

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GRAZIELE MORAES LOSSO

**IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS CARCINOGENÉTICA CLÁSSICA
E MUTADORA E CORRELAÇÃO COM O FENÓTIPO
NEOPLÁSICO DE CARCINOMAS COLORRETAIS
ESPORÁDICOS**

**CURITIBA
2009**

GRAZIELE MORAES LOSSO

**IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS CARCINOGENÉTICAS CLÁSSICA
E MUTADORA E CORRELAÇÃO COM O FENÓTIPO
NEOPLÁSICO DE CARCINOMAS COLORRETAIS
ESPORÁDICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

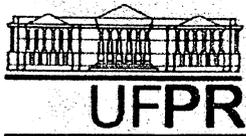
Orientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles

**CURITIBA
2009**

LOSSO, Grazielle Moraes. ***Identificação das vias carcinogênica clássica e mutadora e correlação com o fenótipo neoplásico de carcinomas colorretais esporádicos.*** Curitiba, 2009. 116p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: José Ederaldo Queiroz Telles

Palavras-chave: **Câncer Colorretal, Instabilidade de Microssatélite, Vias Carcinogênicas.**



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

TERMO DE APROVAÇÃO

“Identificação e correlação entre o fenótipo neoplásico das vias carcinogênicas clássica (p53) e mutadora (msi) em carcinomas coloretais esporádicos”

por

GRAZIELE MORAES LOSSO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles (presidente)

Prof. Dr. Renato Araújo Bonardi

Prof. Dra. Angelica Beate Winter Boldt

Curitiba, 4 de agosto de 2009

***A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência
leva os homens a se curvar em diante de Deus.***

(Voltaire)

DEDICATÓRIA

- A Deus;
- Ao meu esposo Marco Aurélio Fária Losso;
- A minha irmã Tatiane Moraes Dierings.

AGRADECIMENTOS

- À Universidade Federal do Paraná (UFPR);
- Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia;
- Ao professor José Ederaldo Queiroz Telles, pela oportunidade e apoio na orientação;
- Aos membros da banca pelas valiosas recomendações e sugestões;
- Ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR);
- Ao professor Roberto Moraes pelas orientações;
- Ao professor Flávio Saavedra Tomasich pelas orientações da pré-defesa;
- Ao Dr. Marssoni Deconto Rossoni pelas colaborações na casuística;
- À CAPES, pelo apoio financeiro viabilizando esta pesquisa;
- Ao meu esposo Marco Losso pelas intermináveis orientações normativas da ABNT;
- As técnicas de laboratório de imunoistoquímica Janir March e Julie Pimentel Justos;
- Aos amigos que apoiaram e colaboraram durante todo o período;
- A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
1.1. Considerações Iniciais.....	16
1.2. Justificativa.....	18
1.3. Objetivos.....	21
1.3.1. Geral	21
1.3.2. Específicos	21
1.4. Estrutura da dissertação.....	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1. Aspectos Morfológicos do Intestino Grosso Normal	23
2.1.1. Aspecto Histológico	25
2.1.2. Graduação Histológica e Estadiamento dos Tumores câncer colorretal	26
2.2. Epidemiologia.....	29
2.3. Etiopatogenia.....	31
2.3.1. Tumores do Intestino Grosso Esporádicos	33
2.3.2. Tumores do Intestino Grosso Hereditários	33
2.3.2.1. Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose.....	34
2.3.2.2. A Polipose Adenomatosa Familiar.....	35
2.3.2.3. Síndrome de <i>Gardner</i>	37
2.4. Mecanismos Moleculares da Carcinogênese Colorretal	37
2.4.1. Via Clássica ou Supressora.....	39
2.4.1.1 Genes Supressores de Tumor	40
2.4.1.2 Gene <i>Tp53</i>	41
2.4.2. Via da Instabilidade de Microsatélite ou Mutadora.....	47
2.4.2.1. Genes de Reparo (MMR) no CCR.....	49
3 MATERIAL E MÉTODO	56
3.1. Laboratório de pesquisa.....	56

3.2. Casuística.....	56
3.2.1. Critérios de exclusão	57
3.3. Técnicas empregadas.....	57
3.3.1. Técnica histológica	57
3.3.2. Parâmetros patológicos	58
3.3.3. Técnica Tissue Microarrays (TMAs) para imunistoquímica	58
3.3.4. Técnica imunistoquímica: Geral.....	59
3.3.5. Imunistoquímica para hMLH1	61
3.3.6. Imunistoquímica para hMSH6	62
3.3.7. Imunistoquímica para hMSH2	63
3.3.8. Imunistoquímica para p53	65
3.4. Metodologia Estatística.....	67
4 RESULTADOS.....	68
4.1. Distribuição dos casos quanto ao sexo	68
4.2. Distribuição dos casos quanto à idade	69
4.3. Distribuição dos casos quanto ao tipo histológico e o grau de diferenciação	70
4.4. Distribuição dos casos quanto ao TNM e estadio	71
4.5. Distribuição dos casos quanto à reatividade ao p53.....	72
4.6. Distribuição dos casos quanto à reatividade das proteínas de reparo.....	74
4.7. Distribuição dos casos quanto o <i>status</i> das proteínas de reparo	76
4.8. Distribuição dos casos quanto ao <i>status</i> MSI	77
4.9. Correlação da proteína p53 com as características clínico-patológicas	78
4.10. Correlação entre as proteínas de reparo e os dados clínico-patológicos.....	80
4.11. Correlação do <i>status</i> das proteínas de reparo com as características clínico-patológicas.....	82
4.12. Correlação das características clínico-patológicas com p53 + <i>versus</i> EPR.....	84
4.13. Correlação entre o <i>Status</i> MSI e as características clínico-patológicas	85
4.14. Identificação das vias carcinogénicas	86
4.15. Correlação das vias carcinogénicas	87
5 DISCUSSÃO	89
6 CONCLUSÕES	99
6.1 Considerações Finais.....	99
6.2 Conclusões.....	100

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
APÊNDICE A – Planilha anato-patológica.....	112
APÊNDICE B – Planilha de Imunoistoquímica	113
ANEXO A – Termo de aprovação do Comitê de Ética.	114
ANEXO B – Critérios de Bethesda e Amsterdam.	115
ANEXO C – Quadro esquemático da técnica TMA.....	116

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Tipos de cânceres mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira, sem pele não melanoma. As colunas estão sobrepostas em relação ao sexo.....	29
FIGURA 4 – Seqüência Carcinogênica proposta por Fearon e Vogelstein (1990).....	39
FIGURA 5 – Proteína p53 é constituída de 393 aminoácidos na sua extensão apresenta quatro regiões de domínios funcionais.....	41
FIGURA 6 – Via da regulação do ciclo celular, no processo apoptótico, efetuado pela proteína p53.....	42
FIGURA 7 – Mecanismo de atuação da proteína p53.....	44
FIGURA 8 – Carcinogênese colorretal. Reparo defeituoso (<i>Mismatch repair</i>).....	49
FIGURA 10 - Distribuição dos casos de câncer colorretal esporádico segundo o sexo.....	68
FIGURA 11 - Distribuição dos 51 casos de câncer colorretal esporádico por grupo etário.....	69
FIGURA 12 – Distribuição dos 51 casos de CCR esporádico em relação ao tipo histológico....	70
FIGURA 13 – Distribuição dos 51 casos de CCR quanto o grau de diferenciação.....	70
FIGURA 14 – Distribuição de 51 casos de câncer colorretal em relação à profundidade de invasão (pT) segundo o sistema TNM.....	71
FIGURA 15 – Distribuição de 51 casos de câncer colorretal em relação ao estadio.....	71
FIGURA 16 – Distribuição da imunorreatividade da proteína p53 em 51 casos de Câncer Colorretal esporádico.....	72
FIGURA 17 – Análise imunoistoquímica de câncer colorretal. A) Hiperexpressão positiva da proteína p53; (objetiva x 100).....	73
FIGURA 18 – Incidência da expressão das proteínas de reparo hMLH1, hMSH2, hMSH6 em 51 casos com CCR esporádico.....	74
FIGURA 19 – Análise imunoistoquímica de câncer colorretal. A) imunexpressão positiva da proteína hMLH1; B) imunexpressão negativa da proteína hMSH2; C) imunexpressão negativa para proteína hMSH6 (objetiva x 100).....	75
FIGURA 20 – <i>Status</i> das proteínas de reparo casos com CCR esporádico.....	76
FIGURA 21 – <i>Status</i> MSI-H casos com CCR esporádico.....	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA (TNM) COLON E RETO	27
TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA (TNM) COLON E RETO	27
TABELA 3 – CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA (TNM) COLON E RETO	27
TABELA 4 – GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA (TNM) CÓLON E RETO	28
TABELA 5 - ESTADIAMENTO (TNM) COLON E RETO.....	28
TABELA 6 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53.....	72
TABELA 7 – DESCRIÇÃO ESTÁTISTICA DA REATIVIDADE DAS PROTEÍNAS DE REPARO.....	74
TABELA 8 – DISTRIBUIÇÃO DO <i>STATUS</i> DAS PROTEÍNAS DE REPARO.....	76
TABELA 9 – DISTRIBUIÇÃO DO <i>STATUS</i> MSI-H.....	77
TABELA 10 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS <i>VERSUS</i> p53.....	78
TABELA 11 – HIPEREXPRESSÃO p53 + <i>VERSUS</i> AS VARIÁVEIS.....	79
TABELA 12 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS <i>VERSUS</i> hMLH1 -	80
TABELA 13 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS <i>VERSUS</i> hMSH2 -	80
TABELA 14 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS <i>VERSUS</i> hMSH6 -	81
TABELA 15 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E O <i>STATUS ERP</i>	82
TABELA 16 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E O <i>STATUS</i>	83
TABELA 17 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS p53 <i>VERSUS</i> EPR.....	84
TABELA 18 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS <i>VERSUS</i> MSI - H	85
TABELA 19 – <i>STATUS</i> MSI – H COM <i>STATUS</i> p53	86
TABELA 20 - HIPEREXPRESSÃO p53 COM O <i>STATUS</i> MSI.....	86
TABELA 21 - IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS CARCINOGENÉTICAS	86
TABELA 22 - FREQUÊNCIA DAS VIAS.....	86
TABELA 23 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS VIA CLÁSSICA.....	87
TABELA 24 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS VIA MUTADORA.....	87
TABELA 25 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS <i>VERSUS</i> VIAS.....	88
TABELA 26 – MÉDIA IDADE DOS CASOS DAS VIAS CARCINOGENÉTICAS.....	88
TABELA 27 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS MÉDIAS DE IDADE.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	- Gene da Polipose Adenomatosa coli
CCR	- Câncer Colorretal
DAB	- Cromógeno diaminobenzidina
DCC	- Gene “ <i>Deleted in Colon Câncer</i> ”
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
GST	- Genes Supressores Tomorais
hMLH1	- <i>Human mut - L Homologue -1</i>
hMSH2	- <i>Human mut - S Homologue -2</i>
hMSH6	- <i>Human mut - S Homologue - 6</i>
HNPCC	- Câncer Colorretal Hereditário não Polipóide
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
<i>K-ras</i>	- Oncogene – <i>Kirten-ras</i>
LOH	- Perda da Heterozigose
MCC	- Gene “ <i>Mutated in Colon Cancer</i> ”
MMR	- <i>Mismatch repair genes</i>
MSI	- Instabilidade de Microsatélite
MSI – H	- Alta Instabilidade de Microsatélite
MSI – L	- Baixa Instabilidade de Microsatélite
MSS	- Estabilidade de Microsatélite
OMS	- Organização Mundial de Saúde
p53	- <i>Protein 53 or tumor Protein 53</i>
PAF	- Polipose Adenomatosa Familiar
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PMS1	- Gene de reparo do DNA (<i>Mismatch Repair Gene</i>)
PMS2	- Gene de reparo do DNA (<i>Mismatch Repair Gene</i>)
pTNM	- Classificação histopatológica pós - cirúrgica
RMP	- Reparo do Mau Pareamento
TBS	- Solução Salina Fosfatada e Tamponada
TMA	- Tissue Microarrays

RESUMO

A capacidade de prever a agressividade biológica pela identificação das vias carcinogénicas através da análise tecidual é de valor inestimável para o tratamento dos pacientes com cancro. Se tumores não responsivos aos tratamentos usuais pudessem ser identificados, estes pacientes poderiam ser poupados da toxicidade terapêutica e, assim poderiam ser candidatos a novas modalidades terapêuticas não convencionais. Nesta pesquisa objetivava-se identificar as vias carcinogénicas clássica (p53) e mutadora (MSI-H) e correlacioná-las com o fenótipo neoplásico de 51 tumores colorretais esporádicos. Métodos: Blocos de tecidos fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina foram submetidos a cortes histológicos de 4 μ , para avaliação histológica. A técnica de (TMAs) foi utilizada para uma melhor uniformidade e um menor custo das reações imunoistoquímicas para deteção das proteínas de reparo hMLH1, hMSH2, hMSH6 e a proteína p53. Resultados: Nos 51 casos de CCR esporádico estudados, quanto à distribuição das características clínico-patológicas, observou-se que 57% eram do sexo masculino, 60% do tipo histológico tubular, 51% com grau de diferenciação moderado, 58,82% com profundidade de invasão da subserosa pT3 e estágio IIA com média de idade de 59,4 anos. Nesta pesquisa, 84,31% dos tumores apresentaram hiperexpressão da proteína p53 ($p < 0,05$) e 27,50% apresentaram ausência das proteínas de reparo EPR - ($p < 0,05$). Na análise imunoistoquímica das proteínas hMLH1, hMSH2 e hMSH6 observou-se ausência da imunoexpressão em 15,68%, 11,76% e 17,65% dos tumores respectivamente. Em 19,60% dos casos foram decorrentes da via carcinogénica mutadora (MSI-H) destes, 70% foram do género feminino, 90% do tipo não mucinoso e 80% apresentavam localização preferencial no cólon distal com média de idade de 57,10 anos. Por outro lado 66,66% eram decorrentes da via carcinogénica clássica (p53+). Destes 61,76% foram do género masculino, 85,29% do tipo histológico não mucinoso e 88,24% apresentavam localização preferencial no cólon distal com média de idade de 60,55 anos. Conclusão: Nesta pesquisa as vias carcinogénicas clássica e mutadora não ocorrem com a mesma frequência, sendo que a via predominante na carcinogénese colorretal esporádica é a via clássica. Houve correlação significativa ($p > 0,05$) entre as características patológicas e os marcadores imunoistoquímicos.

ABSTRACT

The ability to predict the carcinogenetic biological aggressiveness by identifying the pathways through tissue analysis is invaluable for the treatment of patients with cancer. If tumors that are not responsive to usual treatments could be identified, patients could be spared the toxicity and therapy, thus could be candidates for new unconventional therapeutic modalities. This research aims to identify and correlate the phenotype of the neoplastic tumor carcinogenetic classic pathways (p53) and mutated (MSI-H) in 51 sporadic colorectal tumors. Methods: Blocks of tissues fixed in formalin at 10% and included in paraffin were subjected to histological sections of 4 μ for histological evaluation. The technique of (TMAs) was used for better uniformity and Immunohistochemistry of the cost of repair proteins hMLH1, hMSH2, hMSH6 and p53. Results: Of the preliminary parameters, on the distribution of the 51 cases of sporadic CRC studied at the clinical and pathological characteristics, we observed that 57% were male, 60% of tubular histological type, 51% with moderate degree of differentiation, 58, 82% with depth of invasion of the sub-serousa PT3 and stage IIA with a mean age of 59.4 years. In this research, 84.31% of the tumors showed hyperexpression of P53 protein ($p < 0.05$) and 27.50% showed absence of protein repair EPR - ($p < 0.05$). In immunohistochemical analysis of the repair proteins hMLH1, hMSH2 and hMSH6 were observed absence of expression in 15.68%, 11.76% and 17.65% respectively. In 19.60% of cases were caused by the mutated carcinogenetic (MSI-H) they were 70 % female, 90% of non-mucinous type and 80% showed preferential localization in distal colon with average age of 57.10 years. While 66.66% were caused by the classic carcinogenetic (p53 +) they were 61.76% male, 85.29% of non-mucinous histological type and 88.24% had preferential location in the distal colon with a mean age of 60.55 years. Conclusion: In this study carcinogenetic as classical ways and mutated not occur with equal frequency and the predominant pathway in sporadic colorectal carcinogenesis is the classic way. There was significant correlation between pathological features and immunohistochemical markers.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Iniciais

Hoje, quase que diariamente, recebem-se notícias sobre avanços na medicina e, sobre a descoberta de novos genes que causam velhas doenças. O câncer é uma delas, seu nome é usado para descrever as diversas formas de neoplasia. Estas neoplasias podem ser benignas quando não invadem os tecidos vizinhos e, malignas quando formam metástase e se espalham para outros locais do corpo, formando tumores secundários.

O desenvolvimento do câncer segue um processo evolutivo somático clonal envolvendo uma série de mutações, algumas das quais ocasionam mudanças na expressão gênica. O acúmulo de alterações genéticas interfere no crescimento, apoptose e diferenciação celular, devido à desestabilização do genoma (ALBERTS *et al.*, 1997).

Embora os genes estejam suscetíveis a um número de alterações químicas (mutações) ao acaso, a grande maioria é eliminada pelo sistema de reparo do DNA. Há uma variedade de mecanismos de reparo, cada um catalisado por um conjunto diferente de enzimas. Quase todos esses mecanismos dependem da existência de duas cópias da informação genética, uma em cada fita da dupla hélice do DNA. Se a seqüência em uma fita é danificada acidentalmente, a informação não é irrecuperavelmente perdida porque uma versão “*backup*” da fita alterada permanece na seqüência complementar de nucleotídeos na outra fita (ALBERTS *et al.*, 1999; LEWIN, 2001).

Além da falha do sistema de reparo, é necessária a ocorrência de mais de uma única mutação para transformar uma célula normal em uma célula cancerosa. As mutações devem ocorrer pelo menos cinco ou seis vezes de forma independente em

uma única célula, para criar todas as propriedades necessárias para a formação do câncer (ALBERTS *et al.*, 1999; COOPER, 2002).

Tais mutações podem ser dominantes ou recessivas. As mutações dominantes levam a um ganho de função, podendo criar oncogenes que são formas mutadas de proto-oncogenes. Os proto-oncogenes atuam na promoção do crescimento e divisão de células normais, porém, na forma mutada, os mesmos promovem o desenvolvimento do câncer. As mutações recessivas levam a uma perda de função, podendo alterar ou inativar genes supressores de tumor (GST), cujos produtos normais são necessários para inibir o crescimento celular e o ciclo de divisão, prevenindo o desenvolvimento do câncer. Estas mutações não destroem as células mutadas, ao contrário, fornecem-nas uma vantagem competitiva sobre as células vizinhas normais (ALBERTS *et al.*, 1999; KREUZER, 2002).

Além dos proto-oncogenes e dos GST, um terceiro grupo de genes, quando mutados, podem participar do desenvolvimento dos cânceres: os genes de reparo do DNA. Estes genes atuam assegurando que cada informação genética seja corretamente copiada durante a replicação do DNA. Mutações nesses genes levam a um aumento na frequência de outras mutações (BORGES - OSÓRIO *et al.*, 2001; COTRIM *et al.*, 2003).

O câncer colorretal esporádico é uma doença heterogênea, cujas etapas de alterações seqüenciais dos proto-oncogenes e genes de reparo do DNA podem ser decorrentes de alterações moleculares diferentes. Assim sendo, existem etiologias, lesões precursoras e evolução da doença provavelmente distintas.

1.2. Justificativa

Tratar do presente tema é de relevante importância para a patologia, oncologia e medicina preventiva, tendo em vista o fato de tratar-se da identificação de possíveis marcadores no diagnóstico e tratamento do câncer colorretal esporádico.

Neste contexto, entende-se a idéia de marcador como o parâmetro que, de forma independente, em análise multivariada, mostra-se preditivo ou de valor prognóstico. A detecção de um número cada vez maior de marcadores distintos com valor prognóstico ou preditivo tem gerado uma percepção de que apenas a análise global do perfil da neoplasia possa evoluir para o estádiamento padrão ouro. A identificação de marcadores de diferentes naturezas, altamente sensíveis e específicos, pode permitir uma exata definição do comportamento biológico tumoral, o que conduzirá a estratégias terapêuticas cada vez mais personalizadas.

Há subgrupos de tumores malignos do colon e reto com características peculiares, embora semelhantes entre si quanto à forma de apresentação, comportamento biológico e prognóstico. Alguns destes tumores têm sua fisiopatologia aparentemente relacionada à existência de erros de replicação. O diagnóstico destes tumores é feito através da pesquisa de instabilidade de microssatélite (MSI). Há evidências bem estabelecidas de que tumores colorretais malignos com erros de replicação apresentam características que os destacam em diversos aspectos, quanto ao local de incidência (proximal no colon), idade (menos avançada), aspecto histológico (maior incidência de tumores mucinosos) e prognóstico (melhor sobrevida em relação ao câncer colorretal estável para microssatélites) (BOLAND *et al.*, 2008).

Dois mecanismos patogênicos foram propostos para o câncer colorretal. O mais freqüente, responsável por 85% dos casos, é denominado “clássico” está representado pela proteína mutada *p53* e relacionado à ocorrência de eventos mutacionais (germinativos ou somáticos) aditivos que culminam em (*LOH – loss of heterozygosity*) e, portanto, em instabilidade cromossômica. De importância na região genômica, o outro mecanismo é denominado “mutador” e está relacionado à ineficiência do sistema de reparo ou erros de replicação (*mismatch repair genes –*

MMR) representado nesta pesquisa pelo estudo imunohistoquímico das proteínas *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*. Este mecanismo ocorre em decorrência de mutações somáticas ou germinativas nestes genes.

A distinção entre os dois mecanismos é revelante, uma vez que os tumores ditos “mutadores” exibem características biológicas e clínicas que, no conjunto, são denominado fenótipo mutador. Este fenótipo inclui localização preferencial no colon proximal, histologia indiferenciada, infiltração linfocitária, melhor ou pior prognóstico, (dependendo do *estatus* MSI) e maior resistência à quimioterapia com 5-Fluorouracil (CARETHERS; BEHLING *et al.*, 2004; BOLAND *et al.*, 2008).

A identificação de MSI viabiliza o rastreamento para o CCR em indivíduos assintomáticos, o que reduz sua incidência e diminui a mortalidade a ela relacionada, devido à identificação de lesões pré-neoplásicas e câncer em estágio precoce (PINTO M., 2005; BOLAND CR. *et al.*, 2008,). Devido à crescente necessidade de identificar o comportamento biológico individual dos tumores, o diagnóstico de erros de replicação do DNA no câncer colorretal esporádico tornou-se um avanço bastante importante, possibilitando um prognóstico diferenciado e um tratamento específico e adequado a cada paciente (CARETHERS; SMITH E; BEHLING *et al.*, 2004).

A análise da imunexpressão da proteína p53 vem completar o quadro da avaliação do processo de carcinogênese e agressividade do tumor, já que as alterações do gene *TP53* têm sido demonstradas em 60% - 80% dos tumores colorretais. Sabe-se que a proteína p53 selvagem tem um efeito inibitório na proliferação e transformação celulares e este efeito parece ser devido à habilidade de manter as células na fase G1 do ciclo celular (BARNES *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1993).

Adicionalmente à sua função na regulação do ciclo celular, a p53 tem sido implicada na síntese e reparo do DNA, na manutenção da estabilidade genômica, na diferenciação celular e apoptose, sendo que mutações do gene *TP53* alteram significativamente sua atividade regulatória supressora tumoral. No contexto do carcinoma colorretal, definir o *status* da proteína p53 positiva e MSI-H é justamente

identificar aquelas neoplasias oriundas da via clássica, em oposição àquelas oriundas da via mutadora.

Portanto, é de interesse correlacionar as características clínico-patológicas e estadio com os marcadores imunoistoquímicos referidos neste estudo, no sentido de avaliar a importância clínica e patológica das vias em questão.

1.3. Objetivos

1.3.1. Geral

Identificar e correlacionar o fenótipo neoplásico tumoral, expresso pelas características patológicas do tumor, com a via carcinogénica predominante, expressa pela via clássica (p53) ou via mutadora (MSI – Instabilidade de Microssatélite), estudados pelo método imunohistoquímico em carcinomas colorretais esporádicos.

1.3.2. Específicos

1. Avaliar a imunexpressão das proteínas hMLH1 (*Human mut-L Homologue 1*), hMSH2 (*Human mut -S Homologue -2*), hMSH6 (*Human mut-s Homologue - 6*) e a proteína p53 em carcinomas colorretais através da técnica imunohistoquímica aplicada aos TMAs.
2. Relacionar a expressão dos marcadores imunohistoquímicos dos eventos genéticos da carcinogénese colorretal com o estadiamento e as variáveis clínico-patológicas (idade, sexo, localização, estágio, histologia e grau de diferenciação histológica).
3. Avaliar a frequência das vias carcinogénica clássica e mutadora no câncer colorretal esporádico.
4. Verificar se a via carcinogénica mutadora (MSI – H) está relacionada com um pior estadiamento no CCR esporádico segundo BOLAND *et al.* 2008.

1.4. Estrutura da dissertação

Esta dissertação é composta de seis capítulos que são apresentados da seguinte maneira: o presente capítulo introduziu a temática do estudo; o segundo capítulo apresenta a revisão da literatura; o terceiro capítulo apresenta a metodologia empregada para a realização da pesquisa dos marcadores; no quarto capítulo são apresentados os resultados e no quinto capítulo a discussão. Por fim, no sexto e último, são apresentadas as conclusões inerentes ao estudo, e as sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão da literatura está estruturada de maneira a apresentar sistematicamente as diversas abordagens do trabalho. Primeiramente, uma abordagem do aspecto morfológico, histológico e microscópico do intestino grosso normal seguido de uma abordagem dos aspectos gerais e microscópicos do câncer colorretal.

Uma segunda abordagem é feita considerando-se os fatores epidemiológicos e a etiopatogenia do câncer colorretal, descrevendo a distribuição global da doença e seus fatores patogênicos principais.

Por fim, apresentam-se os aspectos moleculares do câncer colorretal. Esta abordagem apresenta as vias carcinogênicas clássicas e a mutadora e, das implicações da instabilidade de microssatélite (MSI) no câncer colorretal esporádico.

2.1. Aspectos Morfológicos do Intestino Grosso Normal

O intestino grosso, órgão tubular distal do sistema digestório, é constituído por 5 partes: apêndice, ceco, cólon, reto e canal anal. O ceco é sua primeira e mais larga porção, localizado anatomicamente na fossa ilíaca direita, sendo separado do íleo pelo anáficio denominado válvula de Bauheni, que se localiza na face lateral esquerda e funciona, geralmente, apenas para permitir o esvaziamento do íleo no ceco. Esta válvula pode, no entanto, ser incompetente e, conseqüentemente, permitir refluxo do material do ceco e do cólon ascendente. O ceco mede 6 a 9 cm de comprimento e é intraperitoneal (ROBBINS, 2000).

O apêndice localiza-se na porção média, na base do ceco e, é considerado como remanescente anatômico, não tendo função conhecida. O ceco apresenta algumas características que permitem sua fácil identificação: presença da válvula meocecal, considerada seu limite superior, geralmente identificada por aspecto intenso

ou ligeiramente lipomatoso, e a convergência das tênias para a base do ceco, onde, com freqüência, consegue-se identificar o orifício apendicular (ROBBINS, 2000).

O cólon é dividido em 4 partes: ascendente ou cólon direito, transverso, descendente e sigmóide ou colón esquerdo. Mede aproximadamente entre 1,2 e 1,5 m de comprimento e tem como principais marcadores anatômicos a colonoscopia, a junção retosigmoideana, a flexura esplênica, a flexura hepática e a junção ileocecal (ROBBINS, 2000).

O colón ascendente é retroperitoneal, com apenas uma diminuta faixa recoberta por peritônio, enquanto que o restante é envolvido por tecido adiposo. Mede entre 30 e 25 cm de extensão, terminando na flexura hepática, angulação aguda que se localiza sob o lobo direito do fígado (ROBBINS, 2000).

O cólon transverso estende-se da flexura hepática à flexura esplênica, sendo fixado no estômago pelo ligamento gastrocólico. A flexura esplênica é outra angulação do intestino grosso e está localizada próxima à cauda do pâncreas e ao baço, fixada ao diafragma esquerdo por vários ligamentos denominados ligamentos frenocólicos (ROBBINS, 2000).

O cólon descendente, da mesma maneira que ascendente, é retroperitoneal e mede aproximadamente 10 cm de extensão é continuado pelo cólon sigmóide, que também mede entre 10 e 15 cm de extensão, sendo intraperitoneal e extremamente móvel (ROBBINS, 2000).

O reto é a penúltima porção do intestino grosso apresenta forma tubular sem haustrações e, mede 12 cm de comprimento. Apresenta algumas características que o tornam-no de fácil localização, entre elas a vascularização da submucosa, geralmente evidente, três pregas transversais denominadas válvulas de Houston na sua extremidade superior. O canal anal é a porção mais estreita do intestino grosso, mede entre 3 e 5 cm de extensão e caracteriza-se pela presença da musculatura circular, o esfíncter anal (ROBBINS, 2000).

2.1.1. Aspecto Histológico

O intestino grosso apresenta uma membrana mucosa lisa, sem pregas, exceto na porção retal. O epitélio de revestimento é do tipo colunar prismático. O intestino grosso não apresenta vilos, as glândulas intestinais de Lieberkühn são longas e caracterizadas pela grande abundância de células caliciformes e pequena quantidade de células enteroendócrinas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

A lâmina própria é rica em linfócitos e nódulos linfáticos. Estas últimas estruturas atravessam frequentemente a camada muscular da mucosa, invadindo a submucosa. A riqueza em células do sistema imunológico deve estar relacionada com a variada e abundante população bacteriana no intestino grosso (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

A camada muscular é bem desenvolvida, sendo constituída por uma camada de fibras circulares e outra de fibras longitudinais. Esta camada difere da do intestino delgado pelo fato de as fibras da camada longitudinal externa se congregarem em três faixas espessas chamadas tênias do colo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

A camada serosa se dispõe diferentemente nas diversas partes do intestino grosso e é caracterizada por pequenos apêndices pedunculados, formados por tecido adiposo e apêndices epiploicos. No ceco, forma um revestimento completo de peritônio recobrendo as superfícies lateral e anterior do cólon ascendente e descendente, as superfícies anterior e lateral do terço superior do reto e apenas a superfície anterior do terço médio de reto. No cólon transversal e no cólon pélvico, o peritônio deixa o intestino e forma uma prega de parede dupla chamada mesocolon transversal e mesocolon pélvico (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

Na região anal, a membrana mucosa apresenta uma série de pregas longitudinais, as colunas retais ou colunas Morgagni. Dois cm acima do orifício anal, o epitélio intestinal colunar simples é gradualmente substituído por epitélio estratificado pavimentoso. Nessa região, a lâmina própria apresenta um rico plexo venoso (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

2.1.2. Graduação Histológica e Estadiamento dos Tumores câncer colorretal

A graduação de um câncer baseia-se no grau de diferenciação das células tumorais e no número de mitoses presentes dentro do tumor como supostos correlatos da agressividade da neoplasia.

O estadiamento do câncer baseia-se no tamanho da lesão primária, na extensão de sua disseminação para linfonodos regionais e na presença ou ausência de metástases transportadas pelo sangue. São utilizadas dois principais sistemas de estadiamento: o sistema desenvolvido pelo *Union Internationale Contre Câncer* (UICC), é desenvolvido pelo *American Joint Committee (AJC) on Câncer Staging*. O UICC emprega o sistema TNM (*Classification of Malignant Tumours*) (UICC *global câncer control* M/S INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA, 2007).

2.1.2.1. Regras gerais do sistema TNM (*Classification of Malignant Tumours*).

O sistema (TNM) para descrever a extensão anatômica da doença tem por base a avaliação de três componentes:

T – a extensão do tumor primário;

N – a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais;

M – a ausência ou presença de metástase à distância.

A adição de número a estes três componentes indica a extensão maligna. Assim temos T0, T1, T2, T3, T4 e N0, N1, N2, N3; M0, M1. O sistema é uma anotação taquigráfica para descrever a extensão clínica de um determinado tumor maligno (UICC *global câncer control* M/S INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA, 2007).

A classificação clínica (classificação clínica pré-tratamento, designada (TNM) (Tabelas – 1, 2 e 3), tem por base as evidências obtidas antes do tratamento. Tais

evidências surgem do exame físico, do diagnóstico por imagem, da endoscopia, da biópsia, da exploração cirúrgica e de outros exames relevantes (*UICC global cancer control* M/S INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA, 2007).

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA (TNM) COLON E RETO

T – Tumor Primário

TX – O tumor não pode ser avaliado.

T0 – Não há evidência de tumor primário.

Tis – Carcinoma *in situ*.

T1 – Tumor invade a lâmina própria ou submucosa.

T2 – Tumor invade a muscular própria.

T3 – Tumor invade desde a muscular própria até a sub-serosa.

T4 – Tumor que perfura o peritônio visceral ou outros órgãos

FONTE: *UICC global cancer control* M/S Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2007.

TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA (TNM) COLON E RETO

N – Linfonodos Regionais

NX – Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.

N0 – Ausência de metástase em linfonodos regionais.

N1 – Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais.

N2 – Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais.

FONTE: *UICC global cancer control* M/S Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2007.

TABELA 3 – CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA (TNM) COLON E RETO

M – Metástase à Distância

MX – A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.

M0 – Ausência de metástase à distância.

M1 – Metástase à distância.

FONTE: *UICC global cancer control* M/S Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2007.

A *classificação patológica* (classificação histopatológica pós-cirurgia), designada pTNM (*Classification of Malignant Tumours*), tem por base as evidências conseguidas antes do tratamento, complementadas ou modificadas pela evidência adicional conseguida através da cirurgia e do exame histopatológico.

A avaliação histopatológica do tumor primário (pT) exige a ressecção histopatológica do tumor ou biópsia adequada. Para avaliar a categoria (pN), exige-se a remoção representativa de nódulos para comprovar a ausência de metástase em linfonodos regionais (pN0). A investigação histopatológica de metástase à distância (pM) exige o exame microscópico (Tabelas 4 e 5) (*UICC global cancer control M/S INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA, 2007*).

TABELA 4 – GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA (TNM) CÓLON E RETO

G – Graduação Histopatológica

GX – Grau de diferenciação não pode ser avaliado.

G1 – Bem diferenciado.

G2 – Moderadamente diferenciado.

G3 – Pouco diferenciado.

G4 – Indiferenciado.

FONTE: *UICC global cancer control M/S Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2007*.

TABELA 5 - ESTADIAMENTO (TNM) COLON E RETO

Grupamento por Estádios

Estádio O	Tis	N0	M0
Estádio I	T1, T2	N0	M0
Estádio IIA	T3	N0	M0
Estádio IIB	T4	N0	M0
Estádio IIIA	T1, T2	N1	M0
Estádio IIIB	T3, T4	N1	M0
Estádio IIIC	qualquer T	N2	M0
Estádio IV	qualquer T	qualquer N	M1

FONTE: *UICC global cancer control M/S Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2007*.

2.2. Epidemiologia

Estima-se que para o ano de 2020, o número de casos novos anuais de câncer seja da ordem de 15 milhões, sendo cerca de 60% destes, em países em desenvolvimento. Um terço dos casos novos que ocorrem anualmente no mundo poderiam ser prevenidos (PARKIN *et al.* 2001). No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer (INCA, 2007).

Segundo o INCA, 2007 no Brasil, o câncer colorretal é o 4º tumor maligno mais freqüente para ambos os sexos (Figura – 1). Além disso, é a terceira neoplasia mais freqüente no mundo (SHIKE, 1990) e a segunda maior causa de morte por câncer nos Estados Unidos e em países em desenvolvimento, considerando-se o sexo (LANDIS, 1998).

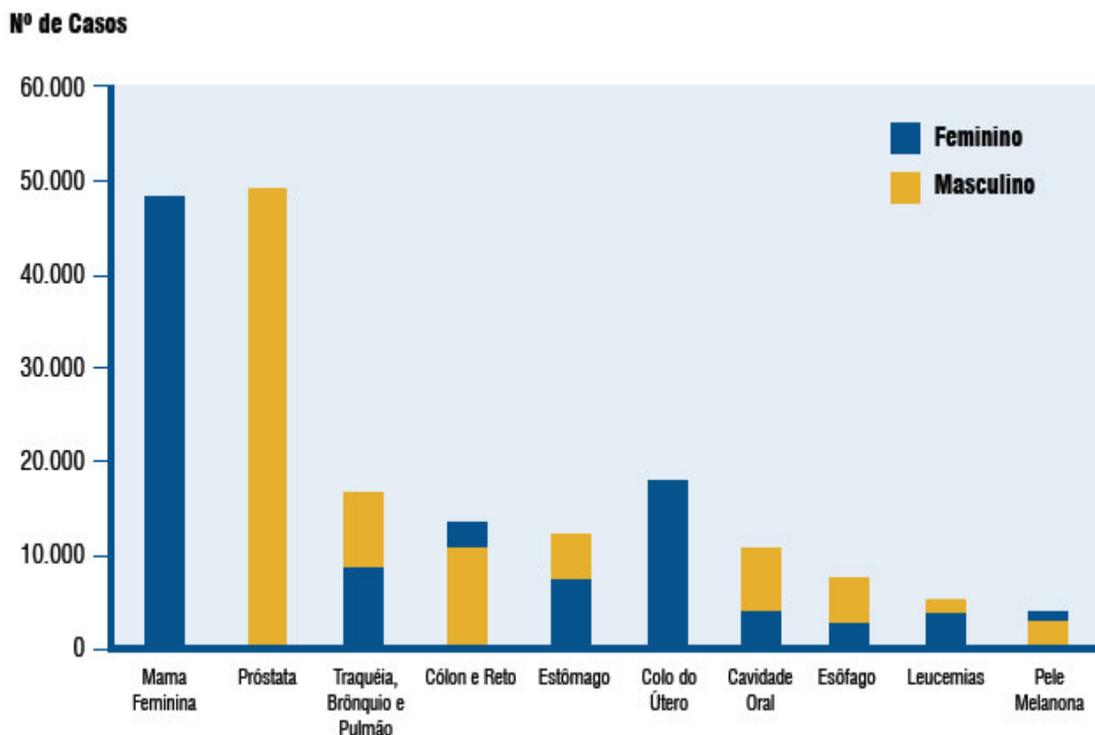


FIGURA 1 – Tipos de cânceres mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira, sem pele não melanoma. As colunas estão sobrepostas em relação ao sexo, evidenciando que, o CCR é o quarto tumor mais freqüente em ambos os sexos com predominância do sexo masculino.

FONTE: Instituto Nacional do Câncer INCA, 2007.

O número de casos novos de câncer de cólon e reto no Brasil no ano de 2008 é de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres (INCA, 2007) (Figura -1). Esses valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e de 15 para cada 100 mil mulheres (Figuras 2 e 3).

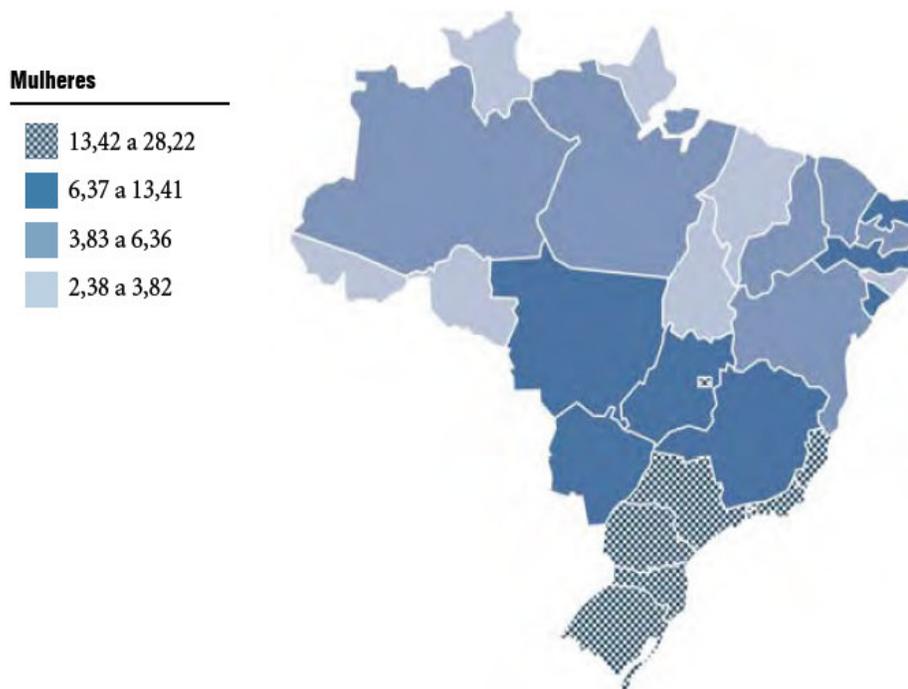


FIGURA 2 – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto).

FONTE: Instituto Nacional do Câncer INCA, 2007.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2007) aponta, no seu último senso, que sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de colón e reto em homens é o terceiro mais freqüente na região Sudeste (19/100.000). Nas regiões Sul (21/100.000) e Centro Oeste (10/100.000) ocupa a quarta posição. Nas regiões Nordeste (4/100.000) e Norte (3/100.000), ocupa a quinta e sexta posição, respectivamente. Para as mulheres, é o segundo mais freqüente na região Sudeste (21/100.000), e o terceiro mais freqüente nas regiões Sul (22/100.000), Centro-oeste (11/100.000) e Nordeste (6/100.000), enquanto, na região Norte (4/100.000), é o quinto mais freqüente.

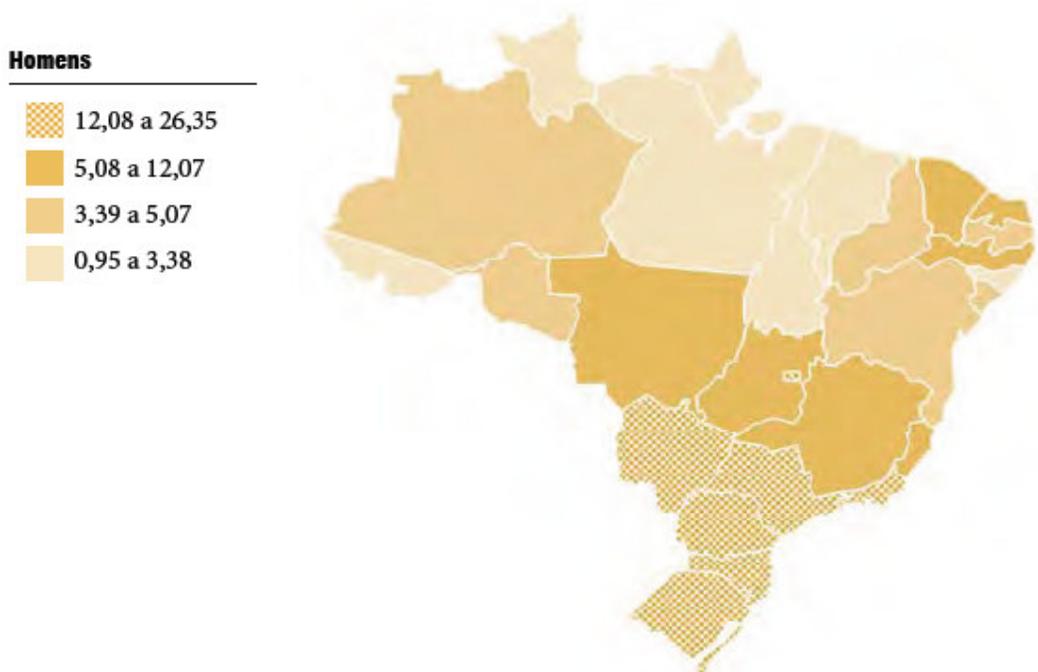


FIGURA 3 – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação (neoplasia do cólon e reto).

FONTE: Instituto Nacional do Câncer INCA, 2007.

A incidência do câncer colorretal aumenta significativamente nas pessoas com mais de 50 anos, mas a possibilidade de desenvolvê-lo já aumenta a partir dos 40 anos (OTTO, 2002). A taxa de sobrevivência em 5 anos é de 40% para os casos operáveis, sendo a sobrevivência global de apenas 25%, devido, principalmente, à falta de diagnóstico precoce.

2.3. Etiopatogenia

Podemos separar os tumores do intestino grosso, de modo simplista, do ponto de vista genético, em dois grandes grupos: os esporádicos, ou seja, que ocorrem sem um caráter familiar, correspondendo à cerca de 85% dos casos, altamente relacionados ao alto consumo de gordura animal e ao baixo consumo de fibras vegetais, incidindo em torno dos 60 anos de idade, com preferência para o lado esquerdo do intestino; e os hereditários, ou seja, que ocorrem devido a um defeito genético herdado por uma família, geração após geração. Neste grupo de pacientes, a dieta não é fator

importante, não existe preferência pelo lado esquerdo do cólon e a incidência ocorre em idades mais precoces, desde os 20 anos. A principal característica clínica deste grupo é a presença de várias pessoas dentro de uma mesma família com câncer de intestino (CHURCH, 1997).

O resultado do tratamento do câncer do cólon e do reto está diretamente relacionado ao diagnóstico precoce, ou seja, quanto mais cedo se faz o diagnóstico, maior o índice de cura, chegando-se a mais de 90% nos casos iniciais. Nos últimos anos, com o rápido e crescente desenvolvimento das técnicas de biologia celular e molecular em laboratórios, chegou-se até a localização e identificação dos defeitos genéticos específicos de pelo menos duas das principais síndromes hereditárias do intestino grosso, a Polipose Adenomatosa Familiar e o Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose, (*PAF* e *HNPCC*, respectivamente). Sua transmissão se faz de geração para geração, seguidamente, sendo que cada filho de um casal com um dos membros acometido tem uma chance de 50% de herdar o defeito genético e, conseqüentemente, a doença (VOGELSTEIN, 1988; CHURCH, 1997).

O CCR é uma doença de mecanismo genético. Seu aparecimento é fruto do acúmulo de mutações genéticas em um determinado clone de células epiteliais do cólon ou reto e que conferem a essa célula epitelial uma vantagem de crescimento ou, mais especificamente, falta de resposta aos determinantes intercelular e intracelular de divisão, diferenciação ou morte celular (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

Oncogenes (*K-ras*), genes supressores tumorais (*APC*, *DCC* e *Tp53*) e genes reparadores do DNA ou MMR (do inglês, *mismatch repair* - genes denominados *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* e *MSH6*) são considerados como de participação central no aparecimento do CCR. Foi através de estudos em doentes portadores de *PAF*, uma das modalidades de CCR hereditário, que foi possível postular o modelo de carcinogênese por múltiplos passos, no qual o acúmulo de mutações genéticas é responsável pela progressão do epitélio colônico normal para adenoma displásico e deste, para o carcinoma invasivo (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

A seqüência adenoma-carcinoma pode ser encarada, conforme demonstrado por Vogelstein e Cols., como a contrapartida morfológica da hipótese de carcinogênese por múltiplos passos. Provavelmente, no entanto, mudanças moleculares e suas seqüelas morfológicas podem levar à formação de uma lesão plano-elevada ou não, grande ou pequena, de crescimento rápido ou lento (WINAWER *et al.*, 1997).

2.3.1. Tumores do Intestino Grosso Esporádicos

Tumores ditos esporádicos são aqueles que se apresentam não hereditários, onde o defeito genético não é herdado e nem passado para seus descendentes. A maioria dos cânceres colorretais é da forma esporádica, e a mutação dos genes envolvidos na carcinogênese é adquirida por fatores mutagênicos.

O desenvolvimento do câncer colorretal esporádico se dá devido a uma complexa interação de variáveis, incluindo elementos externos como agentes ambientais e dietéticos, assim como fatores de natureza somática. O processo da carcinogênese colorretal será abordado em um item aparte.

2.3.2. Tumores do Intestino Grosso Hereditários

As formas hereditárias de câncer podem ser divididas em três categorias: Síndromes do Câncer Herdado; Cânceres Familiares; Síndrome Autossômica Recessiva de Defeito no Reparo do DNA. A primeira inclui vários cânceres bem definidos nos qual a herança de um único gene mutado aumenta acentuadamente o risco de desenvolver um tumor. A predisposição a esses tumores revela um padrão de herança autossômica dominante; dentro desta categoria se encontra a *Polipose Adenomatosa Familiar* (ROBBINS, 2000).

A segunda categoria inclui os cânceres familiares, abrangendo é praticamente todos os tipos comuns de cânceres que ocorrem de modo esporádico; incluindo carcinomas de colon, mama, ovário e cérebro. Os aspectos que caracterizam os cânceres familiares incluem baixa idade, tumores que surjam em dois ou mais parentes próximos, tumores múltiplos ou bilaterais. Os cânceres familiares não estão associados a fenótipos marcadores específicos. Por exemplo, em contraste com a síndrome de Polipose Adenomatosa Familiar, os cânceres familiares de cólon não surgem em pólipos benignos pré-existentes (ROBBINS, 2000).

A terceira categoria é a das Síndromes Autossômicas Recessivas de Defeito no Reparo do DNA, sendo um pequeno grupo de distúrbios autossômicos recessivos que caracterizam-se coletivamente, por instabilidade cromossômica ou instabilidade do DNA (ROBBINS, 2000).

2.3.2.1. Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose

O Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose (*HNPCC*) é uma síndrome hereditária autossômica dominante de penetrância incompleta (LYNCH, *et al.*, 1993) extensamente descrita por Henry Lynch, tendo a denominação alternativa de *Síndrome de Lynch* (ROBBINS, *et al.*, 2000). É responsável por cerca de 5% do total de casos de CCR (AALTONEN, *et al.*, 1998). No Brasil, sua frequência é aumentada, correspondendo a entre 10% e 15% dos casos de CCR (STRACHAN 2002; PINHO 2005).

A síndrome é decorrente da mutação germinativa de um dos seis genes relacionados com o reparo do DNA durante a replicação, conhecidos como genes de reparo de pareamento do DNA (*MMR - mismatch repair*). Os principais genes *MMR* envolvidos na síndrome são *MLH1* (PAPADOPOULOS *et al.*, 1994), *MSH2* (LEACH *et al.*, 1993) e *MSH6* (AALTONEN *et al.*, 1993). Mutações nestes genes correspondem a 90% das alterações genéticas descritas (PELTOMAKI e VASEN, 1997).

No *HNPCC*, o câncer se desenvolve mais rapidamente, é precedido por pouco ou nenhum pólipos, ocorre em idade mais precoce (antes dos 55 anos), em localizações proximais do cólon ou em localizações múltiplas (tumores sincrônicos) por ocasião do diagnóstico ou durante o seguimento (tumores metacrônicos). Na variante conhecida como síndrome de *Lynch* tipo II, o CCR ocorre em associação com tumores de outras localizações, mais especificamente na mama no endométrio e menos freqüentemente nos ovários, pâncreas, trato urinário e estômago (LYNCH, 1993; WINAWER *et al.*, 1997; WARD *et al.* 2001).

De Jong *et al.* (2004), relatam que, pacientes com *HNPCC* desenvolvem adenomas mais freqüentemente e com idade mais precoce do que os não portadores de alteração dos genes dos genes de reparo do DNA. A progressão de adenoma para carcinoma invasivo ocorre rapidamente (VASEN *et al.*, 1999) em alguns pacientes e, isso pode ocorrer em menos de 3 anos, contrastando com a média de 15 anos nos pacientes sem *HNPCC* (DE JONG *et al.*, 2004).

O diagnóstico clínico de *HNPCC* pode ser realizado através dos critérios de Amsterdam proposto pelo ICG-*HNPCC* (International Collaborative Group on *HNPCC*) (THOSON *et al.*, 1999; VASEN *et al.*, 1999) e através dos de *Bethesda* desenvolvido pelo (NCI, *Bethesda Consensus Panel*), sendo estes menos restritivos que os de *Amsterdam* (RODRIGUEZ-BIGAS *et al.*, 1997). O diagnóstico laboratorial para investigação genética pode ser feito por imunistoquímica, teste de instabilidade de microssatélite *MSI* por *PCR* ou pesquisa de mutação nos genes de reparo por sequenciamento.

2.3.2.2. A Polipose Adenomatosa Familiar

A *Polipose Adenomatosa Familiar (PAF)* é uma causa rara de CCR, ocorrendo em 1% de todos os casos. É resultante de uma mutação germinativa em um gene supressor tumoral *APC (Adenomatous Polyposis Coli)*, localizado no cromossoma 5q21-22, cuja herança é autossômica dominante. Em até 20% dos casos

diagnosticados, a mutação genética responsável pela *PAF* não foi herdada (ANDREW *et al.*, 2001).

Esses indivíduos apresentam de centenas a milhares de adenomas colônicos que atapetam a superfície da mucosa. São necessários, no mínimo, 100 pólipos para o diagnóstico da *PAF*. Múltiplos adenomas também podem estar presentes em outras partes do trato alimentar, incluindo a região da ampola de Vater. Histologicamente, a grande maioria dos pólipos é de adenomas tubulares; pólipos eventuais podem ter características vilosas (COURA *et al.*, 2005).

O CCR ocorre por força da degeneração de uma ou mais dessas lesões, invariavelmente até a idade média de 45 anos, caso o intestino não seja removido. Adenomas extraintestinais também são comuns, particularmente no duodeno (região periampular), podendo originar câncer tardiamente. Tumores epidermóides representam outra manifestação variante da *PAF*, conhecida como síndrome de *Gardner* e, acarretam alta morbidade (SYNGAL *et al.*, 2000).

O gene *APC* foi inicialmente localizado no braço longo do cromossomo 5, por análise de ligação, na família de um parente com uma deleção cromossômica microscopicamente visível. A descoberta de pequenas deleções superpostas em dois pacientes não aparentados forneceu a chave para o isolamento do gene. Entre os genes que ficam dentro da região de 100 kb deletada em ambos os pacientes, um mostrou mutações aparentes em outros pacientes. Estas mutações foram vistas nos pacientes, mas não em seus genitores não afetados, confirmando a identificação do gene *APC* (POWELL *et al.*, 1992; KINZLER e VOLGESTEIN, 1996).

Mutações germinativas do *APC* são consideradas as alterações mais precoces detectadas no câncer colorretal, porque praticamente 100% dos indivíduos desenvolverão a neoplasia no futuro. As mutações somáticas do *APC* são vistas em aproximadamente 85% de todos os casos de câncer de cólon, conseqüentemente o

APC está envolvido na grande maioria de casos esporádicos de pólipos do cólon e câncer de cólon.

Devido ao tamanho do gene (133 bp) e ao grande número de mutações causadoras da doença, é difícil e caro testar os membros familiares quanto a mutações germinativas para se determinar se herda o gene da doença. Entretanto, a PCR em tempo real tira proveito do fato de que a maioria das mutações (*APC*) são (mudanças de matriz de leitura) que na maioria das vezes produzem uma proteína truncada.

2.3.2.3. Síndrome de Gardner

É uma variação da *PAF*, distúrbio autossômico dominante que foi mapeado em 5q21, sede do gene supressor tumoral *APC*. Os pacientes exibem pólipos intestinais idênticos aos da polipose adenomatosa familiar, combinados com múltiplos osteomas (particularmente da mandíbula, crânio e ossos longos), cistos epidérmicos e fibromatose (ROBBINS, 2000).

2.4. Mecanismos Moleculares da Carcinogênese Colorretal

O câncer é uma doença genética, independente de ocorrer de forma esporádica ou hereditária, pois a carcinogênese sempre inicia com danos no DNA. Qualquer célula normal pode ser sítio de origem de um processo neoplásico, mas para que aconteça é necessária uma série de eventos acumulados. A formação neoplásica se dá pelo desequilíbrio entre a proliferação celular (ciclo celular) e a apoptose (morte celular) (THOMPSON *et al.*, 1993; FILHO, 2006).

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, tanto a nível fenotípico, quanto a nível genético (ROBBINS, 2000). Uma vez danificado o DNA, há três processos que podem ocorrer na célula: morte celular pelo erro em si ou pela ativação da apoptose; reconhecimento e reparo do dano no DNA; transmissão do dano às células descendentes por falhas em outros mecanismos (ALBERTS *et al.*, 1997).

Para que a carcinogênese ocorra, deve haver uma mutação não letal que deve conferir algum tipo de vantagem à célula, por exemplo: vantagem proliferativa, mutações em outros genes da mesma célula que também confirmam vantagens não letais e a existência de uma instabilidade genética (acúmulos de mutações gênicas) por defeito no reparo do DNA (ALBERTS *et al.*, 1997).

Uma neoplasia maligna possui vários atributos fenotípicos, como crescimento excessivo, invasão local e capacidade de formar metástases distantes. Estas características são adquiridas de modo gradativo – um fenômeno denominado progressão tumoral (ROBBINS, 2000). A nível molecular, a progressão resulta do acúmulo de mutações genéticas que, em alguns casos, são favorecidas por defeitos no reparo do DNA.

Alguns genes associados a síndromes herdadas do câncer colorretal fornecem um aspecto único sobre mecanismos moleculares da carcinogênese. Os que representam elementos importantes na regulação transcricional do ciclo celular é o gene (*TP53*) e os genes do reparo do DNA (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*). Prometem dar contribuição significativa para nossa compreensão destes processos, quase todos os genes herdados causadores de tumor descritos até agora são recessivos pelo menos ao nível de carcinoma. Esta observação sugere que um alelo herdado que produz um tumor no estado heterozigoto não seria tolerado durante o desenvolvimento, esta visão é apoiada pela distribuição tissular quase ubíqua dos produtos destes genes (COTTRELL *et al.*, 1992; ALBERTS *et al.*, 1997).

Atualmente, admitem-se duas vias genéticas distintas para a carcinogênese colorretal (LENGAUE *et al.*, 1997). A primeira, denominada Via Clássica ou Supressora, representa 85% dos casos de CCR e apresenta estabilidade de microssatélite (COTTRELL *et al.*, 1992). A segunda via é a Mutadora ou de Instabilidade de Microssatélite MSI, gera a hipermutabilidade do DNA e, representa 15% dos CCRs remanescentes.

2.4.1. Via Clássica ou Supressora

A Via Clássica ou Supressora ocorre quando mutações somáticas ou germinativas resultam em inativação dos genes supressores tumorais *APC*, *Tp53*, *DCC*, *MCC* e ativação do oncogene *K-ras*. É a via genética envolvida no aparecimento da *PAF*, onde a inativação do primeiro alelo do gene *APC* é herdada (RODGER *et al.*, 1985; WEHMAN *et al.*; 1994).

Nesta via o câncer colorretal desenvolve-se seguindo a seqüência de eventos moleculares em etapas acumulativas, cuja correspondência morfológica é denominada “seqüência Adenoma – Carcinoma” (VOGELSTEIN e FEARON, 1988).

Fearon e Vogelstein (1990) demonstraram que o acúmulo seqüencial é de quatro ou cinco mutações genéticas distintas no câncer colorretal, correspondendo, cada uma destas, a um estágio diferente na seqüência adenoma-carcinoma. A partir destes achados, elaboraram um modelo conforme apresentado na (Figura - 4).

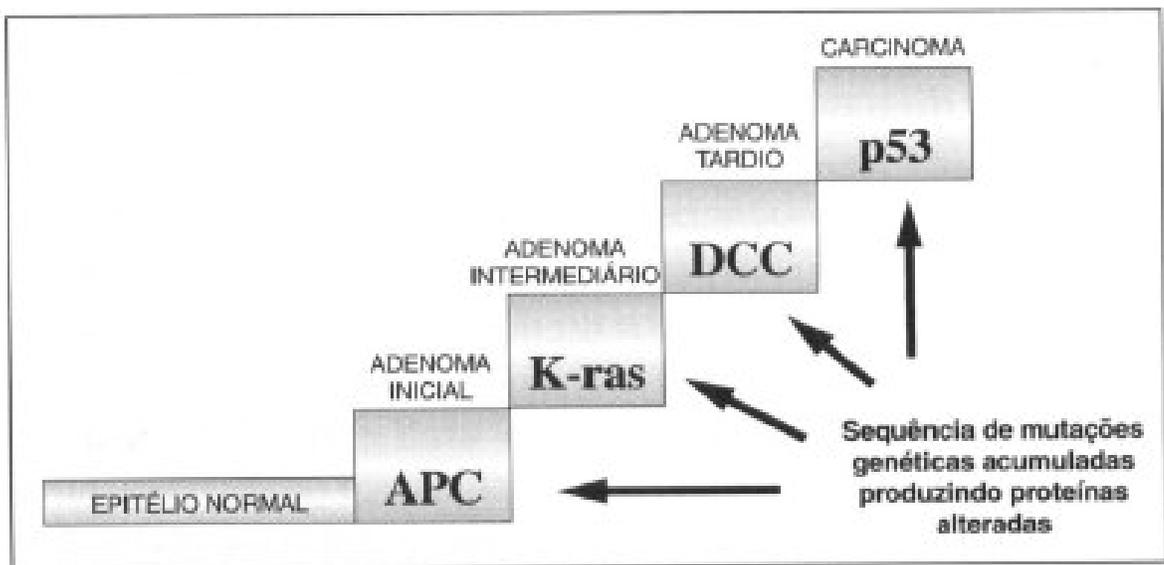


FIGURA 4 – Seqüência Carcinogênica proposta por Feareon e Volgeltein (1990)

FONTE: PINHO e ROSSI, (1999).

No primeiro estágio, a mutação do gene *APC* parece ser a primeira alteração na seqüência adenoma-carcinoma, pois este exerce uma função reguladora na proliferação epitelial normal. A sua inativação, através de mutação, resulta na perda deste controle, levando ao surgimento de um estado hiperproliferativo, conseqüentemente à formação de um adenoma. No segundo estágio, a ativação do gene *K-ras*, mutado como um oncogene, estimulará ainda mais a proliferação celular, evoluindo para um adenoma intermediário (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

No penúltimo estágio o gene *DCC* é mutado. Como o DCC confere adesão celular normal, sua perda de função acarreta a perda da capacidade de coesão celular. Esta mutação está presente em 70% dos carcinomas colorretais e em 50% dos adenomas tardios (FEARON e VOGELSTEIN, 1990). Talvez a última mutação seja a da proteína p53, sendo um elemento decisivo no processo de malignização de uma lesão adenomatosa, encontrada em 75% dos carcinomas colorretais.

2.4.1.1 Genes Supressores de Tumor

Os genes supressores de tumor estão envolvidos no controle de pontos estratégicos da cadeia de eventos que controla o crescimento e a diferenciação celular, evitando a multiplicação celular desordenada. Ao contrário dos oncogenes, que podem depender de apenas uma cópia ativa do gene para manifestar o fenótipo (ação dominante), os genes supressores de tumor precisam ter os dois alelos mutados para induzir o câncer (recessivos). A perda do primeiro alelo do gene supressor de tumor pode ser herdada ou adquirida. O indivíduo heterozigoto para o gene não tem neoplasia, mas apresenta risco maior de desenvolver à mesma. O câncer só se desenvolve se ocorrer uma segunda mutação nas células somáticas e se esta mutação inativar a função do alelo tipo selvagem do gene supressor tumoral. Para estes genes, o desenvolvimento do câncer requer duas mutações de perda de função, isto é, dois eventos (*hits*) inativadores, um em cada duas cópias do gene supressor tumoral (FILHO, 1994; MANSUR, 1997).

2.4.1.2 Gene *Tp53*

Entre todos os genes reconhecidos envolvidos nos processos de tumor, o gene *TP53* é considerado o de maior importância, pois o mesmo atua em dois pontos de checagem do ciclo celular. Este possui 20 kb e é composto de 11 éxons, sendo a região situada entre os exons 5 e 9, considerada *hot spot* de mutação (HARRIS e HOLLSTEIN, 1993; JSYRAMAN E PRIVES, 1997).

O *TP53* tem seu locus no braço curto do cromossomo 17 em p13.1), tendo como produto uma fosfoproteína nuclear chamada p53, que possui 53 kDa (quilodáltons), com 393 resíduos de aminoácidos (Figura – 5). Na sua forma selvagem, exerce controle negativo da proliferação celular (ISOBE *et al.*, 1986; FETT-CONTE *et al.*, 2002).

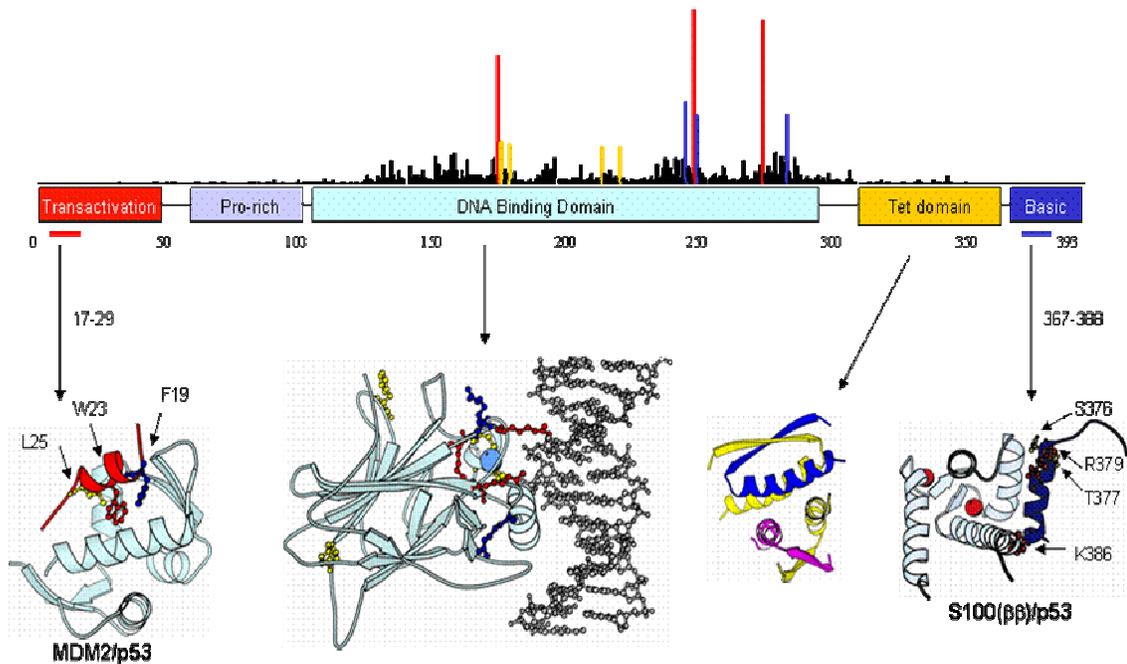


FIGURA 5 – Conformação estrutural da proteína p53 que é constituída de 393 aminoácidos na sua extensão apresentando quatro regiões de domínios funcionais: (1) domínio de transativação localizado na região amino-terminal, que compreende os oitenta primeiros aminoácidos; (2) domínio de ligação ao DNA, localizado na porção central da proteína onde estão presentes os picos que representam a frequência das mutações; (3) domínio de oligomerização e (4) domínio de tetramerização. Os dois últimos estão localizados na porção carboxi-terminal da proteína.

FONTE: Adaptado de PASSARGE (2004).

A proteína p53 foi descrita pela primeira vez em 1979, em células transformadas pelo vírus SV-40, em associação com o antígeno T. A forma ativa da proteína p53 normal é de difícil detecção, pois tem uma vida-média curta, em torno de 6 minutos. Já as formas inativas ou mutadas tendem a se acumular no núcleo das células, podendo ser facilmente detectadas (LEWIN, 2001; CAVALCANTI *et al.*, 2002).

A proteína p53 participa de várias vias de regulação do ciclo celular (Figura - 6). Dentre as vias mais importantes, destaca-se a inibição da replicação do DNA, na qual funciona como uma molécula de controle (*checkpoint*) que impede a progressão da célula da fase G1 para a fase S e também da fase G2 para a fase M. As células com *TP53* normal, que sofrem dano no DNA, são impedidas de se dividir antes que o dano seja reparado. Caso estes danos sejam muito extensos, a proteína p53 inicia uma série de eventos que levam à morte da célula por apoptose. Desta forma, é garantida a manutenção da integridade do genoma e o controle da proliferação celular (ALBERTS *et al.*, 1997; COOPER, 2001; BORGES-OSÓRIO *et al.*, 2001 KREUZER 2002; CAVALCANTI *et al.*, 2002; FETT-CONTE e SALLES, 2002).

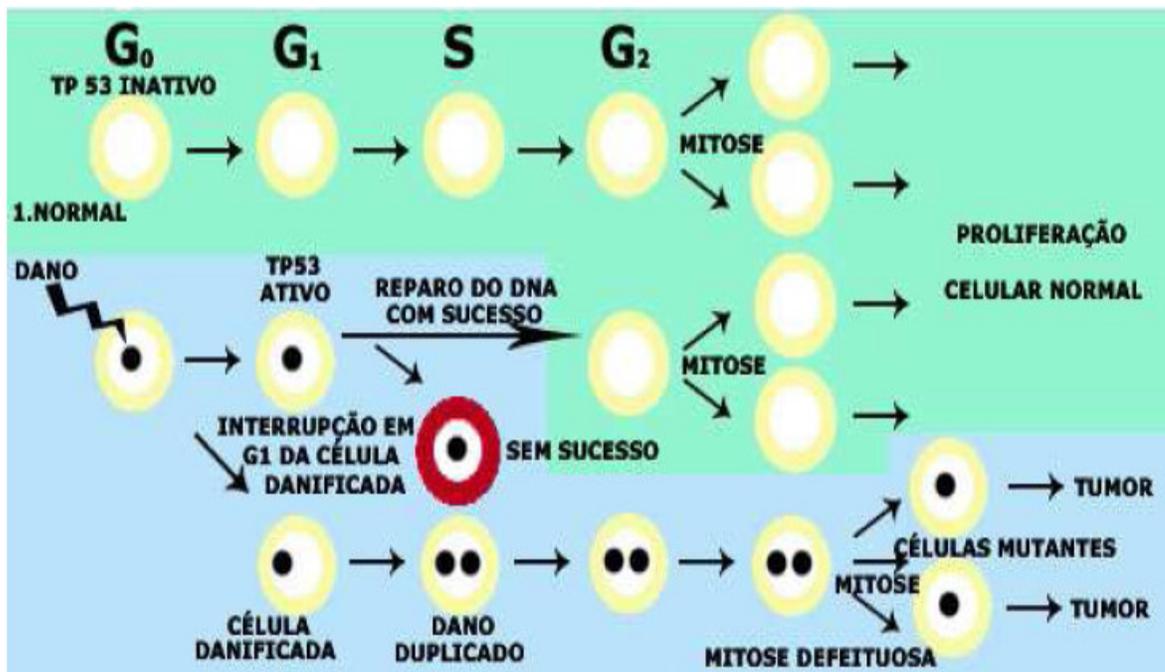


FIGURA 6 – Via da regulação do ciclo celular, no processo apoptótico, efetuado pela proteína p53.

FONTE: Adaptado de PASSARGE (2004).

A capacidade de monitorar a integridade do genoma, impedindo a proliferação de células com o DNA mutado, deu à proteína p53 o nome de “guardião do genoma” (FETT-CONTE e SALLES, 2002; GUIMARÃES *et al.*, 2002).

A função normal do *Tp53* pode ser inativada durante a tumorigênese de quatro formas diferentes: mutação, inibição por reguladores celulares e alteração da localização subcelular (ZAMBETTI e LEVINE, 1993).

A inativação da proteína selvagem pode ocorrer através da formação de complexo entre produtos oncogênicos virais com o antígeno T de SV-40, proteína E1B-55 kDa de adenovírus tipo 5, proteína E6 do vírus do papiloma humano tipo 16 e 18 (SARNON *et al.*, 1982; WERNESS *et al.*, 1990; ZAMBETTI; LEVINE, 1993).

A elevação do nível de proteína p53 selvagem no núcleo também constitui uma forma de inativação de sua função relacionada com a predisposição ao câncer. Assim, a elevação da p53 selvagem pode contribuir para a proliferação celular através da ativação de outros genes ainda no genoma humano (BARNES *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1993).

Diferentemente de outros genes supressores de tumor, que são inativados por mutação do tipo deleções de porção do gene ou inserção de nucleotídeos (*nonsense*), as mutações no gene *TP53* ocorrem por troca de um nucleotídeo (*missense*), em mais de 90% dos casos. Como resultado, a proteína pode ter sua conformação alterada, aumentando sua estabilidade e permitindo seu acúmulo nas células tumorais. As substituições de nucleotídeo também podem gerar códons de parada da leitura do RNAm (*stop códon*), traduzindo uma proteína truncada (HARRIS e HOLLSTEIN, 1993; CAVALCANTI *et al.*, 2002).

Em síntese, a inativação da proteína p53 por mutação, pode levar ao aumento da proliferação, instabilidade genômica e perda de importantes mecanismos de controle do ciclo celular (CAVALCANTI *et al.*, 2002).

Mutações no gene *TP53* são detectadas em mais de 53 tipos diferentes de tumores incluindo os de cólon, bexiga, cérebro, mama, cérvix, esôfago, laringe, fígado, pulmão, ovário, pâncreas, próstata, pele, estômago e tireóide (JORDE *et al.*, 2000; ALBERTS *et al.*, 1997; FETT-CONTE e SALLES, 2002).

Na fase G1 do ciclo celular, o produto do gene *TP53* ativa a transcrição do gene 21 induzindo a síntese da proteína p21 (gene regulador). Esta inibe a ação das quinases dependentes de ciclina (CDK), fazendo com que as células parem na fase G1 do ciclo celular, antes de ocorrer a duplicação do DNA, para o reparo do DNA. A proteína p53 também ativa o gene GADD-45, que atua corrigindo as mutações. Quando o reparo é terminado, a proteína p53 é degradada pela ação da proteína MDM-2, produto do gene *mdm-2* (Figura - 7) (MARX, 1993; ALBERTS *et al.*, 1997; JORDE *et al.*, 2000).

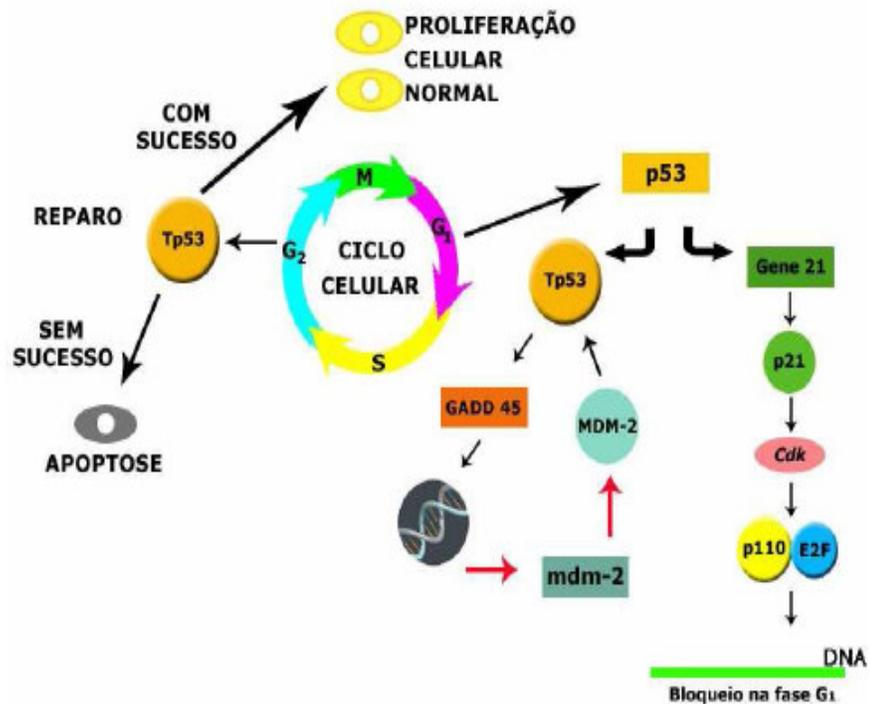


FIGURA 7 – Mecanismo de atuação da proteína p53

FONTE: Adaptado de PASSARGE (2004).

Quando o gene *Tp53* sofre mutações, que levam à inativação da proteína p53, as células com danos no DNA tendem a acumular mutações cromossômicas adicionais, pois não ocorre a parada do ciclo celular para o reparo, formando assim, clones de células com DNA mutado (BORGES-OSÓRIO *et al.*, 2001; FETT-CONTE e SALLES, 2002).

Embora as mutações no gene *Tp53* causadoras de tumor tenham sido observadas principalmente em células somáticas, a que ocorre em células germinativas é responsável pela síndrome de *Li-Fraumeni* (SLF) (KREUZER 2002). Esta síndrome rara é transmitida de modo autossômico dominante, caracterizando-se pela predisposição a carcinomas de mama e cólon, tecidos moles, sarcomas, osteossarcomas, tumores cerebrais, leucemias e carcinomas adrenocorticais. Estes tumores em geral se desenvolvem em membros jovens da família com a síndrome SLF (THOMPSON *et al.*, 1993; JORDE *et al.*, 2000).

Em um dos primeiros relatos na análise por imunistoquímica da proteína mutada p53 em câncer colorretal, FINLAY *et al.*, (1989) notaram níveis intracelulares altos em comparação ao achado nas células normais, nas quais a proteína não foi detectada. Os altos níveis encontrados são devido ao aumento da meia-vida da proteína mutada.

Em tumores colorretais, 50% a 75% dos casos apresentam perda da função de ambos os alelos do gene *Tp53* esta perda da função decorre da mutação de um alelo e perda do outro por deleção de uma região extensa do DNA cromossômico (GREENBLATT *et al.*, 1994).

AHNEN (1999), pesquisando mutações no gene *Tp53* observou que a mutação estava presente entre 80% a 90% dos carcinomas colônicos esporádicos e em 20% a 40% dos adenomas. No mesmo trabalho, o autor correlaciona a proteína mutante com a severidade da displasia, embora reconheça uma frequência menor da proteína anômala no epitélio com displasia de baixo grau.

JURACHA *et al.* (2006) analisaram a expressão imunistoquímica da proteína p53 em 83 pacientes com diagnóstico de câncer retal. A proteína apresentou-se mutada em 43,4% destes tumores. RIBEIRO *et al.* (2000) correlacionaram a proteína p53 com os resultados de quimioterapia e radioterapia em 118 pacientes com adenocarcinoma de reto distal e concluíram que a proteína p53 pode ser útil na avaliação prognóstica da terapia multimodal.

ILYAS e TABOT (1995) pesquisaram a p53 por imunohistoquímica estudando 10 pacientes com displasia presente. no mínimo um ano antes da colectomia, usaram o anticorpo monoclonal DO7, específico para ambos os tipos mutante e selvagem, e fizeram a leitura do resultado por contagem de células positivas. Dos 10 casos, 7 foram positivos; 2 desses 7 tinham p53 positivo em espécimes antes do desenvolvimento do carcinoma ou displasia os outros 5 foram negativos para displasias 1 a 4 anos antes da cirurgia. Baseado nesses resultados os autores concluíram que a superexpressão da p53 é um evento tardio no desenvolvimento da carcinogênese colorretal em portadores de Retocolite Ulcerativa Crônica.

A proteína p53 detectada por imunistoquímica é, na maioria das vezes, produto de mutações na região (Central - C) do gene *TP53* sendo indicador de pior prognóstico em carcinomas de colon e mama (figura 5) (STARZNSK, *et al.*, 1992; RIBEIRO, *et al.*, 1998).

KAHLENBERG *et al.* (2000) em seu trabalho correlacionando a proteína p53 com a sobrevida dos pacientes com câncer colorretal, encontraram uma sobrevida de quatro anos de 71% dos pacientes com tumores com proteína normal, comparada com 54% dos casos com proteína p53 mutante, enquanto WANG *et al.* (1998) relataram sobrevida de 5 anos de 87% e 50% dos pacientes, respectivamente.

TAKEDA *et al.* (1999) demonstraram que a detecção de anticorpos séricos anti-proteína p53 mutante, em pacientes portadores de CCR, está relacionada a uma menor resposta tumoral à quimioterapia, podendo servir como elemento importante para a escolha da terapêutica a ser instituída. PARADISDO *et al.* (2000) relataram também um valor preditivo de resposta à quimioterapia através da pesquisa da proteína p53

mutante diretamente no tecido tumoral, porém associada à análise da timidilato sintetase.

ADELL *et al.* (1999) observaram que tumores retais contendo p53 mutada apresentaram um maior índice de recidivas locais após radioterapia pré-operatória.

2.4.2. Via Mutadora ou Instabilidade de Microssatélite

A via decorrente da instabilidade de microssatélite (MSI) ou Mutadora representa um dos mecanismos de instabilidade genômica, sendo fruto da inativação das proteínas de reparo do DNA. Alterações nestes genes levam a uma instabilidade genética que propicia o acúmulo de mutações em sítios críticos, resultando na transformação neoplásica (AALTONEN *et al.*, 1998; FILHO, 2006).

O genoma humano é formado por cerca de 60 a 70% de nucleotídeos que são compostos por seqüências únicas, ou seja, segmentos cuja organização de nucleotídeos ocorre apenas uma vez em todo o genoma. Dentre estas seqüências únicas estão os genes, que são seqüências contendo o código para a síntese de proteínas, os quais representam cerca de 5 a 10% de todo o genoma. Os 25% a 40% restantes da molécula de DNA são formados por seqüências repetitivas de DNA, as quais podem ser observadas diversas vezes em todo o genoma. Estas seqüências repetitivas de nucleotídeos podem ser subdivididas em repetições dispersas e repetições *tandem* (ou satélite), sendo este nome devido ao aparecimento da espectrometria óptica de uma banda “anexa” (ou satélite) junta à banda principal (CUTAIT *et al.*, 2002).

As repetições *tandem* do DNA podem ser classificadas de acordo com extensão da seqüência repetitiva em satélite, minissatélite e microssatélite. As seqüências de microssatélites consistem de pequenas repetições em *tandem* de um, dois, três ou quatro nucleotídeos dispersos no genoma (BORGES-OSÓRIO 2001). Assim sendo, podem ser estes microssatélites compostos por um mononucleotídeo, dinucleotídeo,

trinucleotídeo ou tetranucleotídeo. O número de repetições de microssatélite pode variar entre os indivíduos, motivo pelo qual são consideradas como as impressões digitais do DNA de cada um e são utilizadas em exames de paternidade (PINHO, 2005).

Por causa da natureza repetitiva das seqüências de microssatélite, estas estão sempre sujeitas as alterações freqüentes no número de repetições, originando a instabilidade de microssatélite (MSI) (BOLAND *et al.*, 1998).

Portanto, instabilidade de microssatélite é definida como alterações no número de unidades repetitivas em um ou mais microssatélites causado por deleções ou inserções de nucleotídeos no DNA do tumor quando comparados aos mesmos microssatélites existentes em amostras de DNA de tecido normal do mesmo indivíduo, como aquele obtido nas células sanguíneas, por exemplo. Dito de outra forma, as células tumorais apresentam “impressões digitais” defeituosas em seu DNA quando comparadas aos outros tecidos do organismo (ABE *et al.*, 2001; GERVAZ *et al.*, 2002).

Os MSI representam uma característica fenotípica marcante no *HNPCC*, estando presentes em 80% a 90% dos tumores nesta síndrome e, nos casos esporádicos, ocorrem em 10% a 20% do câncer colorretal (BOLAND *et al.*, 1998; DIETMAIER *et al.*, 1997). Com a incapacidade de reparo do DNA, há acúmulo de mutações genéticas, o que irá desencadear um processo de carcinogênese distinto da via clássica, não estando ainda esclarecido a sua participação ou não no processo da seqüência adenoma-carcinoma proposto por Fearon e Volgestein (1988).

Tumores que apresentam alta freqüência de MSI apresentam um fenótipo específico (fenótipo mutador), que inclui a localização preferencial na região proximal do colon direito, do tipo mucinoso, histologicamente pouco diferenciado, tipicamente diplóide, estadiamento menos avançado e com infiltração linfocitária marcante. Indivíduos com esses tumores apresentam melhor prognóstico e sobrevida do que pacientes com tumores com estabilidade cromossômica e com estabilidade de

microsatélite (MSS) e são resistentes a quimioterapia adjuvante com 5-fluorouracil (THIBODEAU *et al.*,1993; RIBIC *et al.*, 2003; LYNCH e CHAPELLE 2003; CHANG *et al.*, 2006).

Para compreendermos melhor o mecanismo da carcinogênese colorretal pela via de instabilidade de microsatélite abordaremos o mecanismo do mau pareamento do DNA e seus genes envolvidos, pois a falha deste mecanismo é a chave para compreensão da via de MSI no câncer colorretal (Figura – 8).

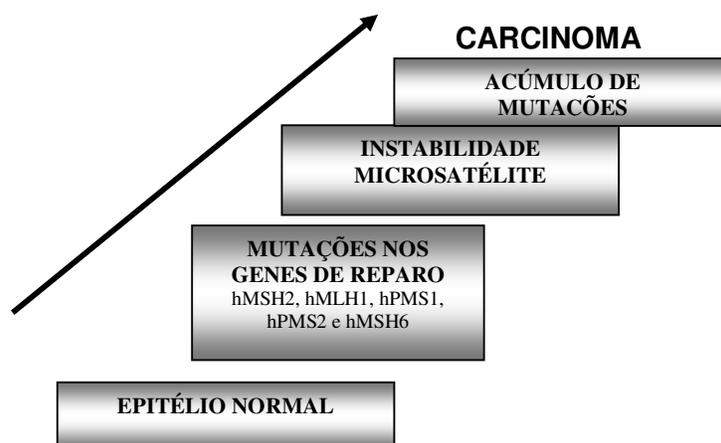


FIGURA 8 – Carcinogênese colorretal. Reparo defeituoso (*Mismatch repair*).

FONTE: PINHO M. e ROSSI B.M, (1999).

2.4.2.1. Genes de Reparo *MMR* no CCR

O DNA sofre freqüentemente alterações através de perdas de segmentos e mutações ocorridas durante o processo de divisão celular. Para corrigir tais alterações, dispõe-se de algumas proteínas com função de realizar os reparos necessários para manter a integridade do DNA. Estas proteínas são produzidas a partir de alguns genes conhecidos como genes de reparo (*mismatch repair genes – MMR*) e sua função é exercida de forma contínua, preservando os tecidos celulares (ABE *et al.*, 2001; GERVAZ *et al.*,2002).

Os mecanismos de reparo do DNA apresentam uma importância vital para a manutenção da integridade genética das células, em função destas estarem constantemente sendo bombardeadas por radicais livres e componentes exógenos capazes de afetar os componentes cromossômicos (HALES, 2005).

Sensores capazes de captar a presença de danos no DNA ativam vias de sinalização, que por sua vez, ativam marcadores celulares que alteram a expressão gênica, atrasando o ciclo celular devido ao processo de checagem por pontos de controle (*checkpoints*). Estes mecanismos podem resultar tanto na reparação do DNA celular quanto na ativação dos processos apoptóticos, caso o reparo na estrutura genética da célula não se mostre viável (HALES, 2005).

Os mamíferos apresentam quatro principais mecanismos de reparo do DNA. São eles: o reparo por excisão de nucleotídeos, responsável por corrigir a maioria dos danos ocorridos no DNA celular; o reparo por excisão de bases, que corrige alguns danos oxidativos; o reparo por interrupções de fitas duplas, a mais tóxica de todas as lesões ao qual o DNA está submetido e, que pode ser induzida por radiação ionizante, algumas drogas, colapso no processo de replicação e por algumas endonucleases específicas. Por fim, o reparo do mau pareamento do DNA, que corrige problemas no pareamento do DNA durante a replicação.

O reparo do mau pareamento é um sistema que garante a estabilidade genômica através da identificação e correção das bases pareadas erroneamente durante a síntese do DNA (ESHLEMAN; MARKOWITZ, 1996). Os genes de (RMP) do DNA são homólogos aos encontrados na bactéria *Escherichia coli* e na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Até agora, sete genes dos sistemas de (RMP) de DNA foram identificados em humanos: *MSH2*, *MLH1*, *MS1*, *PMS2*, *MSH3*, *hMSH6* e *MLH3*. Uma vez que a função destes genes reparadores é assegurar que a informação genética seja copiada corretamente durante a divisão celular, quando são danificados ou sofrem mutações, aumenta a frequência de outras mutações genéticas que podem levar ao câncer (Figura 9) (LOEB, 1999).

Os principais genes envolvidos no *MMR* (*mismatch repair genes*) no câncer colorretal hereditário e esporádico, são: *MLH1* (*Gene Human mut - L Homologue 1*), *MSH2* (*Gene Human mut - S Homologue -2*), *MSH6* (*Gene Human mut - s Homologue - 6*) (GRIZZLE *et al.*, 1999). O gene *MLH1* está localizado no cromossoma 3p21-23 em área de importância para os genes envolvidos no câncer colorretal hereditário não polipóide (LINDBLOM *et al.*, 1993; NYNSTROM-LAHTIM *et al.*, 1994). O gene *MSH2* está localizado no cromossoma 2p21, em área inicialmente identificada como região importante para genes envolvidos no Câncer Colorretal Hereditário Não Poliplóide (*HNPCC*) (LEACH *et al.*, 1993; PELTOMAKI *et al.*, 1993), o gene *MSH6* está localizado também está localizado no cromossoma 2 mas sua localização é 2p16 h (AALTONEM *et al.*, 1993).

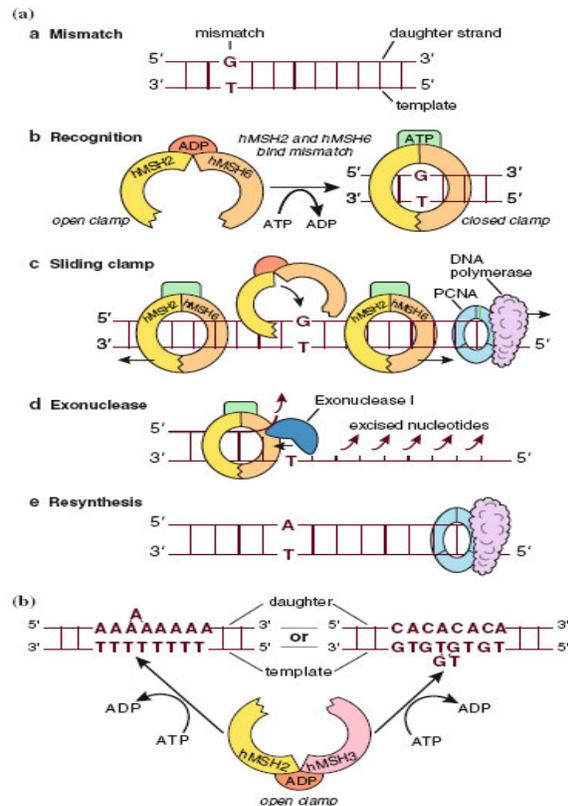


FIGURA 9 – Reparo das proteínas do complexo (*MMR*) no DNA. Quando detectado um mau pareamento, a correção ocorre na fita recém-sintetizada que não foi ainda metilado, possibilitando que o sistema de reparo corrija o filamento que tem uma base normal no lugar errado e impede que o mau pareamento leve a uma mutação. As proteínas conhecidas como envolvidas especificamente no reparo de mau pareamento dirigida por metila são chamadas proteínas mutadoras. Um defeito no sistema de reparo de mau pareamento dirigido por metila pode causar o *HNPCC*.

FONTE: BOLAND *et al.* (2008).

A observação de um grande número de alterações nas seqüências de microssatélite em um determinado tecido tumoral demonstra a ausência de uma função normal de reparo de DNA. Representa conseqüentemente, uma evidência indireta de que existe uma deficiência na ação das proteínas de reparo causada pela presença de mutações. A este tipo de defeito genético denominamos erros de replicação (*replications errors – RER +*) (NILBERT *et al.*, 1999; WARD *et al.*, 2001).

Em um workshop internacional, realizado em 1997 nos Estados Unidos sobre *MSI* e erros de replicação do DNA na detecção de câncer e predisposição familiar, foi proposto um painel de 5 marcadores de microssatélite (dois mononucleotídeos – BAT25 e BAT26 e três dinucleotídeos – D5S346, D2S123 e D17S250) para serem utilizados em análise de *MSI* em pacientes com câncer colorretal (LOUKOLA *et al.*, 2001; BOLAND *et al.*, 1998).

Os tumores *MSI* são classificados em três grupos: *MSI-H (high)*, quando mais de 30% - 40% dos microssatélites investigados estão instáveis; *MSI-L (low)* se a instabilidade é observada em menos de 30% - 40% dos microssatélites investigados e *MSS* (microssatélite estável) se não for observada instabilidade em nenhum dos microssatélites investigados (BOLAND *et al.*, 1998).

Alterações nos genes *MLH1* e *MSH2* são a principal causa de instabilidade de microssatélite em *HNPCC* e apenas um pequeno número dos casos de *HNPCC* se deve a mutações herdadas em *MSH6*. Defeitos em outros genes do sistema de reparo ocorrem em pequenas porções de casos, tanto esporádicos quanto relacionados à síndrome, e estas diferenças são atribuídas ao fato de que algumas proteínas do sistema de reparo do DNA apresentam funções únicas, enquanto outras têm um papel parcial (YANG *et al.*, 2004).

LANZA *et al.* (2002), avaliando a expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo *MLH1* e *MLH2* e instabilidade de microssatélite pelo painel molecular proposto pelo *Workshop of Bethesda*, em 724 amostras de adenocarcinomas colorretais,

verificaram que 133 (18%) foram classificados como *MSI – H*, 23 (3,2%) como *MS-L* e 568 (78,4%) com *MSS*. A perda da expressão de *hMLH1* ou *hMSH2* foi observada em 120 (90,9%) dos 132 tumores com (*MSI-H*): do total de tumores com imunistoquímica negativa, 106 (80,3%) apresentaram perda de expressão *hMSH2*. A expressão de *hMLH1* e *MSH2* foi comparada com características clínicas e patológicas e, os autores observaram que a expressão negativa para as proteínas de reparo está associada com maior frequência de tumores no cólon proximal e que tumores sem expressão de *hMLH1* apresentam maiores dimensões, são mais indiferenciados e apresentam maior frequência da expressão normal da proteína p53, o que indicava funcionamento adequado da proteína, indicando outra via de carcinogênese.

A instabilidade de microssatélite de alto grau (*MSI-H*) é rara na ausência de displasia de alto grau, sugerindo ser provavelmente um evento tardio, resultante da transição de adenoma para carcinoma. Tumores com *MSI*, são responsáveis por 10%-20% de todos os cânceres colorretais esporádicos, causados principalmente pela hipermetilação do gene *MLH1*, levando à perda da expressão da proteína (KANE *et al.*, 1997; CUNNINGHAM *et al.*, 1998; HERMAN *et al.*, 1998).

Estudos realizados por NUNN *et al.* (2003) e MARCUS *et al.* (1999) têm comprovado a ausência ou redução da expressão das proteínas de reparo do DNA não somente em carcinomas colorretais, mas também em carcinomas epidermoídes de cabeça e pescoço. A redução na expressão da proteína *hMLH1* está intimamente relacionada à alta instabilidade de microssatélite (*MSI-H*) em lesões presentes em portadores da síndrome *HNPCC* e é atribuída a mutação, deleção ou hipermetilações no alelo nativo, que resultam em deficiência no sistema de reparo do DNA (MARCUS *et al.*, 1999). Entretanto, a hipermetilação da região promotora do gene *MLH1* é a principal causa da ausência da imunexpressão da proteína *hMLH1*, ocorrendo na maioria dos tumores esporádicos (LEUNG *et al.*, 1999). Consequentemente, a imunistoquímica para *hMLH1* pode ser utilizada como marcador de *MSI-H*.

A existência de um fenótipo metilador *CpG island* tem sido postulada para explicar a hipermetilação somática associada com o silenciamento do gene *MLH1* e diversos outros genes supressores de tumor (YAMASSHITA *et al.*, 2003). A perda da

expressão da proteína hMSH2 também tem sido descrita, mas pelo fato do promotor do gene MSH2 não tornar-se metilado, é mais provável a ocorrência de uma mutação germinativa em um dos alelos desses pacientes (MITCHELL 2005; HATCH *et al.*, 2005).

LONGACRE e FENOGLIO-PREISER (1990), reconheceram que alguns pólipos hiperplásicos apresentam displasia, fenômeno referido com adenoma serrilhado ou como uma associação de pólipo hiperplásico com pólipo adenomatoso. Em trabalhos mais recentes, têm-se sugerido que pólipos hiperplásicos do cólon direito sejam precursores dos cânceres colorretais esporádicos com MSI (JASS *et al.*, 2000; JASS, 2001).

CHANG-HO *et al.* (2008) em seu trabalho, estudaram 78 pacientes com câncer colorretal, investigando alterações genéticas nos genes *APC*, *K-ras*, *TP53*, MSI, por análise molecular (PCR). Verificaram mutações em 64,1% dos pacientes genes *K-ras*, *TP53*, *APC* e sendo que 69,2% também apresentaram alterações de instabilidade de microssatélite.

Uma pequena parcela dos pacientes portadores de *HNPCC* apresenta mutações hereditárias em *MSH6*, enquanto uma grande parte dos casos atípicos de (*HNPCC*), que se manifestam tardiamente e se apresentam isolados na família, evidenciam alterações na expressão desta proteína (BUTTIN *et al.*, 2004; LAWES *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2004).

DE JONG *et al.* (2004), em seu trabalho, com 249 portadores de *HNPCC*, avaliaram a expressão de *MLH1*, *PMS2*, e *MSH2* através do método imunoistoquímico e, observaram que os portadores de mutação nos genes de reparo desenvolveram adenomas em idade mais precoce do que os não portadores. Além disso, os adenomas dos portadores têm maior ocorrência de displasia de alto grau e de ausência de expressão das proteínas de reparo, recomendando a realização de imunoistoquímica nos adenomas de pacientes jovens.

PIÑOL *et al.*, (2005) utilizaram o método imunistoquímico para testar a acurácia dos critérios de Bethesda com os marcadores hMLH1 e hMSH2 na identificação do pacientes com *HNPCC*. Os autores concluíram que os critérios de Bethesda revisados constituem uma abordagem boa para a seleção de pacientes sob risco de *HNPCC*. Nos pacientes que preenchem os critérios, a utilização da análise de instabilidade de microssatélite e da perda da expressão das proteínas são uma peça fundamental na identificação da síndrome.

HOWKINS e WARD (2001) observaram a perda da expressão da proteína hMLH1 e, concluíram que alguns pólipos hiperplásicos localizados no cólon direito podem estar associados com câncer colorretal esporádico com MSI, porém a frequência com que às lesões benignas progridem para o câncer com instabilidade de microssatélite é desconhecida.

Capítulo 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Laboratório de pesquisa

O método Tissue Microarray (TMAs) foi realizado no Laboratório de Histotecnologia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

As técnicas laboratoriais de imunistoquímica com os anticorpos monoclonais específicos para hMLH1, hMSH6, hMSH2 e p53 foram realizadas no Laboratório de Imunistoquímica do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

A técnica de imunistoquímica da proteína de reparo hMSH2 foi realizada no Laboratório de Imunistoquímica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC).

3.2. Casuística

Foram selecionadas 51 amostras de casos de carcinoma de cólon e reto, provenientes dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), seguindo a linha de pesquisa: “Fatores de risco na disseminação das neoplasias do intestino grosso e marcadores biomoleculares no diagnóstico precoce e prognóstico das neoplasias digestivas”, sob coordenação do Professor José Ederaldo Queiroz Telles. Este projeto obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em humanos da mesma instituição (ver termo de aprovação no Anexo A).

3.2.1. Critérios de exclusão

Os casos de tumores colorretais foram excluídos quando o paciente:

- Era portador de Doença Inflamatória Intestinal;
- Preenchia os critérios internacionais de Bethesda e Amsterdam II (Anexo B).

3.3. Técnicas empregadas

3.3.1. Técnica histológica

Os espécimes foram fixados em formol 10% e processados automaticamente, incluídos em parafina e cortados em micrótomo rotativo, onde foram obtidos os cortes histológicos de 4µm de espessura.

Os cortes histológicos foram distendidos em banho-maria histológico e, posteriormente, em lâminas de vidro carregadas positivamente (*STAR FROST®*, Made in Germany). Estas foram levadas à estufa a 60°C por 24h.

A partir de cada bloco foi feita uma lâmina com coloração de hematoxilina – eosina (HE) (BANCROK; STEVENS, 1977; MICHANY, 1980; SPENCER, 1982) para verificação da representatividade.

3.3.2. Parâmetros patológicos

O diagnóstico histopatológico e a graduação do câncer colorretal, foram feitos conforme descrito pela OMS (Organização Mundial da Saúde) (BARNES *et al.*, 2005).

Revisaram-se lâminas, prontuários e laudos anátomo-patológicos observando-se as seguintes variáveis: sexo, idade, tipo histológico, grau de diferenciação, profundidade de invasão, localização tumoral e estadió.

Os resultados foram incluídos em banco de dados no programa computacional Microsoft Access® (Apêndice A), para facilitar uma análise global das variáveis anatomo-patológicas e favorecer pesquisas futuras.

3.3.3. Técnica Tissue Microarrays (TMAs) para imunoistoquímica

Para a realização das amostras dos TMAs analisaram-se histologicamente as lâminas de 51 pacientes em um total de 530 lâminas, levando-se em consideração a melhor área tumoral para o estudo imunoistoquímico.

Neste experimento, o método TMAs consistiu em extrair manualmente cilindros teciduais de blocos doadores de parafina (com uma pinça de *punch* n° 04) e, recolocá-los em um novo bloco receptor, de tal maneira que os tecidos de vários pacientes possam ser examinados na mesma lâmina.

As 51 amostras foram reunidas em grupos de 11 a 12 amostras, constituindo 5 novos blocos receptores, que continham a amostra da área tumoral selecionada. Para a identificação dos pacientes no TMAs, construiu-se um mapa de matriz com a localização de cada caso no bloco de parafina (ver quadro esquemático da técnica no Anexo C).

3.3.4. Técnica imunoistoquímica: Geral

O protocolo geral das reações imunoistoquímicas é descrito sequencialmente a seguir.

1. Desparafinização e Hidratação

Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, de 15 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, reidratados em banhos descendentes de etanóis, com passagens em etanol absoluto, etanol 95% e duas passagens de etanol 70% durante 5 minutos cada.

2. Recuperação Antigênica

Em seguida, realizaram-se lavagens dos cortes em água corrente por 10 minutos, seguidas por banhos em água destilada e, pelo tratamento das lâminas para recuperação antigênica. Este tratamento consistiu em mergulhá-las em tampão (EDTA) pH 8,0, em banho-maria a uma temperatura de 96°C. O tempo de incubação depende do anticorpo utilizado. Após o tratamento, as lâminas foram deixadas em repouso até que atingissem a temperatura ambiente.

3. Bloqueio da Peroxidase Endógena

Após o resfriamento, os cortes foram novamente lavados em água corrente por dez minutos, com duas passagens subseqüentes em água destilada e um banho de 10 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol (1:1, v/v) para bloqueio da peroxidase endógena tecidual.

4. Incubação Anticorpo Primário

As lâminas foram lavadas novamente em água corrente por dez minutos e posteriormente imersas em três banhos em solução (TBS) pH 7,3 por cinco minutos

cada. Em seguida, os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário por período de tempo variável para cada anticorpo utilizado.

5. Sistema de Detecção

Após a incubação com o anticorpo primário, foi realizada a lavagem com tampão (TBS) pH 7,3 por cinco minutos. Em seguida, foi feita a incubação, também em câmara úmida, com o sistema de detecção (vide cada anticorpo).

6. Revelação

Após nova lavagem com tampão (TBS) pH 7,3 seguida por dois banhos consecutivos de cinco minutos cada, a reação foi revelada por meio da imersão das lâminas na solução do cromógeno 3'3 diaminobenzidina tetrahidrocloro (*DAB*, *SIGMA-Aldrich Co., St. Louis, USA*) por dez minutos.

7. Finalização e Montagem

Os cortes foram então lavados em solução tampão de (TBS) e submetidos a quatro lavagens consecutivas com água destilada. Em seguida foram contra-corados com hematoxilina de Mayer por dois minutos e lavados por dez minutos em água corrente.

As lâminas foram posteriormente submetidas a desidratação em cadeia ascendente de etanóis e, diafanização em três banhos de xilol e montagem com Entellam ® neu (Merk KgaA- Alemanha).

3.3.5. Imunoistoquímica para hMLH1

A reação imunoistoquímica para hMLH1 diferiu do protocolo geral nos seguintes aspectos:

- *Recuperação Antigênica:* tempo de recuperação foi de 30 minutos a uma temperatura de 96°C.
- *Incubação do Anticorpo Primário:* O anticorpo hMLH1 (Host: Mouse, clone: 14) (Zymed®, prediluído) foi incubado por 20 horas a 4°C, em câmara úmida.
- *Sistema de Detecção:* Utilizou-se o método do polímero marcado com o Kit SuperPicTure™ 2ª geração (Zymed®), no qual o anticorpo secundário é incubado por 20 minutos. Após a incubação, as lâminas são lavadas três vezes com tampão (TBS) pH 7,3 em seguida incubadas com o polímero conjugado (HRP), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Os controles positivos externos para a proteína hMLH1 foram uma amostra de melanoma e uma amostra de tecido de cólon normal. Estes tecidos foram selecionados por apresentarem níveis elevados da expressão desta proteína de reparo.

Os controles positivos internos foram de linfócitos B (ativados) e células estromais do próprio tecido, por apresentarem níveis elevados da expressão da proteína.

3.3.5.1. Interpretação para hMLH1

A reação imunoistoquímica foi examinada ao microscópio óptico com aumento de (400X). A reação foi considerada positiva quando houve coloração nuclear acastanhada para a expressão das proteínas hMLH1. Foram consideradas como negativas as células com núcleos de coloração azul, contracolorados pela hematoxilina de Mayer.

A imunorreatividade da proteína hMLH1 no tecido estudado (coloração nuclear acastanhada) é refletida como resultado positivo. Um resultado positivo (+) é interpretado como funcionamento normal do gene.

A perda da imunorreatividade da proteína hMLH1 no tecido estudado (sem coloração nuclear acastanhada) é refletida como resultado negativo. Um resultado negativo (-) é interpretado como alteração na expressão gênica, esta alteração pode estar sendo ocasionada por mutação no gene *MLH1*.

3.3.6. Imunoistoquímica para hMSH6

A reação imunoistoquímica para hMSH6 diferiu do protocolo geral nos seguintes aspectos:

- *Recuperação Antigênica:* O tempo de recuperação foi de 30 minutos a uma temperatura de 96°C.
- *Incubação Anticorpo Primário:* O anticorpo “hMSH6 (Host: Mouse, Clone: 2D4B5) (Zymed®)”, diluição (1:200), foi incubado por 45 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida.
- *Sistema de Detecção:* Utilizou-se o método do polímero marcado com o Kit SuperPicTure™ 2ª geração (Zymed®), no qual o anticorpo secundário é incubado por 20 minutos. Após a incubação, as lâminas são lavadas três vezes com tampão (TBS) pH 7,3 em seguida incubadas com o polímero conjugado (HRP), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

O controle positivo externo para reação imunoistoquímica para hMSH6 foi uma amostra de apêndice, por apresentar níveis elevados da expressão desta proteína.

Os controles positivos internos foram de linfócitos B (ativados) e células estromais do próprio tecido, por apresentarem níveis elevados da expressão da proteína.

3.3.6.1. Interpretação para hMSH6

As lâminas da reação imunoistoquímica foram examinadas ao microscópio óptico, com um aumento de (400X). Considerou-se a reação positiva quando houve coloração nuclear acastanhada para a expressão da proteína hMSH6.

A imunorreatividade da proteína hMSH6 no tecido estudado (coloração nuclear acastanhada) é refletida como resultado positivo. Um resultado positivo (+) é interpretado como funcionamento normal do gene.

A perda da imunorreatividade da proteína hMSH6 no tecido estudado (sem coloração nuclear acastanhada) é refletida como resultado negativo. Um resultado negativo (-) é interpretado como alteração na expressão gênica, esta alteração pode estar sendo ocasionada por mutação no gene *MSH6*.

3.3.7. Imunoistoquímica para hMSH2

A reação imunoistoquímica para hMSH2 diferiu do protocolo geral nos seguintes aspectos:

- *Recuperação Antigênica:* Tempo de recuperação foi de 30 minutos a uma temperatura de 96°C.
- *Incubação do Anticorpo Primário:* O anticorpo “hMSH2 (Host: Mouse, clone: FE11) (Zymed®)” diluição (1:300), foi incubado por 45 minutos a temperatura ambiente.

- *Sistema de Detecção:* A incubação do anticorpo secundário utilizou o sistema do polímero marcado (ADVENCE, DaKo), em câmara úmida durante 30 minutos do anticorpo secundário (ADVENCE HRP Link) seguida de banhos de tampão (TBS), pH 7,3 por 5 minutos, com posterior incubação do conjugado (ADVENCE HRP Enzyme) por 30 minutos.

O controle positivo externo para reação imunoistoquímica para hMSH2 foi uma amostra de tecido de cólon normal, por apresentar níveis elevados da expressão desta proteína.

Os controles positivos internos foram de linfócitos B (ativados) e células estromais do próprio tecido, por apresentarem níveis elevados da expressão da proteína.

3.3.7.1. Interpretação para hMSH2

As lâminas da reação imunoistoquímica foram examinadas ao microscópio óptico, com um aumento de (400X). Considerou-se a reação positiva, quando houve coloração nuclear acastanhada para a expressão da proteína hMSH2.

A imunorreatividade da proteína hMSH2 no tecido estudado (coloração nuclear acastanhada) é refletida como resultado positivo. Um resultado positivo (+) é interpretado como funcionamento normal do gene.

A perda da imunorreatividade da proteína hMSH2 no tecido estudado (sem coloração nuclear acastanhada) é refletida como resultado negativo. Um resultado negativo (-) é interpretado como alteração na expressão gênica, esta alteração pode estar sendo ocasionada por mutação no gene *MSH2*.

3.3.7.2. Avaliação das proteínas hMLH1, hMSH2, hMSH6 quanto ao *Status*

Segundo o resultado das reações imunoistoquímicas das três proteínas de reparo hMLH1, hMSH6, hMSH2, classificaram-se os tumores em três grupos:

1 - (*EPR-*) (Ausência de expressão da Proteína de Reparo): quando pelo menos uma proteína apresentou resultado negativo (-) perda da imunoexpressão.

2 - (*EPR+*) (Presença de expressão da Proteína de Reparo): quando houver imunoexpressão das proteínas de reparo (todos os três resultados positivos (+)).

3 – (*MSI -H*) (Alta Instabilidade de Microssatélite): tumores que apresentaram *EPR-* (Ausência de Expressão Proteína de Reparo), exceto quando houve perda (-) da imunoexpressão da proteína hMSH6, isoladamente.

A classificação *MSI (instabilidade de Microssatélite)* é baseada na premissa de que a imunoistoquímica apresenta sensibilidade de 92,3% e especificidade de 100% para os genes de reparo (*MMR*). Portanto, pode ser screenig para defeito dos genes de reparo (LINDOR *et al.*, 2002; FLEUR *et al.*, 2003). Porém o gene *MSH6* não pode ser associado isoladamente com o fenótipo *MSI* (BOLAND *et al.*, 2008).

3.3.8. Imunoistoquímica da p53

A reação imunoistoquímica para p53 diferiu do protocolo geral nos seguintes aspectos:

- *Recuperação Antigênica*: tampão (EDTA), pH 8,0 por 20 minutos a uma temperatura de 96°C.

- *Incubação do Anticorpo Primário*: O anticorpo “p53 (clone DO-7®, DAKO/AS)” diluição (1:200), foi incubado por 45 minutos a temperatura ambiente.

- *Sistema de Detecção*: Utilizou-se o método do polímero marcado com o Kit SuperPicTure™ 2ª geração (Zymed®), no qual o anticorpo secundário é incubado por 20 minutos. Após a incubação, as lâminas são lavadas três vezes com tampão (TBS) pH 7,3 em seguida incubadas com o polímero conjugado (HRP), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para a reação da proteína p53, utilizou-se como controle externo um adenocarcinoma de cólon utilizado na rotina do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.3.8.1. Interpretação para p53

A reação imunoistoquímica foi examinada ao microscópio óptico, com um aumento de (400X). A reação foi considerada positiva, quando houve coloração nuclear acastanhada para a expressão da proteína p53. Foram consideradas como negativas as células com núcleos de coloração azul, contracolorados pela hematoxilina de Mayer.

Quando houve imunorreatividade nuclear no tecido estudado (hiperexpressão) traduzindo alteração na expressão gênica da proteína p53 está, é refletida como resultado positivo.

Um resultado positivo (+) é interpretado como hiperexpressão da proteína. Esta pode estar sendo ocasionada por mutação no gene *Tp53*.

Quando não houve imunorreatividade da proteína p53 está, é interpretada como resultado negativo. Um resultado negativo (-) é interpretado como funcionamento normal do gene.

Na avaliação da positividade das reações para proteína p53, fez-se uso dos critérios abaixo (ILYAS, TALBOT, 1995).

- Negatividade: Menos de 10% das células positivas;
- Positividade +: Imunorreatividade de 10 – 25%;
- Positividade ++: Imunorreatividade de 25 – 50%;
- Positividade +++: Mais de 50% das células imunopositivas.

As reações positivas foram reunidas em único grupo para aumentar o poder estatístico.

3.4. Metodologia Estatística

Os dados foram registrados no programa (Microsoft Access®), conferidos e transportados para software Minitab Statística®. Para a comparação clínico-patológica das alterações dos marcadores utilizou-se o teste de T-Student (Fischer's) teste do qui-quadrado e Binominal teste (valor de $p < 0,05$ considerado significativo). O índice de confiança (IC 95%) foi calculado de acordo com a natureza da distribuição e caráter de dependência ou independência dos marcadores tumorais. A análise de média, mediana, máximo e mínimo, desvio padrão também foi empregada nesta pesquisa para idade e sexo.

Capítulo 4

RESULTADOS

Analisaram-se 51 casos de câncer colorretal esporádico referentes ao período de (1995 – 2005), provenientes do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná UFPR, Curitiba, PR.

4.1. Distribuição dos casos quanto ao sexo

A incidência de CCR em (n=51) pacientes observou-se que a está foi maior no sexo masculino (Figura 10).

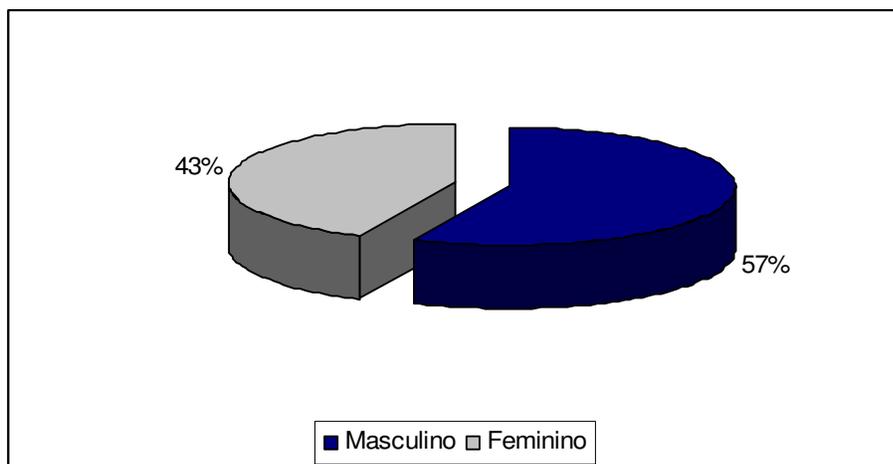


FIGURA 10 - Distribuição dos casos de câncer colorretal esporádico segundo o sexo.

4.2. Distribuição dos casos quanto à idade

Nos (n=51) casos analisados observou-se que a média de idade foi de 59,14 anos (variância de 24,00 – 91,00 anos).

A doença foi mais freqüente (n=17) na faixa etária (61-70), correspondendo a 33,33% dos casos com uma distribuição normal entre as faixas etárias (Figura 11).

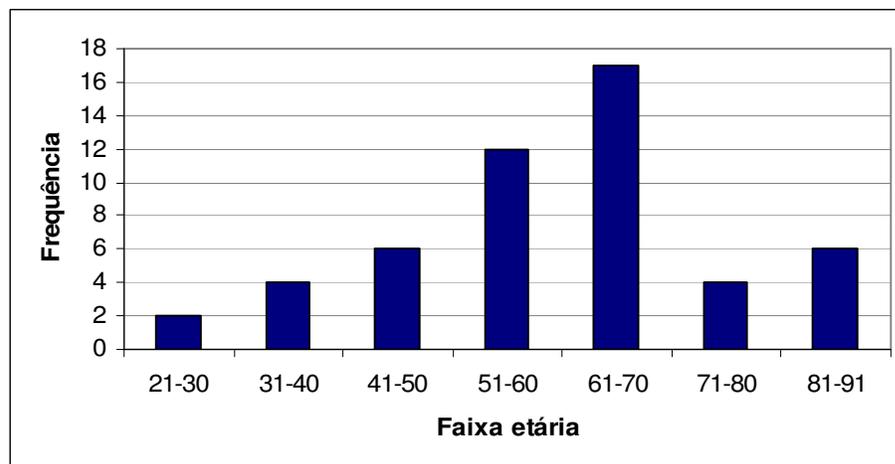


FIGURA 11 - Distribuição dos 51 casos de câncer colorretal esporádico por grupo etário.

4.3. Distribuição dos casos quanto ao tipo histológico e o grau de diferenciação

Os tipos histológicos encontrados na análise dos tumores foram: tubular (n=31), túbulo – papilífero (n=12) e mucinoso (n=8) (Figura 12).

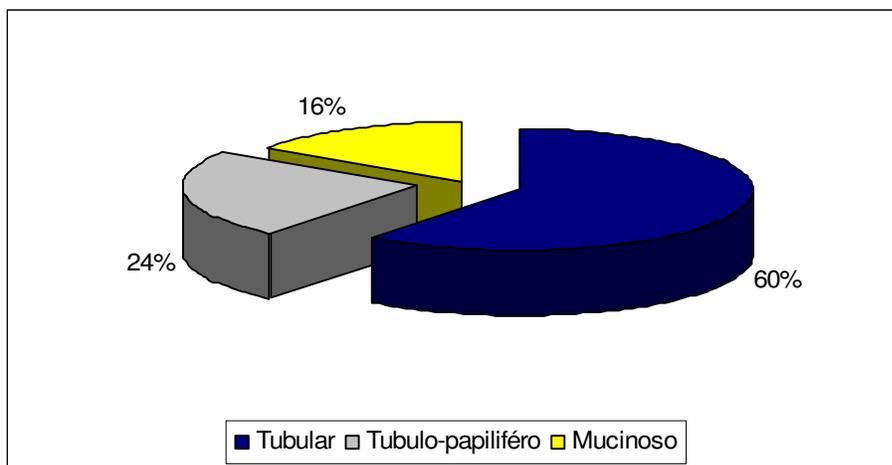


FIGURA 12 – Distribuição dos 51 casos de CCR esporádico em relação ao tipo histológico.

Em todos os tumores estudados, o grau de diferenciação histológica apresentou-se: bem diferenciado (G1) em 35% (n=18) dos casos, moderadamente diferenciado (G2) em 51% (n=26) e pouco diferenciado em 14% (n=7) (G3) dos casos (Figura 13).

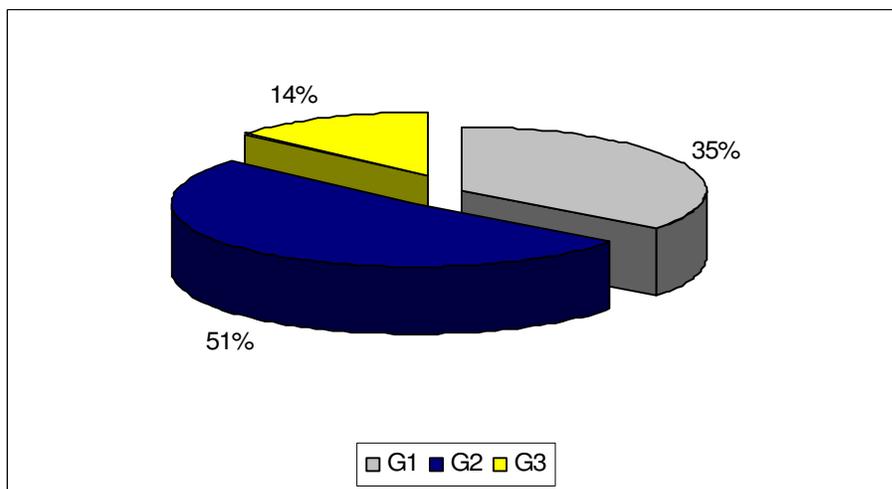


FIGURA 13 – Distribuição dos 51 casos de CCR quanto o grau de diferenciação.

4.4. Distribuição dos casos quanto ao TNM e estádio

Em 30 casos (58,82%) observou-se invasão da sub-serosa (pT3) e em 3 casos (5,88%) houve invasão de outros órgãos ou estruturas (pT4). A profundidade de invasão até a muscular própria (pT2) foi observada em 16 casos (31,37%) (Figura 14).

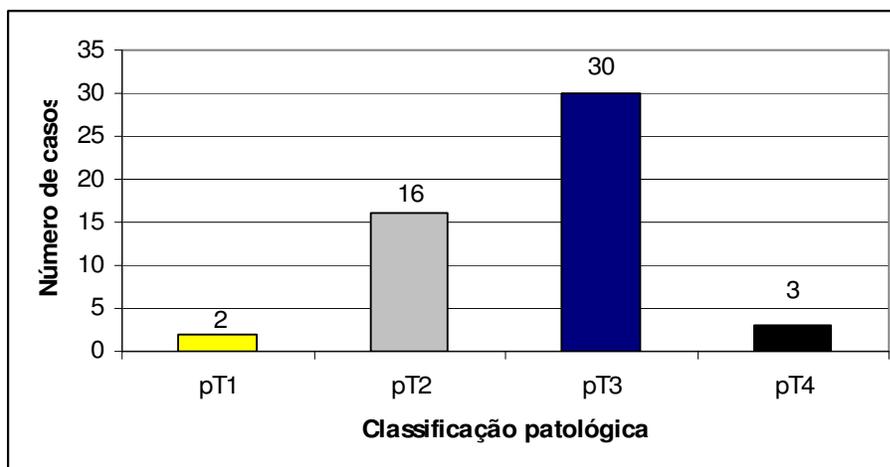


FIGURA 14 – Distribuição de 51 casos de câncer colorretal em relação à profundidade de invasão (pT) segundo o sistema TNM.

No agrupamento por estádios, observa-se uma incidência maior no estágio IIA, seguidos por estágio I e IIB (Figura 15).

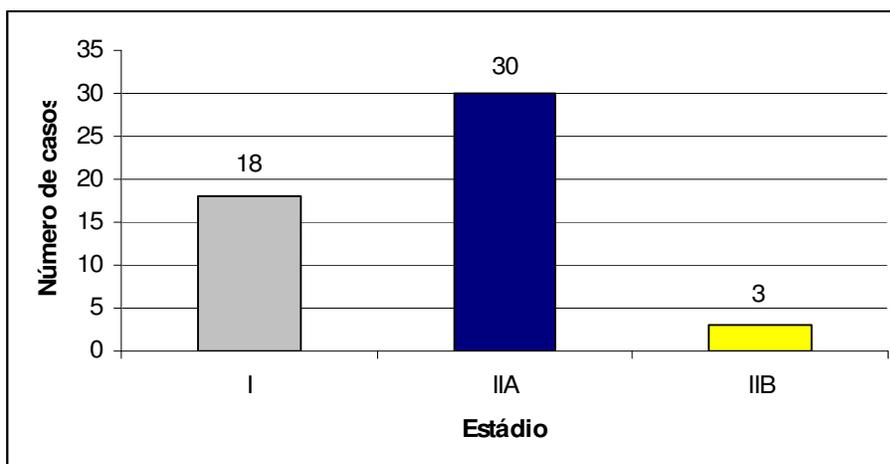


FIGURA 15 – Distribuição de 51 casos de câncer colorretal em relação ao estágio.

4.5. Distribuição dos casos quanto à reatividade ao p53

A hiperexpressão da proteína p53 foi observada em 84,31% dos tumores analisados (Figura 16 e Tabela 6).

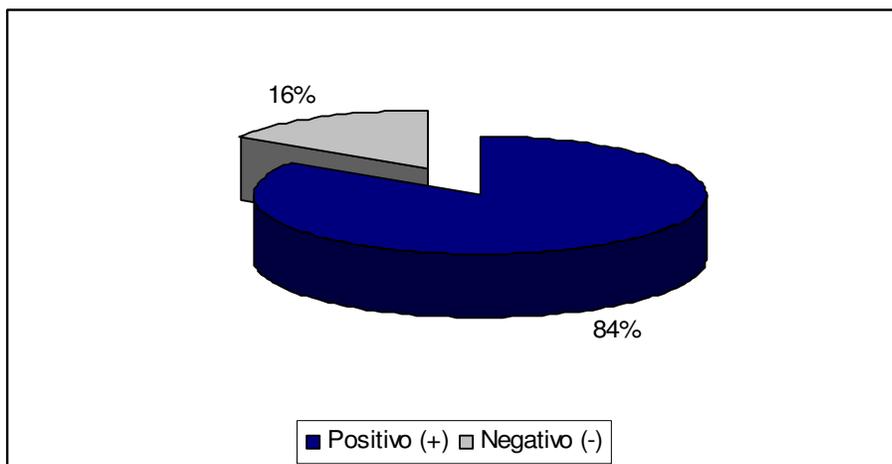


FIGURA 16 – Distribuição da imunorreatividade da proteína p53 em 51 casos de Câncer Colorretal esporádico.

TABELA 6 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53.

Imunoexpressão	n	Proporção	Teste Prop.	Valor de p*
p53 +	43	84,31%	50,00%	0,00626
p53 -	8	15,69%		
Total	51	100,00%		

NOTA: * Binominal Teste.

A Figura 17 apresenta a hiperexpressão nuclear da proteína p53 (evidenciada pelo anticorpo monoclonal DO-7).

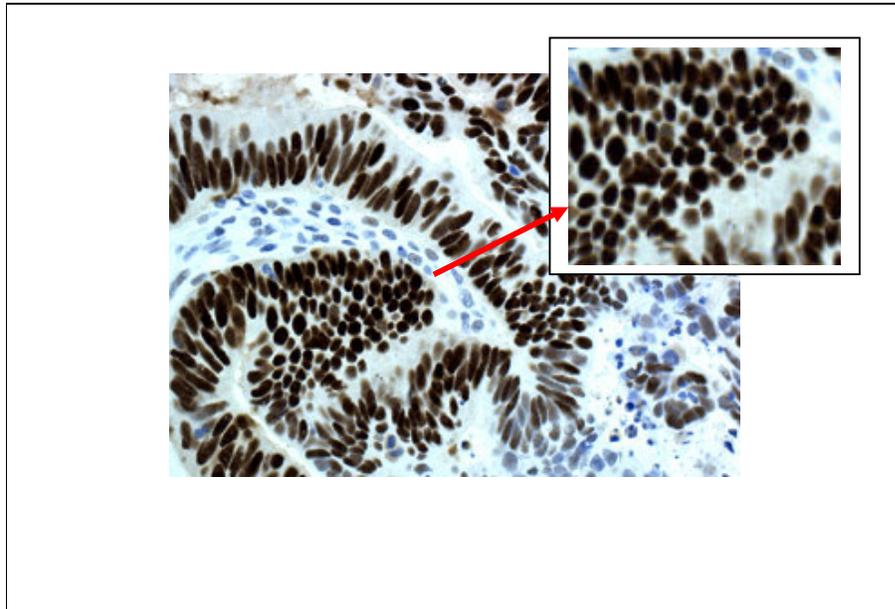


FIGURA 17 – Análise imunohistoquímica de câncer colorretal. No detalhe da foto a hiperexpressão positiva da proteína p53; (objetiva x 100).

4.6. Distribuição dos casos quanto à reatividade das proteínas de reparo

Não houve imunoposição das proteínas de reparo hMLH1, hMSH2, hMSH6 em 15,69%, 11,76% e 17,65% respectivamente (Figura 18 e Tabela 7).

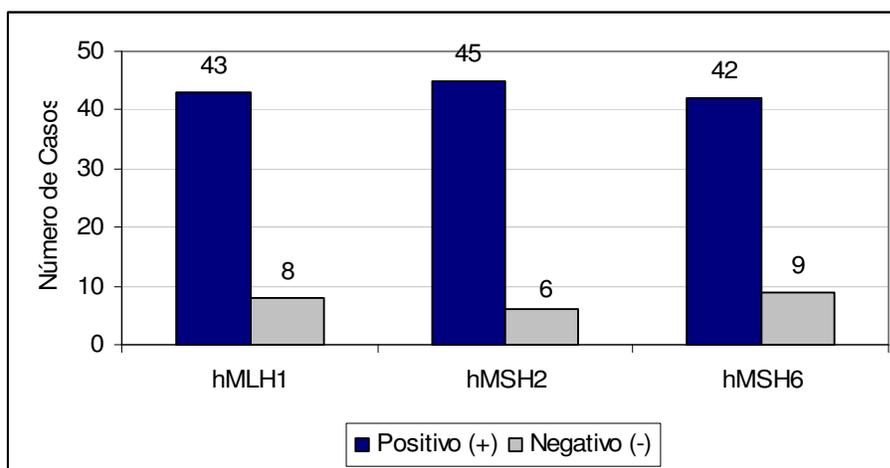


FIGURA 18 – Incidência da expressão das proteínas de reparo hMLH1, hMSH2, hMSH6 em 51 casos com CCR esporádico.

TABELA 7 – DESCRIÇÃO ESTATÍSTICA DA REATIVIDADE DAS PROTEÍNAS DE REPARO.

Proteína	Expressão	n	Proporção	Teste Prop.	Valor de P
hMLH1	+	43	84,31%	50,00%	0,00626
	-	8	15,69%		
	Total	51	100,00%		
hMSH2	+	45	88,24%	50,00%	0,00061
	-	6	11,76%		
	Total	51	100,00%		
hMSH6	+	42	82,35%	50,00%	0,00840
	-	9	17,65%		
	Total	51	100,00%		

NOTA: Binominal Teste.

A Figura 19 apresenta a imunoposição das proteínas de reparo hMLH1, hMSH2 e hMSH6.

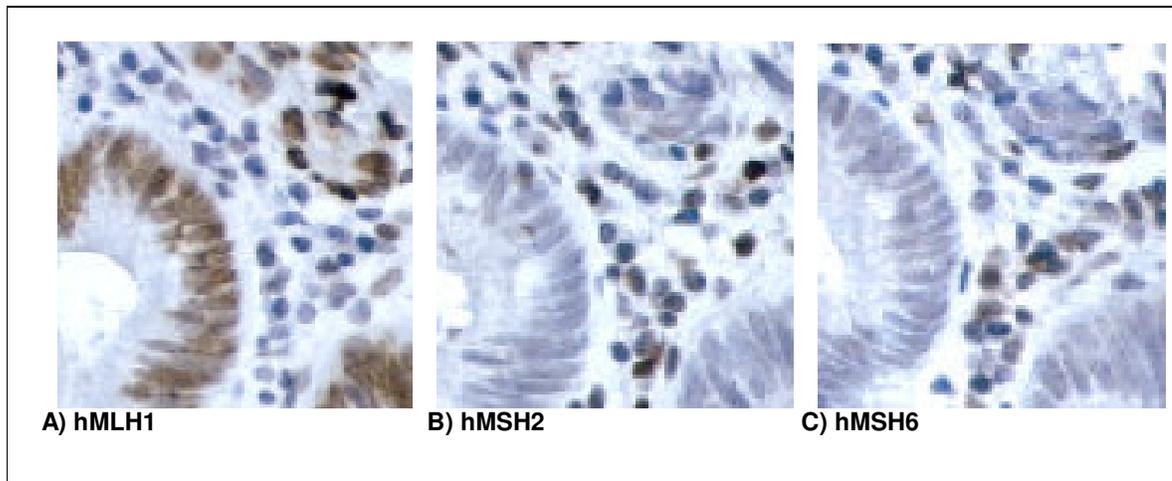


FIGURA 19 – Análise imunistoquímica de câncer colorretal. **A)** imunoposição positiva da proteína hMLH1; **B)** imunoposição negativa da proteína hMSH2; **C)** imunoposição negativa para proteína hMSH6 (objetiva x 100).

4.7. Distribuição dos casos quanto ao *status* das proteínas de reparo

Na Figura 20 e na Tabela 8 observa-se a porcentagem de tumores com (EPR - Ausência de Expressão Proteína de Reparo) e (EPR + Presença de Expressão Proteína de Reparo).

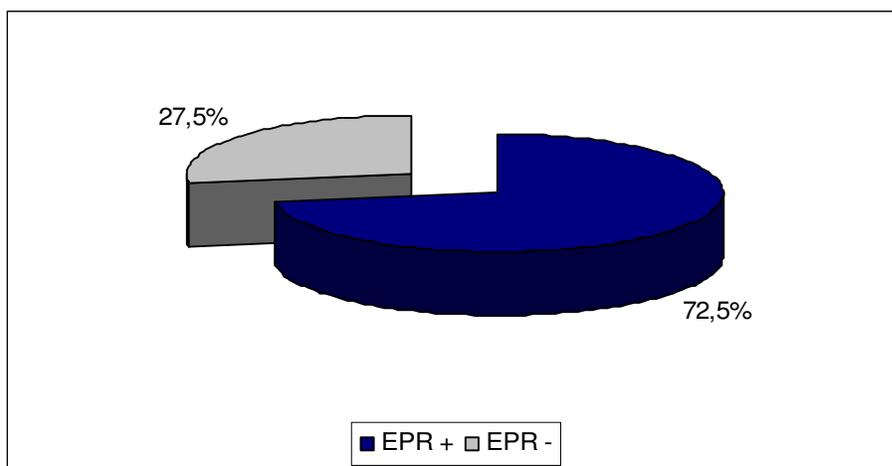


FIGURA 20 – *Status* das proteínas de reparo casos com CCR esporádico.

TABELA 8 – DISTRIBUIÇÃO DO *STATUS* DAS PROTEÍNAS DE REPARO.

<i>Status</i>	N	Proporção	Teste prop.	Valor de p*
EPR +	37	72,55%	50%	0,00177
EPR -	14	27,45%		
Total	51	100,00%		

NOTA:* Binominal Teste IC 95%.

4.8. Distribuição dos casos quanto ao *status* MSI

Na Figura 21 e na Tabela 9 observa-se a percentagem do *status* MSI – H.

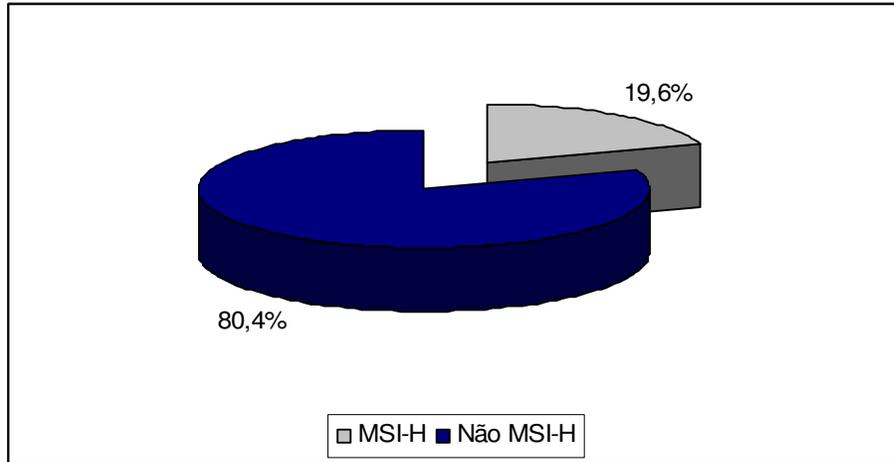


FIGURA 21 – *Status* MSI-H casos com CCR esporádico.

TABELA 9 – DISTRIBUIÇÃO DO *STATUS* MSI-H.

<i>Status</i>	N	Proporção	Teste prop.	Valor de p*
MSI -H	10	19,60%	50%	0,0000147
Não MSI -H	41	80,40%		
Total	51	100,00%		

NOTA: Binominal Teste.

4.9. Correlação da proteína p53 com as características clínico-patológicas

Na Tabela 10 observa-se a correlação entre as características clínico-patológicas e a expressão da proteína p53 nos 51 casos de carcinoma colorretal estudados.

TABELA 10 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS *VERSUS* p53.

Características Clínico - Patológicas		p53		Valor de P*
		+ (n= 43)	- (n= 8)	
Gênero	Feminino	17	5	0,2676
	Masculino	26	3	
Grau de Diferenciação	G1	14	4	0,5081
	G2	22	4	
	G3	7	0	
Tipo Histológico	Tubular	24	7	0,2189
	Mucinoso	7	1	
	Túbulo-papilífero	12	0	
Localização	Cólon Proximal	7	1	1
	Cólon Distal	36	7	
Estadio	I	15	3	0,543
	IIA	26	4	
	IIB	2	1	

NOTA: *Teste T (Fischer's).

Observa-se na Tabela 11 a correlação entre a proporção da hiperexpressão da proteína p53 *versus* as variáveis: características clínico-patológicas e expressão das proteínas de reparo.

TABELA 11 – HIPEREXPRESSÃO p53 + *VERSUS* AS VARIÁVEIS.

	p53 + (n = 43)				p-valor
	Categoria	n	Observado Prop.	Teste Prop.	
Sexo	Masculino	26	60,47%	50%	0,222053
	Feminino	17	39,53%		
	Total	43	100,00%		
hMLH1	+	39	90,70%	50%	0,00104
	-	4	9,30%		
	Total	43	100,00%		
hMSH2	+	39	90,70%	50%	0,00104
	-	4	9,30%		
	Total	43	100,00%		
hMSH6	+	38	88,37%	50%	0,00228
	-	5	11,63%		
	Total	43	100,00%		
Status	EPR +	34	79,07%	50%	0,00017
	EPR -	9	20,93%		
	Total	43	100,00%		
Tipo Histológico Mucinoso	Não	36	83,72%	50%	0,02221
	Sim	7	16,28%		
	Total	43	100,00%		
Estadio	I - IIA	41	95,35%	50%	0,00009
	IIB - IV	2	4,65%		
	Total	43	100,00%		
Localização	Cólon distal	36	83,72%	50%	0,02221
	Cólon proximal	7	16,28%		
	Total	43	100,00%		

NOTA: *Binominal Test.

A média de idade para a imunoexpressão da proteína p53 (+) foi de 59,53 anos e p53 (-) de 57,00 anos o valor de $p=0,420$.

4.10. Correlação entre as proteínas de reparo e os dados clínico-patológicos

Nas Tabelas 12, 13 e 14 observa-se a descrição estatística das proteínas de reparo hMLH1, hMSH2, hMSH6 *versus* as características clínico-patológicas.

TABELA 12 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS *VERSUS* hMLH1 - .

hMLH1 - (n = 8)					
	Categoria	n	Observado Prop.	Teste Prop.	p-valor*
Sexo	Masculino	3	37,50%	50%	0,72656
	Feminino	5	62,50%		
	Total	8	100,00%		
Tipo Histológico Mucinoso	Sim	1	12,50%	50%	0,07313
	Não	7	87,50%		
	Total	8	100,00%		
Estadio	I – IIA	7	87,50%	50%	0,07031
	IIB – IV	1	12,50%		
	Total	8	100,00%		
Localização	Cólon Proximal	2	25,00%	50%	0,28906
	Cólon Distal	6	75,00%		
	Total	8	100,00%		

NOTA: *Binominal Test.

TABELA 13 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS *VERSUS* hMSH2 - .

hMSH2 - (n = 6)					
	Categoria	n	Observado Prop.	Teste Prop.	p-valor*
Sexo	Masculino	1	16,67%	50,00%	0,21875
	Feminino	5	83,33%		
	Total	6	100,00%		
Tipo Histológico Mucinoso	Sim	0		50,005	0,03125
	Não	6	100,00%		
	Total	6	100,00%		
Estadio	I – IIA	6	100,00%	50,00%	0,03125
	IIB – IV	0			
	Total	6	100,00%		
Localização	Cólon Proximal	0		50,00%	0,03125
	Cólon Distal	6	100,00%		
	Total	6	100,00%		

NOTA: *Binominal Test.

TABELA 14 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS VERSUS hMSH6 -.

		hMSH6 - (n = 9)			
	Categoria	n	Observado Prop.	Teste Prop.	p-valor*
Sexo	Masculino	3	33,33%	50,00%	0,50781
	Feminino	6	66,67%		
	Total	9	100,00%		
Tipo Histológico Mucinoso	Sim	1	11,11%	50,00%	0,03906
	Não	8	88,89%		
	Total	9	100,00%		
Estadio	I – IIA	8	88,89%	50,00%	0,03906
	IIB – IV	1	11,11%		
	Total	9	100,00%		
Localização	Cólon Proximal	2	22,22%	50,00%	0,17969
	Cólon Distal	7	77,78%		
	Total	9	100,00%		

NOTA: *Binominal Test.

4.11. Correlação do *status* das proteínas de reparo com as características clínico-patológicas

Na Tabela 15 observa-se a correlação entre as características clínico-patológicas e o *status* das proteínas de reparo nos casos de carcinoma colorretal estudados.

TABELA 15 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E O *STATUS ERP*

Características Clínico-Patológicas		STATUS		Valor de P*
		EPR + (n=37)	EPR - (n=14)	
sexo	Feminino	15	7	0.5427
	Masculino	22	7	
Grau de Diferenciação	G1	12	6	0.6889
	G2	19	7	
	G3	6	1	
Tipo Histológico	Tubular	20	11	0.2184
	Mucinoso	6	2	
	Túbulo-papilífero	11	1	
Estadio	I	15	3	0.4443
	IIA	20	10	
	IIB	2	1	

NOTA: *Teste T (Fischer's) .

Observa-se na Tabela 16 a correlação entre a proporção do status EPR - *versus* as variáveis: características clínico-patológicas e expressão das proteínas de reparo e p53.

TABELA 16 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E O STATUS

	EPR – (n = 14)				
	Categoria	n	Observado Prop.	Teste Prop.	p-valor*
Sexo	Masculino	6	42,86%	50%	0,790537
	Feminino	8	57,14%		
	Total	14	100,00%		
p53	+	9	64,29%	50%	0,42395
	-	5	35,71%		
	Total	14	100,00%		
Tipo Histológico Mucinoso	Sim	2	14,29%	50%	0,01294
	Não	12	85,71%		
	Total	14	100,00%		
Estadio	I - IIA	13	92,86%	50%	0,00183
	IIB - IV	1	7,14%		
	Total	14	100,00%		
Localização	Cólon Proximal	4	28,57%	50%	0,17956
	Cólon Distal	10	71,43%		
	Total	14	100,00%		

NOTA: *Binominal Test.

A média de idade observada RER - foi de 56,53 anos e a média de idade EPR + é de 60,22 anos (p=0,420).

4.12. Correlação das características clínico-patológicas com p53 + versus EPR

Na Tabela 17 observa-se a correlação das características clínico-patológicas com hiperexpressão da p53 versus EPR.

TABELA 17 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS p53 VERSUS EPR.

Características Clínico - Patológicas		p53 + (n=43)		Total	Valor P
		EPR - (n=10)	EPR + (n=33)		
sexo	Feminino	6	21	27	1
	Masculino	4	12	16	
Grau de Diferenciação	G1	4	10	14	0,885
	G2	5	18	23	
	G3	1	5	6	
Tipo Histológico	Tubular	7	24	24	0,4232
	Mucinoso	2	7	7	
	Túbulo-papilífero	1	12	12	
Estadio	I	4	15	15	1
	IIA	6	26	26	
	IIB	0	2	2	

NOTA: *Teste T (Fischer's).

4.13. Correlação entre o *Status* MSI e as características clínico-patológicas

TABELA 18 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS *VERSUS* MSI - H

Características Clínico - Patológicas		MSI - H (n=10)		Valor P
		n	Proporção	
Sexo	Feminino	7	70%	0,34375
	Masculino	3	30%	
Tipo Histológico Mucinoso	Sim	1	10%	0,02148
	Não	9	90%	
Localização	Cólon Proximal	2	20%	0,10937
	Cólon Distal	8	80%	
Estadio	I - IIA	9	90%	0,02148
	IIB - IV	1	10%	

NOTA: *Binominal Test IC.

4.14. Identificação das vias carcinogénicas

Na Tabela 19 observa-se o número de casos (n=10) *status* MSI-H com hiperexpressão da p53 e expressão negativa para p53. Enquanto na Tabela 20 observa-se o número de casos (n=43) *status* p53 + com MSI-H e não MSI-H

TABELA 19 – STATUS MSI – H COM STATUS p53

MSI – H (n= 10)					
	Categoria	n	Observado Prop.	Teste Prop.	p-valor
MSI –H	p53 +	6	60,00%	50,00%	0,75390
	p53 -	4	40,00%		
	Total	10	100,00%		

NOTA: Binominal Teste.

TABELA 20 - HIPEREXPRESSÃO p53 COM O STATUS MSI

p53 + (n =43)					
	Categoria	n	Observado Prop.	Teste Prop.	Asymp. Sig. (2-tailed)
p53 +	MSI -H	6	13,95%	50,00%	0,000001636124
	Não_MSI - H	37	86,05%		
	Total	43	100,00%		

NOTA: Binominal Teste.

TABELA 21 - IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS CARCINOGENÉTICAS

Vias Carcinogénica			
	Observed (n)	Expected (n)	Residual
Via Clássica (p53+)	34 (66,66%)	17	17
Via Mutadora (MSI-H)	10 (19,60%)	17	-7
Via não identificada*	7 (13,725%)	17	-10
Total	51 (100,00%)		

NOTA:* vias que apresentavam p53 – com não MSI-H e EPR - (somente hMSH6).

TABELA 22 - FREQUÊNCIA DAS VIAS

Teste Estatístico	
	via
Chi-Square	25,7647059
Df	2
p-valor	0,000003

NOTA: Via Clássica e Via Mutadora.

4.15. Correlação das vias carcinogénicas

Nas Tabelas 23, 24 e 25 observa-se a correlação das características clínico-patológicas das vias carcinogénicas clássica p53 e via carcinogénica mutadora MSI.

TABELA 23 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS VIA CLÁSSICA.

Via Clássica					
	Categoria	n	Observado Prop.	Teste Prop.	p-valor
Sexo	Masculino	21	61,76%	50,00%	0,22948
	Feminino	13	38,24%		
	Total	34	100,00%		
Tipo Histológico Mucinoso	Não	29	85,29%	50,00%	0,000038558
	Sim	5	14,71%		
	Total	34	100,00%		
Estadio	I - IIA	32	94,12%	50,00%	0,000000069
	IIB - IV	2	5,88%		
	Total	34	100,00%		
Localização	Cólon Distal	30	88,24%	50,00%	0,000006165
	Cólon Proximal	4	11,76%		
	Total	34	100,00%		

NOTA: Binominal Test.

TABELA 24 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS VIA MUTADORA.

Via Mutadora					
	Categoria	n	Observado Prop.	Test Prop.	p-valor
Gênero	Masculino	3	30,00%	50,00%	0,34375
	Feminino	7	70,00%		
	Total	10	100,00%		
Tipo Histológico Mucinoso	Sim	1	10,00%	50,00%	0,02148
	Não	9	90,00%		
	Total	10	100,00%		
Estadio	I - IIA	9	90,00%	50,00%	0,02148
	IIB -IV	1	10,00%		
	Total	10	100,00%		
Localização	Cólon Proximal	2	20,00%	50,00%	0,10937
	Cólon Distal	8	80,00%		
	Total	10	100,00%		

NOTA: Binominal Test IC.

TABELA 25 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS VERSUS VIAS.

Características Clínico - Patológicas		Via varcinogénica			Valor P
		Sem via	via clássica	via mutadora	
Sexo	Feminino	2	13	7	0,1575
	Masculino	5	21	3	
Grau de Diferenciação	G1	3	10	5	0,5813
	G2	3	18	5	
	G3	1	6	0	
Tipo Histológico Mucinoso	Sim	2	5	1	0,6196
	Não	5	29	9	
Localização	Cólon Proximal	2	4	2	0,4432
	Cólon Distal	5	30	8	
Estadio	I - IIA	7	32	9	0,7127
	IIB - IV	0	2	1	

NOTA: *Teste T (Fischer's).

As Tabelas 26 e 27 observa-se as médias de idade em relação as vias carcinogénica a Figura 24 observa-se a comparação entre as médias de idade por via.

TABELA 26 – MÉDIA IDADE DOS CASOS DAS VIAS CARCINOGENÉTICAS.

Vias carcinogénica	Idade Média
Via Mutadora	57,10
Via Clássica	60,65
Via não identificada	54,71

NOTA: Análise de médias

TABELA 27 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS MÉDIAS DE IDADE.

Vias carcinogénicas						
Response: Idade						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Via	2	255,9	128	0,5816	0,5629	
Residual	48	10562,1	220			

NOTA: Com p-valor = 0,5629 não há evidências que a diferença entre as idades médias de cada via seja significativa.

Capítulo 5

DISCUSSÃO

Neste país, o câncer colorretal é o 4º tumor maligno mais freqüente para ambos os sexos. Na cidade de Curitiba, estima-se que ocorrerão 470 novos casos de câncer colorretal para o ano de 2008/2009 (INCA, 2007).

Em relação aos 51 casos de CCR esporádico, observou-se que 57% eram do sexo masculino (Figura 10), 60% do tipo histológico tubular (Figura 12), 51% com grau de diferenciação moderado (Figura 13), 58,82% com profundidade de invasão da subserosa pT3 (Figura 14) e estágio IIA (Figura 15).

A média de idade observada nesta pesquisa 59,14 é semelhante à encontrada na literatura em populações europeias e orientais (KOYAMA *et al.*, 2004). Por outro lado, é de ressaltar que em relação à casuística desta pesquisa observa-se um elevado número de pacientes com menos de 41 anos, representando 11,76% da amostra (Figura 11). MENDES *et al.* (1992) observaram uma incidência semelhante, de 13,1% de pacientes com menos de 40 anos. O paciente com idade inferior aos 45 anos tem uma chance muito maior de pertencer a uma família com uma síndrome de pré-disposição hereditária ao câncer (BONARDI *et al.* 2006; PEEL *et al.*, 2000; TINLEY e LYNCH 1999).

Deve-se ratificar que esta pesquisa é realizada em pacientes sem histórico familiar, com critérios de exclusão (Bethesda e Amsterdam II); portanto, esporádicos. Esta incidência pode estar correlacionada com o fenótipo MSI, pois pacientes que apresentam deficiência do sistema de reparo apresentam idade inferior aqueles sem defeito no sistema de reparo do DNA.

O gene *TP53* é mais comumente implicado na carcinogênese humana (HOLLSTEIN *et al.*, 1991). Nesta pesquisa, houve 84,31% dos tumores apresentaram imunexpressão positiva para a proteína p53 (Tabela 6) e (Figura 16 e 17). Outros

pesquisadores encontraram índices entre 50% e 75% (GREENBLATT *et al.*, 1994; KAHLENBERG *et al.*, 2000) e, entre 23% e 60% (VICTORZON, *et al.*, 1996; LIU, *et al.*, 2006). Estes também utilizaram o anticorpo monoclonal DO-7 em câncer colorretal esporádico.

Já com o anticorpo policlonal CM-1, os percentuais variaram de 34% a 57% (MARTIN *et al.*, 1992; ROVIELLO *et al.*, 1999). Em um estudo mais recente com o monoclonal DO-7 a expressão nuclear da proteína p53 foi positiva em 43,4% dos 83 pacientes com diagnóstico de câncer retal (JURACHA *et al.*, 2006). AHNEN (1999) relatou a ocorrência de mutação no gene p53 em 80% a 90% dos tumores colônicos esporádicos e 20% a 40% em adenomas.

As diferenças observadas na expressividade da proteína p53 podem ser explicadas pelas diferenças entre anticorpos (BASS *et al.*, 1994) e sistemas de detecção e pela maneira como foi quantificada a positividade da reação. O estado de conservação dos blocos parafinados pode afetar os sítios de ligação da proteína com o anticorpo, diminuindo a porcentagem da expressão da proteína.

Uma outra explicação para a menor freqüência da proteína p53 mutada nos estudos supracitados é que a freqüência de mutações do tipo “*nonsense*” poderia estar ocorrendo mais frequentemente. Estas mutações resultam em uma proteína mais curta (proteína truncada) e, conseqüentemente, com imunoistoquímica negativa para a p53. A interpretação imunoistoquímica da proteína p53 é baseada na premissa de que a p53 não mutada tem meia-vida curta, não sendo detectável. Já as mutações da p53 do tipo “*missense*” tornaram a proteína mais estável e, portanto, detectável (FINLAY *et al.*, 1989).

Ausência de coloração também pode ocorrer em casos de deleção do gene, ausência de transcrição ou presença de mutação desestabilizadora, a qual pode estar associadas com perda de função do p53.

A hiperexpressão (mutação) da proteína p53 (n=43) com as características clínico-patológicas e expressão das proteínas de reparo, observou-se que houve

diferença significativa $p < 0,05$ entre a localização (cólon distal), estágio (I-IIA), *status* EPR +, expressão das proteínas de reparo hMLH1, hMSH2 e hMSH6 (Tabela 11).

GALLEGO *et al.* (2000), estudando 126 casos de câncer colorretal, demonstraram relação direta entre achados da p53 mutante e tempo livre da doença. No entanto, não encontraram correspondência com o tempo de sobrevida, nem os outros fatores prognósticos usualmente considerados, como tamanho e localização do tumor, grau de infiltração, invasão neural e vascular, estágio e tipo histológico.

A inativação dos genes de reparo através dos fenômenos genéticos ou epigenéticos é geralmente associada à perda da expressão da proteína correspondente (Figura 17). Na análise imunoistoquímica da proteína de reparo hMLH1, observou-se ausência da imunoexpressão em 15,69%, dos tumores sugerindo perda da expressão gênica (mutação). Houve diferença significativa $p < 0,05$ (Tabela 8) entre expressão positiva e negativa nos 51 tumores analisados. Esta porcentagem é condizente ao encontrado na literatura (LANZA *et al.*, 2002).

Ao analisar a proteína de reparo hMSH2 observou-se perda da expressão em 11,76% dos tumores investigados. E houve diferença significativa $p < 0,05$ (Tabela 7) entre expressão positiva e negativa nos tumores estudados. PARK, *et al.* (2005), em seu estudo de 402 casos de câncer colorretal sem HNPCC ou Polipose Familiar, encontraram 8,7% de perda da expressão do hMLH1 e 4,7% de perda da expressão do hMSH2.

HAMMED *et al.* (2006) em seu estudo de 104 indivíduos com câncer colorretal diagnosticados (com no máximo 45 anos), perceberam que 60% tinham a expressão normal de hMLH1 e hMSH2, encontrando perda da expressão do hMLH1 em 27% e perda da expressão do hMSH2 em 13% dos casos.

Em relação à proteína de reparo hMSH6 observou-se perda da expressão em 17,65%. Houve diferença significativa $p < 0,05$ (Tabela 7) entre expressão positiva e negativa. Mutações no gene hMSH6 são raras nos pacientes com *HNPCC*. Nos casos

esporádicos, pacientes com esta mutação desenvolvem tumores em idade mais avançada e tem maior incidência de câncer de endométrio. A ausência da expressão da proteína hMSH6 é mais comum nos pacientes com (MSI-L) (COURA 2005: HATCH *et al.*, 2005). SHIA *et al.* (2005) demonstraram que, a perda de expressão de MSH2 foi associada frequentemente com perda da expressão de hMSH6 ou expressão fraca.

Ao correlacionar a expressão das proteínas de reparos hMLH1, hMSH2 e hMSH6 com as características clínico-patológicas, observou-se que a perda da expressão da proteína hMLH1 estava mais frequentemente localizada no cólon distal do tipo histológico não mucinoso com estágio menos avançado I - IIA (Tabela 12). Enquanto a perda da expressão da proteína hMSH2, este mais freqüente no sexo feminino, do tipo histológico não mucinoso ($p < 0,05$), com localização preferencial no cólon distal ($p < 0,05$) e, estadios menos avançados ($p < 0,05$), (Tabela 13). Já em relação à proteína hMSH6, observou-se que a perda de expressão também esteve mais freqüente no sexo feminino do tipo histológico não mucinoso ($p < 0,05$), com estágio I - II A ($p < 0,05$) e, localização tumoral Distal (Tabela 14). Não houve diferença significativa $p > 0,05$ entre expressão negativa *versus* as características clínico-patológicas na proteína de reparo hMLH1.

LANZA G, *et al.*, (2002) correlacionando a expressão da proteína MLH1 e MSH2 com as características clínico-patológicas observaram que tumores sem expressão de MLH1 ou MSH2 estavam localizados com maior freqüência no cólon proximal e tumores sem expressão de MLH1 apresentavam maiores dimensões, eram mais indiferenciados e, apresentavam maior freqüência de ausência de p53 (o que indica funcionamento adequado da proteína), indicando outra via da carcinogênese.

Em relação à classificação adotada quanto o *status* das proteínas de reparo em EPR - (Ausência de Expressão Proteína de Reparo) e EPR + (Presença de Expressão Proteína de Reparo), observou-se que EPR - ocorreu em 27,5% dos casos (Figura 20). Houve diferença significativa $p < 0,05$ entre a EPR + e EPR - nos 51 casos de CCR esporádicos (Tabela 8 e Figura 20), contudo, foi mais comum a EPR+. A EPR - evidencia o não funcionamento adequado das proteínas de reparo ocasionando falha no sistema de reparo do DNA.

Considerando a correlação clínico-patológica entre o *status* EPR + e EPR - observou-se que, não houve diferença significativa $p > 0,05$ (Tabela 15). Porém na correlação do *status* EPR - ($n=14$) com as variáveis clínico-patológicas houve significância estatística $p < 0,05$ em relação ao tipo histológico não mucinoso e estadio menos avançado (Tabela 16). As variáveis referentes à expressão da proteína p53 e as proteínas de reparo hMLH1, hMSH2, hMSH6 ($p > 0,05$), portanto, não houve diferença significativa em relação ao *status* EPR - (Tabela 15 e Tabela 16).

Alguns trabalhos relacionam a queda na expressão das proteínas do sistema de reparo do DNA com o agravamento da indiferenciação celular das lesões estudadas. É o caso de lesões em endométrio (ORBO *et al.*, 2003), em pele (HUSSEIN *et al.*, 2001) e em estômago (KITAJIMA *et al.*, 2001). Sugeriu-se, portanto, que as proteínas MMR do DNA estejam intimamente relacionadas com a progressão da malignidade e o agravamento do grau de atipias destas neoplasias, além de poderem constituir um importante grupo de marcadores de prognóstico para estas (KITAJIMA *et al.*, 2001).

Um dos grandes desafios desta pesquisa foi o teste imunoistoquímico para identificação das proteínas de reparo. Por se tratar de uma técnica trabalhosa e relativamente cara, faz com que as pesquisas sejam realizadas com poucos casos.

Com a técnica TMAs foi possível realizar esta pesquisa, permitindo aumentar a casuística e a consistência de quantificações imunoistoquímicas, pois todas as análises foram feitas sob condições idênticas em uma mesma reação. Esta estratégia resultou em um significativo corte de custos devido à redução de tempo, assim como, da quantidade de reagentes. Tal procedimento pode também ser considerado um avanço ao conceito de quantificação em “*hot-spots*”, já que, de cada caso, são selecionadas áreas pequenas, histologicamente bem definidas e homogêneas, representando assim um padrão específico de lesão.

Aproximadamente 10% - 20% dos casos de câncer colorretal esporádico surgem da via instabilidade de microssatélite (MSI) ou via mutadora (BOLAND *et al.*, 1998; DIETMAIER, *et al.*, 1997). Nos tumores CCR esporádicos analisados nesta pesquisa,

observou-se uma incidência de Instabilidade de Microssálite (MSI -H) de 19,6% (Figura 21 e Tabela 9).

A porcentagem encontrada nesta pesquisa pode ser justificada por vários fatores. Primeiramente, a uma grande variabilidade na incidência de MSI nos artigos publicados. Segundo, o método utilizado para definir o *status* das proteínas de reparo foi o imunoistoquímico onde o (MSI-L (*low*) baixa instabilidade) não pode ser analisado.

As reações dos anticorpos utilizados em uma pesquisa dependem do estado de conservação do material (blocos parafinados). As alterações podem modificar os sítios de ligação da proteína com o anticorpo. Outro fator são os novos polímeros (sistema de detecção) utilizados nos últimos dois anos nas reações de imunoistoquímica também podem influenciar a incidência da expressão da proteína, pois este sistema é chamado de 2ª geração, aumentando a sensibilidade da reação.

Também, deve-se evidenciar que os artigos publicados sobre MSI são de populações europeias e orientais. A população brasileira apresenta uma grande heterogeneidade, resultado de cinco séculos de mistura étnica entre os indivíduos. No Brasil, há uma frequência aumentada de pacientes portadores de HNPCC (PINHO 2005; STRACHAN 2002). Mesmo com os critérios de exclusão adotados nesta pesquisa, não se pode excluir a hipótese de um dos pacientes ser portadores da síndrome hereditária.

SHIA J, *et al.*, (2005) tratam do valor da imunoistoquímica na detecção de defeitos nos genes de reparo em *HNPCC*, onde avaliaram a sensibilidade e especificidade da imunoistoquímica para detecção de MSI *versus* a análise molecular da mutação. Estes autores demonstraram que a imunohistoquímica dos três anticorpos (hMLHI, hMSH2, hMSH6) detectaram uma porção significativa dos tumores de pacientes com mutação germinativa, podendo ser utilizada como um método de triagem.

Neste estudo, ao correlacionar as características clínicas patológicas *versus* o *status* MSI-H (n=10), observou-se que a frequência maior era maior no tipo histológico

não mucinoso ($p=0,0214$), com estágio menos avançado ($p=0,0214$) (Tabela 18). Quanto à localização do tumor houve uma maior frequência no cólon distal, em relação ao gênero feminino apresentou-se mais freqüente, porém não houve diferença significativa $p>0,05$ (Tabela 18). A média (57,10) de idade foi menor em pacientes MSI-H do que aqueles com Não MSI-H.

A presença de MSI é uma característica marcante dos CCR. Tumores MSI são tipicamente diplóides, apresentam preferência do lado direito do cólon, com estadiamento menos avançado e idade mais precoce e tipo histológico mucinoso (CHANG *et al.*, 2006). Os CCR com MSI-H têm fundamentalmente características clínicas e patológicas distintas daquelas com MSI-L e MSS (JASS *et al.*, 2002; SINICROPE *et al.*, 2006).

JASS (2003) observou que CCR esporádico com MSI-H apresentavam uma preponderância maior entre o sexo feminino, uma predileção aumentada pelo cólon proximal, envolvia mais exclusivamente o gene *MLH1*, apresentavam uma menor frequência de mutações no *APC*, beta-catenina e *K-ras* e uma frequência aumentada de metilação do DNA, além de serem frequentemente pouco diferenciados e/ou mucinosos e de associaram-se com pólipos (adenomas) serrilhados.

Do ponto de vista da genética molecular, é bem conhecido que o fenótipo maligno dos tumores sólidos depende da aquisição de múltiplas alterações genéticas (JASS, 1999). Tem sido sugerido que a geração de mutações depende previamente do estabelecimento de um estado de instabilidade genética (JASS, 1999).

Duas vias patogênicas distintas foram propostas para o câncer colorretal esporádico nesta pesquisa. A via clássica que surge através dos genes supressores de tumor, representada pela proteína p53 que está relacionado à ocorrência de eventos (germinativos e/ou somáticos) aditivos que culminam em *LOH*, e, portanto, em instabilidade cromossômica de importantes regiões genômicas (COURA *et al.*, 2005; XICOLA *et al.*, 2007), com freqüentes anormalidades citogenéticas e perdas alélicas e ativação de proto-oncogenes (*K-ras* e *myc*) (RAUT *et al.*, 2004). Pertencem a este grupo em torno de 85% dos casos de CCR esporádicos. Nesta pesquisa, observou-se

que 66,66% (Tabela 21) dos casos eram decorrentes da via clássica. Considerou-se via clássica os tumores que apresentaram hiperexpressão na proteína p53 sem presença de MSI-H e sem EPR -.

A outra via é a mutadora, geradora de MSI e oriunda de mutações somáticas e/ou germinativas nos genes de reparo. Ocorre em cerca de 15% a 20% dos CCR esporádicos (COURA *et al.*, 2005; XICOLA *et al.*, 2007). Observou-se que a via carcinogénica mutadora representada pelo *status* MSI-H apresentava-se em 19,6% dos casos (Tabela 21), mesmo quando houve hiperexpressão (mutação) da proteína p53 considerou-se a via mutadora, pois mutações no p53 e APC podem ocorrer nesta via, mas são menos frequentes e quando ocorrem é após MSI (HUANG *et al.*, 1996; PERUCHO 1996; SAMOWITZ e STATTERY, 1997).

Nesta pesquisa não foi possível identificar a via carcinogénica em 13,73% (n=7) dos casos (Tabela 21), pois 3 casos apresentavam p53 normal com EPR+, os outros 4 casos apresentavam hiperexpressão da p53 com perda da imunoexpressão da proteína de reparo hMSH6. Deve-se advertir que a proteína hMSH6 isoladamente não pode ser correlacionada com o *status* MSI-H (BOLAND *et al.*, 2008).

Uma das hipóteses para explicar os 3 casos que não apresentaram nenhuma alteração nas proteínas pesquisadas seria que outras proteínas da via clássica estariam envolvidas como *K-ras*, *APC*, *E-caderina* ou poderia haver uma mutação do tipo *nonsense* ocorrendo na proteína p53. Consequentemente, com imunoistoquímica negativa. Nestes casos, o teste de MSI e do gene *TP53* por PCR permite avaliar qual seria a via predominante.

Neste trabalho, observou-se que a via clássica $p < 0,05$ ocorre mais frequentemente que a mutadora nos casos de CCR esporádico (Tabela 21 e 22).

O estadió do tumor é a única variável prognóstica usada como estratégia de decisões clínicas (SINICROPE *et al.*, 2006). A existência de vias genéticas distintas para a carcinogénese colorretal sugere que as características moleculares e celulares

correspondentes também podem ser usadas como marcadores prognósticos ou preditivos.

Entretanto, ao correlacionar as características clínico-patológicas com as vias carcinogénica clássica e mutadora, observou-se que, o estágio menos avançado (I – IIA) apresentava-se mais frequente $p < 0,05$ em ambas as vias 94,12% e 90,00% respectivamente (Tabela 23 e Tabela 24), assim como o tipo histológico não mucinoso.

Em relação à via clássica observou-se que 61,76% eram do gênero masculino e 88,24% apresentavam localização preferencial no cólon distal (Tabela 23) com média de idade de 60,55 anos (Tabela 26). Enquanto a via mutadora observou-se que 70,00% eram do gênero feminino, 90,00% do tipo não mucinoso e 80,00% apresentavam localização preferencial no cólon distal (Tabela 24) com média de idade de 57,10 anos (Tabela 26).

A identificação das vias carcinogénicas no câncer colorretal esporádico tem aplicação terapêutica. A distinção entre as duas vias é relevante, uma vez que tumores que apresentam alta frequência de MSI apresentam um fenótipo específico (fenótipo mutador ou via mutadora). Esses tumores apresentam melhor prognóstico e sobrevida do que tumores com estabilidade cromossômica e com estabilidade de microssatélite (MSS) (CHANG *et al.*, 2006). Dois eventos falam contra a benignidade dos tumores com MSI. O primeiro é a resistência a quimioterapia 5-fluorouracil e a menor sobrevida dos pacientes em tratamento com a mesma (THIBODEAU *et al.*, 1993; RIBIC *et al.*, 2003; LYNCH *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2006). O segundo evento é que a MSI em CCR pode ser marcador de suscetibilidade herdada ou adquirida para outras doenças, como câncer gástrico, de útero e ovário (CHANG *et al.*, 2006).

Recentemente os pesquisadores JOVER *et al.* (2009), avaliaram o reparo do mau pareamento do DNA (*MMR*) no câncer colorretal, *versus* a resposta da quimioterapia adjuvante com 5-fluorouracil (5-FU) em um grupo de pacientes seguidos prospectivamente durante 5 anos. O grupo incluiu 754 pacientes tratados cirurgicamente com câncer colorretal. Concluíram que os pacientes com deficiência dos *MMR* nos tumores não parecem beneficiar-se da quimioterapia baseada em 5-FU.

Diversas teorias têm sido postuladas para explicar porque tumores MSI-H apresentam melhor prognóstico em carcinomas colorretais esporádicos, apesar das características desfavoráveis. DOLCETTI *et al.* (2001) demonstraram que o valor prognóstico do *status* MSI poderia ser significativamente evidenciado pela avaliação combinada do número de linfócitos citotóxicos ativos intramural. Isso deu suporte a hipótese de que tumores MSI-H podem continuamente produzir novos epítomos imunogênicos como conseqüência de um sistema de reparo defeituoso, o que poderia explicar porque pacientes com câncer colorretal esporádico MSI-H são capazes de apresentar uma resposta imune antitumor mais efetiva, tendo um resultado clínico mais favorável.

Em contrapartida, a via carcinogênica representada pela proteína p53 mutante está relacionada a uma menor sobrevida, uma menor resposta tumoral a quimioterapia e maior índice de recidiva local após radioterapia pré-operatória (TAKEDA *et al.*, 1999; ADELL *et al.*, 1999). Porém, a ausência da hiperexpressão da p53 está correlacionada com uma melhor resposta a quimioterapia adjuvante com 5-Fluorouracil. Células com ausência de expressão da p53 não apresentam repouso na fase G1. Isto sugere que a p53 normal pode estar envolvido na inibição da síntese de DNA após dano ao DNA com quimioterapia e radioterapia. Isto explicaria que a exposição de células tumorais a drogas como 5-Fluorouracil pode levar a um aumento na regulação dos níveis de proteína p53 por aumento de estabilidade pela translocação de proteína p53.

A análise imunoistoquímica das proteínas de reparo juntamente com a proteína p53 representa uma nova ferramenta de pesquisa que pode ser aplicada em larga escala e pode apresentar um papel fundamental na definição do real envolvimento nos processos neoplásicos humanos. A identificação das vias carcinogênicas clássica e mutadora pode prover informação útil para a compreensão do câncer colorretal esporádico e para a terapia a ser empregada.

Capítulo 6

CONCLUSÕES

6.1 Considerações Finais

Apesar dos recentes progressos na definição dos mecanismos moleculares de desenvolvimento a progressão do câncer, somente alguns marcadores biológicos foram identificados como tendo um valor de prognóstico. A identificação de parâmetros que refletem o comportamento biológico do câncer é determinante no prognóstico e no incremento da terapia oncológica.

Esta pesquisa objetivou identificar e correlacionar o fenótipo neoplásico tumoral, expresso pelas características e parâmetros patológicos do tumor, com a via carcinogenética predominante, expressa pela via supressora (p53) ou via mutadora (MSI – Instabilidade de Microssatélite) em 51 casos de carcinomas colorretais esporádicos.

Na busca da diferenciação dos casos de câncer colorretal esporádico dos (*HNPCC*), os resultados deste estudo atestaram a importância da idade do aparecimento da doença, da presença de história familiar e, principalmente, os critérios de Bethesda e Amsterdam usados para exclusão dos pacientes. Estes, aliados ao teste imunistoquímico das proteínas de reparo, poderão permitir a identificação de uma população diferenciada e de risco para *HNPCC*, que deve ser submetida à análise mutacional no complexo MMR e encaminhadas para aconselhamento genético e programas específicos de rastreamento.

Esta pesquisa pretende contribuir com informações iniciais sobre as expressões dos genes *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* e da expressão da proteína p53 em carcinomas colorretais esporádicos uma vez que a grande maioria das pesquisas são realizadas em pacientes portadores de *HNPCC* e em populações européias e orientais. A

imunoistoquímica pode ser um método utilizado no sentido da prevenção e tratamento de afecções a eles associadas.

Com o resultado da análise imunoistoquímica pode-se, modificar o acompanhamento dos pacientes selecionados, promovendo prevenção como exames colonoscópicos rotineiros. A identificação de casos de CCR com não funcionamento adequado das proteínas de reparo (via mutadora) ou da proteína p53 (via clássica) pela imunoistoquímica pode permitir a intervenção quimioterápica neo-adjuvante e específica para cada paciente poupando-o assim de toxicidade terapêutica, possibilitando a aplicação de uma nova modalidade terapêutica.

6.2 Conclusões

Baseado nas condições de realização da presente investigação pelo método imunoistoquímico nos 51 casos de câncer colorretal esporádico, pode-se concluir que:

- A hiperexpressão (mutação) da proteína p53 esteve presente na maioria dos casos de CCR esporádico.
- A perda da expressão da proteína hMSH6 foi maior do que hMLH1 e hMSH2 e apresentou-se associada frequentemente com a perda da expressão hMSH2.
- Houve correlação ($p < 0,05$), entre ausência das proteínas de reparo hMSH2 e hMSH6 com o tipo histológico não mucinoso, estadio iniciais de CCR.
- A ausência das proteínas de reparo (EPR –) ocorreu em 24,5% dos casos.
- Houve correlação ($p < 0,05$), entre (EPR –) e o tipo histológico não mucinoso e estadio I e IIA.
- As vias carcinogênicas clássica (p53) e mutadora (MSI-H) estão envolvidas na carcinogênese colorretal esporádica de forma independente.

- As vias carcinogénicas clássica e mutadora não ocorrem com a mesma frequência, havendo predominância da via carcinogénica clássica no câncer colorretal esporádico.
- Houve correlação ($p < 0,05$), entre a via carcinogénica clássica e tumores do tipo histológico não mucinoso, estadio I e IIA e localização no cólon distal. A via mutadora apresentou tendência para o mesmo tipo de associação.
- A via carcinogénica mutadora não está relacionada com um pior estadiamento no CCR esporádico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTONEN L. A., PELTOMAKI P., LEACH F.S., *et al.* Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. **Science**; 260:812-16; 1993.

AALTONEN L.A., SALOVAARA R., KRISTO P., *et al.* Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. **N Engl J Med**.21;338(21):1481-1487; 1998.

ABE Y., MASUDA H., OKUBO R. Microsatellite instability of each tumor in sporadic synchronous multiple colorectal. **Cancers.Oncol**;8(2):299-304 2001.

ADELL G., SUN X., STAL O., KLINTENBERG H., *et al.* P53 status: an indicadoe for the effet of prooperative radiotherapy of rectal câncer. **Radiother Oncol**; 51 (2): 169-74; 1999.

AHNEN, D.J., Tissue markes of colon câncer resk. **Gastrointestinal Endoscopy**, Denver, v. 49, n. 3, p. 550 -59, 1999.

ALBERTS, BRUCE *et al.* Biologia molecular da célula. 3ª ed. São Paulo: **Arte Medica**, 1997.

ALBERTS, BRUCE *et al.* Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. Porto alegre: **Artemed**, 1999.

ASTHER, V., B; COLLER, F. A. The classification significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. **Annals of surgery** v. 139, n. 6, p. 846 – 51, 1954.

BARNES, D. M., *et al.* Abnormal expression of wild-type p53 protein in normal cells os a cancer family patient. **Lancet**, vol 340, P 259-263, 1992.

BASS IO., MULDER JWR., OFFERHAUS GJA., *et al.* An evaluation of six antibodies for imunohistocheme mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. **J Pathol**; 172:5-12;1994.

BOLAND C.R., KOI M., CHANG K.D., CARETHERS M.J. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch Syndrome: from bench to bedside. **Familial Cancer**;7:41-52 2008.

BOLAND C.R., THIBODEAU S.N., HAMILTON S.R., *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Res**;15; 58(22):5248-5257;1998.

BONARDI *et al.* Family history of colorectal cancer at early age: should extended colectomy be indicated? Rev. bras. **Colo-proctol**, vol.26 no3 july/sept. 2006

BORGES-OSÓRIO, MARIA REGINA. Genética humana. 2a ed. Poto Alegre: **Artmed**, 2001.

BUTTIN BM. *et al.* Penetrance and expressivity of MSH6 germline mutations in seven kindreds not ascertained ley family history. **Am J Hum Genet**; 74: 1262 – 9; 2004.

CARETHERS, JM, SMITH EJ, BEHLING CA *et al.* Use of 5-fluorouracil and Survival in Patients With microsatellite-Unstable colorectal Cancer. **Gastroenterology**126:394-401; 2004.

CHANG EY, DORSEY PB, JOHSON N, *et al.* A prospective analysis of microsatellite instability os molecular marker in colorectal cancer. **The American Journal of Surgery**, 191: 646-651, 2006.

CHANG-HO, JEON, HAN-IL LEE, IM HEE SCHIN, JONG-WOOK PARK. Genetic alterations of APC, K-ras, p53, MSI, and MAGE in Korean colorectal cancer patints. **Int J. Colorectal Dis**; 23:29-35; 2008.

CHURCH, J.M. Prophylactic colectomy in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Ann. Med**, 1997.

COOPER, GEOFFREY M. A célula: uma abordagem molecular. 2ª ed. Porto Alegre: **Artemed**, 2002.

COTRIM, M. A. A. A terapia genética do câncer, 2003. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/BIO240/ac03htm>. Acesso em: 15/07/2007.

COTTRELL S., BICKNELL D., KAKLAMANIS L., *et al.* Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. **Lancet**, 340 (8820): 626 – 30, 1992.

COURA R.S., PROLLA P.A., PROLLA J.C. Hereditary non-polipomatous colorectal cancer: hereditary predisposition, diagnosis and prevention. **Arq Gastroenterologia**; 42(2) 2005.

CUNNINGHAN J.M., CHRISTENSEN *et al.* Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. **Cancer Res**; 58: 3455-60;1998.

CUTAIT R., *et al.* – Instabilidade de microssatélite em Portadores de Câncer Colorretal. **Bras Coloprocto**; (4): 225 – 232;2002.

DE JONG A.E., *et al.* The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in pacientes with HNPCC. **Gastroenterology**; 126: 42 – 8;2004.

DIETMAIER W., WALLINGER S., BOCKER T., *et al.* Diagnostic microsatellite

instability: definition and correlation with mismatch repair expression. **Cancer Res**; 57:4749-4756; 1997.

DOLCETTI *et al.* Correspondence re: Samowitz *et al.*, microsatellity instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. **Cancer Epidemiol Biomark Prev**; 10: 917 – 23; 2001

DUARTE, A. P. *et al.* Importância da invasão neural e linfática no prognóstico de adenocarcinoma colorretal. **Assoc Méd. Brás**, v. 50, n I, p. 21 – 6. 2004.

ESHLEMAN JR., MARKOWITZ SD. Mismatch repair defects in human carcinogenesis. **Hum. Mol Genet**; 5 (Spic Tissue): 1489 – 94;1996.

FEARON ER., VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**; 61 (5): 759 – 67; 1990.

FETT-CONTE, A. e SALLES, A. A importância do gene p53 na carcinogenese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, vol 24, no 2, P 85-89, 2002.

FILHO, Geraldo B. etalii. Bogliolo : Patologia – 5ª edição, Rio de Janeiro – **Guanabara Koogan**, 1994.

FINLAY C.A., HINOS PW., EVINE AJ. The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell**; v. 57, 1083-93; 1989.

GALLEGO M.G.; ACENERO M.J.; ORTEGA S. *et al.* Prognostic influence of p53 nuclear overexpression in colorectal carcinoma. **Dis Colon Rectum** 2000.

GERVAZ P., CEROTTINI J.P., BOUZOURENE H. *et al.* Comparison of microsatellite instability and chromosomal instability in predicting survival of patients with T3N0 colorectal cancer. **Surgery** 2002 Feb;131(2):190-7.

GREENBLATT, M.S., BENNETT *et al.* Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res., Baltimore**, v. 54, p. 4855 – 4878, 1994.

GRIZZLE WE., *et al.* A Molecular Pathology of Early cancer. **Washington DC, ios Press**, 135-170; 1999.

GRODEN J., THLIVERIS A., SAMOWITZ W., *et al.* Identification and characterization of the familial adenomatous poliposis coli gene. **Cell**; 66(3): 589-600; 1991.

GUIMARÃES, *et al.* Presença da proteína p53 como Prognóstico de recidiva/ Progressão epitelial vulvar III. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, vol 24, no 1, Rio de Janeiro, 2002.

HALES B.F. DNA repair disorders causing malformations. **Cuu Opin Genet**; 15(3): 234 – 40; 2005.

HARRIS, C.H. and HOLLSTEIN, M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. **N Engl J. Med**, vol 26, P 239-1318, 1993.

HAWKINS NJ., GORMAN P., *et al.* Colorectal carcinomas arising in the hyperplastic polyposis syndrome progress through the chromosomal instability pathway. **Am J Pathol**; 157, 385 – 92; 2000.

HERMAN J.G., UMAR, POLYAK K., *et al.* Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci. USA**; 95 (12): 6870-75; 1998.

HOLLSTEIN M., SOUSSI T., THOMAS G., *et al.* p53 gene alterations in human tumors: perspectives for cancer control. **Recent Results Cancer Res** 1997.

HOWKINS N.J., WARD R.L. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. **J. Natl Cancer inst.** 2001; 93. p 1307-13.

HUANG J., PAPADOPOULOS N., *et al.* APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. **Proc Natl Acad Sci. USA**; 93: 9049 – 54; 1996.

HUSSEIN M.R., ROGGERO E., *et al.* Alterations in mismatch repair protein expression in benign melanocytic nevi, melanocytic dysplastic nevi, and cutaneous malignant melanomas. **An J Dermatopathol**; 23 (4): 308 -14; 2001.

INCA, 2007. BRASIL. Ministério da Saúde. Estimativas de Câncer no Brasil para 2008/2009; WWW.INCA.gov.br/estimativas/2008.

ILYAS M, TALBOT, I.C. P53 expression in ulcerative colitis: a longitudinal study. **Gut, London** v. 36, n.6 p. 802 – 804, 1995.

JASS J.R., *et al.* Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancers of the colorectum. **Histopathology**; 37: 295-301;2000.

JASS J.R. Serrated route to colorectal cancer: back street or super highway? **J. Pathol**; 193: 283-85; 2001.

JASS J.R., Walsh MD, Barker M., Simms LA., Young J., Leggett B.A. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. **Eur J Cancer**. 2002 May;38(7):858-66.

JORDE L.B, CAREY J.C., BAMSHAD M.J., *et al.* Genética Médica. 2^a ed. Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 2000.

JOVER R., ZAPATER P., CASTELLS A., *et al.* The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. **European journal of cancer** (Oxford, England: 1990) 2009;45(3):365-73; 2009.

JSYRAMAN L. and PRIVES C. Covalent and noncovalent modifiers the p53 protein. **Cell Mol Life Sci**, vol 87, P 55-76, 1999.

JURACH T. M., *et al.* Expressão da proteína p53 e relação clínico-patológica no adenocarcinoma de reto. **Arq. Gastroenterol**; vol. 43, n1, p. 14 – 19; 2006.

JUNQUEIRA E CARNEIRO. **Histologia Básica**. 8^o edição. Ed. Guanabara Koogan, 1995.

KAHLENBERG M.S., STOLER D.L., RODRIGUEZ-BIGAS M.A., *et al.* P53 supressor gene mutations predict decreased survival of patients with sporadic colorectal carcinoma. **Cancer** 2000 Apr 15;88 (8): 1814-9.

KANE M.F., LODA M., GAIDA G.M., *et al.* Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumor and mismatch repair-defective human tumor cell lines. **Cancer Res**; 57: 808 -11; 1997.

KINZLER K.W., VOLGESTEIN B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**; 87: 159 – 70; 1996.

KITAJIMA Y., MYAZAKI K., *et al.* Loss of expression of DNA enzymes MGMT, hMLH1 and hMSH2 during tumor progression in gastric cancer. **Gastric Cancer** 2001; 6: 86-85.

KOYAMA END KOTAKE; Report from the registry of the Japanese society for cancer of the colon and rectum. **Journal Diseases of Colon and Rectum**, 2007.

KREUZER, HELEN. **Engenharia genética e biotecnologia**. 2a ed. Porto Alegre: Artemed, 2002.

LANDIS S.H., MURRAY T., BOLDEN S. Cancer statistics 1998. **CA Cancer J Clin** 1998.

LANZA G., GAFA R., MAESTRI I, *et al.* Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. **Mod Pathol**; 15: 741-9; 2002.

LAWES D. A., PERSON T., SENGUPTA S., *et al.* The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancer. **Br J Cancer**; 93:472-7; 2005.

LAWES D.A., *et al.* The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancer. **Cell**; 75 (6): 1215 – 25; 1993.

LEACH, F.S., NICOLAIDES, N.C., PAPADOPOULOS, N., *et al.* Mutations of a mismatch repair homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cell**, 75, 1215-1225; 1993.

LENNARD-JONES J.E., MELVILLE D.M., MORSON B.C., *et al.* - Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis. Findings among 401 patients over 22 years. **Gut** 1990.

LEUNG SY, YUEN ST, CHUNG LP, *et al.* hMLH1 promoter methylation and lack of hmlh1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. **Cancer Res**; 59 (1): 159-64; 1999.

LENGAUER, C., KINZLER, K., W AND VOGELSTEIN, B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cell. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 94: 2545 – 50, 1997.

LEWIN, BENJAMIN. Gene VII. Porto Alegre: **Artemed**, 2001.

LINDBLOM A., TANNERGAD P., *et al.* Risk of proximal colon second locus predisposing to hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature Genet**; 5: 279-82; 1993.

LINDOR N.M., *et al.* Lower cancer incidence in Amsterdam – I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. **JAMA**;293: 1979 – 85; 2005.

LIU XP., TSUSHIMI K., *et al.* Expression of p21 waf 1/cip1 and p53 proteins in gastric relationships with cell proliferation activity na prognosis. **Cancer Lett**; 170 (2): 183 – 9; 2001.

LOEB K.R., LOEB L.A. Genetic instability and the mutator phenotype studies in ulcerative colitis. **Am J Pathol**; 154 (6) 1621 – 6; 1999.

LONGACRE T.A., FENOGLIO-PREISER C.M. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. **Am J Surg Pathol**; 14: 524-37; 1999.

LOUKOLA A., *et al.* Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). **Cancer Res**; 61: 4545 – 9; 2001.

LUSTOSA S.A.S. O valor prognóstico e a correlação histopatológica das proteínas P53 e BCL – 2 em doentes portadores de adenocarcinoma colorretal, submetidos ao tratamento cirúrgico. (**Tese de Doutorado Universidade Federal de São Paulo**).

LYNCH H.T., CHAPELLE A. Hereditary colorectal cancer. **N Engl Journal Med**; 348 c10: 919 – 32; 2003.

LYNCH H.T., LANSPA S.J., BOMAN B.M., *et al.* Hereditary nonpolyposis colorectal cancer, Lynch syndromes 1 and 2. **Gastroenterol Clin North Am**; 17(4): 679-712; 1988.

LYNCH H.T, SMYRK T., LYNCH J.F. Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome). **Int J Cancer** 1996 Feb 20;69(1):38-43.

M. WEHMAN *et al.* Staging, Grading and Related Histopathological Techniques in Local Therapy of Rectal Tumors. Geog Theime Verlag Stuttgart. New York. **End. Surg**; 2: 237-240;1994.

MARCUS V.A, MADLENSKY L., GRYFE R., *et al.* Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. **Am J surg Pathol**; 23 (10): 1248 -55; 1999.

MARTIN H.M., FILIPE M.I., MORRIS R.W, *et al.* P53 expression and prognosis in gastric carcinoma; 50: 859-62; 1992.

MARX, J. How p53 supresses cell growth. **Science**, vol 263, P 1644 – 1645, 1993.

MENDES, M. B. P.; COSTA, L. D. B; TAMURA, S. Tumores do cólon e reto: Experiência de 16 anos. **Brás. Coloproct**, v. 12. n. 4. 1992.

MITCHELL S.C. The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps. **Medical clinics of North America**; 89 -1;2005.

NILBERT M., PLANCK M., FERNEBRO E, BORG A., JOHNSON A. Microsatellite instability is rare in rectal carcinomas and signifies hereditary cancer. **Eur J Cancer** 1999 Jun;35(6):942-5.

NUNN J, NAGINI S, RISK JM *et al.* Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMLH1, hMSH2, hPM51, hPM52 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the and neck. **Oral Oncol** 2003; 39 92): 115-29.

NYSTROM-LAHITIM, SISTONEN P., MECKLIN J.P., *et al.* Close linkage foundind Hplotype in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. **Proc Natl Acad Sci USA**; 91: 6054-58; 1994.

ORBO A., NILSEN M.N., ARNES M.S., *et al.* Loss of expresión of hMLH1, MSH2, MSH6 and PTEN related to endometrial cancer in 68 pacientes With endometrial hyperplasia. **Int J Gynecol Pathol**; 22 (2); 141-8; 2003.

PAPADOPAULOS N., NICOLAIDES NC, *et al.* Mutation of a mutl homolog in hereditary colon cancer. **Science**; 263 (5153) 1625-9; 1994.

PARADISO A., SIMONE G,. PETRONI S., *et al.* Thymidilate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients. **Br J Cancer** 2000.

PARK I.J., KIM H.C, KIM J.S, YUES YUCS *et al.* Correlation between hMlh1/hMSH2 and p53 protein expression in sporadic colorectal cancer. **Hepatogastroenterology**; 52 (62): 450-54; 2005.

PARKIN D.M. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet Oncol**; 2: 533 – 43; 2001.

PASSARGE, E. Genética: texto e atlas. 2º ed. Poto alegre: **Artmed**, 2004.

PEEL D.J., ZIOGAS A., FOX E.A., *et al.* Characterization of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from a population-based series of cases. **J Natl Cancer Inst**; 92(18):1517-22; 2000.

PELTOMAKI P., AALTONEN L.A, *et al.* Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science**; 260:810 – 12; 1993.

PELTOMAKI P., VANSSEN H.F. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. **Gastroenterology**; 113(4):1146-58; 1997.

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

PIÑOL V., *et al.* Accuracy of revised Bethesda guidelines microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **JAMA**; 293: 1986 – 94;2005.

PINHO M.S.L. Biologia molecular no câncer colorretal: um corte atual na literatura. **Coloproct**; 22 (4); 284 – 288;2002.

PINHO M. e ROSSI B.M. Conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal. **Brás Coloproct**, 19 (1): 57 -60. 1999.

POWELL S.M. Clinical applications of molecular genetics in colorectal cancer. **Sem Colon & Rectal Surg**; 6(1): 2-18;1995.

POWELL S.M., ZILZN, BEAZER-BARCLAY Y., *et al.* APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. **Nature**; 359: 235-37; 1992.

RIBEIRO J.R., *et al.* A p53 overexpression predicts outcome following multimodality therapy in low rectal cancer dis. **Colon Rectum**, Philadelphia, v. 43, p. A47, 2000.

RIBEIRO J.R., *et al.* p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma cancer; 83 (1): 7 – 18; 1998.

RIBIC C.M., SARGENT D.J., MOORE M.J., THIBODGAU S.N., *et al.* Tumor microsatellite instability status as a predictor of benefit from fluorouracil based adjuvant chemotherapy for colon cancer. **N. Engl. J. Med.**, 348. 919 – 32, 2003.

ROBBINS. Patologia Estrutural e Funcional. **Guanabara Koogan** 6ª Edição, 2000.

RODGER C., *et al.* Prognostic Factors in Colorectal Carcinomas Arising in Adenomas: Implications for Lesions Removed by Endoscopic Polypectomy. **Gastroenterology**; 89:328-36; 1985.

RODRIGUEZ-BIGAS M.A., BOLAND C.R., HAMILTON S.R., *et al.* A National Cancer

Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. **J Natl Cancer Inst**; 89(23):1758-62; 1997.

ROVIELLO F., MARRELLI D., VINDIGNI C. *et al.* p53 acumulation is a prognostic factor in intestinal-tyl carcinoma but not in the diffuse type. **Ann Surg Oncol**; 6 (8): 739-45; 1999.

SAMOWITZ W.S., SLATTERY M.L. Microsatellite instability in colorectal adenomas. **Gastroenterology**; 112 151 – 19; 1997.

SARNON, P. *et al.* Adenovirus E1B – 58Kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are phisically associated wity same 54Kd cellular protein in transformed cell. **Cell**. Vol 28, p 387 -394, 1982.

SHIA J, KLIMSTRA D.S, *et al.* Values of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting gemiline mutation in hereditary colorectal neoplasm's. **AM J Surg Pathol**; 29: 96-104; 2005.

SHIKE W., WINAWER S.J., GREENWALD P.H., *et al.* - Primary prevention of colorectal cancer: the WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. **Bull World Health Organ** 1990.

SINICROPE F.A., LEMOINE M., X.L, LYNCH PM., *et al.* Reduced expression of cyclooxygenase 2 proteins in hereditary nonpolyposis colorectal cancers relative to sporadic cancers. **Gastroenterology**; 117: 350 – 58; 1999.

STRACHAN T., READ A.P. Genética Molecular Humana. 2 ed. Porto Alegre: **Artmed** Editora, 2002.

SYNGAL S., SCHORAG D., FALCHUK M., *et al.* Phenotypic characteristics associated with the APC gene I1307 K mutation in Ashkenazi Jewish patients with colorectal polyps. **JAMA**; 16. 857-860; 2000.

TADEKA A., NAKAJIMA K., SHIMADA , *et al.* Clinical significante of serum p53 antibody delection on chemosensitivity assay in humam colorectal cancer. **J Surg Oncol**; Jun; 71 (2): 112-6; 1999.

THIBODEAU SN., BREN G., SCHAID D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science**; 260: 816-19; 1993.

THOMPSON E MARGARET W. Thompson e Thomoson: genética medica. 5ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1993.

THORSON A.G., KNEZETIC J.A., LYNCH H.T. A century of progress in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). **Dis Colon Rectum**;Jan;42(1):1-9; 1999.

TINLEY S., LYNCH H. Integration of family history and medical management of patients with hereditary cancers. **Cancer**; 86:1705-12; 1999.

VASEN HF, WATSON P., MECKLIN J.P., LYNCH H.T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. **Gastroenterology**; Jun;116(6):1453-1456; 1999.

VICTORZON M., NORDLING S., HAGLUND C, *et al.* Expression of P53 protein as a prognostic factor in gastric cancer. **Eur J Cancer**;32 (2): 215-20; 1996.

WALISZEWSKI P. Colorectal carcinoma as a genetic phenomenon. **Patol Pol**; 43(3): 73-78; 1992.

VOLGESTEIN B., FEARON E.R. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N. Engl J Med**; 319: 525 -32; 1988.

WANG Q., ZHAO P., HU Y., YANG G. Prognostic significance of P53 protein expression in patients with colorectal adenocarcinoma. **Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao** 1998.

WARD R., MEAGHER A., TOMLINSON I, O'CONNOR T., NORRIE M., WU R., HAWKINS N. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. **Gut**; Jun;48(6):821-9; 2001.

WERNESS, B. A. *et al.* Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, vol 248, P 76-79, 1990.

WINAWER SJ, FLETCHER RH, MILLER L *et al.* - Colorectal Cancer Screening: Clinical Guidelines and Rationàle. **Gastroenterology** 1997.

WU X, ZHAO H., AMOS CI., *et al.* p53 Genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. **J Natl Cancer Inst**, 2002.

YAMASHITA K, DAI T., DAI Y, *et al.* Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenot.pe. **Cancer Cell**; 4:121-3; 2003.

YANG G, *et al.* Dominant effects of an MSH6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. **Cancer Cell**; 6: 139 – 50; 2004.

ZAMBETTI, G. P. e LEVINE, A.J. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. **Fased J.**, vol 7, P 855- 865, 1993.

ZHANG, W. *et al.* Inactive p53 mutants may enhance the transcriptional activity of wild-type p53. **Cancer Res.**, vol 53. P 4772-4775, 1993.

APÊNDICE A – PLANILHA ANATOMO- PATOLÓGICA.

Caso	Lâmina	Sexo	Idade	Tipo Hist.	Grau Dif.	Prof. Inva.	TNM	Emb. Vas.	Estádio
1	957364	M	36	Tub.pap	G2	Adip.peri.v	T3	N	IIA
2	965619	M	54	tub.muc	G2	musc.prop	T2	N	I
3	964610	F	37	Tub.pap	G2	musc.prop	T2	N	I
4	951461	F	69	Tub.viloso	G2	G.P. Retal	T3	N	IIA
5	967237	M	61	tubular	G2	Serosa	T3	N	IIA
6	950512	F	40	tubular	G1	sub.muc	T1	N	I
7	962191	F	36	tubular	G2	Serosa	T3	N	IIA
8	981379	M	57	tubular	G2	Serosa	T3	N	IIA
9	973063	F	40	tubular	G2	sub.muc	T1	N	I
10	9801895	M	67	tubular	G2	Muscular	T2	N	I
11	971474	M	67	tubular	G2	sub-ser	T3	S	IIA
12	973333	F	58	tubular	G1	Muscular	T2	N	I
13	970370	F	89	Tub.pap	G2	Muscular	T2	N	I
14	992566	F	55	Tub-vilo	G2	Sub. Ser	T3	N	IIA
15	9710554	F	61	tubular	G2	Sub.Ser	T3	S	IIA
16	20000552	F	62	Tub.viloso	G2	Serosa	T3	N	IIA
17	999126	M	45	tubular	G2	Adip.peri.v	T3	S	IIA
18	9910473	F	67	Tubular	G2	musc.prop	T2	N	I
19	995995	M	65	tubular	G2	musc.prop	T2	N	I
20	986408	M	45	tubular	G1	PM	T2	N	I
21	986207	M	58	tubular	G1	G.P. Retal	T3	S	IIA
22	984240	M	62	tubular	G1	G.P. Retal	T3	N	IIA
23	982655	M	50	tubular	G1	Muscular	T3	N	IIA
24	970880	M	71	tub.muc	G1	Muscular	T2	N	I
25	10004427	F	70	Tub.viloso	G2	Serosa	T3	N	IIA
26	8884	F	67	Tub.viloso	G2	Serosa	T3	S	IIA
27	968080	M	51	tubular	G1	G.P. Retal	T3	N	IIA
28	952164	F	77	tubular	G1	G.P. Retal	T3	N	IIA
29	964559	F	49	tubular	G1	Muscular	T2	S	I
30	954053	M	76	tubular	G1	Muscular	T2	N	I
31	20005954	M	59	tubular	G1	Serosa	T4	N	IIB
32	20005421	M	54	tub.muc	G3	Sub. Ser	T3	N	IIA
33	20003288	F	62	mucinoso	G3	Muscular	T2	N	I
34	20002419	M	66	tubular	G1	Muscular	T2	N	I
*35	990171	F							
36	969426	F	60	tubular	G1	Sub. Ser	T3	N	IIA
37	956539	F	54	tub.muc	G3	Sub. Ser	T3	N	IIA
38	20004568	M	62	mucinoso	G3	Sub. Ser	T3	N	IIA
39	958636	M	24	mucinoso	G3	Sub. Ser	T3	N	IIA
40	2002176	F	73	tubular	G3	Sub.ser	T3	S	IIA
41	1008791	F	63	Tubular	G2	G.P. Retal	T3	S	IIA
42	10001822	M	45	tubular	G3	Mus.prop	T2	S	I
43	20003395	F	47	Tubular	G2	Serosa	T4	N	IIB
44	10006483	F	54	Tubular	G1	Sub. Ser	T3	S	IIA
45	10009804	M	67	tub.muc	G2	G.P. Retal	T3	N	IIA
46	20007256	M	83	Tup.paplif	G2	musc.prop	T2	N	I
47	20008592	M	82	tubular	G1	Mesocolon	T3	S	IIA
48	20008714	M	68	Tubular	G2	Mesocolon	T3	S	IIA
49	10004067	M	91	Tup.viloso	G1	G.P. Retal	T3	N	IIA
50	10006337	M	77	Tubular	G1	musc.prop	T2	N	I
51	1004716	M	25	Tup.paplif	G2	G.P. Retal	T4	S	IIB
52	10003155	M	58	Tup.paplif	G2	Perriretais	T3	S	IIA

* Caso excluído. Total de 51 amostras de tumor.

APÊNDICE B – PLANILHA DE IMUNOISTOQUÍMICA.

	Imunoistoquímica					Status	
	P53	hMLH1	hMSH2	hMSH6			
1	+	+	+	+		EPR +	
2	+	-	+	+		EPR -	MSI-H
3	+	+	+	+		EPR +	
4	+	+	+	+		EPR +	
5	+	+	+	+		EPR +	
6	+	-	-	-		EPR -	MSI-H
7	+	+	+	+		EPR +	
8	-	+	+	-		EPR -	
9	-	+	+	+		EPR +	
10	+	+	+	-		EPR -	
11	+	+	+	+		EPR +	
12	+	+	+	+		EPR +	
13	+	+	+	+		EPR +	
14	+	+	+	+		EPR +	
15	+	+	-	-		EPR -	MSI-H
16	+	+	-	+		EPR -	MSI-H
17	+	+	+	+		EPR +	
18	+	+	+	+		EPR +	
19	+	+	+	+		EPR +	
20	-	+	+	+		EPR +	
21	+	+	+	+		EPR +	
22	+	-	-	+		EPR -	MSI-H
23	+	+	+	+		EPR +	
24	-	+	+	+		EPR +	
25	+	+	+	+		EPR +	
26	+	+	+	+		EPR +	
27	+	-	+	+		EPR -	MSI-H
28	-	-	-	-		EPR -	MSI-H
29	+	+	+	-		EPR -	
30	+	+	+	+		EPR +	
31	+	+	+	+		EPR +	
32	+	+	+	-		EPR -	
33	+	+	+	+		EPR +	
34	+	+	+	+		EPR +	
36	+	+	+	+		EPR +	
37	+	+	+	+		EPR +	
38	+	+	+	+		EPR +	
39	+	+	+	+		EPR +	
40	+	+	+	+		EPR +	
41	-	-	+	+		EPR -	MSI-H
42	+	+	+	+		EPR +	
43	-	-	+	-		EPR -	MSI-H
44	-	-	-	-		EPR -	MSI-H
45	+	+	+	+		EPR +	
46	+	+	+	+		EPR +	
47	+	+	+	+		EPR +	
48	+	+	+	+		EPR +	
49	+	+	+	+		EPR +	
50	+	+	+	+		EPR +	
51	+	+	+	+		EPR +	
52	+	+	+	+		EPR +	

MS-H: alta instabilidade de microssatélite: MSS: EPR + (Presença expressão de proteína); EPR - (Ausência de expressão de proteína) . P53 (+) sugere mutação.

* A não expressão da proteína (-) indica o não funcionamento adequado da proteína sugerindo mutação.

ANEXO A – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.

ANEXO B – CRITÉRIOS DE BETHESDA E AMSTERDAM.

Critérios de Bethesda.

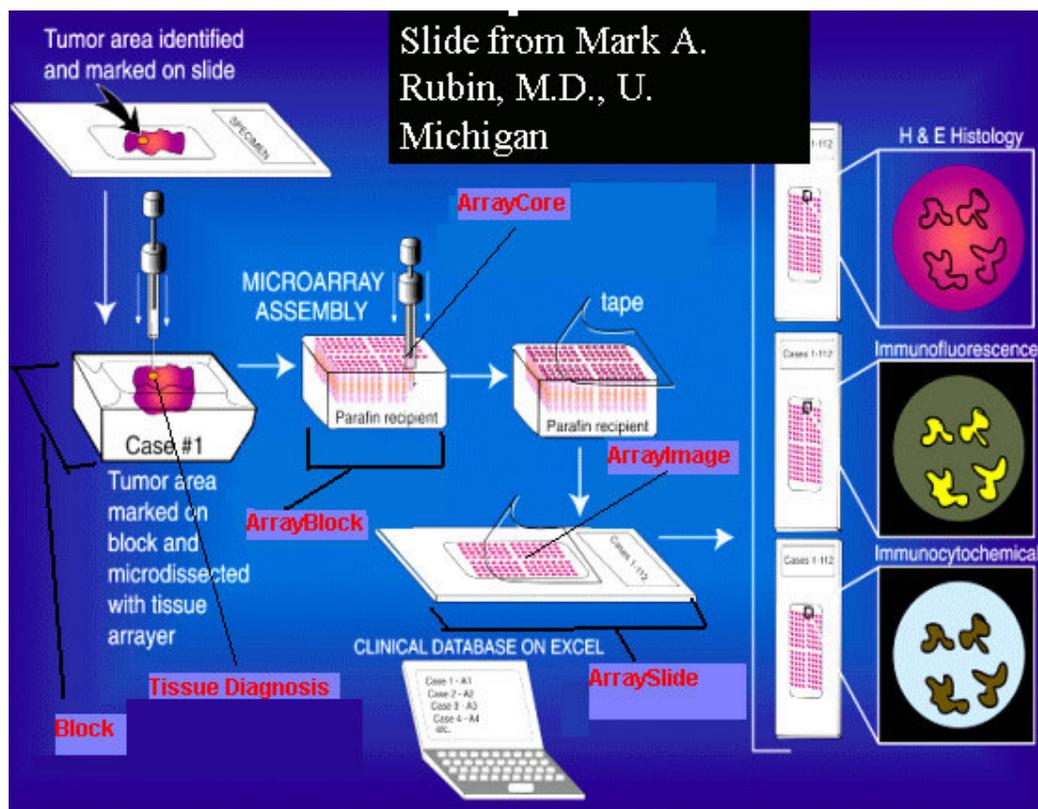
-
-
- 1) - Indivíduos com câncer que preencham os critérios de Amsterdam.
 - 2) - Indivíduos com 2 cânceres relacionados com HNPCC, incluindo CCR metacrônicos e sincrônicos ou cânceres extra-cólicos associados.
 - 3) - Indivíduos com CCR e um parente de 1º grau com CCR ou câncer extra-cólico relacionado com HNPCC e/ou adenoma colo-retal (um dos cânceres diagnosticado abaixo dos 45 anos e os adenomas abaixo dos 40 anos).
 - 4) - Indivíduos com câncer colo-retal ou endometrial diagnosticado abaixo dos 45 anos.
 - 5) - Indivíduos com câncer de cólon direito com padrão histológico indiferenciado abaixo dos 45 anos.
 - 6) - Indivíduos com CCR com células em anel de sinete diagnosticado abaixo dos 45 anos.
 - 7) - Indivíduos com adenomas diagnosticados antes dos 40 anos.
-
-

Critérios de Amsterdam.

Pelo menos três casos de câncer colo-retal (CCR), que preencham os seguintes critérios:

- um membro seja parente em 1º grau dos outros dois.
 - pelos menos 2 gerações sucessivas acometidas.
 - pelo menos um dos casos de CCR diagnosticado abaixo dos 50 anos.
 - polipose adenomatosa familiar deve ser excluída.
-
-

ANEXO C – QUADRO ESQUEMÁTICO DA TÉCNICA TMA.



FONTE: http://tmi.pathology.jhmi.edu/doc/manual/schema_ArrayBlok.html

Nota: Quadro esquemático representando a técnica de TMA, a sequência segue em identificação da lesão visualização do tumor na lâmina e no bloco doador, posteriormente retirada do tumor por uma pinça de puch ou robo. O bloco receptor com os tissue microarray contendo a lesão tumoral, para posterior corte histológico e análise dos microarray permitindo multiplas análise imunoistoquímica.