ l da mistura foi aplicada no gel. A eletroforese foi realizada a 90 V, por aproximadamente 16 horas à TA.

3.3.5.2. Coloração por nitrato de prata

Tanto os géis de poliacrilamida não desnaturantes como os desnaturantes foram corados com nitrato de prata.

Após a separação eletroforética dos géis não desnaturantes pelo sistema GenePhor, a coloração do GeneGel Excel 12,5 % e do GeneClean 15 % foi realizada utilizando-se o Kit Plus One DNA Silver Staining e o sistema de coloração automática de géis Hoefer (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo as recomendações do fabricante. O gel corado foi colocado em estufa a 37°C por 12 horas para secar.

Os géis desnaturantes preparados na cuba de sequenciamento modelo S2 foram transferidos para recipiente contendo solução de fixação, constituído por etanol absoluto a 10% e ácido acético glacial a 5% (MERCK). O gel permaneceu nesta solução por 20 minutos sob leve agitação em uma mesa de agitação Rockermix 1030 (Brinkmann, Alemanha). Decorrido esse tempo, retirou-se essa solução através de sucção com uso de uma bomba de vácuo BIORAD Laboratories Inc. (BIORAD Laboratories, Hercules, CA, EUA); adicionou-se, então, a solução de impregnação contendo 0,17% de nitrato de prata (MERCK), que foi mantida por 20 minutos. Retirou-se o excesso de solução de impregnação lavando o gel com água destilada por 20 minutos sob agitação. Para a revelação do gel, utilizou-se a solução contendo hidróxido de sódio a 9,0 g/l (MERCK) e formaldeído a 0,1% (MERCK) por aproximadamente 20 minutos (SAMBROOK *et al.*, 1989). Após essa etapa, retirou-se o excesso de solução de revelação lavando-se o gel com água destilada por 20 minutos.

Para os géis desnaturantes preparados na cuba V16-2, a diferença com relação ao gel anteriormente descrito foi o tempo de permanência nas soluções, sendo que na solução de fixação, o gel permaneceu por 15 min.; na impregnação, 12 min.; a lavagem com água destilada durou 15 minutos e a

revelação, aproximadamente 15 min. Uma última lavagem com água destilada por 10 min. foi requerida.

Para posterior análise dos géis, estes foram fotografados em sistema de fotodocumentação e a análise das bandas foi realizada com auxílio do programa de computador Molecular Analyst (BIORAD) .

3.3.6. Análise dos *loci* contendo Microssatélites

A definição e a distinção dos tumores com MSI foi baseada na análise comparativa das imagens das bandas formadas pelos segmentos do DNA amplificados do tecido do tumor em relação a do tecido normal.

A MSI foi definida pela migração anormal, com presença de bandas extras, causadas por inserções ou deleções das unidades repetitivas no DNA das amostras de tumor, ausentes nas amostras de tecido normal. Cada *locus* foi analisado por dois observadores independentes e os pacientes receberam as seguintes denominações (BOLAND, *et al.*, 1998):

MSI - H - Instabilidade de microssatélites de alto grau; em 30% ou mais dos marcadores analisados. Se considerarmos os 5 marcadores propostos pelo ICG-HNPCC, pelo menos 2/5 marcadores instáveis;

MSI – L - Instabilidade de microssatélites de baixo grau; em menos de 30% dos marcadores analisados. Com os marcadores propostos pelo ICG-HNPCC, 1/5 marcador instável;

MSS – Ausência de instabilidade de microssatélites.

Para definição e distinção de perda de heterozigose (LOH), analisou-se a ausência parcial ou total de uma ou mais bandas na amostra de DNA tumoral, comparada com as amostras de DNA normal do mesmo indivíduo (CHRISTENSEN, *et al.* 1999).

Para as análises subseqüentes dos resultados, os pacientes foram classificados com base no fenótipo de erro de replicação (RER) do DNA. O fenótipo RER foi estabelecido a partir da análise de MSI, com definição de duas categorias: (1) fenótipo RER positivo - RER(+), caracterizado por instabilidade

de microssatélites de alto grau (MSI-H) ; e (2) fenótipo RER negativo – RER(-), diferenciado por instabilidade de microssatélites de baixo grau (MSI-L) ou microssatélite estável (MSS).

3.3.7. Análise Estatística

Os cálculos para sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram feitos de acordo com RIMER *et al.* 1999. As fórmulas empregadas nos cálculos estão descritas abaixo:

- Sensibilidade: $VP/VP+FN$;
- Especificidade : $VN/VN+VP$;
- Valor Preditivo Positivo (VPP) : $VP/VP+FP$;
- Valor Preditivo Negativo (VPN) : $VN/VN+FN$, onde

VP – casos verdadeiros positivos; **VN** – casos verdadeiros negativos;

FP – casos falso positivos; **FN** – casos falso negativos.

A associação entre duas variáveis categóricas qualitativas foi avaliada em tabelas de frequências e pelos testes Qui-quadrado (χ^2).

Modelos de regressão logística foram utilizados para identificar os fatores mais associados com a variável de desfecho (Fenótipo RER), e as magnitudes das associações foram avaliadas com o uso do *odds ratio* (OR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (I.C. 95%), estimados com base nos modelos logísticos. A significância de cada variável no modelo foi verificada com o teste da Razão de Verossimilhanças (RV). O nível de significância foi de $p < 0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas com o emprego do programa SPSS (Statistical Package for Social Science), na versão 10.0.

4. RESULTADOS

4.1. Otimização da extração do DNA de material parafinado

De modo geral, a metodologia empregada para a extração de DNA foi eficiente, possibilitando a análise posterior. Duzentas e doze amostras foram extraídas de 106 casos. A quantificação das amostras no espectrofotômetro resultou em concentrações que variaram de 50 a 500 ng/ul.

4.2. Otimização da PCR para as regiões microssatélites

O cloreto de magnésio foi usado em diferentes concentrações na reação de PCR (de 1,5 a 2,5 mM) e verificou-se que para todas as regiões amplificadas a melhor concentração foi de 2,25 mM, como mostra a **figura 6**; nela observamos que conforme aumenta-se a concentração do $MgCl_2$ aparece maior número de bandas. A **figura 7** mostra a utilização de diferentes concentrações de DMSO e formamida. Podemos observar que com o aumento da concentração de DMSO, nas colunas 1, 3, 5 e 7 não houve diferença com relação a nitidez das bandas; para as amostras 2, 4, 6 e 8, conforme aumentamos a concentração do DMSO as bandas desapareceram completamente. No caso da formamida, observamos algo semelhante; com o aumento das concentrações, as bandas foram desaparecendo, enquanto com concentrações mais baixas não observamos diferença na nitidez das bandas. Consideramos então que não havia vantagem em usar esses tipos de reagentes nas reações de amplificação.

Para os marcadores microssatélites D5S346, TP53, D2S123, as reações apresentavam tampão de PCR-1X (KCl 50mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM pH9,0), 400 μ M de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 400 nM de cada oligonucleotídeo, 2,25 mM de cloreto de magnésio (concentração final), 1,25 U da enzima *Taq* DNA polimerase e água deionizada estéril. Para os marcadores microssatélites BAT25, BAT26, BAT40 e D17S250, as reações apresentavam tampão de PCR-1X, 200 μ M de cada nucleotídeo, 300 nM de

cada oligonucleotídeo, 2,25 mM de cloreto de magnésio (concentração final), 1,50 U da enzima *Taq* DNA polimerase e água deionizada estéril.

Figura 6 - Análise dos microssatélites BAT26 e BAT40 em gel de poliacrilamida com diferentes concentrações de MgCl_2 . BAT26 (colunas 1, 3, 5 e 7) e BAT 40 (colunas 2, 4, 6 e 8) com diferentes concentrações de MgCl_2 em gel de poliacrilamida. Colunas 1 e 2: 1,5 mM; Colunas 3 e 4: 2,0 mM; Colunas 5 e 6: 2,25 mM e Colunas 7 e 8: 2,5 mM;

PM: marcador de peso molecular de 50 bp.

Figura 7 - Análise dos microssatélites BAT26 e BAT40 em gel de poliacrilamida com diferentes concentrações de DMSO e formamida. BAT26 (Gel A) e BAT40 (Gel B). A - DMSO: Colunas 1 e 2: Sem DMSO; Colunas 3 e 4: 1,25%; Colunas 5 e 6: 2,5% e Colunas 7 e 8: 5,0%; **B - Formamida:** Colunas 1 e 2: 1,25%; Colunas 3 e 4: 2,5%; colunas 5 e 6: 5,0%; PM : marcador de peso molecular de 50 bp.

4.3. Avaliação dos produtos de amplificação em gel de poliacrilamida

A padronização foi realizada mediante o uso de diferentes concentrações de poliacrilamida e uréia na composição do gel.

Para os géis não desnaturantes, tanto a concentração a 10% quanto 15% permitiu visualizar as bandas dos produtos amplificados, mas não possibilitou nitidez das mesmas. Entretanto, quando usamos a uréia como agente desnaturante, a análise das bandas foi favorecida. Nesta situação, quando combinamos poliacrilamida a 10% com 7,0 M de uréia obtivemos melhores resultados (**figura 8**).

Quando utilizamos os géis dos kits GeneGel Clean 15/24 e GeneGel Excel 12,5/24, observou-se melhor resolução no gel a 12,5% (**figura 9**).

Para o gel desnaturante preparado no sistema V16-2, concentrações baixas de poliacrilamida e altas de uréia não permitiram boa visualização das bandas dos microssatélites. Assim, testamos a adição de formamida ao gel, além da uréia. Os resultados podem ser visualizados na **figura 10**, que mostra que tanto na concentração de 32% quanto 36% de formamida, não trouxe contribuição para a separação e visualização mais nítida das bandas. Experimentos posteriores levaram a observação de que géis contendo 10% de poliacrilamida e 3,0 M de uréia apresentaram melhores resultados (**figura 11**).

Figura 8 - Análise de produtos de PCR de regiões microssatélites em gel de poliacrilamida com diferentes concentrações de uréia. A : 6% de poliacrilamida / 5,3M de uréia; B: 8% de poliacrilamida / 7M de uréia; C: 10% de poliacrilamida / 7,0M de uréia; PM: marcador de peso molecular de 50 bp; N: tecido normal; T: tecido tumoral.

Figura 9 - Análise dos produtos de PCR de regiões microssatélites com géis de poliacrilamida realizados pelo sistema de eletroforese GenePhor.

A: Gel com 15% de poliacrilamida (Gene Gel Clean);

B: Gel com 12,5% de Poliacrilamida (Gene Gel Excel).

PM: marcador de peso molecular de 50 bp; **N:** tecido normal; **T:** tecido tumoral.

Figura 10 - Géis de Poliacrilamida com diferentes concentrações de uréia. **A** - 7% / 2,7M; **B** - 8% sem uréia; **C** - 8% / 3,0M uréia; **D** - 8% / 3,0M uréia / 32% formamida; **E** - 7% / 5,6M uréia / 36% formamida; **F** - 15% / 5,6M uréia.

PM: marcador de peso molecular de 50 bp; **N:** tecido normal; **T:** tecido tumoral.

Figura 11 - Géis de poliacrilamida desnaturantes realizados no sistema V16-2. Géis com 10% de poliacrilamida e 3,0M de uréia: **A** - Caso 80 mostrando as regiões microssatélites BAT26 e D2S123 sem alterações nos microssatélites BAT26 e D2S123; **B** - Caso 83 mostrando instabilidade de microssatélites dos loci BAT25 e BAT26. **N:** tecido normal; **T:** tecido tumoral.

4.4. Análise dos *loci* contendo microssatélites

Foram avaliados 106 casos de CCR e seus correspondentes tecidos normais, através da técnica da PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Foram analisadas regiões microssatélites contendo repetições mononucleotídicas e dinucleotídicas, num total de sete *loci* diferentes. A análise foi realizada comparando-se o padrão de bandas do tecido tumoral com o normal correspondente; a instabilidade foi considerada quando observamos alterações na migração dos produtos amplificados ou quando observamos novas bandas na amostra correspondente ao tecido tumoral. Essas observações podem ser verificadas na **figura 12**. A classificação para instabilidade usada com a análise dos 7 marcadores foi MSI-H, quando mais de 30% dos marcadores estivessem instáveis; MSI-L, quando menos de 30% dos marcadores estivessem instáveis e MSS, quando nenhum marcador apresentasse instabilidade.

A **figura 13** mostra a análise da LOH. Em alguns *loci* observamos a perda parcial ou total de bandas na amostra correspondente ao tecido tumoral, quando comparado ao respectivo tecido normal.

Figura 12 - Instabilidade de microssatélites nos loci D2S123 (A); D5S346 (B); BAT25 (C) e BAT 26 (D). Gel de poliacrilamida desnaturante com os produtos de PCR, mostrando amostras de tecidos normais (N) e tumorais (T) de pacientes com CCR. **A** - *Locus* D2S123: presença de bandas extras no tecido tumoral da amostra 24 (seta) que não estão presentes no tecido normal correspondente. Amostra 20 sem alterações nas bandas. **B** - *Locus* D5S346: presença de bandas extras no tecido tumoral do caso 10 (seta), ausentes no tecido normal correspondente. **C** - *Locus* BAT25: presença de bandas no tecido tumoral do caso 28 (seta) ausentes no caso 25 (normal); **D** - *Locus* BAT 26: presença de bandas no tecido tumoral do caso 28 (seta) ausentes no normal (caso 30).

PM: marcador de peso molecular de 50 bp; **N:** tecido normal; **T:** tecido tumoral

Figura 13 - Análise de perda de heterozigose (LOH) nos loci D17S250 e D5S346. A - Locus D17S250: ausência parcial de bandas no tecido tumoral do caso 78 (setas), antes presentes no tecido normal correspondente. B - Locus D5SB46: ausência de bandas no tecido tumoral do caso 63 presentes no respectivo tecido normal. N: tecido normal; T: tecido tumoral.

Quando analisamos a MSI-H no grupo sem critérios, observamos 1 caso (3,2%) classificado como RER(+), apresentando os marcadores D5S346 e TP53 instáveis. Nesse mesmo caso não foi possível avaliar o marcador D2S123. Neste grupo tivemos também 5 casos (16,1%) MSI-L, com presença de apenas um marcador instável. Os marcadores que se apresentaram instáveis nestes casos foram D5S346 e TP53. Como a análise desses marcadores com a técnica utilizada nos possibilita avaliar também perda de heterozigose (LOH), observamos três pacientes com LOH, um caso MSI-L com instabilidade no TP53 e LOH no marcador D17S250, o segundo caso com LOH no TP53 e o terceiro caso no D5S346. Os demais marcadores apresentaram-se sem alterações no restante dos casos.

No entanto, quando avaliamos apenas os marcadores recomendados pelo ICG-HNPCC (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250) ou marcadores de Bethesda, o que observamos neste mesmo grupo é que o único caso MSI-H passa a ter apenas um marcador instável (D5S346) e portanto, é considerado como MSI-L. Além disso, passamos a ter 2 casos (6,5%) MSI-L ao invés dos 5 (16,1%), anteriormente classificados com todos os marcadores. Essa diminuição dos casos MSI-L ocorreu, pois 3 pacientes (9,7%) foram anteriormente classificados como MSI-L por apresentarem TP53 instável, e uma vez que este marcador não faz parte do painel recomendado, esses casos passam a ser MSS.

Analisando o grupo com Critérios de Bethesda e avaliando as 7 regiões microssatélites, 14 casos (18,7%) foram classificados como MSI-H, enquanto 14 casos (18,7%) apresentaram MSI-L. Quarenta e sete pacientes (62,7%) foram caracterizados como MSS. Mas quando analisamos o painel dos marcadores de Bethesda, dois casos antes classificados como MSI-L passam a ser MSI-H e assim, ficamos com 16 pacientes (21,3%) MSI-H e 11 pacientes (14,7%) MSI-L. Isso foi possível pois estes dois casos apresentaram BAT25 e BAT26 instáveis.

Os resultados da instabilidade dos diferentes *loci* e as características clínico-patológicas de todos os pacientes estudados ($n=106$) constam no **ANEXO C**. Se considerarmos então dois subgrupos, MSI-H e MSI-L, e avaliarmos a frequência de instabilidade com relação as regiões microssatélites, então podemos observar que os microssatélites BAT25 e BAT26 foram muito mais frequentes em MSI-H do que em MSI-L, enquanto neste último grupo podemos notar maior frequência dos microssatélites D17S250 e TP53. Na **figura 14** estão os resultados dos 7 *loci* utilizados em nossa análise, considerando o número total de pacientes ($n=106$).

Figura 14 – Frequência da instabilidade de cada um dos microssatélites analisados entre os pacientes MSI-H e MSI-L no grupo total de pacientes ($n=106$). A porcentagem se refere à fração dos pacientes que apresentaram MSI para cada marcador dentre o total de casos em cada categoria, MSI-H ($n=15$) e MSI-L ($n=19$).

Para avaliarmos a importância e o poder do painel usado, calculamos valores para sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) com relação ao fenótipo RER (**tabela 7**). Analisando-se os marcadores individualmente podemos constatar que, ao analisarmos o painel com os 7 marcadores, o mais sensível, dentre eles, foi o BAT25 (93,3%). Com relação à especificidade, D5S346 (97,8%), mostrou o melhor valor, enquanto BAT25 apresentou 96,6%. D2S123 demonstrou melhor VPP (83,3%), enquanto que, o BAT25 revelou o melhor VPN (98,9%). Os cálculos também foram feitos para o painel de Bethesda, apresentando algumas diferenças relacionadas na **tabela 7**.

Tabela 7 – Sensibilidade, Especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos marcadores microsatélites em relação ao fenótipo de erro de replicação (RER). Avaliação dos parâmetros considerando 5 e 7 marcadores respectivamente.

MICROS.	SENSIB. (%)		ESPECIF. (%)		VPP (%)		VPN (%)	
	PB	PA	PB	PA	PB	PA	PB	PA
BAT25	100	93,3	96,6	96,6	94,2	82,4	100	98,9
BAT26	93,7	86,7	98,9	96,7	93,7	81,2	98,9	97,8
D5S346	43,7	53,3	96,7	97,8	70,0	80,0	90,6	92,7
D2S123	62,5	71,4	95,6	96,7	83,3	83,3	93,5	95,6
D17S250	68,7	73,3	91,1	91,2	73,3	73,3	94,2	95,4
BAT40	-	73,3	-	94,5	-	78,6	-	94,5
TP53	-	80,0	-	93,4	-	66,7	-	96,6

Micros. – microsatélite; Sensib. – sensibilidade; Especif. – especificidade; PB – Painel de Bethesda (5 marcadores); PA – Painel Ampliado (7 marcadores).

Agrupando os marcadores microssatélites dois a dois para o cálculo dos mesmos parâmetros (**tabela 8**) e considerando os 7 marcadores analisados, observamos que a associação BAT25 e BAT26 apresentou a melhor sensibilidade (86,7%) e o melhor VPN (97,7%). Quanto à especificidade, a associação BAT26 e D5S346 apresentou 94,5%, enquanto a associação BAT25 e BAT26 apresentou 93,4%. A associação de marcadores que mostrou maior VPP foi BAT25 e BAT26 (76,5%). Os mesmos cálculos foram realizados para as associações dos 5 marcadores de Bethesda, também relacionados na **tabela 8**. Por ela podemos notar que a associação entre os marcadores BAT25 e BAT26 apresenta valores maiores dentro de um painel mais reduzido do que anteriormente avaliado.

Tabela 8 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos marcadores microssatélites associados dois a dois em relação ao RER.

MICROSSATÉLITE	SENSIB. (%)		ESPECIF. (%)		VPP (%)		VPN (%)	
	PB	PA	PB	PA	PB	PA	PB	PA
BAT25+BAT26	93,8	86,7	97,8	93,4	100	76,5	98,9	97,7
BAT25+D2S123	62,5	66,7	96,7	92,3	83,3	66,7	94,6	94,4
BAT25+D17S250	68,8	73,3	91,1	88,0	73,4	61,1	94,3	95,3
BAT25+D5S346	43,8	46,7	94,5	92,3	70,0	58,3	90,4	91,3
BAT25+BAT40	-	73,3	-	91,2	-	64,7	-	95,4
BAT25+TP53	-	73,3	-	87,9	-	55,0	-	95,2
BAT26+D2S123	56,3	60,0	95,6	92,3	81,2	64,3	92,5	93,3
BAT26+D17S250	68,8	66,7	90,0	89,0	68,8	58,8	94,2	95,3
BAT26+D5S346	37,5	40,0	95,6	94,5	60,0	54,5	89,6	90,5
BAT26+BAT40	-	73,3	-	92,3	-	64,7	-	95,5
BAT26+TP53	-	73,3	-	90,1	-	55,0	-	95,4
D2S123+D17S250	50,0	53,3	88,9	89,0	57,2	57,1	90,9	92,0
D2S123+D5S346	37,5	40,0	92,2	93,4	54,5	60,0	89,3	90,4
D2S123+BAT40	-	53,3	-	92,3	-	61,5	-	92,3
D2S123+TP53	-	46,7	-	89,0	-	46,7	-	91,0
D17S250+D5S346	37,5	40,0	87,8	89,0	46,2	50,0	88,8	90,0
D17S250+BAT40	-	53,3	-	89,0	-	57,1	-	92,0
D17S250+TP53	-	60,0	-	84,6	-	47,4	-	92,8
D5S346+BAT40	-	40,0	-	93,4	-	54,5	-	90,4
D5S346+TP53	-	46,7	-	91,2	-	46,7	-	91,2
BAT40+TP53	-	60,0	-	90,1	-	52,9	-	93,2

Sensibil. – sensibilidade; Especif. – especificidade; PB – painel de Bethesda (5 marcadores); PA – painel ampliado (7 marcadores).

Utilizando os mesmos cálculos para cada um dos critérios de Bethesda disponíveis, obtivemos o que mostra a **tabela 9**. Como se pode notar, na comparação dos resultados de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para os critérios de Bethesda, com relação a região microssatélite BAT25, nenhum dos critérios, isoladamente, pôde rivalizar com o resultado da frequência de instabilidade nesta região para a detecção do fenótipo RER, tanto com o uso do painel de Bethesda, quanto com o painel ampliado.

Quando, então, observamos a sensibilidade com relação aos critérios estudados, idade, localização do tumor, histologia, sincronicidade e padrão mucinoso, a localização do tumor apresentou 80,0% de sensibilidade, com relação ao painel ampliado. Ainda considerando o painel ampliado, a característica sincrônica apresentou especificidade de 93,4%, enquanto a localização, 65,9%. A localização do tumor apresentou 29,3% de VPP; e 95,3% de VPN. Quando avaliamos os critérios considerando apenas o painel de Bethesda, houve pequeno aumento para as variáveis calculadas. Isso pode ser observado na **tabela 9**.

Tabela 9 - Sensibilidade, Especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos critérios em relação ao RER. Avaliação dos parâmetros considerando 5 e 7 marcadores respectivamente.

CRITÉRIOS	SENSIBIL. (%)		ESPECIF. (%)		VPP (%)		VPN (%)	
	PB	PA	PB	PA	PB	PA	PB	PA
IDADE	25,0	26,7	68,9	69,2	12,5	12,5	83,8	85,2
LOCAL	81,2	80,0	66,7	65,9	31,7	29,3	95,2	95,3
HIST	50,0	46,7	70,0	69,3	22,9	20,0	88,7	88,7
SINCR	12,5	6,7	94,5	93,4	28,6	14,3	85,8	85,9
MUCOS	12,5	6,7	88,9	87,9	16,7	8,3	85,1	85,1
BAT25	100	93,3	96,6	96,6	94,2	82,4	100	98,9

Sensib. – sensibilidade; Especif. - especificidade; PB – Painel de Bethesda (5 marcadores); PA – Painel Ampliado (7 marcadores).

Quando calculamos esses parâmetros para a associação dos critérios dois a dois (**tabela 10**) apenas a associação entre o grau histológico e a sincronicidade apresentou valor maior que os obtidos com o marcador BAT25.

Tabela 10 – Sensibilidade, Especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos critérios associados dois a dois em relação ao RER. Avaliação dos parâmetros considerando os painéis de Bethesda e o painel ampliado de marcadores microssatélites.

CRITÉRIOS	SENSIBIL. (%)		ESPECIF. (%)		VPP (%)		VPN (%)	
	PB	PA	PB	PA	PB	PA	PB	PA
IDADE+LOCAL	18,7	20,0	92,2	83,5	23,1	21,4	86,4	86,4
IDADE+HIST	0	0	95,5	90,0	0	0	84,3	84,5
IDADE+SINC	0	0	95,5	92,3	0	0	84,8	85,0
IDADE+MUCOS	6,2	6,7	93,3	89,0	14,3	9,0	84,8	85,3
LOCAL+HIST	43,7	40,0	94,4	90,0	70,0	40,0	90,4	90,0
LOCAL+SINC	12,5	6,7	94,4	92,3	40,0	12,5	85,8	85,7
LOCAL+MUCO	12,5	6,7	93,3	91,2	33,0	11,1	85,7	85,6
HIST+SINC	6,2	0	98,9	95,6	50,0	0	85,6	85,3
HIST+MUCO	6,2	0	97,8	94,5	33,0	0	85,4	85,1
SINC+MUCO	6,2	0	97,8	95,6	33,0	0	85,4	85,3
BAT 25	100,0	93,3	96,6	96,6	94,2	82,4	100,0	98,9

Sensibil. – sensibilidade; Especif. – especificidade; PB – painel de Bethesda (5 marcadores); PA – painel ampliado (7 marcadores).

4.5. Associação entre a presença dos critérios de Bethesda e o fenótipo de erro de replicação (RER)

A **figura 15** mostra a distribuição dos pacientes portadores de RER(+) e RER(-) quanto à presença dos critérios estudados. Analisando a figura abaixo podemos notar que 8,5% dos casos (n=9) apresentaram, simultaneamente, três ou mais critérios de Bethesda. Embora isso nos leve a pensar que entre esses pacientes poderíamos ter um grande número de RER(+), apenas um caso foi positivo. Quando fazemos uma análise dos 106 casos utilizando o teste do Qui-quadrado (χ^2), observamos correlação significativa quanto ao número de critérios ($p=0,038$). Observamos que ter pelo menos dois critérios aumentam as chances de se encontrar um CCR com instabilidade de microssatélites. Se consideramos apenas o nosso grupo de estudo (n=75), ou seja, o grupo com pelo menos um dos critérios de Bethesda, não observamos tal correlação entre o número de critérios e a MSI.

Figura 15 – Distribuição dos grupos RER(+) e RER(-) de acordo com o número de critérios estudados, considerando o total de casos (n=106).

Para avaliar a significância dos critérios em relação ao fenótipo RER, considerando o grupo com pelo menos um critério de Behtesda (n=75), a **tabela 11** mostra as freqüências observadas entre fenótipo RER e cada uma das variáveis analisadas. Os critérios de Bethesda estão em negrito.

Tabela 11 - Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para o fenótipo RER(+) de acordo com os critérios de Bethesda, sexo e estadiamento de Dukes.

Variável	Categorias	RER (-) n=61	RER (+) n=14	OR bruto (I.C. 95%)	Valor de p ^a	OR ajustado ^c (I.C. 95%)
Idade	> 45 anos	33 (54,1)	10 (71,4)	—	0,237	1,41 (0,28;7,22)
	≤ 45 anos	28 (45,9)	4 (28,6)	0,47 (0,13;1,67)		
Sexo	M	33 (54,1)	6 (42,9)	—	0,448	
	F	28 (45,9)	8 (57,1)	1,57 (0,48;5,07)		
Dukes	A	9 (14,8)	3 (21,4)	—	0,480	
	B	17 (27,9)	6 (42,9)	1,59 (0,21;5,27)		
	C	26 (42,6)	3 (21,4)	0,35 (0,06;2,03)		
	D	9 (14,8)	2 (14,3)	0,67 (0,09;4,99)		
Localização^b	Distal	30 (50,9)	2 (14,3)	—	0,013	9,12 (1,33;62,70)
	Proximal	29 (49,2)	12 (85,7)	6,21 (1,17;32,78)		
Histologia	Grau I/II	33 (54,1)	7 (50,0)	—	0,782	
	Grau III	28 (45,9)	7 (50,0)	1,18 (0,37;3,77)		
Sincrônico	Negativo	55 (90,2)	13 (92,9)	—	0,755	
	Positivo	6 (9,8)	1 (7,1)	0,71 (0,8;6,37);		
Mucinoso	Negativo	50 (82,0)	13 (92,9)	—	0,316	0,22 (0,02;1,97)
	Positivo	11 (18,0)	1 (7,1)	0,35 (0,04;2,96)		
Número de Critérios	1	28 (47,5)	4 (28,6)	—	0,229	
	2	23 (39,0)	9 (64,3)	2,74 (0,75;10,06)		
	3 ou +	8 (13,6)	1 (7,1)	0,88 (0,09;8,97)		

" — " indica a casela de referência.

^a valor de p para o teste χ^2 .

^b dois casos com informação não recuperada.

^c modelo com as variáveis *Localização*, *Faixa de idade* e *Mucosecretor*.

De acordo com a **tabela 11**, a *localização do tumor* foi a única variável estatisticamente associada com o fenótipo RER(+) ($p=0,013$), sendo que 85,7% dos casos RER(+) localizaram-se no cólon proximal enquanto 14,3% no cólon distal. O *odds ratio* (OD) bruto para a chance de apresentar o fenótipo RER(+) em relação ao fenótipo RER(-) para os pacientes com malignidade no cólon proximal é de 6,2 (I.C. 95%: 1,3; 30,2). Com a análise multivariada controlada pela faixa de idade e padrão mucinoso, *localização do tumor* manteve-se significativa, apresentando um OD de 9,1 (I.C. 95%: 1,3; 62,7).

A mesma análise estatística foi realizada para o total de casos estudados ($n=106$) e também observamos que *localização do tumor* foi a única variável estatisticamente associada com o fenótipo positivo ($p = 0,001$), sendo que 80,0% dos casos com a neoplasia no cólon proximal apresentaram RER(+) e apenas 20% dos casos foram RER(-). O OR bruto para a chance de apresentar fenótipo RER(+) em relação ao fenótipo RER(-) para a malignidade no cólon proximal foi, nesse caso, igual a 8,28 (I.C. 95%: 2,2; 31,6). Na análise multivariada a *localização do tumor* manteve-se significativa, apresentando uma OR ajustada para idade, grau histológico e padrão mucinoso igual a 11,94 (I.C. 95%: 2,8; 51,6).

4.6 - Associação entre o sexo e os casos agrupados de acordo com a idade e os critérios anatomopatológicos

Quando avaliamos o sexo associando-o com a idade e os critérios avaliados, não observamos resultados estatisticamente significativos. Essas observações podem ser acompanhadas na **tabela 12**.

Tabela 12 – Associação entre sexo, a idade e os critérios anatomopatológicos dos pacientes com CCR

Variável	Categorias	N	SEXO		<i>p</i> ¹
			MASC	FEM	
Idade	≤ 45 anos	32	14	18	0,217
	> 45 anos	43	25	18	
Localização	Cólon proximal	41	21	20	0,871
	Cólon distal	32	17	15	
Diferenciação	Grau I/II	40	22	18	0,578
Histológica	Grau III	34	17	17	
Estadiamento do Tumor ²	A	12	3	9	0,098
	B	23	14	9	
	C	29	14	15	
	D	11	8	3	
Sincrônico	Sim	7	6	1	0,06
	Não	68	33	35	
Mucinoso	Sim	12	7	5	0,631
	Não	63	32	31	

¹Teste χ^2 - quadrado; ²Estadiamento de Dukes

4.7 - Associação entre a idade, estadiamento de DUKES e os critérios anatomopatológicos

Se dividirmos os pacientes em dois grupos, um com idade inferior ou igual a 45 anos e o outro apresentando casos com idade superior a 45 anos, observamos que 82,9% dos casos de cólon proximal apresentavam mais de 45 anos, enquanto 17,0%, idade inferior ou igual a 45 anos. Quando analisamos os casos acometendo o cólon distal, 25,0% dos pacientes tinham mais de 45 anos, e 75,0%, idade menor ou igual a 45 anos ($p \leq 0,001$; **tabela 13**).

Tabela 13 – Associação entre a idade, estadiamento de DUKES e os critérios anatomopatológicos

Variável	Categorias	N(%)	IDADE		p^1
			≤ 45 anos	> 45 anos	
Localização	Cólon proximal	41	7	34	<0,001
	Cólon distal	32	24	8	
Diferenciação histológica	Grau I/II	40	21	19	0,065
	Grau III	34	11	23	
Sincrônico	Sim	7	0	7	0,017
	Não	68	32	36	
Mucinoso	Sim	12	3	9	0,177
	Não	63	29	34	
Estadiamento do Tumor ²	A	12	5	7	0,628
	B	23	8	15	
	C	29	15	14	
	D	11	4	7	

¹Teste χ -quadrado; ²Estadiamento de Dukes

4.8 - Associação entre a localização da neoplasia, estadiamento de DUKES e os critérios anatomopatológicos

Quando associamos a localização da lesão com o grau de diferenciação histológica, não observamos resultados significativos.

Para o estadiamento de DUKES notamos que, no cólon proximal, a maior frequência foi de 31,7% de casos apresentando estadiamento de Dukes B e C, enquanto para o cólon distal, lesões com estadiamento de Dukes C foram mais frequentes (46,8%). A associação entre local e estadiamento apresentou uma correlação marginal ($p=0,056$), observando-se que houve maior número de lesões estadiadas como DUKES D em cólon proximal. Os demais estadios foram equivalentes para ambas localizações.

Dos 12 casos de CCR com padrão mucossecrator, 75% foram encontrados no cólon proximal, enquanto 25% no cólon distal. Quando associado a localização não foi observada resultados significativos.

Quanto aos 7 casos sincrônicos, todos localizavam-se no cólon proximal e apresentaram associação significativa com o mesmo ($p=0,014$). Estes e outros dados podem ser avaliados na **tabela 14**.

Tabela 14 – Associação entre a localização da neoplasia, estadiamento de DUKES e os critérios anatomopatológicos.

Variável	Categorias	N	LOCAL		<i>p</i> ¹
			PROX	DIST	
Diferenciação histológica	Grau I/II	40	22	18	0,825
	Grau III/indif	33	19	14	
Estadiamento do tumor ²	A	12	5	7	0,056¹
	B	22	13	9	
	C	28	13	15	
	D	11	10	1	
Padrão Mucinoso	Sim	12	9	3	0,150
	Não	61	32	29	
Sincrônico	Sim	7	7	0	0,014¹
	Não	66	34	32	

¹Teste χ -quadrado; ² Estadiamento de Dukes

4.9 - Associação entre a histologia, estadiamento de DUKES e critérios anatomopatológicos.

Não observamos associações significativas com relação a diferenciação histológica e os critérios apresentados na **tabela 15**.

Tabela 15 – Associação da diferenciação histológica, estadiamento de DUKES e os critérios anatomopatológicos

Variável	Categorias	N	DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA		<i>p</i> ¹
			I/II	III	
Estadiamento do Tumor ²	A	12	8	4	0,146
	B	23	13	10	
	C	29	11	18	
	D	11	8	3	
Sincrônico	Sim	7	6	1	0,071
	Não	68	34	34	
Padrão Mucinoso	Sim	12	8	4	0,312
	Não	63	32	30	

¹Teste χ -quadrado; ² Estadiamento de Dukes

4.10 - Associação entre o Estadiamento de DUKES e os critérios anatomopatológicos

Para o padrão mucinoso, metade dos casos com essa característica concentraram-se no grupo com DUKES C. Quanto a sincronicidade, os casos apresentaram-se distribuídos uniformemente entre as 4 classificações de DUKES.

Tabela 16 – Associação entre o Estadiamento de Dukes e os critérios anatomopatológicos.

Variável	Categorias	N	ESTADIAMENTO DE DUKES				<i>p</i> ¹
			A	B	C	D	
Padrão	Sim	12	1	4	6	1	0,700
Mucinoso	Não	63	11	19	23	10	
Sincrônico	Sim	7	2	1	2	2	0,447
	Não	68	10	22	27	9	

¹Teste χ -quadrado

4.11 - Associação entre a multicentricidade e o padrão mucinoso

Não observamos associação significativa com relação ao padrão mucossecretor (n=12) e a multicentricidade (n=7). Dos doze casos mucossecretores, apenas dois foram também sincrônicos. Os cinco casos sincrônicos restantes não apresentaram o padrão mucinoso ($p=0,341$).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas 7 regiões microssatélites em 106 amostras de adenocarcinoma colorretal (CCR) e suas respectivas margens livres de doença para a avaliação da instabilidade de microssatélites (MSI). Os casos estudados foram divididos em 2 grupos de acordo com a presença ou ausência dos seguintes critérios de Bethesda: localização do tumor no cólon proximal, presença de pelo menos 50 % de padrão mucinoso, idade abaixo de 45 anos ao diagnóstico de CCR, presença de tumores sincrônicos ou metacrônicos e grau histológico pouco diferenciado ou indiferenciado (RODRIGUEZ-BIGAS, *et al.*, 1997). Esses critérios foram avaliados e sugeridos em 1996 para identificar pacientes que poderiam ser testados para instabilidade de microssatélites como prováveis portadores da síndrome HNPCC. Como nosso estudo foi desenvolvido dentro de um serviço voltado à anatomia patológica, os critérios que nós avaliamos foram os obtidos nas análises dos laudos presentes no laboratório.

Em nossa casuística estudamos a instabilidade de microssatélites (MSI) mediante a utilização de um conjunto de marcadores, incluindo e ampliando a recomendação do ICG-HNPCC (BOLAND *et al.* 1998). Para isso, utilizamos a reação em cadeia pela polimerase (PCR), seguida pela avaliação e interpretação em gel de poliacrilamida desnaturante testando diversas concentrações de poliacrilamida e uréia. Christensen *et al.* (1999) analisaram a MSI usando diferentes métodos, gel de poliacrilamida revelados por nitrato de prata e por autoradiografia e PCR fluorescente, e concluíram que apesar da pequena variabilidade de interpretação dos resultados, os resultados finais foram idênticos (CHRISTENSEN, *et al.*, 1999). Outros autores utilizam técnicas semelhantes para observar o mesmo fenômeno (SCHLEGEL, *et al.*, 1995; ZHOU, *et al.*, 1997; BOCKER, *et al.*, 1997; SANTOS, *et al.*, 1999; DIETMAIER & HOFSTÄDTER, 2001). Cawkwell *et al.* (1994), fazendo análise de

microssatélites relatou o uso do PCR multiplex fluorescente como uma técnica apropriada para se distinguir a perda de heterozigose (LOH) da MSI e além disso, possibilitou a avaliação de vários loci simultaneamente. Mas, como em nosso estudo o método foi muito reprodutível, e além disso, utilizamos equipamentos de uso convencional em nosso laboratório, não consideramos necessária a utilização de outros métodos.

Nós avaliamos a instabilidade dos marcadores de Bethesda, BAT25 (íntron 16 do oncogene c-kit), BAT26 (íntron 5 do gene MSH2) , D2S123 (íntron do MSH2) , D5S346 (íntron do gene APC) e D17S250 (íntron do cromossomo 17), e, pelo fato de não haver estudos sobre a relevância de tais marcadores em nossa população, acrescentamos dois marcadores na análise; um marcador mononucleotídico proposto em um painel alternativo, BAT40 (íntron 2 do gene da 3- β -hidroxiesteróide dihidrogenase) , (DIETMAIER *et al.*, 1997), e TP53 (JONES, *et al.*, 1992), marcador localizado no cromossomo 17 (gene TP53). No caso específico de TP53, o seu uso foi motivado pelo fato do mesmo estar em um cromossomo sujeito a perdas alélicas em câncer colo-retal esporádico (PELTOMÄKI, *et al.*, 1993; KINZLER & VOGELSTEIN, 1996).

A MSI, característica do fenótipo de erro de replicação ou RER, é detectada mediante a análise de vários microssatélites e caracteriza-se pela mudança no tamanho de unidades repetitivas de nucleotídeos no DNA (microssatélites) devido à inserção ou deleção de nucleotídeos. Entretanto, não é claramente estabelecido o número de microssatélites instáveis que deve ser detectado em um indivíduo para que ele possa ser diagnosticado como portador deste fenótipo. De maneira geral, a detecção de um único microssatélite instável permite que se classifique o indivíduo como portador de instabilidade de microssatélites de baixo grau (MSI-L). Apenas indivíduos com dois ou mais microssatélites instáveis (MSI-H) são, em geral, diagnosticados como portadores do fenótipo RER. Todavia, há diferenças entre os diversos estudos com relação a quantidade de microssatélites instáveis que devem ser considerados para diagnosticar o indivíduo como portador do fenótipo RER

(AALTONEN, *et al.*, 1994; SCHLEGEL, *et al.*, 1995; THIBODEAU *et al.*, 1998; GAFÁ *et al.*, 2000; PERCESEPE *et al.*, 2001). Quando se usa mais do que 5 marcadores para o diagnóstico, encontramos na literatura uma discrepância de 10 a 40% de loci instáveis para considerarmos tal fenótipo. Outro ponto muito questionável é quanto ao número mínimo de microssatélites que devem ser pesquisados para o diagnóstico do RER (PELTOMÄKI *et al.*, 1993; IONOV *et al.*, 1993; AALTONEN *et al.*, 1993; THIBODEAU *et al.*, 1993; AALTONEN, *et al.*, 1994; SCHLEGEL, *et al.*, 1995; DIETMAIER *et al.*, 1997; KRAJINOVIC *et al.*, 1998; THIBODEAU *et al.*, 1998; CRAVO, *et al.*, 1999; LOUKOLA *et al.*, 2001; PERCESEPE *et al.*, 2001; WÜLLENWEBER, *et al.*, 2001; RAEDLE, *et al.*, 2001).

Esta indefinição tem motivado os diferentes grupos de pesquisa a procurar estabelecer um painel ideal e altamente específico para CCR e em particular para HNPCC. Em 1997 foram sugeridos diversos marcadores que parecem melhor detectar os casos RER(+) (DIETMAIER, *et al.*, 1997 ; BOCKER , *et al.*, 1997). Neste mesmo ano o ICG-HNPCC sugeriu um painel mínimo para detecção dos casos RER(+) conhecido atualmente como marcadores de Bethesda (BOLAND, *et al.*, 1998).

É relevante notar a presença dos marcadores BAT25 e BAT26 neste painel. Os dois são compostos de repetições mononucleotídicas e que parecem ser, em geral, mais afetadas pela instabilidade. Essa suscetibilidade à instabilidade foi inicialmente descrita por Ionov *et al.*, em 1993. A importância desses marcadores está na facilidade em analisá-los, já que eles apresentam características quase monomórficas, sendo inclusive sugerida a análise de alguns desses marcadores sem o correspondente tecido normal (HOANG, *et al.*, 1997; ZHOU, *et al.*, 1997).

Em nosso estudo o fenótipo RER(+) (MSI-H) foi definido quando 30% (3/7) ou mais dos marcadores utilizados apresentaram-se instáveis. Seguindo a recomendação de Boland *et al.* (1998). Dentre os 106 pacientes analisados, observamos a instabilidade em 15 pacientes (14,15%). Tais resultados estão de

acordo com os obtidos em outros estudos que encontraram de 8 a 30% de RER(+) em pacientes com CCR (PELTOMÄKI *et al.*, 1993; THIBODEAU *et al.*, 1993; SCHLEGEL, *et al.*, 1995; DIETMAIER *et al.*, 1997; KRAJINOVIC *et al.*, 1998; THIBODEAU *et al.*, 1998;; GAFÁ *et al.*, 2000; LOUKOLA *et al.*, 2001; PERCESEPE *et al.*, 2001; WÜLLENWEBER, *et al.*, 2001; RAEDLE, *et al.*, 2001).

É interessante notar que os critérios de Bethesda utilizados em nosso estudo parecem realmente selecionar pacientes com maior probabilidade de apresentar o fenótipo RER, uma vez que apenas um dentre os 31 (3,3%) pacientes sem critérios de Bethesda apresentou o fenótipo, enquanto 14 dos 75 pacientes (18,7%) com pelo menos um dos critérios de Bethesda apresentaram o mesmo diagnóstico. Este número está de acordo CRAVO, *et al.*, 1999, mas quando se todos os critérios de Bethesda são aplicados, números superiores a esse são obtidos para o teste de MSI (WÜLLENWEBER *et al.*, 2001).

Quando partimos para a análise individual dos marcadores, observamos que os microssatélites BAT25 e BAT26, apresentaram a melhor sensibilidade em reconhecer o fenótipo RER(+) (93,33% e 86,67% respectivamente). Na verdade, considerando apenas os pacientes que apresentaram pelo menos um dos critérios de Bethesda, a sensibilidade do BAT25 foi de 100% e a do BAT26 de 92,8%. Resultados semelhantes foram observados em recente trabalho que, avaliando o painel de 5 marcadores de Bethesda propõe o uso apenas do microssatélite BAT26 como suficiente para classificar os casos RER(+) (LOUKOLA, *et al.*, 2001). No mesmo estudo os autores avaliaram a expressão dos genes de reparo através da imunohistoquímica e demonstraram que os casos de CCR com mutação em um dos genes de reparo MLH1, MSH2 e MSH6, apresentavam tanto BAT26 como BAT25 instáveis, sugerindo que tanto um marcador como o outro são muito sensíveis para detecção de alterações nos três principais genes de reparo envolvidos no HNPCC. Assim como em nosso trabalho, a especificidade destes marcadores também tem se mostrado elevada em diversos estudos publicados, principalmente em relação ao

microssatélite BAT26 (THIBODEAU, *et al.*, 1998; BRUECKL, *et al.*, 2000; ZHOU, *et al.*, 1997; DIETMAIER, *et al.*, 1997; HOANG, *et al.*, 1997; SAMOWITZ, *et al.*, 1999; SALOVAARA, *et al.*, 2000).

Refletindo ainda a complexidade da definição do fenótipo RER(+), nossos resultados permitem o diagnóstico de 14 pacientes (18,6%) RER(+), com a utilização dos 7 marcadores, mas o número de pacientes com o mesmo diagnóstico passa para 16 (21,3%) se apenas os marcadores de Bethesda forem considerados. Esta diminuição de pacientes com diagnóstico de RER(+) com o aumento do painel, contrasta com dados da literatura que descrevem o aumento da detecção da instabilidade de microssatélites com a ampliação do painel estudado (DIETMAIER, *et al.*, 1997; THIBODEAU, *et al.*, 1998). Estas observações salientam a importância tanto da escolha dos marcadores, quanto do escore utilizado para a classificação dos casos, tanto mais, quando observamos que um dos pacientes classificados como RER(+) com o uso dos 7 marcadores apresentava 4 critérios de Bethesda (localização da neoplasia no cólon proximal, histologia pouco diferenciada, lesões sincrônicas e padrão mucinoso da lesão). Talvez, portanto, o mais indicado seja a ampliação do painel de Bethesda apenas nos casos MSI-L.

É ainda curioso observar que a associação dos diversos marcadores 2 a 2 não aumentou nem a sensibilidade e nem a especificidade de detecção do fenótipo RER quando comparadas ao BAT25.

Embora a literatura venha sugerindo o BAT26 como marcador isolado, suficiente para o diagnóstico do fenótipo RER, nossos dados mostram uma superioridade discreta do BAT25 sobre o BAT26. Isto poder-se-ia dever à heterogeneidade da população brasileira em relação à de estudos já publicados ou se tratar apenas de uma variação amostral.

A sensibilidade do marcador BAT26 poderia estar relacionada à sua localização em um sítio de splicing no íntron 5 do gene MSH2 (LIU *et al.*, 1994), que é um gene associado ao fenótipo RER(+). Entretanto, o BAT25 não se localiza em um gene que tenha correlação conhecida com o fenótipo. Sua

localização é no íntron 16 do proto oncogene c-kit (PARSONS, *et al.*, 1995; ICHIKAWA, *et al.*, 2001). Este proto oncogene codifica uma proteína denominada KIT que funciona como um receptor transmembrana para o “stem cell factor” (SCF). A expressão aberrante deste oncogene tem sido descrita em vários tipos de neoplasias como em mama (HINES, *et al.*, 1999), pulmão (TURNER, *et al.*, 1992), próstata (SIMAK, *et al.*, 2000), sendo característico do tumor estromal gastrointestinal ou GIST (HIROTA, *et al.*, 1998). Além destes, também em CCR Bellone *et al.* encontraram ativação aberrante deste gene (BELLONE, *et al.*, 1997; BELLONE *et al.*, 2001). A freqüente alteração do BAT25 em CCR com RER(+) poderia permitir a especulação de um papel para este receptor na biologia das células tumorais em CCR.

De qualquer forma é interessante ainda observar a aparente especificidade dos marcadores BAT25 e BAT26 para o CCR e também para outras neoplasias envolvidas no HNPCC (AALTONEN, *et al.*, 1993; JÄRVINEN, *et al.*, 1995; PAPADOPOULOS, *et al.*, 1995; KINZLER & VOGELSTEIN, 1996; DIETMAIER, *et al.*, 1997; MIYAKI, *et al.*, 1997; CRAVO, *et al.*, 1999a; MACDONALD, *et al.*, 2001). Ambos tiveram em nossa casuística sensibilidade maiores que os outros marcadores estudados. Entretanto, este não é o fenômeno encontrado em qualquer neoplasia. Estudos realizados em cânceres de mama mostraram que se o painel de marcadores de Bethesda for usado neste tipo de tumor, apenas o D17S250 aparece como o marcador mais susceptível para essa análise seguido do TP53 que não pertence ao painel. Os marcadores BAT25 e BAT26 não identificaram nenhuma instabilidade em mama (SIAH, *et al.*, 2000). Em recente estudo em carcinoma de ovário, Gras *et al.* verificaram que MSI não foi um evento freqüente neste tipo de neoplasia (GRAS, *et al.*, 2001); achados diferentes foram observados por SOOD *et al.*, que analisou o painel de Bethesda e sugeriu um marcador adicional, NME1, um dinucleotídeo que, juntamente com os marcadores de Bethesda, permite a identificação dos tumores de ovário com MSI-H, apenas usando os 6 marcadores. Vale lembrar que esse painel auxilia na identificação do fenótipo

RER(+), mas ainda não há um consenso quanto ao grupo de marcadores necessários para detectar MSI em tumores de ovário (SOOD, *et al.*, 2001).

Observamos em nosso estudo que o marcador com menor sensibilidade em detectar os casos RER(+) foi D5S346, um dinucleotídeo localizado em um íntron do gene APC, que demonstrou grande frequência de perda de heterozigose (6 casos dos 106 analisados). Isto poderia estar associado a localização deste marcador em uma região do gene supressor de tumor APC, cuja perda de heterozigose é um evento freqüente em neoplasias (WEINBERG & HANAHAN, 1996). Isto também foi observado por Bocker *et al.* quando analisou o D5S346, inferindo que a interpretação de LOH e MSI de loci como esse pode causar confusões, principalmente se a microdissecção do tumor não for realizada (BOCKER, *et al.*, 1997). Diferente de nós, esse mesmo estudo relatou que na classificação dos casos MSI-L, muitos dos loci microssatélites alterados localizavam-se no cromossomo 5, como o D5S346, evento não observado em nosso estudo, já que tivemos apenas 2 casos classificados como MSI-L no grupo sem critérios pela análise do D5S346 e nenhum no grupo com critérios.

Com relação aos marcadores D17S250, D2S123, BAT40 e TP53 eles não variaram muito em identificar os casos MSI-H, quando avaliadas sensibilidade (71 a 80%) e especificidade (91 a 98%). Dentre estes marcadores os que apresentaram LOH no grupo com pelo menos um critério, foram o TP53 em três casos e o D2S123 em 1 caso. Esse evento não foi muito freqüente em nossa casuística, sendo que o marcador TP53 foi o que apresentou maior número de casos com LOH, depois do D5S346, e isso pode ser justificado também devido a sua localização no gene supressor de tumor TP53, sugerindo que esses tumores talvez sigam um outro caminho para o desenvolvimento da neoplasia.

Quando fazemos uma nova análise, dividindo agora o grupo em MSI-H, MSI-L e MSS, se consideramos o estudo dos 7 marcadores, então obtemos 14 pacientes MSI-L no grupo com critérios e neste observamos que os

marcadores mais alterados foram D17S250, TP53. Considerando, então, a análise com 5 marcadores de Bethesda, passamos a ter 11 casos com MSI-L, ao invés de 14 casos anteriormente classificados. Esse número maior no grupo com 7 marcadores é devido a presença de MSI em TP53 e em BAT40, e como esses marcadores não pertencem ao painel de Bethesda, os casos passaram a ser MSS.

MSI-L ocorre em 10-15% dos CCR e é definida pela presença de instabilidade em um número limitado de marcadores. Até recentemente, a etiologia do subgrupo MSI-L era incerta, mas, tumores MSI-L podem estar associados com cânceres de indivíduos com mutação no gene de reparo do DNA, MSH6 (PAPADOPOULOS, *et al.*, 1995). Outros estudos sugerem que este fenótipo poderia resultar de alterações epigenéticas, como a hipermetilação do promotor de MLH1, levando ao silenciamento da transcrição e tradução desse gene (CUNNINGHAM, *et al.*, 1998), tido como um dos principais mecanismos envolvidos nos CCRs esporádicos com MSI-H (HERMAN, *et al.*, 1998; WHEELER, *et al.*, 1999).

Ainda outro mecanismo proposto envolve o gene O-6-metilguanina metiltransferase ou MGMT, também relacionado ao reparo do DNA. Este gene pode apresentar sua região promotora hipermetilada, e predispor o tumor ao aumento de mutações em outros genes, como por exemplo, o gene K-ras, comprometendo todo o sistema de reparo (WHITEHALL, *et al.*, 2001; KAMBARA, *et al.*, 2001). Com esses dados podemos sugerir maior atenção para esses casos, pois eles podem conduzir a identificação de diferentes caminhos na biologia da doença.

Um ponto interessante a ser comentado é quanto a variação alélica observada nos diversos marcadores microssatélites atualmente em estudo. Pyatt *et al.* (1999) afirmaram que podem ocorrer variações alélicas em aproximadamente 13% no locus BAT26 e cerca de 18% no locus BAT25 em indivíduos afro-americanos, observação que não ocorreu em estudo realizado por Ichikawa *et al.* (2001) em uma população com 100 doadores japoneses

(PYATT, *et al.*, 1999; ICHIKAWA, *et al.*, 2001). Samowitz *et al.*, também encontraram polimorfismos com freqüência de 7,7% em afro-americanos, sendo muito diferente da encontrada em caucasianos, de 0,08% (SAMOWITZ, *et al.*, 1999). Ao analisarmos nossos casos, pareamos sempre tecido normal e tumoral e não observamos nenhuma alteração com relação ao tamanho dos alelos, a não ser quando os casos apresentaram instabilidade desses loci mononucleotídicos.

Finalmente, analisando os critérios de Bethesda obtidos dos laudos anatomo-patológicos, observamos associação estatisticamente significativa entre o fenótipo RER(+) e a localização do tumor ($p=0,013$). Esses achados estão de acordo com os de outros grupos relatados na literatura (PELTOMÄKI, *et al.*, 1993a; THIBODEAU, *et al.*, 1993; KIM, *et al.*, 1994; SCHLEGEL, *et al.*, 1995; THIBODEAU, *et al.*, 1998; CRAVO *et al.*, 1999; JERNVALL, *et al.*, 1999; GERVAZ, *et al.*, 2002). Por outro lado, em nossa casuística, nenhum dos outros critérios mostrou associação significativa com RER, contrastando com diversos achados da literatura, que relatam a associação de idade (KIM, *et al.*, 1994; SAMOWITZ *et al.*, 1995; NAIDOO, *et al.*, 2000; WÜLLENWEBER, *et al.*, 2001), grau histológico pouco diferenciado (JERNVALL *et al.*, 1999; PERCESEPE *et al.*, 2001), sincronicidade (GRYFE *et al.*, 2000) e padrão muinoso (KIM *et al.*, 1994; CRAVO *et al.*, 1999; GAFÁ *et al.*, 2000). Esta falta de associação provavelmente se deve apenas ao tamanho da amostra estudada, embora não se possa excluir por completo um comportamento biológico diferente do CCR na população brasileira.

Apesar de não observarmos essa correlação significativa, a idade média do grupo MSI-H é menor que do MSI-L/MSS sugerindo que o evento possa ocorrer em nossa população com uma idade um pouco maior do que a observada (45 anos), elucidando a necessidade de aumentar o número de casos utilizando, talvez, outro escore para idade.

Pacientes com neoplasia RER(+) localizada no cólon proximal têm apresentado melhor prognóstico e resposta a quimioterapia. Estudos mostram

que indivíduos com fenótipo RER(+) e localização no cólon proximal apresentam melhor sobrevida que indivíduos com fenótipo RER(-) com a mesma localização (JERNVALL *et al.*, 1999, ELSALEH *et al.*, 2000). Alguns autores também associam uma melhor resposta a quimioterapia adjuvante com 5-fluorouracil em indivíduos apresentando o fenótipo RER(+) (ELSALEH, *et al.*, 2000; WATANABE *et al.*, 2001). Desta forma, o estudo do fenótipo RER de um indivíduo pode ser importante para determinar os fatores prognósticos biológicos e essa identificação pode permitir um refinamento na seleção de pacientes com CCR que poderão se beneficiar com futuras estratégias terapêuticas.

6 – CONCLUSÕES

1 - A instabilidade de microssatélites de alto grau (MSI-H ou fenótipo RER +) foi observada em 15 (14,2%) dos 106 pacientes analisados com 7 marcadores microssatélites, 19 (17,9%) pacientes foram considerados com instabilidade de baixo grau (MSI-L) e 72 (67,9%) foram estáveis (MSS);

2 – Analisando apenas o grupo de 75 pacientes com pelo menos um dos critérios de Bethesda encontramos 14 (18,6%) dos pacientes considerados MSI-H e 14 (18,6%) de pacientes MSI-L.

3 – Com a análise do painel dos 5 marcadores de Bethesda observamos que 16 (21,3%) dos pacientes do grupo com pelo menos um dos critérios de Bethesda analisados foram considerados MSI-H e 11 (14,6%) classificados como MSI-L;

4 - Ao avaliarmos os painéis com 5 e 7 regiões microssatélites, observamos que o BAT25 apresentou melhor sensibilidade, seguido pelo BAT26, comportamento este que não se alterou quando os demais marcadores foram associados dois a dois;

5 – Observou-se associação de MSI-H com a localização proximal da neoplasia.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTONEN, L.A., PELTOMAKI, P., LEACH, F.S., SISTONEN, P., PYLKKAENEN, L., MECKLIN, J.P., JAERVINEN, H., POWELL, S.M., JEN, J., HAMILTON, S.R., PETERSON, G.M., KINZLER, K.W., VOGELTEIN, B., De la CHAPELLE, A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. **Science**, v.260, p.812-6, 1993.
- AALTONEN, L.A., PELTOMAKI, P., MECKLIN J.P., JÄRVINEN, H., JASS, J.R., GREEN, J.S., LYNCH, H.T., WATSON, P., TALLQVIST, G., JUHOLA, M., SISTONEN, P., HAMILTON, S.R., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN B., de la CHAPELLE, A. Replication erros in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. **Cancer Research**, v.54, p.1645-8, 1994.
- AARNIO, M., MECKLIN, J.P. ALTONEN, L., NYSTRON LAHTI, M., JARVINEN, H.J. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. **Int. J. Cancer**, v.64, p.430-3, 1995.
- ACHARYA, S., WILSON, T., GRADIA, S., KANE, M.F., GUERRETTE, S., MARSISCHKY, G.T., KOLODNER, R., FICHEL, R. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.13629-34, 1996.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1997. cap. 24, p.1255-94.
- AQUILINA, G., BIGNAMI, M. Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. **J. Cell. Physiol.**; v.187, p.145-54, 2001.

- BABA, S. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Dis. Colon Rectum**, v.40, (suppl), p.S86-95, 1997.
- BELLONE, G., CARBONE, A., SIBONA, N., BOSCO, O., TIBAUDI, D., SMIRNE, C., MARTONE, T., GRAMIGNI, C., CAMANDONA, M., EMANUELLI, G., RODECK, U. Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. **Cancer Res.**, v.61, p.2200-06, 2001.
- BELLONE, G., SILVESTRI, S., ARTUSIO, E., TIBAUDI, D., TURLETTI, A., GEUNA, M., GIACHINO, C., VALENTE, G., EMANUELLI, G., RODECK, U. Growth stimulation of colorectal carcinoma cells via the c-kit receptor is inhibited by TGF- β 1. **J. Cell. Physiol.**, v.172, p.1-11, 1997.
- BISHOP, J.M. The molecular genetics of cancer. **Science**, v.235, p.305-11, 1987.
- BISHOP, J.M., WEINBERG, R.A. **Scientific american molecular oncology**. New York: Scientific American, Inc., p.1-13, 1996.
- BLACKWELL, L.J., MARTIK, D., BJORNSON, K.P., BJORNSON, E.S., MODRICH, P. Nucleotide-promoted release of hMutS α from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. **J. Biol. Chem.**; v.273, n.48, p.32055-62, 1998.
- BOCKER, T., DIERMANN, J., FRIEDL, W., GEBERT, J., HOLINSKI-FEDER, E., KARNER-HANUSCH, J., KNEBEL-DOEBERITS, M.V., KOELBLE, K., MOESLEIN, G., SCHACKERT, H-K., WIRTZ, H-C., FISHEL, R., RÜSCHOFF, J. Microsatellite instability analysis: A multicenter study for reliability and quality control. **Cancer Research**, v.57, p.4739-43, 1997.

- BOLAND, C.R. Hereditary Nonpolyposis colorectal cancer. In: KINZLER, K.W.& VOGELSTEIN, B. **The genetic basis of human cancer**. New York: McGraw-Hill, 1998. p.565-87.
- BOLAND, R., MARRA, G. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. **J. Natl. Cancer Inst.**; v.87, p.1114-25, 1995.
- BOLAND, R., TRONCALE, F.J. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. **An. Intern. Med.**, v.100, n.5, 1994.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2001/estimativas.html>. Acesso em: 23 abril 2002.
- BRENTNALL, T.A., CHEN, R., LEE, J.G., KIMMEY, M.B., BRONNER, M.P., HAGGITT, R.C., KOWDLEY, K.V., HECKER, L.M., BYRD, D.R. Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. **Cancer Res.**, v.55, p.4264-7, 1995.
- BRONNER, C.E., BAKER, S.M., MORRISON, P.T., WARREN, G., SMITH, L.G., LESCOE, M.K., KANE, M., EARABINO, C., LIPFORD, J., LINDBLOM, A., TANNERGARD, P., BOLLAG, R.J., GODWIN, A.R., WARD, D.C., NORDENSKJOLD, M., FISHEL, R., KOLODNER, R., LISKAY, R.M. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue Hmlh1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature**, v.368, p.258-61, 1994.

- BRUECKL, W.M., LIMMERT, T., BRABLETZ, T., GUENTHER, K., JUNG, A ., HERMANN, K., WIEST, G.H., KIRCHNER, T., HOHENBERGER, W., HAHN, E.G., WEIN, A . Mismatch repair deficiency in sporadic synchronous colorectal cancer. **Anticancer Res.**, v.20 (6C), p.4727-32, 2000.
- BURT, R.W., SAMOWITZ, W.S. The adenomatous polyp and the hereditary polyposis syndromes. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v.17, p.657, 1988.
- CARETHERS, J.M. The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v.25, p.755-73, 1996.
- CAWKWELL, L., QUIRKE, P. The molecular biology and genetics of colorectal cancer. In: WILLIAMS N.S. **Colorectal cancer**. New York: Churchill Livingstone, 1996. p.1-19.
- CHRISTENSEN, M., SUNDE, L., BOLUND, L., ORNTOFT, T.F. Comparison of three methods of microsatellite detection. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.59, p.167-78, 1999.
- COUNTS, J., GOODMAN, J. Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. **Cell**, v.83, p.13-5, 1995.
- CRAVO, M., LAGE, P., ALBUQUERQUE, C., CHAVES, P., CLARO, I., GOMES, T., GASPAR, C., FIDALGO, P., SOARES, J., NOBRE-LEITÃO, C. BAT-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: A correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes. **J. Pathol.**, v.188, p.252-7, 1999a.

- CRAVO, M.L., FIDALGO, P.O., LAGE, P. A., ALBUQUERQUE, C.M., CHAVES, P.P., CLARO, I., GOMES, T., GASPAR, C., SOARES, J.O., NOBRE-LEITÃO, C. Validation and simplification of Bethesda guidelines for identifying apparently sporadic forms of colorectal carcinoma with microsatellite instability. **Cancer**, v.85, p.779-85, 1999.
- CUNNINGHAM, J.M., CHRISTENSEN, E.R., TESTES, D.J., KIM, C-Y, ROCHE, P.C., BURGART, L.J., THIBODEAU, S.N. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. **Cancer Res.**, v.58, p.3455-60, 1998.
- DEBRAWERE, H., GENDREL, C.G., LECHAT, S., DUTREIX, M. Differences and similarities between several tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellites. **Biochimie**, v.79, p.577-86, 1997.
- DIETMAIER, W., HOFSTÄDTER, F. Detection of Microsatellite instability by real time PCR and Hybridization probe melting point analysis. **Lab Invest**, v.81, p.1453-56, 2001.
- DIETMAIER, W., WALLINGER, S., BOCKER, T., KULLMANN, F., FISHEL, R., RÜSCHOFF, J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. **Cancer Res.**, v.57, p.4749-56, 1997.
- ELSALEH, H., JOSEPH, D., GRIEU, F., ZEPS, N., SPRY, N., IACOPETTA, B. Association of tumor site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. **Lancet**, v.355, p.1745-50, 2000.
- FEARON, E.R., VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v.61, p.759-67, 1990.

- FEARON, E.R., GRUBER, S.B. Molecular abnormalities in colon and rectal cancer
In: MENDELSON, J., HOWLEY, P.M., ISRAEL, M.A., LIOTTA, L.A. **The molecular basis of cancer**. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p.289-312.
- FEARON, E.R. Cancers of the gastrointestinal tract In: De VITA Jr., V.T., HELLMAN, S., ROSEMBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology**. Philadelphia: J.B. Lippincott, 2001. p.1038-51.
- FEARON, E.R. DCC: is there a connection between tumorigenesis and cell guidance molecules?. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1288, p.M17, 1996.
- FISHEL, R. Signaling mismatch repair in cancer. **Nature Med.**, v.5, p.1239-41, 1999.
- FISHEL, R. The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Revising the mutator hypothesis. **Cancer Research**, v.61, p.7369-74, 2001.
- FISHEL, R., LESCOE, M.K., RAO, M.R.S., COPELAND, N.G., JENKINS, N.A., GARBER, J., KANE, M., KOLODNER, R. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell**, v.75, p.1027-38, 1993.
- FISHEL, R., KOLODNER, R.D. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. **Curr. Op. Genet. Dev.**, v.5, p.382-95, 1995.
- FRAZIER, M.L., SU, L.-K., AMOS, C.I., LYNCH, P.M. Current applications of genetic technology in predisposition testing and microsatellite instability assays. **J. Clin. Oncol**, v.18, p.70s-74s, 2000.

- GAFÁ, R., MAESTRI, I., MATTEUZZI, M., SANTINI, A., FERRETTI, S., CAVAZZINI, L., LANZA, G. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. **Cancer**, v.89, p.2025-37, 2000.
- GERVAZ, P., CEROTTINI, J-P., BOUZOURENE, H., HAHNLOSER, D., DOAN, C.L., BENHATTAR, J., CHAUBERT, P., SESIC, M., GILLET, M., CARETHERS, J.M. Comparison of microsatellite instability and chromosomal instability in predicting survival of patients with colorectal cancer. **Surgery**, v.131, p.190-7, 2002.
- GOELZ, S.E.; VOGELSTEIN, B.; HAMILTON, S.R.; FEINBERG, A.P. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. **Science**, v.228, p.187-90, 1985.
- GRADIA, S., ACHARYA, S., FISHEL, R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. **Cell**, v.91, p.995-1005, 1997.
- GRAS, E., CATASUS, L., ARGÜELES, R., MORENO-BUENO, G., PALACIOS, J., GAMALLO, C., MATIAS-GUIU, X., PRAT, J. Microsatellite instability, MLH-1 promoter hypermethylation, and frameshift mutations at coding mononucleotide repeat microsatellites in ovarian tumors. **Cancer**, v.92, p.2829-36, 2001.
- GRYFE, R., KIM, H., HSIEH, E.T.K., ARONSON, M.D., HOLOWATY, E.J., BULL, S.B., REDSTON, M., GALLINGER, S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. **N. Engl. J. Med.**, v.342, p.69-77, 2000.

HAMILTON S.R., AALTONEN, L.A. **World health classification of tumors pathology & genetics of tumors of the digestive system**. Lyon: IARC Press, 2000. p.110.

HARFE, B.D., MINESINGER, B.K., JINKS-ROBERTSON, S. Discrete in vivo roles for the MutL homologs Mlh2p and Mlh3p in the removal frameshift intermediates in budding yeast. **Curr. Biol.**, v.10, p.145-8, 2000.

HERMAN, J.G., UMAR, A., POLYAK, K., GRAFF, J.R., AHUJA, N., ISSA, J-P. J., MARKOWITZ, S., WILLSON, J.K.V., HAMILTON, S.R., KINZLER, K.W., KANE, M.F., KOLODNER, R.D., VOGELSTEIN, B., KUNKEL, T.A., BAYLIN, S.B. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.6870-5, 1998.

HINES, S.J., LITZ, J.S., KRYSKAL, G.W. Coexpression of c-kit and stem cell factor in breast cancer results in enhanced sensitivity to members of the EGF family of growth factors. **Breast Cancer Res.**, v.58, p.1-10, 1999.

HIROTA, S., ISOZAKI, K., MORIYAMA, Y., HASHIMOTO, K., NISHIDA, T., ISHIGURO, S., KAWANO, K., HANADA, M., KURATA, A., TAKEDA, M., TUNIO, G.M., MATSUZAWA, Y., KANAKURA, Y., SHINOMURA, Y., KITAMURA, Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. **Science**, v.279, p.577-80, 1998.

HOANG, J-M., COTTU, P.H., BENEDICTE, T., SLMON, R.J., THOMAS, G., and HAMELIN, R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. **Cancer Res.**, v.57, p.300-3, 1997.

- IACCARINO, I., MARRA, G., PALOMBO, F., JIRICNY, J. hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutS α . **EMBO J.**, v.17, p.2677-86, 1998.
- ICHIKAWA, A., SUGANO, K., FUJITA, S. DNA variants of BAT25 in Japanese, a locus frequently used for analysis of microsatellite instability. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v.31(7), p.346-8, 2001.
- ILIAS, M., STRAUB, J., TOMLINSON, I.P.M., BODMER, W.F. Genetic Pathways in Colorectal and other cancers. **Eur. J. Cancer**, v.35, p.1988-2002, 1999.
- IONOV, Y., PEINADO, M.A., MALKHOSYAN, S., SHIBATA, D., PERUCHO, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repetitive sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. **Nature**, v.363, p.558-76, 1993.
- JACOB, S., PRAZ, F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. **Biochimie**, v.84, p.27-47, 2002.
- JÄRVINEN, H.J., MECKLIN, J.P., SISTONEN, P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Gastroenterology**, v.108, p.1405 -11, 1995.
- JASS, J.R. Diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Histopathology**, v.32, p.491-97, 1998.
- JERNVALL, P., MÄKINEN, M.J., KARTTUNEN, T.J., MÄKELA, J., VIHKO, P. Microsatellite instability: impact on cancer progression in proximal and distal colorectal cancers. **Eur. J. Cancer**, v.35(2), p.197-201, 1999.

- JIRICNY, J. Eukaryotic mismatch repair: an update. **Mutat. Res.**, v.409, p.107-21, 1998.
- JIRICNY, J. NYSTRÖM-LAHTI, M. Mismatch repair defects in cancer. **Current Opinion in Genet. & Develop.**, v.10, p.157-61, 2000.
- JONES, M.H., NAKAMURA, Y. Detection of loss of heterozygosity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism. **Genes Chromosomes Cancer**, v.5, p.89-90, 1992.
- KAMBARA, T., MATSUBARA, N., NAKAGAWA, H., NOTOHARA, K., NAGASAKA, T., YOSHIMO, T., ISOZAKI, H., SHARP, G.B., SHIMIZU, K., JASS, J., TANAKA, N. High frequency of low-level microsatellite instability in early colorectal cancer. **Cancer Research**, v.61, p.7743-6, 2001.
- KENNEDY, E.P., HAMILTON, R. Genetics of colorectal cancer. **Semin. Surg. Oncol.**, v.15, p.126-30, 1998.
- KIM, H., JEN, J., VOGELSTEIN, B., HAMILTON, R. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. **Am. J. Pathol.**, v.145, p.148-56, 1994.
- KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B (Ed.). Colorectal tumors. In: _____. **The genetic basis of human cancer**. New York: McGraw-Hill, 1998. p.565-87.
- KINZLER, K.W. & VOGELSTEIN, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**, v.87, p.159-170, 1996.

- KINZLER, K.W., NILBERT, M.C., VOGELSTEIN, B., BRYAN T.M., LEVY D.B., SMITH K.J., PREISINGER A.C., HAMILTON S.R., HEDGE P., MARKHAM A.; CARLSON M., JOSLY G., GRODEN J., WHITE R., MIKI Y., MIYOSHI Y., NISHISHO I., NAKAMURA Y. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. **Science**, v.251 (4999), p.1366-70, 1991.
- KOLODNER, R.D. Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. **Trends Biochem. Sci.**, 1995; v.20, p.397-401.
- KRAJINOVIC, M., RICHER, C., GORSKA-FLIPOT, I., GABOURY, L., NOVAKOVIC, I., LABUDA, D., SINNETT, D. Genomic loci susceptible to replication errors in cancer cells. **Br. J. Cancer**, v.78(8), p.981-5, 1998.
- LEACH, F.S., NICOLAIDES, N.C., PAPADOPOULOS, N., LIU, B., JEN, J., PARSONS, R., PELTOMÄKI, P., SISTONEN, P., AALTONEN, L.A., NYSTRÖM – LAHTI, M., GUAN, X.Y., ZHANG, J., MELTZER, P.S., YU, J., KAO, CHEN D. J., CEROSALETI, K.M., FOURNIER, R.E.K., TODD, S., LEWIS T., LEACH, R.J., NAYLOR, S.L., WEISSENBAACH, J., MECKLIN, J-P., JARVINEN, H., PETERSEN, G.M., HAMILTON, S.R., GREEN J., JASS, J., WATSON, P., LYNCH, H.T., TRENT, J.M., CHAPELLE, A., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cell**, v.75 (6), p.1215-25, 1993.
- LEIS, J.F., LIVINGSTON, D.M. The tumor suppressor genes and their mechanisms of action In: BISHOP, J.M.; WEINBERG, R.A. **Scientific American Molecular Oncology**. New York: Scientific American, Inc., 1996. p.111-41.

- LEVINSON, G., GUTMAN, G.A. High frequencies of short frameshifts in poly CA/TG tandem repeats dorne by bacteriophage M13 escherichia coli K12. **Nucleic Acids Res.**, v.15, p.5323-38, 1987.
- LIOTTA, L.A., LIU, E.T. Essentials of molecular biology: genomics and cancer. In: De VITA Jr, V.T.; HELLMAN, S.; ROSEMBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology**. Philadelphia: J.B. Lippincott, 2001. p.17-29.
- LIPKIN ,S.M., WANG, V., JACOBY, R., BANERJEE-BASU, S., BAXEVANIS, A.D.; LYNCH, H.T., ELLIOT, R.M., COLLINS, F. *MLH3* a DNAmismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. **Nat. Genet.**, v.24, p.27-35, 2000.
- LIU, B., PARSONS, R., PAPADOPOULOS, N., NICOLAIDES, N.C., LYNCH, H.T., WATSON, P., JASS, J.R., DUNLOP, M., WYLLIE, A ., PELTOMAZI, P., DE LA CHAPELLE, A., HAMILTON, S.R., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. **Nat. Med.**, v.2, p.169-74, 1996.
- LOEB, L.A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.51, p.3075-9, 1991.
- LOEB, L.A. Endogenous carcinogenesis: molecular oncology intothe twenty –first century: presidential address. **Cancer Res.**, v.49, p.5489-96, 1989.
- LOTHE, R.A., PELTOMÄKI, P., MELING, G.I., AALTONEN, L.A., NYSTRÖM-LAHTI, M., PYLKÄNEN, L., HEIMODAL, K., ANERSEN, T.I., MOLLER, P., ROGMUM, T.O., FOSSA, S.D., HALORSEN, T., LANGMARK, F., BROGGER, A., de la CHAPELLE, A., BORRESEN, A. L. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. **Cancer**

Res., v.53, p.5849-82, 1993.

LOUKOLA, A., EKLIN, K., LAIHO, P., SALOVAARA, R., KRISTO, P., JÄRVINEN, H., MECKLIN, J-K., LAUNONEN, V., AALTONEN, L.A. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). **Cancer Research**, v.61, p.4545-49, 2001.

LUCE, M.C., BINNIE, C.G., CAYOVETTE, M.C., KAM-MORGAN, L.N. Identification of mismatch repair gene mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer patients. **Int. J. Cancer**, v.69, p.50-2, 1996.

LYNCH, H.T., LYNCH, J.F. Lynch syndrome II and urologic manifestations. **J. Urol.**, v.143, p.24-8, 1990.

LYNCH, H.T., SMYRK, T., LYNCH, J.F. Clinical and molecular genetic aspects of the Lynch syndromes. **Semin. Colon Rectal Surg.**, v.6, p.38-47, 1995.

LYNCH, H.T., KRUSH, A.J. Cancer family "G" revisited: 1895-1970. **Cancer**, v.27, p.1505-11, 1971.

LYNCH, H.T., SMYRK T.; LYNCH J. An update of HNPCC (Lynch Syndrome). **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.93, p.84-99, 1997.

LYNCH, HT., SMYRK, T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome). an updated review. **Cancer**, v.78, p.1149-67, 1996.

LYNCH, H.T., LYNCH, J. Lynch syndrome: genetics, natural history, genetic counseling, and prevention. **J. Clin. Oncol.**, v.18, p.19s-31s, 2000.

- MAEHARA, Y., ODA, S., SUGIMACHI, K. The instability within: problems in current analyses of microsatellite instability. **Mutation Research**, v.461, p.249-63, 2001.
- MACDONALD, N.D., SALVESEN, H.B., RYAN, A., IVERSEN, O-E., AKSLEN, L.A., JACOBS, I.J. Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas. **Cancer Research**, v.60, p.1750-2, 2000.
- MARRA, G., BOLAND, R. DNA repair and colorectal cancer. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v.25, p.755-72, 1996.
- MECKLIN, J-P., PELTOMÄKI, P. Genetic changes associated with colon tumor development. **Ann. Chir. Gynaecol.**, v.89, p.211-5, 2000.
- MILLER, D.M., BLUME, S., BORST, M., GEE, J., POLANSKI, D., RAY, R., RODU, B., SHRESTHA, K., SNYDER, R., THOMAS, S., TRAN-PATERSON, R. Oncogenes, malignant transformation, and modern medicine. **Am. J. Med. Sci.** v.300 (1), p.59-69, 1990.
- MIYAKI, M., KONISHI, M., TANAKA, K., KIKUCHI-YANOSHITA, R., MUKAOKA, M., YAUNO, M., IGARI, T., KOIKE, M., CHIBA, M., MOKI, T. Germline mutation of MSH6 in the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Nat. Genet.**, v.17, p.271-2, 1997.
- MODRICH, P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. **Annu. Rev. Genet.**, v.25, p.229-53, 1991.

- NAKASHIMA, H., MORI, M., MIMORI, K., INOUE, H., SHIBUTA, K., BABA, K., MAFUNE, K., AKIYOSHI, T. Microsatellite instability in Japanese esophageal carcinoma. **Int. J. Cancer**, v.64, p.286-9, 1995.
- NICOLAIDES, N.C., PAPADOPOULOS, N., LIU, B., WEI Y.F., CARTER, K.C., RUBEN, S.M., ROSEN, C.A., HASELTINE, W.A., FLEISCHMANN, R.D., FRASER, R.M., ADAMS, M.D., VENTER, J.C., DUNLOP, M.G., HAMILTON, S.R., PETERSON, G.M., CHAPELLE, A., VOGELSTEINS, B., KINZLER, K.W. Mutations in two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature**, v.371(6492), p.75-80, 1994.
- PALOMBO, F., GALLIARI, P., IACCARINO, I., LETTIERI, T., HUGHES, M., D'ARRIGO, A., TRUONG, O., HSUAN, J.S., JIRICNY, J. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. **Science**, v.268 (5219), p.1912-4, 1995.
- PAPADOPOULOS, N., NICOLAIDES, N.C., LIU, B., PARSONS, R., LENGAUER, C., PALOMBO, F., D'ARRIGO, A., MARKOWITZ, S., WILSON, J.K.V., KINZLER, K.W., JIRICNY, J., VOGELSTEIN, B. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. **Science**, v.368, p.1915-17, 1995.
- PAPADOPOULOS, N., NICOLAIDES, N.C., WEI, Y-F., RUBEN, S.M., CARTER, K.C., ROSEN, C.A., HASELTINE, W.A., FLEISCHMANN, R.D., FRASER, C.M., ADAMS, M.D., VENTER, J.C., HAMILTON, S.R., PETERSEN, G.M., WATSON, P., LYNCH, H.T., PELTOMÄKI, P., MECKLIN, J-P., de la CHAPELLE, A., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B. Mutation of a *mutL* Homolog in Hereditary Colon Cancer. **Science**. v.263, p.1625-9, 1994.

PARSONS, R., MYEROFF, L.L., LIU, B., WILSON, J.K.V., MARKOWITZ, S.D., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor β type II receptor gene in colorectal cancer. **Cancer Res.**, v.55, p. 5548-50, 1995.

PELTOMÄKI, P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. **Human Mol. Genetics**, v.10, p.735-40, 2001.

PELTOMÄKI, P., AALTONEN, L. A., SISTONEN, P., PYLKKÄNEN, L., MECKLIN, J.P., JÄRVINEN, H., GREEN, J.S., JASS, J.R., WEBER, J.L., LEACH, F.S., PETERSEN, G.M., HAMILTON, S.R., de la CHAPELLE, A., VOGELSTEIN, B. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science**, v.260, p.810-2, 1993.

PELTOMÄKI, P., de la CHAPELLE, A. Mutations predisposing to Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. **Advances in Cancer Research**. Academic Press, p.93-119, 1997.

PELTOMÄKI, P., LOTHE, R.A., AALTONEN, LA., PYLKKÄNEN, L., NYSTRÖM-LAHTI, M., SERUCA, R., DAVID, L., HOLM, R., RYBERG, D., HAUGEN, A., BROGGER, A., BORRESEN, A-L., de la CHAPELLE, A. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma Syndrome. **Cancer Research**, v.53, p.5853-5, 1993.

- PERSECEPE, A., BORGHI, F., MENIGATTI, M., LOSI, L., FORONI, M., DI GREGORIO, C., ROSSI, G., PEDRONI, M., SALA, E., VACCINA, F., RONCUCCI, L., BENATTI, P., VIEL, A., GENUARDI, M., MARRA, G., KRISTO, P., PELTOMÄKI, P., PONZ de LEON, M. Molecular Screening for Hereditary Nonpolyposis colorectal cancer: a prospective, population-based study. **J. Clin. Oncol.**, v.19, p.3944-50, 2001.
- PISANI, P., PARKIN, D.M., BRAY, F., FERLAY J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. **Int. J. Cancer**, v.83 (1), p.18-29, 1999.
- POWELL, S.M. Clinical applications of molecular genetics in colorectal cancer. **Sem Colon & Rectal Surg**, v.6, p.2-18, 1995.
- PROLLA, TA. DNA mismatch repair and cancer. **Curr. Opin. in Cell Biol.**, v10, p.311-6, 1998.
- PYATT, R., CHADWICK, R.B., JOHNSON, C.K., ADEBAMOWO, C., de la CHAPELLE, A., and PRIOR, T.W. Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. Implications for microsatellite instability testing. **Am. J. Pathol.**, v.155, p.349-53, 1999.
- RAEDLE, J., TROJAN, J. BRIEGER, A., WEBER, N., SCHÄFER, D., PLOTZ, G., STAIB-SEBLER, E., KRIENER, S., LORENZ, M., ZEUZEM, S. Bethesda Guidelines: relation to microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in patients with colorectal cancer. **Ann Intern Med**. v.135, p.566-76, 2001.
- RHYU, MS. Molecular Mechanisms underlying hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. **J. Natl. Can. Inst.**, v.88(5), p.240-51, 1996.

RIMER, B.K., SCHILDKRAUT, J., HIATT, R.A. Cancer Screening. In: DE VITA Jr.; V.T., HELLMAN, S., ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology**. 6. ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1999. cap25, p.627-40.

RISINGER, JI, BERCHUCK, A, KOHLER, MF, WATSON, P, LYNCH, HT, BOYD, J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. **Cancer Res.**, v.53, p.5100-3, 1993.

RODRIGUEZ-BIGAS, M.A., BOLAND, R., HAMILTON, S.R., HENSON, D., JASS, J., KHAN, P.M., LYNCH, H., PERUCHO, M., SMYRK, T., SOBIN, L., SRIVASTAVA, S. A National Cancer Institut Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Meeting Highlights and Bethesda Guidelines. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.89(23), p.1758-62, 1997.

ROSAI, J. Cancers of the Gastrointestinal Tract. In: _____. **Ackerman's surgical pathology**, 8. ed. Local: Von Hoffmann Press, Inc, 1995. cap.16, p.589-813.

RÜSCHOFF, J., BOCKER, T., VOGEL, P., SCHLEGEL, J. Microsatellite instability: new aspects in the carcinogenesis of colorectal carcinoma. **Virchows Archiv.**, v.426, p.215-22, 1995.

SALETTI, P., EDWIN, I.D., PACK, K., CAVALLI, F., ATKIN, W.S. Microsatellite instability: Application in hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Annals of Oncology**, v.12, p.151-160, 2001.

- SALOWAARA, R., LOUKOLA, A., KRISTO, P., KÄÄRIÄINEN, H., AHTOLA, H., ESKELINEN, M., HÄRKÖNEN, N., JULKUNEN, R., KANGAS, E., OJALA, S., TULIKOURA, J., VALKAMO, E., JÄRVINEN, H., MECKLIN, J.P., AALTONEN, L.A., de la CHAPELLE, A. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.**, v.18, p.2193-200, 2000.
- SAMOWITZ, W.S., SLATTERY, M.L., KERBER, R.A. Microsatellite instability in human colonic cancer is not a useful clinical indicator of familial colorectal cancer. **Gastroenterology**, v.109, p.1765-71, 1995.
- SAMOWITZ, W.S., SLATTERY, M.L., POTTER, J.D., LEPPERT, M.F. BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. **Am. J. Pathol.**, v.154, p.1637-41, 1999.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Local: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTOS, A.C., YAMAOKA, Y., GRAHAM, D.Y., SEPULVEDA, A.R. Variability in the interpretation of microsatellite patterns with different electrophoretic conditions. **J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.**, v.52, p.302-4, 1999.
- SARKAR, G, KAPELNER, S., SOMMER, S.S. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. **Nucleic Acids Research**, v.8 (24), p.7465, 1990.
- SCHLEGEL, J., BOCKER, T., TIRNGIBL, H., HOFSTADTER, F., RUSHOFF, J. Detection of microsatellite instability in human colorectal carcinomas using a nonradioactive PCR-based screening technique. **Vischows Arch.**, v.426, p.233-7, 1995.

- SIAH, S.P., QUINN, D.M., BENNETT, G.D., CASEY, G., FLOWER, R.L.P., SUTHERS, G., RUDZKI, Z. Microsatellite instability markers in breast cancer: A review and study showing MSI was not detected at BAT25 d BAT26 microsatellite markers in early-onset breast cancer. **Breast Cancer Res. and Treatment**, v.60, p.135-42, 2000.
- SIMAK, R., CAPODIECI, P. COHEN, D.W., FAIR, W.R., SCHER, H., MELAMED, J., DROBNJAK, M., HESTON, W.D., STIX, U., STEINER, G., CORDON-CARDO, C. Expression of c-kit and kit-ligand in benign and malignant prostatic tissues. **Histol. Histopathol.**, v.15, p.365-74, 2000.
- SIMPSON, A.J.G. The natural somatic mutation frequency and human carcinogenesis. **Advances in Cancer Research**. Academic Press, p.210-40, 1997.
- SINGAL, R. & GINDER, G. DNA Methylation. **Blood**, v.93(12), p.4059-70, 1999.
- SOOD, A.K., HOLMES, R., HENDRIX, M.J.C., BULLER, R.E. Application of the National Cancer Institute International Criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. **Cancer Res.**, v.61, p.4371-4, 2001.
- SPIRIO, L., JOSLYN, G., NELSON, L., LEPPERT, M., and WHITE, R. A CA repeat 30-70 Kb downstream for the adenomatous polyposis coli (APC) gene. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p.6348, 1991.
- STRAND, M., PROLLA, T.A., LISKAY, R.M., PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v.365, p.274-6, 1993.

THIBODEAU, S.N., FRENCH, A .J., CUNNINGHAM, J.M., TESTER, D., BURGART, L.J., ROCHE, P.C., McDONNELL, S.K., SCHAID, D.J., VOCKLEY, C.W., MICHELS, V.V., GIST H. FARR, Jr., AND O'CONNELL, M.J. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. **Cancer Res.**, v.58, p.1713-8, 1998.

THIBODEAU, SN, BREN, G, SHAID, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science**, v.260, p.816-9,1993.

THOMPSON, MW, McINNES, RR, WILLARD, HF. **Genética Médica**, Ed. Guanabara Koogan, 5 ed., p.250-60, 1993.

TOFT, NJ, ARENDS, MJ. DNA mismatch repair and colorectal cancer. **J. Pathol.**, v.185, p.123-9, 1998.

VASEN, H.F.A., MECKLIN, J-P., MEERA KHAN, P., LYNCH, H.T. The international Collaborative Group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). **Dis. Colon Rectum**, v.34, p.424-5, 1991.

VASEN, H.F.A., WATSON, P., MECKLIN, J -P, LYNCH, H.T. The International Collaborative Group on HNPCC. New clinical criteria for HNPCC (Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. **Gastroenterology**, v.116, p.1453-6, 1999.

VOLKENANDT, M., DICKER, A.P., FANIN, R., BANERJEE, D., ALBINO, A., BERTINO, J.R. Polymerase chain reaction analysis of DNA from paraffin-embedded tissue. In: White, B.A. **Methods in molecular biology PCR protocols: current methods and applications**. Totowa, NJ: Humana Press, 1993. cap. 8, p.81-8.

- WALISZEWSKI, P. Colorectal carcinoma as a genetic phenomenon. **Patol Pol.**, v.43(3), p.73-8, 1992.
- WARTHIN, A.S. Hereditary with reference to carcinoma. **Arch. Int. Med.**, v.12, p.546-55, 1913.
- WATANABE, T., WU, T-T., CATALANO, P.J., UEKI, T., SATRIANO, R., HALLER, D.G., BENSON III, A.B., HAMILTON, S.R. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. **N. Engl. J. Med.**, v.344, p.1196-206, 2001.
- WATSON, P. LYNCH, H.T. Extracolonic cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Cancer**, v.71, p.677-85, 1993.
- WEBER, J.L., KWITEK, A.E., MAY, P.E., WALLACE, M.R., COLLINS, F.S., LEDBETTER, D.H. Dinucleotide repeat polymorphisms at the D17S250 and D17S261 loci. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.15, 1990.
- WEBER, J.L. & MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.**, v.44, p.388-96, 1989.
- WEINBERG, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.49, p.3713-21, 1989.
- WEINBERG, R.A., HANAHAN, D. The molecular pathogenesis of cancer. In: BISHOP, J.M.. **Molecular Oncology**, New York, Scientific American Inc., p.179-204, 1996.

- WEISSENBACH, J. GYAPAY, G., DIB, C., VIGNAL, A, MORISSETE, J., MILLASSEAU, P., VAYSSEIX, G., and LATHROP, M. A second generation linkage map of the human genome. **Nature**, v.359, p.794-801, 1992.
- WESTERMEIER, R. Denaturing PAGE of DNA (Method 14). In: **Electrophoresis in Practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations**. 2 ed. Germany, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1997. p. 257-262, pp. 331.
- WHEELER, J.M.D., BECK, N.E., KIM, H.C., TOMLINSON, I.P.M., MORTENSEN, N.J.McC., BODMER, W.F. Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: The predominant role of hMLH1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.10296-301, 1999.
- WHITEHALL, V.L.J., WALSH, MD, YOUNG, J., LEGGETT, B.A. JASS, J.R. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low – level DNA microsatellite instability. **Cancer Res**, v.61, p.827-30, 2001.
- WIJNEN, J., VASE, H., MEERA KHAN, P., MENKO F.H., VAN DER KLIFT H., VAN LEEUWEN C., VAN DER BROEK M., VAN LEEUWEN-CORNELISSE I., NAGANGAST F., MEIJERS-HEIJBOER A., LINDHOUT, D., GRIFFIOEN, G., CATS, A., KLEIBEUKER, J., VARESCO, L., BERTARIO, L., BISGAARD, M.L., MOHR, J., FODDE, R. Seven new mutations in hMSH2, na HNPCC gene, identified by denaturing gradient-gel electrophoresis. **Am. J. Hum. Genet.**, v.56 (5), p.1060-66, 1995.

- WILLENT, W.C., STAMPFER, M. J., COLDITZ, G.A., ROSNER, B. A., SPEIZER, F. E. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. **N. Engl. J. Med.**, v.323, p.1664-72, 1990.
- WINAWER, S. J., SCHOTTENFELD, D., FLEHINGER, B.J. Colorectal Screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.83, p.243-53, 1991.
- WINAWER, S.J., FLETCHER, R.H., MILLER, L., GODLEE, F., STOLAR, M.H., MURROW, C.D., WOOLF, S.H., GLICK, S.M., GANIATS, T.G., BOND, J. H., ROSEN, L., ZAPKA, J.G., OLSEN, S.J., GIARDIELLO, F.M., SISK, J.E., VAN ANTWERP, R., BROWN-DAVIS, C., MARCINIAK, D.A., MAYER, R.J. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. **Gastroenterology**, v.112 (2), p.594, 1997.
- WU, J.S., FAZIO, V. W. Colon cancer. **Dis. Colon Rectum.**, v.43, p.1473-86, 2000.
- WÜLLENWEBER, H-P., SUTTER, C., AUTSCHBACH, F., WILLEKE, F., KIENLE, P., BENNER, A., BÄHRING, J., KADMON, M., HERFARTH, C., DOEBERITZ, M VON K, GEBERT, H. Evaluation of Bethesda Guidelines in relation to microsatellite instability. **Dis Colon Rectum**, v.44, p.1281-9, 2001.
- ZETTER, B.R. Adhesion molecules in tumor metastasis. **Semin. Cancer Biol.**, v.4, p.219-29, 1993.

ZHOU, X-P., HOANG, J-M., LI, Y-J., SERUCA, R., CAREIRO, F., SOBRINHO-SIMÕES, M., LOTHE, R.A ., GLEESON, CM., RUSSELL, SE., MUZEAU, F., FLEJOU, JF., HOANG-XUAN, K., LIDEREAU, R., THOMAS, G., and HAMELIN, R. Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. **Genes Chromosomes Cancer**, v.21, p.101-107, 1998.

8 - ANEXOS

ANEXO A – Parecer da CONEP com relação ao projeto desenvolvido no Hospital Sírio Libanês

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 118/99

Processo: 25000.011500/99-48

Registro na CONEP: 521

Projeto de Pesquisa: "Detecção de instabilidade de microssatélites em tumores colo-retal com características de câncer colo-retal hereditário não-poliposo (HNPCC)"

Pesquisador responsável: Cláudia Muraro de Carvalho

Instituição: Hospital Sírio Libanês

Área temática especial: Genética Humana

Ao se proceder a análise do projeto acima, cabem as seguintes considerações:

a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Solicita-se porém, que o título do termo de consentimento seja adequado à nomenclatura brasileira (Consentimento Livre e Esclarecido).

b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições da Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Brasília, 01 de abril de 1999

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/MS

ANEXO C - LISTA DE PACIENTES COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E RESULTADOS DO TESTE MOLECULAR

nº	IDADE	SEXO	LOCAL	HIST.	DUKES	SINC.	MUCIN.	BAT25	BAT26	D2S123	D17S250	D5S346	BAT40	TP53	FENÓTIPO	MSI
33	49	M	CP	III	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
34	51	M	CP	III	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
35	37	F	CP	III	D	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
36	55	F	CP	III	B	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
37	59	F	CD	II	D	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
38	48	M	CD	II	A	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	RER(-)	MSI-L
39	40	M	CD	III	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
40	63	M	CD	II	B	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
41	35	F	ND	III	B	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
42	84	F	CP	II	B	não	não	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	RER(+)	MSI-H
43	60	M	CD	II	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
44	57	M	CP	III	C	sim	sim	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSI-L
45	57	F	CD	II	A	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
46	23	F	CP	II	A	não	não	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	RER(+)	MSI-H
47	74	M	CD	II	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
48	65	M	CD	II	A	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
49	72	F	CP	II	A	sim	não	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	RER(+)	MSI-H
50	41	F	CD	II	A	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
51	62	F	CP	III	C	não	não	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	RER(+)	MSI-H
52	53	F	CP	III	B	não	sim	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSI-L
53	74	M	CP	II	A	sim	não	NP	(-)	(-)	NP	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
54	63	M	CD	II	A	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
55	75	M	CD	III	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
56	77	M	CD	II	A	não	sim	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSI-L
57	41	M	CD	III	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
58	47	F	CD	II	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
59	37	F	CD	III	B	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
60	53	F	CD	II	C	não	não	(-)	(-)	NA	(-)	(+)	(-)	(+)	RER(+)	MSI-H
61	59	M	CD	II	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
62	73	F	CP	II	D	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
63	70	F	CP	I	C	não	sim	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
64	81	M	CP	II	D	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	RER(-)	MSI-L

ANEXO C - LISTA DE PACIENTES COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E RESULTADOS DO TESTE MOLECULAR

nº	IDADE	SEXO	LOCAL	HIST.	DUKES	SINC.	MUCIN.	BAT25	BAT26	D2S123	D17S250	D5S346	BAT40	TP53	FENÓTIPO	MSI
97	77	F	CD	II	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
98	68	M	CD	II	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
99	69	M	CD	II	A	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
100	83	M	CD	II	B	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
101	48	M	CD	II	B	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
102	76	F	CD	II	B	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
103	55	M	CD	II	D	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
104	83	M	CD	II	B	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
105	91	F	CD	II	B	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	RER(-)	MSS
106	70	M	CD	II	C	não	não	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	RER(-)	MSI-L

CP - Cólon proximal; CD - Cólon distal; HIST. - Grau histológico; DUKES - Estadiamento do tumor; SINC. - Sincrônico; MUCIN. - Padrão mucinoso;

ND - Local não designado; IN - indiferenciado; NA - Não amplificou; NF - Exame não realizado