

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ÉRIKA PEREIRA ZAMBALDE

ANÁLISE MOLECULAR DA MUTAÇÃO *BRAF* V600E E DA INSTABILIDADE
DE MICROSSATÉLITES EM PORTADORES DE CÂNCER DE CÓLON E
RETO DO SUL DO BRASIL

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ÉRIKA PEREIRA ZAMBALDE

ANÁLISE MOLECULAR DA MUTAÇÃO *BRAF* V600E E DA INSTABILIDADE
DE MICROSSATÉLITES EM PORTADORES DE CÂNCER DE CÓLON E
RETO DO SUL DO BRASIL

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Co-orientadores: Dr Juliano Javert Lourenço e Prof. Dr Iglenir João Cavalli

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Zambalde, Érika Pereira

Análise molecular da mutação *BRAF* V600E e da instabilidade de microssatélites em portadores de câncer de cólon e reto do sul do Brasil. / Érika Pereira Zambalde. – Curitiba, 2016.

99 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Co-orientadores: Juliano Javert Lourenço e Iglênir João Cavalli

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Colon (Anatomia) - Cancer 2. Reto - Cancer I. Título II. Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca, 1958- III. Lourenço, Juliano Javert VI. Cavalli, Iglênir João V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.292



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo assinados, membros da banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado, a qual se submeteu **ÉRIKA PEREIRA ZAMBALDE**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética são de parecer que se aprove a candidata.
Secretaria da Coordenação do Programa do Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 29 de março de 2016

Doutora Vanessa Santos Sotomaior
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Membro Titular

Doutora Danielle Malheiros Ferreira
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Membro Titular

Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Presidente

Visto

Doutora Ana Claudia Bonatto
Vice-Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR

Dedico esse trabalho aos meus pais, André e Ana, à minha irmã Ellen, que sempre estiveram comigo mesmo longe apoiando minhas decisões e me incentivando a alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, por ter me dado seu voto de confiança, por sua dedicação nesses dois anos e todo auxílio na realização desse trabalho. E também pelo carinho e amizade.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr Juliano Javert Lourenço e Prof. Dr Iglénir João Cavalli. Ao Juliano por ter me dado oportunidade de realizar parte deste trabalho no INCA. E ao Iglénir por toda ajuda na análise dos resultados e também por todo ensinamento, carinho e amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética por todo apoio, colaboração, carinho e principalmente pela amizade.

À todos meus amigos do Departamento de Genética por toda amizade e carinho, que fizeram a vida longe de casa ser mais fácil.

Ao Instituto Nacional de Câncer (INCA) pela oportunidade, e pela atenção e carinho com que me receberam.

Ao Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira, obrigada por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por toda atenção, carinho, amizade e contribuição a esse trabalho.

Ao Laboratório Citolab pelo fornecimento das amostras e laudos.

À técnica de laboratório Ms. Ana Mattana pela amizade e por estar sempre disposta a nos ajudar.

À minha banca de acompanhamento e defesa pela disponibilidade, sugestões e comentários.

Aos meus pais, Ana e André. Ao meu pai por todo incentivo, apoio e auxílio. À minha mãe por todo amor, carinho e confiança.

À minha irmã pela inspiração, amor e carinho. E por me fazer acreditar que sempre é possível alcançar nossos objetivos.

Á CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, fizeram parte da minha vida durante esse período me apoiando e permitiram que esse trabalho fosse concluído.

“A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”.

Guimarães Rosa

RESUMO

O Câncer de Cólon e Reto (CCR) é um dos cânceres mais frequentes do mundo. Esta doença compreende subgrupos que se caracterizam por alterações genéticas e anatomopatológicas específicas e pode ser dividida em câncer esporádico e hereditário, sendo o Câncer de Cólon e Reto Hereditário Não-Polipomatoso (HNPCC) uma das formas mais comuns de CCR hereditário. Essa síndrome tem como principal característica a instabilidade de microssatélites (MSI), porém cerca de 10 a 15% dos CCR esporádicos também apresentam MSI. A análise da mutação V600E no proto-oncogene *BRAF* foi proposta para identificar CCR esporádico com MSI, e distingui-lo do HNPCC. O objetivo deste trabalho foi estimar a frequência da mutação V600E em CCRs esporádicos em uma população do Sul do Brasil e verificar se há correlação com MSI correlacionando os resultados com os dados clínicos e anátomopatológicos. Para isso, foi realizada a extração do DNA de 84 amostras em parafina, a amplificação dessas por PCR e, em seguida, para identificação da V600E foi realizado o sequenciamento. A mutação V600E não foi encontrada em nenhuma das amostras analisadas. Já para a análise de instabilidade de microssatélites foram genotipados três marcadores: BAT25, BAT26 e CAT25. A MSI foi observada em 12 (14,28%) amostras, sendo sete (58,33%) classificadas com alta instabilidade de microssatélites (MSI-H) e cinco (41,67%) com baixa instabilidade de microssatélites (MSI-L). Em relação à correlação de MSI-H com os dados clínicos e anátomopatológicos encontramos que um (10%) paciente apresentava idade ≤ 50 anos; três (8,33%) variavam entre 51-69 anos; e dois (6,45%) apresentavam idade ≥ 70 anos. Dos sete casos com MSI-H, cinco (10,87%) eram do sexo feminino e em, 17,85% os tumores estavam localizados no cólon direito/proximal. A proporção de MSI encontrada neste estudo foi a esperada e demonstrou associação com o local do tumor, reafirmando sua importância na abordagem inicial dos pacientes com CCR por se caracterizar como um importante auxiliar prognóstico e preditivo.

Palavras-chave: Câncer de Cólon e Reto. *BRAF* V600E. Instabilidade de Microssatélites

ABSTRACT

The Colorectal Cancer (CRC) is one of the most frequent cancers worldwide. It comprises sub-groups which are characterized by genetic and pathological alterations and can be divided into sporadic and hereditary cancer. One of the most common forms of hereditary CRC, is the Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC). The main feature of this syndrome is the microsatellite instability (MSI), but MSI also have been reported in 10-15% of sporadic CRC. A V600E mutation the *BRAF* proto-oncogene has been proposed to identify sporadic CRC with MSI, and distinguish it from HNPCC. The aim of the present study was to determinate the frequency of V600E mutation in sporadic CRCs of the southern Brazil population, its association with MSI and evaluate the association between clinical and anatomic pathological data. Initially, the extraction of DNA of 84 samples formalin-fixed paraffin-embedded was performed. The samples were amplified by PCR. Sequencing was utilized to analyze the V600E. The V600E mutation was not detected in any of the samples. For the microsatellite analysis, it was done a genotyping of three markers: BAT25, BAT26 and CAT25. MSI was observed in 12 samples (14.28%), seven (58.33%) of them presented high microsatellite instability (MSI-H) and five (41,67%) low microsatellite instability (MSI-L). As regards the correlation of MSI-H with clinical and pathological anatomical data, we observed that one (10%) patient was ≤ 50 years old; three (8.33%) were between 51-69 years old; and two (6.45%) were ≥ 70 years old. Of the seven patients with MSI-H, five (10.87%) of them were female and 17.85% tumors were located in right/proximal colon. The proportion of MSI in this study was as expected and demonstrated association with the tumor location, it reaffirms its importance in the initial approach to patients with CRC for assisting in the prognostic and predictive.

Key-words: Colorectal Cancer. *BRAF* V600E. Microsatellite Instability.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ANATOMIA DO INTESTINO GROSSO.....	16
FIGURA 2 – ALTERAÇÕES DAS VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS.....	30
FIGURA 3 – VIA DE SINALIZAÇÃO RAS/RAF EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E EM TUMORES COM MUTAÇÕES <i>BRAF</i> V600E.....	31
FIGURA 4– MODELO DE PROGRESSÃO MSI + CCR - HNPCC E CASO ESPORÁDICO.....	36
FIGURA 5 – ELETROFEROGRAMA DA SEQUENCIA DE DNA AMPLIFICADA.....	51
FIGURA 6 AMOSTRAS GENOTIPADAS PARA O MARCADOR BAT25. .	54
FIGURA 7 AMOSTRAS GENOTIPADAS PARA O MARCADOR BAT 26.....	55
FIGURA 8 AMOSTRAS GENOTIPADAS PARA O MARCADOR CAT25.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 CRITÉRIOS DE AMSTERDAM UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE HNPCC.	23
TABELA 2 CRITÉRIOS DE BETHESDA UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO DE HNPCC.	23
TABELA 3 SISTEMA DUKES.....	26
TABELA 4 SISTEMA DE ASTLER-COLLER.....	26
TABELA 5 SISTEMA TNM (TUMOR; LINFONODO; METÁSTASE).....	27
TABELA 6 ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE CÓLON E RETO.....	27
TABELA 7 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS DUAS VIAS DE CCR.....	29
TABELA 8 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	45
TABELA 9 SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS.....	47
TABELA 10 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS PACIENTES COM MSI E RESPECTIVOS MARCADORES.....	53
TABELA 11 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS E MOLECULARES DAS AMOSTRAS.....	81

LISTA DE SIGLAS

CCR – Câncer de Cólon e Reto

HNPCC – Câncer Colorretal Hereditário Não Poliposo (*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*)

FAP – Polipose Adenomatosa Familiar (*Familial Adenomatous Polyposis*)

MMR – sistema de reparo de pareamento incorreto (*mismatch repair system*)

MLH1 – Human mutL homolog 1

MSH2 – Human mutS homolog 2

MSH3 – Human mutS homolog 3

MSH6 – Human mutS homolog 6

PMS1 – Postmeiotic segregation increased 1

PMS2 – Postmeiotic segregation increased 2

MSI – Instabilidade de microssatélites (*microsatellite instability*)

MSI-H – Instabilidade de microssatélites de alto grau (*microsatellite instability high*)

MSI-L – Instabilidade de microssatélites de baixo grau (*microsatellite instability low*)

MSS – Estabilidade de microssatélites (*microsatellite stability*)

INCA – Instituto Nacional do Câncer

NCI – National Institute of Cancer.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	MORFOLOGIA DO INTESTINO GROSSO.....	16
2.2	O CÂNCER DE CÓLON E RETO (CCR)	19
2.2.1	Câncer de Cólon e Reto Esporádico.....	20
2.2.2	Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (FAP)	21
2.2.3	Câncer de Cólon e Reto Hereditário Não-polipomatoso (HNPCC) ou Síndrome de Lynch.....	22
2.3	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE CÓLON E RETO	24
2.4	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO CÂNCER DE CÓLON E RETO	24
2.5	MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER DE CÓLON E RETO	28
2.5.1	O gene <i>BRAF</i>	30
2.5.2	Instabilidade de microssatélites	33
2.5.2.1	Genes de Reparo no CCR.....	35
2.6	REVISÃO DA LITERATURA	38
3.	JUSTIFICATIVA.....	42
4.	OBJETIVOS	43
4.1	OBJETIVO GERAL	43
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
5.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	44
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	44
5.3	EXTRAÇÃO DE DNA.....	46
5.4	AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	46
5.5	SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	48
5.6	ANÁLISE DE INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES (MSI)	49
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
6	RESULTADOS.....	51
6.1	SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>BRAF</i> V600E.....	51
6.2	INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES (MSI).....	52
7	DISCUSSÃO	56

8	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cólon e reto (CCR) corresponde ao terceiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado no mundo, com aproximadamente 1,4 milhão de casos novos em 2012, e acredita-se que esse número alcance 2,4 milhões até 2035 (INCA, 2014).

Esta doença compreende subgrupos que se caracterizam por alterações genéticas e anatomopatológicas específicas e pode ser dividida em câncer esporádico, onde o paciente não possui histórico familiar e corresponde a cerca de 80% das neoplasias colorretais; e o câncer hereditário, que corresponde ao restante dos casos. As principais síndromes hereditárias são a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e o Câncer de cólon e reto hereditário não-polipomatoso (HNPCC) ou Síndrome de Lynch (GONZALEZ-PONS e CRUZ-CORREA, 2015).

A FAP é caracterizada pelo desenvolvimento de centenas de milhares de pólipos adenomatosos, sendo a segunda síndrome hereditária mais comum entre os CCR. A maioria dos casos clássicos de FAP surge como consequência de uma mutação germinativa no gene *APC* (KINZLER *et al.*, 1991- VALLE, 2014).

O HNPCC é a síndrome mais comum de predisposição ao câncer de cólon e reto, e está associado a mutações nos genes envolvidos no reparo de erros de replicação no DNA (*mismatch repair* ou MMR) (LEACH *et al.*, 1993; AALTONEN *et al.*, 1993; PAPADOPOULOS *et al.*, 1994). A perda de atividade desses genes resulta no acúmulo de mutações caracterizadas por alterações no comprimento das sequências repetitivas, evidenciadas como instabilidade de microssatélites, ou MSI (MOREIRA, 2012). Mais de 90% dos tumores de pacientes diagnosticados com HNPCC apresentam alta instabilidade de microssatélites (MSI.-H) (PELTOMÄKI e VASEN, 1997).

Cerca de 10 a 15% dos cânceres esporádicos também apresentam MSI-H e é importante a diferenciação entre estes subtipos, especialmente quando não se tem informações da história familiar, ou seja, marcadores moleculares no câncer de cólon e reto são necessários para uma classificação mais precisa e individualizada do câncer colorretal (RICHMAN, 2015). A mutação V600E, no

proto-oncogene *BRAF*, está associada a 43 a 76% dos cânceres de cólon esporádicos que apresentam uma alta instabilidade de microssatélites (MSI-H), mas não está presente nos portadores de HNPCC, podendo, portanto, atuar como um marcador para os CCRs. esporádicos com alta instabilidade de microssatélites, discriminando-os dos familiares (DOMINGO *et al.*, 2004; LOUGHREY *et al.*, 2007; CAPPER *et al.*, 2013).

BRAF (ou proto-oncogene B-Raf, ou oncogene homólogo ao v-Raf de sarcoma murino viral B1) codifica uma proteína com atividade de cinase serina/treonina e atua em vias de sinalização envolvidas com a diferenciação e divisão celular, sendo regulada pela via MAP/ERKs cinase (WELLBROCK, KARASARIDES e MARAIS, 2004; KOLCH, 2005; SNELL, 2012). A mutação V600E em células epiteliais do cólon contribui para um ganho de resistência a estímulos apoptóticos, que é uma provável característica das lesões pré-malignas no cólon e reto, que leva ao câncer esporádico. Parece também estar relacionada ao desenvolvimento e manutenção de fenótipos transformados e invasivos em células epiteliais do cólon, conferindo um pior prognóstico para o paciente. Além disso, essa mutação potencializa a hipermetilação no promotor de *MLH1* (*mutL homolog 1*) (PRETO *et al.*, 2008).

A análise da mutação V600E pode vir a ser um potencial marcador molecular de CCR fornecendo informações clínicas da resposta ao tratamento, diagnóstico e prognóstico. Assim como a mutação *BRAF* V600E, o *status* MSI tem um valor prognóstico e preditivo para CCRs.

Neste trabalho, investigamos a mutação *BRAF* V600E e a instabilidade de microssatélites em uma população do Sul do Brasil portadora de CCR esporádico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MORFOLOGIA DO INTESTINO GROSSO

O intestino grosso (FIGURA 1), que tem cerca de 1,5 m de comprimento, estende-se desde a válvula ileocecal até o ânus e é composto por: ceco; apêndice; cólons ascendente, transverso, descendente e sigmoide; reto e canal anal. Sua primeira parte é o ceco, a parte mais larga do intestino grosso, ele é completamente intraperitoneal e não possui um mesentério, de modo que é móvel dentro da fossa ilíaca direita. O apêndice é um divertículo intestinal, rico em tecido linfóide, de fundo cego que se estende para baixo a partir do ceco (SPENCE, 1991; MOORE E DALLEY, 2007).

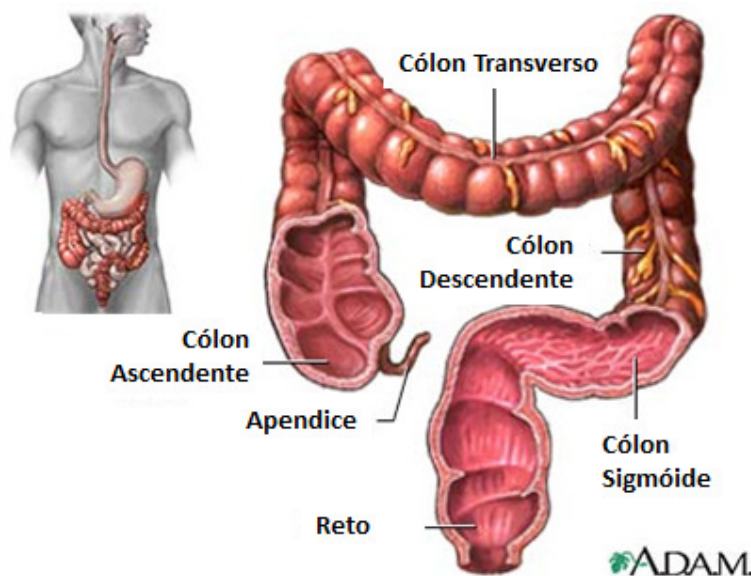


FIGURA 1- ANATOMIA DO INTESTINO GROSSO DEMONSTRANDO OS CÓLONS ASCENDENTE, TRANSVERSO, DESCENDENTE, SIGMOIDE E O RETO.

FONTE: AMERICAN ACCREDITATION HEALTHCARE COMMISSION (ADAM) - 2015.

O cólon possui quatro partes: ascendente, transversa, descendente e sigmoide. O cólon ascendente é uma continuação superior do ceco e está firmemente ligado contra a parede posterior do abdome. O cólon transverso é a parte mais longa e mais móvel do intestino grosso que atravessa toda a

cavidade abdominal. O cólon descendente ocupa uma posição retroperitoneal e quando esse atinge o limite superior da pelve, curva-se para o plano sagital mediano formando o cólon sigmoide. O cólon sigmoide tem a forma de S alongado, e está suspenso pelo mesocólon sigmoide, possuindo comprimento e disposição variáveis, terminando na junção retossigmóide.

Logo em seguida ao cólon sigmoide, abaixo dele, o intestino grosso dirige-se longitudinalmente à frente do osso sacro. Esta porção é chamada de reto. O reto acumula e armazena temporariamente as fezes. Ele termina com a flexura anorretal quando o intestino penetra no diafragma da pelve tornando-se o canal anal (SPENCE, 1991; MOORE E DALLEY, 2007).

O canal anal abre-se através do ânus. Ele é rodeado por músculos – esfíncteres externo e interno; e na junção com o reto é formado por uma túnica circular espessa de musculatura lisa involuntária. O esfíncter externo é formado por musculatura esquelética e com controle voluntário. Normalmente, por isso, a pessoa pode controlar os movimentos da defecação (SPENCE, 1991).

Além da divisão do intestino é importante entendermos sobre sua irrigação, pois auxilia no entendimento das metástases nos cânceres de cólon e reto. A origem embriológica do intestino grosso reflete-se na distribuição arterial, sendo assim a porção direita é irrigada pela artéria mesentérica superior através de seus ramos ileocecólico, cólica direita e cólica média, enquanto o cólon esquerdo é irrigado pela artéria mesentérica inferior. A artéria cólica média emerge da artéria mesentérica superior, passando para o lado direito do mesocólon transversal, e depois se divide em dois ramos: o direito e o esquerdo. A artéria cólica esquerda divide-se em um ramo ascendente e outro descendente, o primeiro dirige-se ao ângulo esplênico. A artéria mesentérica inferior, desce verticalmente em situação retroperitoneal, cruzando a artéria e a veia íliaca esquerda, emitindo as artérias sigmoidianas em número variável de dois a seis. Estes ramos principais se dividem para formar uma rede arterial interligada que chega à parede colônica pelo bordo mesocólico, artérias marginais de Drummond. A comunicação entre a artéria cólica média (ramo da artéria mesentérica superior) e a artéria cólica esquerda (ramo da artéria mesentérica inferior) recebe o nome de arcada de Riordan (CORDEIRO, 2005).

A artéria retal superior é continuação da mesentérica inferior. Depois de emitir ramos retossigmoidianos, bifurca-se na porção do reto em dois ramos

laterais, os quais descem de cada lado do reto, emitindo pequenos ramos até o nível da reflexão peritoneal. Esses ramos penetram na camada muscular e atingem a submucosa, de onde, como vasos retos, descem até as colunas retais, ao nível da linha pectínea, terminando sob a forma de plexos capilares. A artéria retal superior direita divide-se em dois ramos que descem ao nível das faces posterior e anterior do reto, enquanto o ramo esquerdo continua sem se dividir até o nível da face lateral esquerda do reto. Como a veia retal superior acompanha a artéria, este arranjo seria responsável pela distribuição das hemorróidas internas. Os ramos da artéria retal superior anastomosam-se com os da retal média, inferior e sacral média, que irrigam o reto inferior e o ânus (CORDEIRO, 2005).

As veias acompanham as artérias quanto à sua origem, número e distribuição, recebendo também a mesma nomenclatura. Exceção é apresentada pela veia mesentérica superior, que recebe a gastroepiplóica antes de entrar na veia porta. As outras tributárias da mesentérica superior, isto é, pancreática, jejunais, ileais, ileocecólica, veias cólica direita e média, correspondem exatamente aos ramos arteriais. A veia mesentérica superior se inicia ao nível do íleo terminal, tem trajeto oblíquo para cima na raiz do mesentério e situa-se à direita e em frente da artéria correspondente. A veia mesentérica inferior começa como continuação da veia retal superior, que drena o sangue do reto e porção superior do canal anal.. As veias do reto compreendem a retal superior, que drena na mesentérica inferior e sistema porta, e as veias retais média e inferior, que alcançam a circulação geral através das veias ilíacas internas (CORDEIRO, 2005).

A drenagem linfática do cólon acompanha a irrigação arterial principal e envolve uma rede de nódulos linfáticos, divididos em intrínsecos e extrínsecos, estes distribuídos em quatro grupos de acordo com a proximidade do cólon. Os intrínsecos ficam na parede do cólon, sendo que os da mucosa drenam da lâmina própria para a submucosa, muscular e serosa. Os extrínsecos epicólicos localizam-se na parede acima da serosa, os paracólicos nas arcadas marginais, os intermediários acompanham os vasos principais das mesentéricas e são o meio pelo qual a célula cancerosa da mucosa pode propagar-se (metástases) (CORDEIRO, 2005)..

Em relação ao reto e canal anal, a drenagem é feita por três pedículos: superior, que acompanha a artéria retal superior, artéria mesentérica inferior, que por sua vez é ramo da aorta e que acompanha exatamente a artéria retal superior; médio, que acompanha a artéria retal média, indo localizar-se na asa do sacro em um só gânglio, geralmente no ponto em que a retal média se origina na íliaca interna; e o inferior, que acompanha a artéria retal inferior, que normalmente drena para a região inguinal (CORDEIRO, 2005).

2.2 O CÂNCER DE CÓLON E RETO (CCR)

O termo câncer é utilizado para designar um conjunto de mais de 100 doenças comumente caracterizadas pelo crescimento descontrolado e pela proliferação de células anormais que apresentam além do potencial proliferativo, capacidade de invasão de tecidos adjacentes e de órgãos distantes (INCA, 2012).

O CCR é uma doença multifatorial que ocorre devido ao acúmulo de mutações em um determinado número de células do tecido epitelial, levando essas células a adquirirem uma vantagem de crescimento e a alterarem suas funções normais no organismo (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

Foi verificado que oncogenes (como o *BRAF*), genes supressores de tumor (*APC* - *adenomatous polyposis coli*, *DCC* - *deleted in colorectal cancer* e *TP53* - *tumor protein p53*) e genes reparadores do DNA ou MMR (do inglês, *mismatch repair* como *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* e *MSH6*) tem participação no aparecimento desse tipo de câncer (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

A história familiar de CCR e a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino (como as poliposes adenomatosas) são importantes fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer. Além disso, os fatores ambientais, como a dieta podem aumentar esse risco (NIVATVONGS, 1999).

Uma metanálise feita por Zandonai et al. (2012) demonstrou que a ingestão de carne vermelha está relacionada com o aumento do risco para câncer colon e reto em 28% a 35%, e que a carne processada está associada a um risco de 20% a 49%, normalmente os estudos apontam principalmente os

componentes nitrosos, aminas herocíclicas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como produtos carcinogênicos da carne.

Em, 2016, Surya *et al.*, demonstraram que a água obtida a partir das fezes de ratos alimentados com carne vermelha induziu preferencialmente a apoptose em células epiteliais normais do cólon do que naquelas que possuíam a mutação no gene *APC*, iniciando uma seleção positiva de células neoplásicas.

A idade também é considerada um fator de risco já que a maioria dos casos diagnosticados ocorre em pacientes com mais de 50 anos de idade (PEREA *et al.*, 2010). Este câncer tem um bom prognóstico se a doença for diagnosticada em estágios iniciais (INCA, 2012).

O desenvolvimento de técnicas de biologia celular e molecular possibilitou a identificação e localização das alterações genéticas de duas síndromes hereditárias do intestino grosso, a polipose adenomatosa familiar e o câncer colorretal hereditário não polipomatoso, facilitando assim o seu diagnóstico (VOGELSTEIN *et al.*, 1988; CHURCH, 1996).

O câncer colorretal é dividido, do ponto de vista genético, em dois grupos: os esporádicos, onde o paciente não possui histórico familiar e corresponde a cerca de 80% desses cânceres (DE LA CHAPELLE, 2004; MORÁN *et al.*, 2010) e o câncer hereditário, que corresponde ao restante dos casos e tem como principal característica a presença de muitas pessoas dentro de uma mesma família com câncer colorretal (CHURCH, 1996). As principais síndromes hereditárias são a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) (OMIM: 175100) e o Câncer de Cólon e Reto Hereditário Não-Polipomatoso (HNPCC) ou Síndrome de Lynch (OMIM:120435), responsável por cerca de 5 a 10% dos casos (CUNNINGHAM *et al.*, 1998; LYNCH, 2008; PEREA *et al.*, 2010).

2.2.1 Câncer de Cólon e Reto Esporádico

Esse tipo de câncer incide em pessoas em torno de 60 anos de idade, não tem um caráter familiar e está relacionado com fatores ambientais, como ao alto consumo de gordura animal e baixo consumo de fibras vegetais (CHURCH, 1996).

O desenvolvimento do câncer colorretal esporádico ocorre devido ao acúmulo linear de mutações genéticas e/ou anomalias cromossômicas (JUBB, BELL e QUIRKE, 2001). Normalmente o tumor se inicia a partir de pólipos adenomatosos (APC) os quais sofrem mutações gênicas e hipermetilação de regiões promotoras, o que leva a um tumor mais agressivo (HARDY, MELTZER e JANKOWSKI, 2000). Todo o processo da carcinogênese colorretal será abordado posteriormente.

Alguns tumores colorretais esporádicos também apresentam instabilidade de microssatélites (MSI), e ausência de proteínas MLH1 e PMS2 (WANG *et al.*, 2003). Esse tipo de tumor ocorre em indivíduos mais velhos, no qual podem ocorrer mutações no gene *BRAF* (V600E) e metilação de ilhas CpG. Curiosamente, mutações no gene *BRAF* são detectadas em CCRs esporádicos com MSI, mas não em CCRs familiares e se constituem em um prognóstico ruim (OGINO *et al.*, 2009)

2.2.2 Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (FAP)

A Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar é uma doença herdada de forma autossômica dominante, caracterizada pelo desenvolvimento de centenas de milhares de pólipos adenomatosos, sendo a segunda mais comum síndrome hereditária de CCR (VALLE, 2014).

O CCR ocorre por força da degeneração de uma ou mais dessas lesões (pólipos), 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 FAP, conhecida como síndrome de Gardner e acarretam alta morbidade (SYNGAL *et al.*, 2000)

A maioria dos casos clássicos de FAP surge como consequência de uma mutação germinativa no gene *APC*, localizado no cromossomo 5q21 (KINZLER *et al.*, 1991). Todas as pessoas portadoras de uma mutação germinativa no gene *APC*, vão desenvolver FAP (FEARON e VOGELSTEIN,

1990; KINZLER e VOGELSTEIN, 1996). Na maioria dos casos de FAP, a mutação é herdada de forma autossômica dominante; no entanto, em 15% - 20% dos casos, a mutação *APC* parece surgir *de novo* (VALLE, 2014).

Mutações germinativas no gene *APC* são consideradas as alterações mais precoces detectadas no câncer colorretal, desde que 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 (LOSSO, 2009)

2.2.3 Câncer de Cólon e Reto Hereditário Não-polipomatoso (HNPCC) ou Síndrome de Lynch

O Câncer de Cólon e Reto Hereditário Não-Polipomatoso (HNPCC) ou Síndrome de Lynch é responsável por cerca de 10% dos CCR, sendo que se desenvolve tipicamente a partir de adenomas e tem uma rápida evolução, o que os diferencia dos casos esporádicos (BAUCOM e WISE, 2012). Além disso, no HNPCC, o câncer se desenvolve mais rapidamente, e ocorre em idade mais precoce (antes dos 55 anos) (WINAWER *et al.*, 1997; WARD *et al.*, 2001).

Essa síndrome é uma doença genética de herança autossômica dominante que, além de predispor ao câncer de cólon e reto, também predispõe a outros tipos de neoplasias como de endométrio, ovário, estômago, intestino e vias biliares (MECKLIN e JÄRVINEN, 2005; PEREA *et al.*, 2010; STEINKE *et al.*, 2013). É clinicamente classificada de acordo com os Critérios de Amsterdam (TABELA 1) (VASEN *et al.*, 1991; VASEN *et al.*, 1999) e de Bethesda (TABELA 2) (HERRÁIZ e MUÑOZ-NAVAS, 2009).

A síndrome é decorrente da mutação germinativa em um dos seis genes relacionados com o reparo do DNA durante a replicação, conhecidos como genes de reparo de pareamento incorreto 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 (PELTOMÄKI e VASEN, 1997).

As mutações que provocam erros na maquinaria de reparo levam à ocorrência de instabilidade de microssatélites (MSI) que é um marcador típico do HNPCC (MOREIRA *et al.*, 2012). Sendo assim, o diagnóstico laboratorial para investigação genética pode ser feito por imuno-histoquímica pesquisando a presença ou ausência das proteínas correspondentes, teste de instabilidade de microssatélite (MSI) por PCR ou pesquisa direta de mutação nos genes de reparo por sequenciamento.

TABELA 1 CRITÉRIOS DE AMSTERDAM UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE HNPCC.

Critérios de Amsterdam II
Pelo menos três parentes com câncer associado ao câncer de cólon e reto sendo um deles um parente de primeiro grau.
Pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas.
Pelo menos um caso de câncer de colon e reto diagnosticado antes dos 50 anos.

FONTE: VASEN (1991; 1999).

TABELA 2 CRITÉRIOS DE BETHESDA UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO DE HNPCC.

Critérios de Bethesda
Critérios de Amsterdam positivos.
Câncer de cólon e reto diagnosticado antes dos 50 anos.
A presença de câncer de colón e reto síncrona ou metacrônica ou outro câncer relacionado ao HNPCC independentemente da idade.
Indivíduos com CCR e um parente de primeiro grau com adenoma ou CCR ou câncer extracolônico associado ao HNPCC. Um dos tumores até os 45 anos e o adenoma antes dos 40 anos de idade.
Indivíduos com câncer de cólon ou endométrio antes dos 45 anos.
Indivíduos com CCR no lado direito, com padrão indiferenciado em teste histológico antes dos 45 anos.
Indivíduos com CCR com presença de células em anel de sinete antes dos 45 anos.
Indivíduos com adenoma colônico antes dos 40 anos.

FONTE: HERRÁIZ E MUÑOZ-NAVAS (2009)

2.3 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE CÓLON E RETO

O câncer de cólon e reto (CCR) corresponde ao terceiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado no mundo, com aproximadamente 1,4 milhão de casos novos em 2012, e acredita-se que esse número alcance 2,4 milhões até 2035 (FERLAY, 2012)

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima-se, no Brasil em 2016, 34.280 casos novos de câncer de cólon e reto, sendo 16.660 homens e 17.620 mulheres.

Em 2014 o INCA calculou um risco estimado de 15,44 casos novos a cada 100 mil homens e 17,24 a cada 100 mil mulheres. É o segundo tipo de câncer mais frequente na região Sudeste (22,67/ 100 mil) e terceiro na região Sul (20,43/100 mil) para homens e o segundo mais frequente nas regiões Sudeste (24,56/ 100 mil) e Sul (21,85/ 100 mil) para mulheres.

A sobrevida média global em cinco anos encontra-se em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% nos países em desenvolvimento. Assemelhando-se à incidência, as taxas de mortalidade são mais baixas em mulheres, do que nos homens (INCA, 2014).

É preciso a organização de um sistema adequado e que forneça além de um diagnóstico apropriado, um acompanhamento do tratamento desses pacientes (TÁRRAGA LÓPEZ, ALBERO e RODRÍGUEZ-MONTES, 2014). Porém, mesmo em países com maiores recursos, a relação custo-benefício em investimentos para estratégias apropriadas de prevenção e detecção precoce do CCR tem impossibilitado a implantação de rastreamento populacional (INCA, 2014).

2.4 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO CÂNCER DE CÓLON E RETO

O intestino é composto por células epiteliais que revestem o interior da cavidade e possuem um alto número de renovação. Subjacente a esse epitélio está a membrana basal, que forma parte da matriz extracelular e é composta por proteínas secretadas tanto por células epiteliais acima membrana como por

células do estroma abaixo da mesma. As células mesenquimais que compõe o estroma são fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune. Abaixo dessa camada, encontra-se uma camada de músculo liso (WEINBERG, 2008).

A camada de células epiteliais constitui o local de maiores alterações patológicas, incluindo àquelas associadas ao desenvolvimento de um carcinoma de cólon. As alterações celulares começam por um processo chamado de hiperplasia, onde há um aumento de divisões celulares em certo local. Pode ocorrer também uma displasia, um crescimento desordenado com alterações na histologia e forma celular. Um crescimento maior das células displásicas, porém delimitado é chamado de pólipos. Os pólipos podem ser hiperplásicos (não são considerados neoplasias) ou neoplásicos benignos, também denominados de adenomas. Com o tempo, os adenomas podem invadir a membrana basal e diferentes tecidos, podendo adquirir a capacidade de metastatizar, sendo então considerados malignos e recebem o nome de carcinomas (PONZ DE LEON e DI GREGORIO, 2001).

Com relação as características histológicas o tumor pode ser classificado como tubular ou mucinoso, sendo o adenocarcinoma tubular o padrão mais habitual. Em aproximadamente 20% dos casos, os túbulos das glândulas são muito irregulares ou mal formados, ocasião em que esses tumores são classificados como pouco diferenciados. O tipo mucinoso pode ser detectado em até 15% dos casos e representa aquele em que 50% ou mais do volume do tumor é constituído por muco, na forma de lagos mucosos extracelulares ou composto por células “em anel de sinete”, nas quais o muco se acumula no citoplasma (ARAÚJO e SEID, 2013). O carcinoma do tipo histológico mucinoso vem sendo o mais controverso, de acordo com o prognóstico (COMPTON, 2003). Ele vem sendo considerado de pior prognóstico quando localizado no retossigmóide, ou se ocorrer em pacientes com menores de 45 anos. Apesar dessa classificação os tipos histológicos atualmente definidos não discriminam de modo independente o estadiamento na maioria dos casos de CCRs. (NETO, 2008)

Muitos fatores afetam o prognóstico do CCR, sendo que uma grande proporção deve-se ao estágio anátomo-patológico no momento do diagnóstico. Quase todos os pacientes são tratados com ressecção cirúrgica (AKKOCA *et*

al., 2014). O grau de invasão na parede intestinal, a propagação para os linfonodos regionais e a disseminação à distância são características que levam à classificação e ao estadiamento do CCR (MÜSSNICH, 2000). Diferentes sistemas são utilizados na classificação de CCR, sendo eles: sistema de DUKES, Sistema de Astle-Coller e Sistema TNM (TABELAS 3, 4, 5 E 6) (DUKES e BUSSEY, 1958; ANDRADE e PEREIRA, 2007; AKKOCA *et al.*, 2014).

TABELA 3 SISTEMA DUKES

Estádio A	Tumor limitada à mucosa ou invadindo ligeiramente a camada muscular.
Estágio B	Tumor invadiu a camada muscular
Estágio C	Tumor invadiu os linfonodos.
Estágio D	Tumor com metástases à distância ou doença disseminada.

FONTE: Modificado de DUKES E BUSSEY (1958).

TABELA 4 SISTEMA DE ASTLER-COLLER

Estádio A	Tumor limitado à mucosa.
Estágio B1	Tumor limitado à parede intestinal, sem invasão dos linfonodos.
Estágio B2	Tumor além da parede intestinal, sem invasão dos linfonodos.
Estágio B3	Tumor aderindo ou invadindo órgãos adjacentes, com invasão dos linfonodos.
Estágio C1	O tumor não invadiu a parede do intestino, porém há metástases em linfonodos..
Estágio C2	Tumor invadiu a parede intestinal e há metástase no linfonodo intestinal.
Estágio C3	Tumor invadiu órgãos adjacentes e há metástase nos linfonodos
Estágio D	Tumor com metástases à distância ou doença disseminada.

FONTE: Modificado de ANDRADE E PEREIRA (2007); AKKOCA (2014).

TABELA 5 SISTEMA TNM (TUMOR; LINFONODO; METÁSTASE)

Tumor primário (T)	
TX	Tumor primário desconhecido.
T0	Sem tumor primário.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor invadindo submucosa.
T2	Tumor invadindo a camada muscular.
T3	Tumor invadindo a subserosa ou o tecido pericólico/perirretal.
T4	Tumor invadindo órgãos ou estruturas vizinhas e/ou o peritônio visceral
Linfonodos regionais (N)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Não há metástases linfáticas.
N1	Comprometimento de 1 a 3 linfonodos.
N2	Comprometimento de 4 ou mais linfonodos.
Metástases (M)	
MX	Metástase à distância não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase distante.
M1	Presença de metástase à distância.

FONTE: Modificado de ANDRADE E PEREIRA (2007); AKKOCA (2014).

TABELA 6 ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE CÓLON E RETO

Estádio	T	N	M	DUKES	ASTLER-COLLER
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4	N0	M0	B	B2
IIIA	T1-T2	N1	M0	C	C1
IIIB	T3-T4	N1	M0	C	C2
IIIC	Qualquer T	N2	M0	C	C1/C2
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	D	D

FONTE: Modificado de ANDRADE E PEREIRA (2007); AKKOCA (2014).

2.5 MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER DE CÓLON E RETO

O câncer é uma doença genética, independente de ocorrer de forma esporádica ou hereditária, pois a carcinogênese se inicia com danos ao DNA. Uma vez danificado o DNA, há três processos que podem ocorrer na célula: morte celular, reconhecimento e reparo do dano, transmissão do dano às células descendentes (ALBERTS, 2002).

Os cânceres surgem como uma consequência do acúmulo de mutações e da desregulação de genes envolvidos nas vias de sinalização que regulam o destino celular, sobrevivência e manutenção do genoma, dentre eles os genes envolvidos no reparo do DNA (VOGELSTEIN *et al.*, 2013).

O câncer de cólon e reto compreende subgrupos caracterizados por alterações genéticas e anatomopatológicas específicas. Alguns genes envolvidos na proliferação celular (como o *BRAF*) e outros no reparo do DNA (como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*) estão associados ao desenvolvimento desse tipo de câncer (GONZALEZ-PONS e CRUZ-CORREA, 2015).

Uma característica marcante em todos os tipos de formação de câncer é a perda da estabilidade genômica, ocasionada por alterações das vias de transdução de sinais (LENGAUER, KINZLER e VOGELSTEIN, 1998). Essa alteração pode ocorrer de modos diferentes. Na via Clássica Adenoma-Carcinoma, o principal mecanismo de progressão neoplásica é a instabilidade cromossômica (CIN), levando à perda de heterozigose (LOH) e geralmente se inicia devido a uma mutação no gene APC. Já em outra via descrita, a Mutadora, ocorre a instabilidade de microssatélites (MSI), onde o principal mecanismo neoplásico é a perda de genes/proteínas envolvidos no MMR (CEDERQUIST, 2005).

A via Clássica ocorre quando mutações somáticas ou germinativas resultam na ativação de oncogenes como *BRAF* e inativação de genes supressores de tumor, como *APC* e *TP53* (LYNCH e DE LA CHAPELLE, 2003). Nesta via o câncer se desenvolve seguindo uma sequência de eventos moleculares cumulativos (VOGELSTEIN *et al.*, 1988).

A via Mutadora é consequência da inativação de proteínas de reparo do DNA. As alterações nos genes de reparo levam a uma instabilidade genética

causando um acúmulo de mutações que vão resultar em um câncer (AALTONEN *et al.*, 1998).

Além disso, mecanismos epigenéticos também têm sido descritos como fatores importantes na alteração dessas vias, como a hipermetilação das ilhas CpG que é um mecanismo de silenciamento de genes supressores de tumor, incluindo certos genes de reparo de DNA, onde atua através de hipermetilação de seu promotor (KIM e CHANG, 2014).

Estas vias levam a uma transição de uma lesão não tumoral para uma progressão à malignidade, a qual é acompanhada por expressão desregulada de genes supressores tumorais e oncogenes. Estas alterações têm sido consideradas como potenciais marcadores moleculares de CCR, porque podem fornecer informações clínicas da resposta ao tratamento, diagnóstico e prognóstico (TABELA 7) (GONZALEZ-PONS e CRUZ-CORREA, 2015).

TABELA 7 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS DUAS VIAS DE CCR

	Instabilidade Cromossômica (CIN)	Instabilidade de Microsatélites (MSI)
Prevalência	80-85%	15-20%
Eventos Moleculares	Caracterizada por aneuploidias, inativação de APC/b-catenina, acúmulo de alterações genéticas em oncogenes e genes supressores de tumores, e ganhos e perdas de alelos.	Mutações/ Alterações epigenéticas nos genes MMR que resultam em inserções e/ou deleções em microsatélites.
Características Clínicas	Associado a um pior prognóstico.	Associado a uma localização proximal do tumor, menor estadiamento, um alto grau de diferenciação, e abundância de linfócitos infiltrantes.

FONTE: Modificado de GONZALEZ-PONS E CRUZ-CORREA (2015).

Consistente com esses modelos genéticos existem pelo menos três rotas evolutivas para CCRs esporádicos (FIGURA 2) (JASS, 2007; PANCIONE, REMO e COLANTUONI, 2012).

A primeira é a via tradicional, que começa a partir de mucosa normal através de adenomas tubulares com mutação no gene *APC* seguida de uma mutação em *KRAS* levando a um adenocarcinoma no cólon distal com mutação no gene *TP53* e instabilidade cromossômica (CIN). A segunda é a via alternativa, que começa a partir de uma mucosa normal através das vilosidades, parcialmente com adenomas serrilhados (com mutações em *KRAS*, *BRAF*, *APC* e *CIMP*) resultando em câncer de cólon com mau prognóstico e com baixa capacidade de resposta a quimioterapia. A terceira é o caminho serrilhado, que começa a partir de uma mucosa normal via adenomas sésseis serrilhados com mutação no gene *BRAF*, *CIMP* (metilação em Ilhas CpG) e alta instabilidade de microssatélites resultando em um câncer de cólon proximal com bom prognóstico (PANCIONE, REMO e COLANTUONI, 2012; YAMAGISHI *et al.*, 2016).

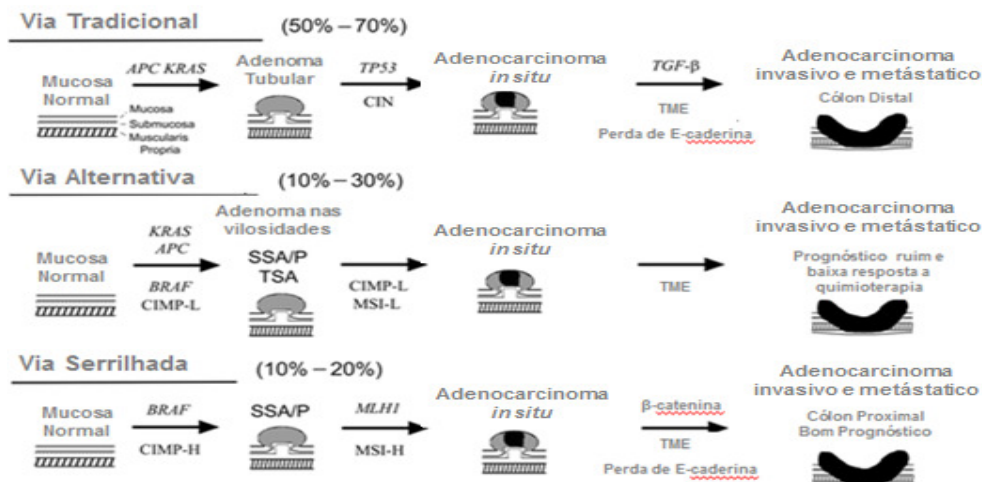


FIGURA 2 – ALTERAÇÕES DAS VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS. 1- Via Tradicional. 2- Via Alternativa. 3- Via Serrilhada.

FONTE: Modificado de YAMAGISHI *et al.* (2016)

2.5.1 O gene *BRAF*

O proto-oncogene *BRAF* (V-Raf murine sarcoma viral oncogene B1) codifica uma serina treonina cinase que atua na via de transdução de sinal do

RAS/RAF/MEK/ MAPK. Está localizado no cromossomo 7 e possui 18 éxons (SNELL, 2012).

BRAF atua como um mediador importante do crescimento e diferenciação celular em diferentes tecidos e a via pode ser ativada por diferentes receptores, incluindo receptores acoplados à proteína G e receptores de tirosinas cinases (FIGURA 3a) (WELLBROCK, KARASARIDES e MARAIS, 2004).

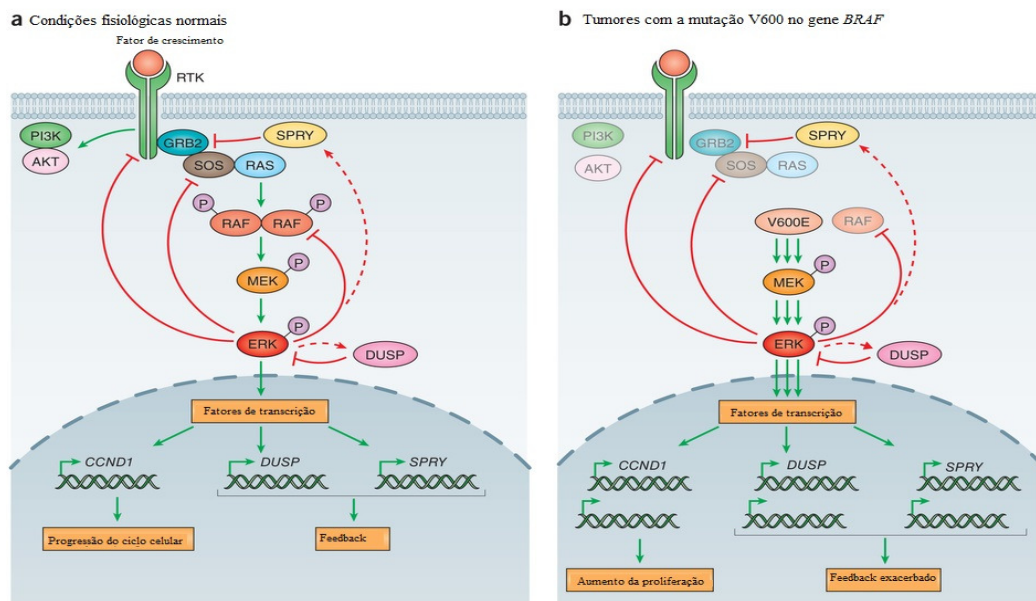


FIGURA 3 – VIA DE SINALIZAÇÃO RAS/RAF EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E EM TUMORES COM MUTAÇÕES *BRAF* V600E. (A) A cascata raf/merk/erk funciona através da fosforilação por *Ras*. (b) A mutação em *BRAF* faz com que ele fique constantemente ativo independente da fosforilação por *Ras*.

FONTE: Modificado de BERG E SOREIDE (2012).

O estímulo desses receptores leva a ativação de RAS que por sua vez ativa uma das cinases da família RAF, incluindo BRAF. A cascata continua com a ativação de MAPK que ativada pode fosforilar outras proteínas alvos no citoplasma ou fazer translocação para o núcleo sendo seus alvos fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos na diferenciação e proliferação celular (WELLBROCK, KARASARIDES e MARAIS, 2004; KOLCH, 2005). Mutações nos genes dessa via podem resultar em um descontrolado processo de divisão celular e tumorigênese.

A alta frequência de mutações no gene *BRAF* em cânceres humanos sugere que este possui um importante papel, tanto na iniciação do tumor,

quanto na manutenção do seu crescimento (PHILLIPS, KALADY e KIM, 2010). Dentre as mutações somáticas descritas no gene *BRAF*, cerca de 80 a 90% correspondem a uma transversão simples T>A (c.1799>A) no exon 15 (SNP rs113488022), levando a uma substituição de uma valina para um glutamato na posição 600 e por isso a mutação é denominada de V600E. Essa transversão resulta em um ganho de função da proteína levando a uma constante ativação do *BRAF* (FIGURA 3b) e, conseqüentemente, da cascata de fosforilação da via RAF/MAP/MEK/ERK (JARRY *et al.*, 2004; BENLLOCH *et al.*, 2006).

No câncer de cólon e reto, a cinase mutante BRAF contribui para a carcinogênese, aumentando a resistência aos estímulos apoptóticos e promovendo a ocorrência de mutações nas células, que passam a ter um fenótipo mais invasivo (PRETO *et al.*, 2008). Sendo assim, essa mutação tem sido associada a uma baixa sobrevivência relacionada ao câncer de cólon (SAMOWITZ, SWEENEY, *et al.*, 2005; OGINO *et al.*, 2009).

A mutação V600E que ocorre no exón 15 do gene *BRAF* é um “hotspot”, tendo sido descrita em uma variedade de cânceres humanos, especialmente no melanoma, câncer de tireoide e de cólon e reto (DAVIES *ET AL.*, 2002; DI NICOLANTONIO *et al.*, 2008; UEDA *et al.*, 2008). Nos CCR esporádicos, ocorre com uma frequência de 10–15% (LIÈVRE, BLONS e LAURENT-PUIG, 2010).

De acordo com um estudo de Davies *et al.* (2002), essa mutação foi identificada em diferentes linhagens de células cancerosas, incluindo 59% dos melanomas, 18% dos cânceres colorretal, 11% dos gliomas, 3% dos cânceres de pulmão, 9% dos sarcomas, 4% dos carcinomas de ovário, 2% dos cânceres de mama e 14% dos cânceres de fígado, comprovando que mutações no gene *BRAF* estão presentes em diferentes tipos de tumor.

A mutação *BRAF* V600E geralmente é encontrada em células malignas. A sua presença tem sido considerada para a decisão de um tratamento alvo, já que os pacientes que a apresentam têm uma pior resposta ao tratamento com Panitumumab® ou Cetuximab® (DI NICOLANTONIO *et al.*, 2008; SANTINI *et al.*, 2010).

A mutação *BRAF* V600E pode complementar o padrão molecular, permitindo um melhor acompanhamento dos pacientes com CCR, e pode ser considerada como um marcador de prognóstico ruim para CCR (CHEN *et al.*,

2014). Além disso, a detecção da mutação *BRAF* V600E tem sido proposta como um marcador de diagnóstico para distinguir o câncer esporádico com instabilidade de microssatélites, do câncer de cólon e reto não-polipomatoso (HNPCC) (PICHLER *et al.*, 2009). Sendo assim, a análise da mutação V600E pode ser uma estratégia confiável, rápida e de baixo custo, pois a sua detecção pode excluir a necessidade da análise dos genes de reparo.

2.5.2 Instabilidade de microssatélites

O DNA é composto por uma sequência de cerca de três bilhões de pares de nucleotídeos: adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G). Cerca de 60 a 75% destes nucleotídeos são compostos por sequências únicas, ou seja, segmentos onde a organização dos nucleotídeos ocorre apenas uma vez em todo o genoma. Dentre estas sequências únicas estão os genes, os quais representam cerca de 5 a 10% de todo o genoma. Os 25 a 40% restantes são formados pelas sequências repetitivas de DNA, as quais podem ser observadas diversas vezes em todo o genoma. Estas podem ser subdivididas em repetições dispersas e repetições em *tandem* (ou satélites). As repetições em *tandem* do DNA podem ser classificadas de acordo com a extensão da sequência repetitiva em satélites, minissatélites e microssatélites (PINHO, 2002).

Os microssatélites são pequenos segmentos repetitivos de DNA em que um único nucleotídeo (mononucleotídeos) ou unidades de dois ou mais nucleotídeos (por exemplo, di-, tri-, tetra-, ou pentanucleotídeos) são repetidos no genoma, geralmente em regiões não codificadoras (DE LA CHAPELLE e HAMPEI, 2010).

Há uma variação interindividual em relação ao número de repetições presente em determinados *loci* e essas regiões apresentam uma elevada taxa de mutação, devido ao fato de que a DNA polimerase pode “escorregar” nessas regiões causando erros durante a replicação (PUERTA-GARCÍA, CAÑADAS-GARRE e CALLEJA-HERNÁNDEZ, 2015).

A instabilidade de microssatélites (MSI) é caracterizada quando algumas células apresentam números diferentes de repetições de nucleotídeos, quando

comparado ao restante de células do organismo (DE LA CHAPELLE e HAMPEL, 2010). Em 1997, numa conferência em Bethesda, foi proposto um painel composto por três locos com repetições dinucleotídicas (D2S123, D5S346, D17S250) e dois com repetições mononucleotídeos (BAT26, BAT25), como um teste padrão para a pesquisa de MSI em câncer de cólon e reto.

Tomando como base este painel, os tumores com MSI passaram a ter três classificações possíveis: alta instabilidade (MSI-H), para os que apresentam dois ou mais dos marcadores instáveis; baixa instabilidade (MSI-L), para aqueles com apenas um dos marcadores instáveis; e estável (MSS) quando não havia sequer um marcador instável (BOLAND *et al.*, 1998). Além disso, quando MSI-H pode ser considerado positivo para erro de replicação (RER) ou RER negativa quando MSI-L ou MSS (AL-SUKHNI, ARONSON e GALLINGER, 2008; HUANG *et al.*, 2010)

Apesar desse painel ainda ser o mais utilizado para identificação de MSI, algumas alterações vêm sendo propostas, devido à incidência de polimorfismos na população dos marcadores, principalmente nos dinucleotídios (D2S123, D5S346, D17S250), que compõem 3 dos 5 marcadores do painel de Bethesda.

Por isso, em 2002, o NCI (National Institute of Cancer) propôs que os critérios de Bethesda fossem revistos para o rastreamento do CCR (LAGHI *et al.*, 2004; UMAR *et al.*, 2004; PIÑOL *et al.*, 2005), sugerindo a utilização de mononucleotídeos para uma maior sensibilidade na detecção de MSI. Foi também demonstrado por Buhard *et al.*, (2004) que o uso de mononucleotídeos tem melhor eficácia em relação aos dinucleotídeos devido sua natureza ser *quasi* monomórfica (SHEMIRANI *et al.*, 2011).

Em 2005, Findeisen *et al.*, (2005) descreveram um novo marcador mononucleotídeo, o T25 na região 3'UTR do gene da Caspase 2 (7q34-q35), sendo denominado de CAT25. O CAT25 apresentou um padrão *quasi* monomórfico em tecido normal de indivíduos caucasianos e também de origem africana e asiática, e por isso uma PCR (*Polimerase Chain Reaction*) deste marcador, isoladamente ou em multiplex com BAT25 e BAT26, em DNA tumoral é suficiente para produzir a mesma sensibilidade e especificidade que o painel indicado pela "Bethesda Guidelines".

Bianchi *et al.*, (2009) comprovaram os achados de Findeisen e colaboradores avaliando a confiabilidade de CAT25. Testaram 55 tecidos

tumorais de pacientes com HNPCC utilizando tanto o painel de Bethesda quanto o marcador CAT25. CAT25 estava alterado em todos os 13 cânceres de cólon e reto classificados como MSI-H usando o painel Bethesda e naqueles tumores que apresentaram um padrão estável para Bethesda, o CAT25 não se alterou. Além disso, 100 amostras de tecido normal foram analisadas e CAT25 apresentou um padrão *quasi* monomórfico.

Aliado a este pensamento, Morandi *et al.*, (2012) avaliaram 13 marcadores (BAT25, BAT26, CAT25, MT1XT20, TGFBR2, Mybt22, BAT40, NR21, NR24, D2S123, D5S346, D17S250, D18S58) de microssatélites a fim de avaliar a sensibilidade e especificidade dos marcadores. Observaram que nenhuma alteração em CAT25 foi encontrada nos casos MSS e MSI-L, assim como para os marcadores MT1XT20 e MybT22. A partir dos resultados, perceberam que BAT26 apresentava 97,5% de sensibilidade, MT1XT20 97,3% e CAT25 97,1%. Quanto a CAT25, MT1XT20 e MybT22, apresentavam 100% de especificidade.

A sensibilidade e especificidade do teste para verificação de MSI para a identificação de pacientes com HNPCC foi revista por De La Chapelle, Palomaki e Hampel (2009).

Um fenótipo clínico e patológico é identificado para os tumores que apresentam uma alta instabilidade de microssatélites (MSI-H), que compreendem cerca de 15% dos cânceres de cólon e reto, enquanto tumores com baixa instabilidade de microssatélites (MSI-L) e tumores estáveis (MSS) parecem ser fenotipicamente semelhantes. Tumores MSI-H são encontrados predominantemente no cólon proximal e estão associados a um melhor prognóstico e sobrevida do que os MSI-L ou MSS, e também são resistentes à quimioterapia adjuvante com 5-fluorouracil (BOLAND *et al.*, 1998; RIBIC *et al.*, 2003).

2.5.2.1 Genes de Reparo no CCR

O DNA sofre pequenas alterações através de perdas de segmentos e mutações durante a divisão celular. Para corrigir essas alterações, o organismo dispõe de algumas proteínas que tem como função o reparo do DNA para

manter sua integridade. Essas proteínas são produzidas por genes que são conhecidos como genes de reparo. Os diferentes sistemas de reparo são acionados na dependência do tipo de lesão sofrida pelo DNA. Entre eles, um eficiente sistema para as regiões repetitivas é o reparo de bases (*mismatch repair genes* – MMR), cuja função é exercida de forma contínua, preservando o DNA (ABE, MASUDA e OKUBO, 2001; GERVAZ *et al.*, 2002).

A presença da instabilidade dos microssatélites (MSI) ocorre justamente devido a mutações em genes que levam a erros na maquinaria de reparo (MOREIRA *et al.*, 2012). As proteínas presentes na maquinaria de reparo formam complexos (heterodímeros) que se ligam às regiões de DNA onde ocorreram erros e iniciam a remoção dos nucleotídeos. A perda dessas proteínas leva a um acúmulo de erros de replicação do DNA, particularmente em áreas do genoma com sequências curtas de nucleotídeos repetitivos (UMAR *et al.*, 2004).

A falha dos genes responsáveis pelo MMR pode ocorrer de duas maneiras: uma mutação germinativa em um alelo, seguida por inativação somática do alelo selvagem em uma célula da mucosa do cólon (estes indivíduos apresentarão a forma hereditária, caracterizando o HNPCC ou Síndrome de Lynch e correspondendo a cerca de 3 a 5% de todos os CCRs), ou uma falha somática que leva à inativação de ambos os alelos, correspondendo a cerca de 10 a 15% de todos os CCRs (FIGURA 3) (DE LA CHAPELLE e HAMPEL, 2010).

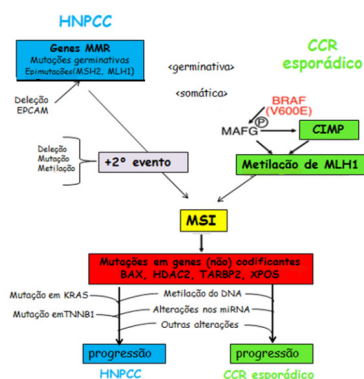


FIGURA 4– MODELO DE PROGRESSÃO MSI + CCR - HNPCC E CASO ESPORÁDICO. NO CASO ESPORÁDICO MSI OCORRE DEVIDO A MUTAÇÃO NO GENE BRAF OU METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE *MLH1*. JÁ no HNPCC, MSI OCORRE DEVIDO A MUTAÇÕES EM GENES DE REPARO.

FONTE: Modificado de YAMAMOTO E IMAI (2015)

As mutações no CCR ocorrem principalmente nos genes *MLH1* (*Gene Human mut-L Homologue-1*) localizado na região cromossômica 3p21-23, *MSH2* (*Gene Human mut-S Homologue-2*) na região 2p21, *MSH6* (*Gene Human mut-s Homologue-6*) na região 2p16 e *PMS2* (*postmeiotic segregation increased 2*) na região 7p22.2 (BALMAÑA *et al.*, 2013; MORRISON, 2015).

A correlação genótipo-fenótipo tem sido observada em portadores de mutação nos diferentes genes, como se segue: mutação em *MLH1* está associada a um maior risco de CCR em indivíduos jovens, em *MSH2* a um maior risco de cânceres extra-colônicos, podendo ser no trato urinário, ovários, estômago e cérebro, em *MSH6* a um maior risco de câncer no endométrio e em *PMS2* a um menor risco de desenvolver CCR ou câncer de endométrio (15 - 20%), em comparação com portadores de outra mutação (VASEN *et al.*, 2001; BALMAÑA *et al.*, 2010). Como mutações nos genes de MMR podem levar a uma perda de expressão da proteína correspondente essa poderá ser inferida por meio de técnicas de imunohistoquímica (IHC) (HAMPEL *et al.*, 2005; PIÑOL *et al.*, 2005).

A deficiência de MMR não só contribui para a patogênese de uma grande proporção de CCR, mas também determina a resposta a drogas que são frequentemente utilizadas nos tratamentos (HEWISH *et al.*, 2010). Assim MSI pode servir como um marcador no prognóstico de câncer de cólon (YACOUB, NAGALLA e AKLILU, 2012).

Alguns autores atribuem a origem dos tumores esporádicos com alta instabilidade de microssatélites (MSI-H) à hipermetilação nas ilhas CpG (CIMP-alta) (ISSA, 2004; OGINO *et al.*, 2009). Ilhas CpG estão presentes nas regiões promotoras de vários genes, inclusive *MLH1*, e quando estas ilhas são metiladas, a transcrição do gene é silenciada (PAI *et al.*, 2014). Esses fatores epigenéticos envolvidos na inativação do *MLH1* estão correlacionados com a presença da mutação no oncogene *BRAF* nesse tipo de tumor (DENG *et al.*, 2004; DOMINGO *et al.*, 2004; DOMINGO *et al.*, 2005).

O HNPCC (Síndrome de Lynch) tem um alto nível de instabilidade de microssatélites (MSI-H) como sua marca característica, que é causada por defeitos genéticos na linhagem germinativa, porém essa MSI-H também ocorre em alguns casos de câncer de cólon e reto esporádicos, dificultando o seu diagnóstico (CAPPER *et al.*, 2013).

A mutação V600E no gene *BRAF* está associada a 43 a 76% dos casos de tumores esporádicos com MSI-H (DOMINGO *et al.*, 2004; KOINUMA *et al.*, 2004; NAGASAKA *et al.*, 2004; SAMOWITZ, ALBERTSEN, *et al.*, 2005; HALVARSSON *et al.*, 2008; DE VOGEL *et al.*, 2009; PARSONS *et al.*, 2012). Essa mutação é encontrada exclusivamente nos casos esporádicos, sendo importante para distinguir, com sucesso, a doença hereditária e a esporádica associada com MSI-H (LOUGHREY *et al.*, 2007; CAPPER *et al.*, 2013).

2.6 REVISÃO DA LITERATURA

Li *et al* (2006) avaliaram o fenótipo clínico, patológico e molecular de tumores colorretais com mutações *BRAF*. A mutação no gene *BRAF* foi identificada em 8% (23/275) dos cânceres colorretais. Elas foram 5-10 vezes mais frequentes em tumores com infiltração linfocitária, localizados no cólon proximal, baixo grau histológico e mucinoso ($P < 0,002$ para cada). Os tumores com mutação *BRAF* também foram 10 vezes mais propensos a apresentarem MSI e metilação do DNA ($P < 0,0001$), em comparação com tumores sem essa mutação.

As características morfológicas dos tumores com mutação *BRAF* permaneceram após a estratificação de acordo com a instabilidade de microssatélites e fenótipos de metilação. Mutações no gene *BRAF* foram encontradas junto com mutações no *KRAS*, mas não demonstraram nenhuma associação clara com a presença da mutação *TP53*. A mutação *BRAF* identifica um subgrupo de câncer colorretal com distintas características fenotípicas independentes do *status* de instabilidade de microssatélites. E, portanto, este poderia ser um marcador valioso para estudos destes tumores.

Um banco referência de tumores contendo 28 HNPCC com mutações germinativas comprovadas ou com critérios Amsterdam I (média de idade de 37 anos) positivos e perda de expressão *MLH1*, 14 tumores MSI-H esporádicos com perda da expressão de *MLH1* e presença da mutação *BRAF* V600E (média de idade de 80,5 anos), e 16 tumores MSS esporádicos (média de idade de 76,5 anos) foram estudados por Bettstetter *et al.* (2007). A metilação do promotor de *MLH1* não foi encontrada em nenhum tumor MSS. Pacientes

HNPCC não apresentaram ou apresentaram um baixo nível de metilação do promotor de *MLH1*. Mutações *BRAF* V600E não foram detectadas em pacientes HNPCC. Sendo assim, a análise quantitativa da metilação de *MLH1* em CCR MSI-H é uma ferramenta molecular valiosa para distinguir HNPCC e CCR MSI-H esporádicos. A detecção de uma mutação *BRAF* V600E apoia ainda mais a exclusão de HNPCC.

Num estudo feito por Velho *et al.*, (2008), foi verificado que as mutações nos genes *KRAS*, *PIK3CA* e *BRAF* foram observadas em 71% dos pólipos e são mutuamente exclusivas. Mutações *KRAS* ocorreram em 35% dos pólipos. *PIK3CA* foi encontrada em apenas um dos pólipos. Mutações *BRAF* V600E ocorreram em 29% dos casos, todos eles classificados como adenoma serrilhado. Metilações na ilha CpG (CIMP) foram detectadas em 25% dos pólipos sendo todos esses positivos para a mutação em *BRAF*. A metilação de *MLH1* não foi detectada e todos os pólipos analisados tinham microssatélite estável.

A comparação entre a frequência de mutações oncogênicas em pólipos e CCR (MSI e MSS) os levaram a sugerir que mutações em *KRAS* e *PIK3CA* podem preceder os dois tipos de CCR, diferentemente de mutações *BRAF* que precedem carcinomas MSI, já que a frequência encontrada da mutação em *BRAF* em pólipos serrilhados é semelhante ao que é encontrado em MSI CCR, mas estatisticamente diferente do que se encontra em tumores com estabilidade de microssatélite (MSS).

Isso demonstra que as mutações em *BRAF*, *KRAS* e *PIK3CA* ocorrem antes da transformação maligna, indicando que estas alterações são oncogênicas, exercendo um papel primário na carcinogênese colorretal. Além disso, foi demonstrado que as mutações em *BRAF* ocorrem em associação com fenótipo CIMP em pólipos serrilhados e que esses e tumores MSI mostram uma frequência semelhante de mutações *BRAF*.

Ang *et al.* (2009) investigaram a relação entre a mutação *BRAF*, o fenótipo de metilação de ilhas CpG (CIMP+) e da metilação de *APC* no câncer colorretal de pacientes jovens. Verificaram que a mutação *BRAF* V600E foi encontrada em 7% dos casos e foi fortemente associada com as características de um tumor no sítio proximal, estágio avançado e baixo grau histológico. Mais da metade (53%) dos tumores com mutação *BRAF* eram também CIMP+, o

que foi avaliado por um painel padrão de marcadores, em comparação com apenas 4% dos tumores selvagens para *BRAF* ($P < 0,0001$). Em contraste com CIMP+, a metilação de *APC* foi inversamente correlacionada com a mutação *BRAF* ($P=0,02$). Mutação *BRAF* e CIMP+ são, portanto, suscetíveis de estarem envolvidos, embora raramente, no caminho para a inativação de *APC*, durante o desenvolvimento da CCR em pacientes mais jovens.

Através da análise de associação em 2012, Rasuck *et al.* (2012) caracterizaram tumores CCR utilizando critérios clínicos e moleculares. O grupo 1 foi caracterizado por indivíduos com mais de 60 anos de idade, sexo feminino, tumor do lado direito, alta instabilidade de microssatélites, e tumores sincrônicos ou metacrônicos. Os indivíduos do grupo 2 tinham menos de 45 anos de idade, sexo masculino, com tumores do lado esquerdo ou no reto e estabilidade de microssatélites.

Eles encontraram que o *status* de erro de replicação (RER) teve associação com tumor metacrônico, metilação do gene *MLH1* e uma associação inversa com tumores do lado esquerdo e sincrônicos. E apesar de não terem observado uma associação significativa, um maior número de indivíduos com história familiar de câncer e tumores sem metilação do promotor foram encontradas no grupo 2. Também observaram que a mutação V600E não demonstrou associação com características clínicas ou moleculares. Estes autores concluíram que a avaliação de MSI e da metilação dos promotores dos genes *MLH1* e *PMS2* devem ser consideradas como auxiliares no diagnóstico clínico.

Através do estudo da instabilidade de microssatélites (MSI) e da mutação V600E no gene *BRAF* em câncer de cólon e reto, Seppälä *et al.* (2015) categorizaram os pacientes em subtipos mais detalhados com base em características do tumor. Para isso, 762 amostras de tumores de pacientes com CCR esporádico foram analisadas, sendo os pacientes acompanhados durante 5,2 anos de sobrevida.

Comparando tumores de cólon e reto estáveis para microssatélites (MSS), os MSI tiveram um melhor prognóstico para uma sobrevida livre da doença (DFS; 5 anos: 85,8% vs 75,3%, 10 anos: 85,8% vs 72,9%, $P=0,027$; HR (*hazard ratios*): 0,49; CI (*confidence interval*): 0,30-0,80 , $P=0,005$) e uma sobrevida específica para a doença (DSS; 5 anos: 83,2% vs 70,5%; 10 anos:

83,2 vs 65,0%, $P=0,004$). Comparado com os portadores de *BRAF* selvagem, os portadores da mutação *BRAF* V600E demonstraram uma pior sobrevida (sobrevida global; 5 anos: 62,3% vs 51,6%, $P=0,014$; HR:1,43; CI:1,07-1,90, $P=0,009$), especialmente no câncer de reto (para DSS, HR: 10,60, CI (*confidence interval*): 3,04-36,92, $P<0,001$). O subtipo MSS/*BRAF* (V600E) demonstrou um baixa DSS (HR:1,88, CI:1,06-3,31, $P = 0,030$), mas o subtipo MSI/*BRAF* V600E foi um fator prognóstico bom para DFS (HR:0,42, CI:0,18-0,96, $P = 0,039$).

Entre os pacientes no estágio I-II, o subtipo MSS/*BRAF* V600E foi independentemente associado com baixa DSS (HR: 5,32 CI: 1,74-16,31 $P=0,003$). Sendo assim, os autores concluíram que tumores com instabilidade de microssatélites estão associados com melhor prognóstico em comparação com MSS. A mutação *BRAF* V600E está associada a um prognóstico ruim, a menos que ocorra em conjunto com a MSI. O subtipo MSI/*BRAF* V600E teve um prognóstico favorável em comparação com o subtipo MSS/*BRAF* selvagem. Tumores do reto positivos para *BRAF* V600E demonstraram particularmente um mau prognóstico. O subtipo MSS/*BRAF* V600E foi associado ao aumento da mortalidade específica da doença, mesmo em estágio I-II CCR.

Hurtado *et al.* (2015) determinaram a frequência e distribuição de mutações pontuais somáticas nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* e a instabilidade de microssatélites (MSI) em pacientes com câncer de cólon (CC). Cinquenta e oito pacientes com CC esporádico foram analisados, 16 apresentaram mutações no gene *KRAS* (G12R, G12D, G12V, G13D) e dos 42 pacientes que não apresentaram qualquer mutação em *KRAS*, 10 tiveram mutações no *BRAF* (V600E) e *PIK3CA* (E542K, E545D, E545K, Q546E, H1047R). Isoladamente ou em combinação com mutações *PIK3CA*, mutações em *BRAF* foram observadas em 27% dos tumores com alta MSI e em 2% dos tumores estáveis ($p < 0,049$).

A percentagem mais elevada de tumores com alta MSI estavam localizados no cólon direito ($p < 0,001$), e apresentaram a mutação *BRAF* ($p < 0,020$). Portanto, este estudo sugeriu a presença de diferentes características moleculares entre tumores do cólon direito e esquerdo que devem ser considerados na definição da conduta terapêutica.

3. JUSTIFICATIVA

A maioria dos casos de HNPCC são classificados atualmente de acordo com os critérios de Amsterdam e Bethesda (VASEN *et al.*, 1999; HERRÁIZ e MUÑOZ-NAVAS, 2009), e confirmados através da análise de cinco genes que codificam proteínas de reparo, sendo eles *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* e *PMS2*.

Porém essa classificação é falha, pois além dos critérios clínicos dependerem de informações que nem sempre são possíveis de se obter, como histórico familiar da doença, também foi observado que em casos de câncer esporádico também podem ocorrer alterações em alguns desses genes de reparo, sendo o *MLH1* o principal envolvido.

Diante destes fatos, há a necessidade de um marcador que possibilite a distinção da doença hereditária e esporádica. A mutação *BRAF V600E* mostra ser um potencial marcador, já que aparentemente ela está associada à maioria dos casos de cânceres esporádicos com alteração somática de *MLH1* (*mutL homolog 1*).

Além disso, a detecção dessa mutação em tumores de cólon e reto com alto grau de instabilidade de microssatélites (MSI-H) pode ser associada com a ausência de mutações germinativas nos genes *MLH1*, *MSH2* (*mutS homolog 2*) e *MSH6* (*mutS homolog 6*), o que torna dispensável a análise molecular destes genes em casos positivos para *V600E*. A presença da mutação pode indicar um tratamento mais direcionado e prever a evolução clínica do paciente.

Neste estudo pretendemos identificar a mutação *BRAF V600E* e analisar sua frequência em amostras de tumores caracterizados como esporádicos, além de verificar sua correlação com a instabilidade de microssatélites.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a mutação V600E como um potencial marcador para os CCRs esporádicos em uma amostra coletada no Sul do Brasil e assim contribuir com a determinação da importância desta mutação na classificação desse tipo de câncer, podendo auxiliar no prognóstico e direcionamento da terapia.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a frequência da mutação V600E no gene *BRAF* em uma amostra do Sul do Brasil;
- Avaliar a presença ou ausência da instabilidade de microssatélites, através dos marcadores BAT25, BAT 26 e CAT25;
- Correlacionar os resultados obtidos com os dados clínicos e anátomo patológicos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da FURB e está protocolado sob o número 146/11.

O Laboratório CITOLAB da cidade de Curitiba, Paraná forneceu amostras de tecido tumoral parafinado de pacientes que foram diagnosticados com câncer esporádico de cólon e/ou reto. Juntamente com o material também foram disponibilizados os laudos contendo informações como tipo e tamanho da lesão, estadiamento da doença e idade do paciente. O critério utilizado na seleção das amostras foi o diagnóstico anátomo-patológico de CCR esporádico, sem histórico familiar.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Através dos laudos cedidos pelo CITOLAB, 84 casos de carcinomas de cólon e reto foram classificados de acordo com suas características clínicas e moleculares. A idade foi informada em 76 pacientes, variando de 36 a 89 anos, com média e mediana de 65 e 62,5 anos, respectivamente. Desses, 10 (13,16%) foram diagnosticados com idade \leq 50 anos, 35 (46,05%) entre 51-69 anos e 31 (40,79%) com idade \geq 70. 84 pacientes, 46 (54,76%) eram do sexo feminino e 38 (45,24%) do sexo masculino (Tabela 8).

O local do tumor foi definido em 74 casos, sendo distribuído da seguinte forma: 2 (2,70%) no Ângulo Esplênico, 13 (17,57%) no Ceco, 10 (13,51%) no Cólon Ascendente ou Direito, 7 (9,46%) no Cólon Descendente ou Esquerdo, 10 (13,51%) no Cólon Sigmóide, 3 (4,05%) no Cólon Transverso, 14 (18,92%) no Reto e 15 (20,27%) na transição Retossigmóide. Além do local, o tipo de tumor também foi definido em 79 casos, sendo 6 (7,59%) Mucinoso e 73 (92,41%) Tubular. A presença de metástase foi detectada em 35 (45,45%) de 77 pacientes. O estadiamento tumoral foi determinado pela patologia de acordo com o sistema pTNM (INCA, 2004) em 56 (66,67%) dos 84, sendo 5 (8,93%) no estágio 0, 9 (16,07%) no estágio I, 12 (21,43%) no estágio IIA, 4 (7,14%) no

estádio IIB, 2 (3,57%) no estágio IIIA, 14 (25%) no estágio IIIB, 5 (8,93%) no estágio IIIC e 5 (8,93%) no estágio IV. As informações acima descritas são apresentadas na Tabela 8.

TABELA 8 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO

Gênero	Total (%)
Feminino	46 (54,76%)
Masculino	38(45,24%)
Idade	Total (%)
≤ 50 anos	10 (13,16%)
51-69	35 (46,05%)
≥ 70	31 (40,79%)
Sem informação	8
Média	65 anos
Mediana	62,5 anos
Máxima	89 anos
Mínima	36 anos
Local do Tumor	Total (%)
Ângulo Esplênico	2 (2,70%)
Ceco	13 (17,57%)
Cólon Ascendente	10(13,51%)
Cólon Descendente	7 (9,46%)
Cólon Sigmóide	10 (13,51%)
Cólon Transverso	3 (4,05%)
Reto	14 (18,92%)
Retossigmóide	15 (20,27%)
Sem informação	10
Tipo de Tumor	Total (%)
Mucinoso	6 (7,59%)
Tubular	73(92,41%)
Sem informação	5
Metástase	Total (%)
Ausente	42 (54,55%)
Presente	35 (45,45%)
Sem informação	7
Estadiamento	Total (%)
0	5 (8,93%)
I	9 (16,07%)
IIA	12 (21,43%)
IIB	4 (7,14%)
IIIA	2 (3,57%)
IIIB	14 (25%)
IIIC	5 (8,93%)
IV	5 (8,93%)
Sem informação	28

FONTE: A autora (2016)

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras destinadas ao estudo foram desparafinizadas numa sequência de 2 banhos de xilol por 10 minutos e um por 12 horas seguido de 3 banhos de etanol puro por 5 minutos e colocadas em uma solução contendo proteinase K para desagregação. Posteriormente, foram submetidas à extração do DNA seguindo o protocolo de fenol-cloroformio modificado de Isola *et al.* (1994).

Foi acrescentado um volume de fenol, clorofórmio e álcool isoamilico (na proporção 25:24:1), homogeneizado e centrifugado por 5 min a 20817,16 g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo do tipo *ependorf* (1,5 mL). Foram acrescentados 2 volumes de etanol 100% e 0,27 volume de acetato de amônia 7,5M e a amostra foi deixada por cerca de 18 horas a 20°C. No outro dia o tubo foi centrifugado por 20 min a 20817,16 g e o sobrenadante foi descartado. O botão de células foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 min a 20817,16 g. Para finalizar o botão de células foi lavado com etanol 70% e em seguida ressuspendido com 50µL de TE e armazenado a 20°C.

5.4 AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para amplificação dos fragmentos de interesse foi realizada uma reação de PCR utilizando aproximadamente 10ng de DNA genômico das amostras selecionadas, com os seguintes reagentes: Para a amplificação de *BRAF*: 1,5X de *Taq Platinum Buffer®* (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl₂; 0,25 mM de dNTPs; 1 µM de cada iniciador (senso e antisenso); 1 U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen); e água ultra pura para um volume final de reação de 25 µL.

Para os iniciadores BAT25, BAT26 e CAT25: 1X de *Taq Platinum Buffer®* (Invitrogen); 1,25 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 1,2 µM de cada iniciador (senso e antisenso); 1,25 U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen); e água ultra pura para um volume final de reação de 20 µL. AS sequencias dos iniciadores estão descritas na TABELA 9 a seguir:

TABELA 9 SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS.

Iniciador	Sequência	Tamanho do amplicon em pares de base
BAT25-F	5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3'	120
BAT25-R	5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'	
BAT25-f	5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3'	
BAT26-F	5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3'	116
BAT26-R	5'-AACCATTC AACATTTTAAACCC-3'	
BAT26-f	5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3'	
CAT25-F	5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'	146
CAT25-R	5'-GAGCTTG CAGTGAGCTGAGA-3'	
CAT25-f	5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3'	
<i>BRAF</i> -F	5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3'	215
<i>BRAF</i> -R	5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3'	

Legenda: F - iniciador senso (*Forward*), R - iniciador antisenso (*Reverse*), f - iniciador marcado com FAM,

FONTE: A autora (2016).

Os iniciadores BAT25, BAT26 já haviam sido utilizados pelo laboratório de Genética do Centro de Pesquisa do INCA para um estudo anterior, e como esse trabalho foi feito com auxílio desse laboratório, nós seguimos o mesmo protocolo. Os iniciadores CAT25 senso, antisenso e marcado, foram os mesmos utilizados por Findeisen *et al.* (2005). Já os iniciadores senso e antisenso para o sequenciamento do éxon 15 do gene *BRAF* foram descritos por Elisei *et al.* (2008).

Para a amplificação de *BRAF* as condições de PCR foram: pré-desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida de 38 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 59°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto com fase final de extensão de 72°C por 10 minutos.

O produto amplificado nessa PCR foi visualizado através da eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X. A coloração e visualização foi realizada com *Gel RedTM* (Uniscience)

A PCR seguiu as seguintes condições para os marcadores BAT25 e BAT26: pré-desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 1 minuto, temperatura de hibridização diferenciada para cada iniciador, sendo 57°C para o BAT25 e 56°C para o BAT26, e extensão a 72°C por 45 segundos com fase final de extensão de 72°C por 10 minutos.

Para o marcador CAT25 as condições foram: pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 38 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos com fase final de extensão de 72°C por 7 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1X e para coloração e visualização foi utilizado *BlueGreen* (Thermo Scientific™).

5.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA

O sequenciamento do gene *BRAF* foi realizado no INCA (Instituto Nacional do Câncer), em colaboração com o grupo do Dr Miguel Angelo Moreira.

Fragmentsos amplificados por PCR foram sequenciados por meio do kit *Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®), de acordo com o protocolo do fabricante. O kit utiliza dideoxynucleotídeos marcados com fluorescência. Para cada reação de sequenciamento foram utilizados 3,2 pmol do iniciador senso ou antisenso.

As condições da reação de sequenciamento foram: etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto; 35 ciclos com desnaturação a 96°C por 15 segundos, pareamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 4 minutos; e finalmente extensão a 72°C por 5 minutos. A precipitação dos produtos foi feita com a adição de 40 µL de etanol 65%, seguida de incubação em temperatura ambiente por 15 minutos. Foi realizada centrifugação a 20817,16 g por 20 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se mais 200 µL de etanol 70%, seguido de ressuspensão do botão de células e nova centrifugação a 20817,16 g por 20 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e as amostras foram mantidas a 37°C, por cerca de 15

minutos, para secagem do produto. Os produtos foram sequenciados em ambas as direções, no sentido da tradução do RNAm e no sentido contrário, usando o kit comercial *BIG-DYE 3.1* (Amersham Biosciences). As reações de sequenciamento abrangendo o éxon 15 de *BRAF* foram feitas no sequenciador ABI 3130XL (Amersham Biosciences).

Para a análise de bioinformática foram utilizados os *softwares* Bioedit® e MEGA 6.06®, através dos quais as sequencias senso (*forward*) e antisenso (*reverse*) foram analisadas e em seguida, formulou-se uma sequencia consenso de cada uma das 83 amostras. Após a formulação da sequencia consenso essas foram comparadas à sequencia referencia, que foi obtida através do banco de dados ENSEMBL¹. A mutação V600E, que consiste de uma troca de uma timina por uma adenina, está presente na posição 176429 do gene, que consiste na posição 121 da região amplificada e sequenciada.

5.6 ANÁLISE DE INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES (MSI)

Para a análise de microssatélites foi feita por análise do tamanho de fragmentos a partir de três marcadores de MSI, sendo todos eles mononucleotídios (BAT25, BAT26 e CAT 25). Esta etapa também foi realizada no INCA, em colaboração com o grupo do Dr. Miguel Angelo Moreira.

A análise foi realizada segundo o protocolo a seguir: os produtos de PCR gerados a partir da amplificação pelos iniciadores BAT25, BAT26 e CAT25 foram diluídos em água ultra pura em uma proporção adequada (1:5). Para cada amostra, utilizou-se para preparar o tampão de corrida 8,7µL de formamida e 0,3µL de padrão de peso molecular “Liz500” ®. Do tampão de corrida foram adicionados 9,0µL em cada poço da placa de genotipagem. Em seguida foram adicionados 1,0µL de produto de PCR (diluído quando necessário). Para retirar as bolhas que poderiam ter se formado, a placa foi centrifugada. Antes da análise as amostras foram desnaturadas por 3 minutos a 95°C e logo em seguida colocadas no gelo. A placa foi então colocada no

¹ <http://www.ensembl.org>

sequenciador automático ABI3130xl (Applied Biosystems®) e as amostras foram analisadas utilizando o programa “*Peak Scanner*” (Applied Biosystems®).

Na análise pelo programa “*Peak Scanner*” (Applied Biosystems®) observamos vários picos na região dos microssatélites, efeito do escorregamento da DNA-polimerase. , Dentre esses picos escolhemos o de maior área para determinação do tamanho do fragmento. Para o BAT25 o tamanho aproximado esperado do fragmento era de 120 pb, para BAT26 de 116pb e para CAT25 de 146pb. Quando observamos a instabilidade de microssatélites, há dois conjuntos de picos, dos quais também selecionamos o pico de maior área, e obtemos dois fragmentos de tamanhos diferentes, sendo um do tamanho esperado e o outro com um número de pares de bases diferente do esperado.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como não foi encontrada a mutação *BRAF* V600E em nenhuma das amostras não foi possível fazer as análises pretendidas.

O teste do qui ao quadrado e de Fisher foram utilizados para verificar a significância das diferenças observadas na distribuição da presença ou ausência de MSI, MSI-H e MSI-L, e as características clínicas e histopatológicas dos pacientes. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

6 RESULTADOS

6.1 SEQUENCIAMENTO DO GENE *BRAF* V600E

Foram analisadas por sequenciamento 84 amostras de pacientes portadores de câncer de cólon e reto provenientes do Laboratório CITOLAB da cidade de Curitiba, Paraná.

Estas amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger acima descrito. A mutação V600E não foi identificada em nenhuma amostra. A figura 5 apresenta um exemplo de um eletroferograma, com destaque para a região variável na qual se encontra a mutação demonstrando base Timina (T), representando a ausência da mutação V600E na amostra.

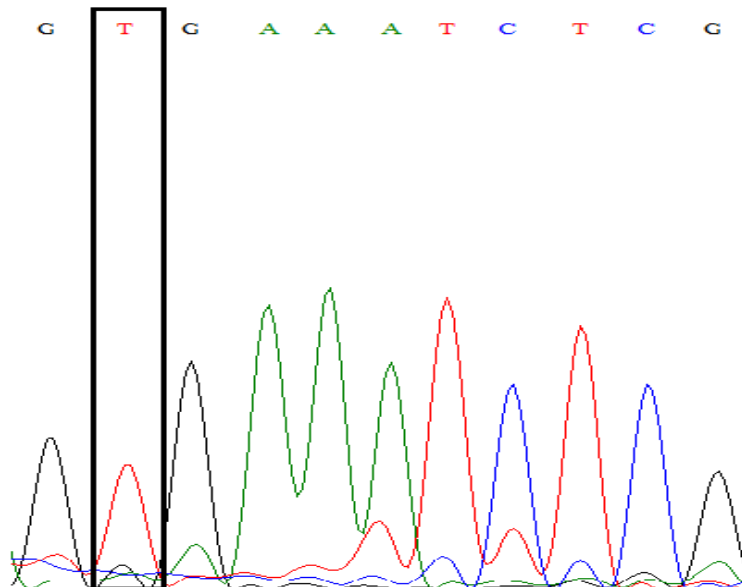


FIGURA 5 – ELETROFEROGRAMA DA SEQUENCIA DE DNA AMPLIFICADA. A base T destacada indica que a amostra não possui a mutação V600E.

FONTE: A autora (2015)

6.2 INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES (MSI)

A instabilidade de microssatélites foi observada em 12 (14,28%) dos 84 pacientes, desses 7 (58,33%) foram classificados como de alta instabilidade (MSI-H), por apresentarem dois ou mais marcadores com instabilidade, e 5 (41,67%) foram classificados como de baixa instabilidade por apresentarem apenas um marcador instável (TABELA 11). O uso dos três marcadores utilizados no nosso trabalho permite essa classificação sem a necessidade da comparação com o tecido normal.

As características clínicas e histopatológicas foram variáveis para os dois grupos. Dos 7 pacientes classificados como MSI-H, 5 (71,43%) eram mulheres e 2 (28,57%) homens, com idade entre 47 e 80 anos. Dois (28,57%) tumores se localizavam no Cólon Distal/Esquerdo, que corresponde aos Cólon descendente e sigmóide, retossigmóide e reto, e cinco (71,43%) se localizavam no Cólon Proximal/Direito, que compreende os cólons ascendente e transverso e o ceco. Dos tumores MSI-H, cinco (71,43%) apresentaram metástase e seis (85,71%) foram classificados de acordo com o seguinte estadiamento: 1- I (16,67%); 1- IIA (16,67%) 1-IIIB (16,67%); 1-IIIC (16,67%); 2- IV (33,33%), (TABELA 10).

Já dos cinco pacientes classificados como MSI-L, três (60%) eram mulheres e dois (40%) homens, com idade entre 55 e 84 anos. Três (75%) tumores estavam localizados no cólon Proximal/Direito, que compreende os cólons ascendente e transverso e o ceco e um (25%) no Cólon Distal/Esquerdo que corresponde aos Cólon descendente e sigmóide, retossigmóide e reto. Dos quatro tumores MSI-L informativos, dois (50%) apresentaram metástase e dos três informativos para o estadiamento, dois (67%) eram IIA; e um (33%) - IIB (TABELA 10).

TABELA 10 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS PACIENTES COM MSI E RESPECTIVOS MARCADORES

Amostra	Idade	Sexo	Loc. Tum.	Tipo Tum.	Met.	Estadio	BAT25	BAT26	CAT25	Classificação
1216336	47	F	CD	Tub.	P	IIIB	MSI	MSI	-	MSI-H
11157892	56	M	CD	Tub.	A	I	MSI	-	MSI	MSI-H
11142012	59	M	CD	Tub.	P	IIIC	MSI	MSI	-	MSI-H
11156452	55	F	CE	Tub.	A	IIA	MSS	MSS	MSI	MSI-L
1191782	69	F	CD	Tub.	P	-	MSS	MSS	MSI	MSI-L
11102142	62	M	CD	Tub.	-	-	-	MSI	MSS	MSI-L
1184753	80	F	CE	Tub.	A	IIA	MSI	MSS	MSI	MSI-H
11181622	84	F	CD	Tub.	P	IIB	MSI	MSS	-	MSI-L
1293265	-	M	-	-	A	IIA	MSS	MSI	-	MSI-L
12140162	66	F	CD	Tub.	P	-	MSI	MSI	MSI	MSI-H
123090	77	F	CD	Tub.	P	IV	-	MSI	MSI	MSI-H
121201	-	F	CE	Tub.	P	IV	MSS	MSI	MSI	MSI-H

Legenda: M – masculino; F- feminino; Loc. Tum. – localização tumoral; CD – cólon direito; CE- cólon esquerdo; Tipo Tum. – tipo tumoral; Tub – tubular; Met. – metástase; P – presente; A – ausente; MSI – instabilidade de microssatélites; MSS – estabilidade de microssatélites; MSI-H – alta instabilidade de microssatélites; MSI-L – baixa instabilidade de microssatélites.

FONTE: A autora (2016).

A presença ou ausência de MSI não se distribuiu igualmente de acordo com a localização dos tumores, se localizados no cólon direito ou esquerdo ($\chi^2_1=6,47$; $p<0,05$). A principal diferença foi devida ao excesso de pacientes observados com MSI e com tumor no cólon direito, sendo que o χ^2 parcial desta classe representou 52% (3,39/6,47) do valor do χ^2 total. A presença ou ausência de metástases se distribuiu igualmente nos pacientes com e sem MSI ($\chi^2_1=1,71$; $p>0,10$). O teste exato de Fisher demonstrou que não há diferença estatisticamente significativa na presença ou ausência de metástases quando se compara MSI-H e MSI-L ($p=0,57$). Também, não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos tumores de estágio I/II e III/IV nos pacientes com e sem MSI ($\chi^2_1=0,20$; $p>0,30$). O teste exato de Fisher demonstrou que não há diferença estatisticamente significativa nos tumores com os mesmos estágios quando se compara MSI-H e MSI-L. Quanto ao tipo do tumor ((tubular ou mucinoso) os pacientes com e sem MSI distribuíram-se igualmente ($\chi^2_1 =1,05$; $p>0,75$). A presença ou ausência de MSI se distribuiu igualmente nos pacientes do sexo masculino e feminino ($\chi^2_1=0,79$; $p>0,30$), o

mesmo tendo sido observado quando se comparou, pelo teste exato de Fisher, entre os pacientes MSI-H e MSI-L ($p=0,58$). Considerando a idade dos pacientes por faixa etária (≤ 50 anos, 51 a 69 anos e ≥ 70 anos) os com e sem instabilidade de microssatélites se distribuíram igualmente pelas mesmas ($\chi^2_2=0,90$; $p>0,50$)

Os alelos observados na genotipagem do marcador BAT25 variavam entre 120 e 124 pares de base e esse se apresentou alterado em cinco (50%) dos casos com MSI. Nas amostras em que foi observada instabilidade o alelo adicional observado variou de 114 a 116 pares de bases (FIGURA 6).

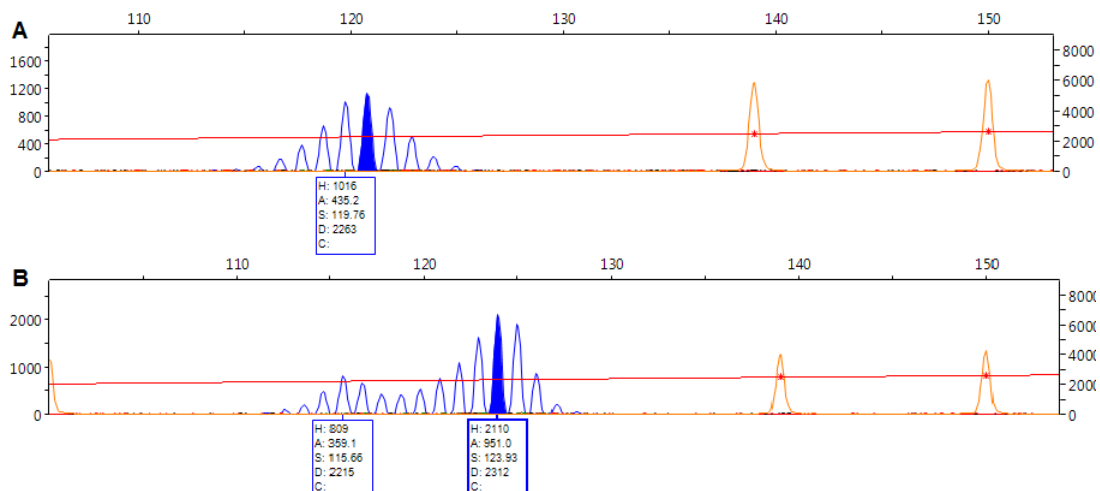


FIGURA 6 AMOSTRAS GENOTIPADAS PARA O MARCADOR BAT25. (A) PRESENÇA DE UM ALELO, DO TAMANHO ESPERADO, PARA O MARCADOR BAT25, EM AMOSTRA NORMAL; (B) DOIS ALELOS PARA O MARCADOR BAT 25.

FONTE: A autora (2016)

Já para o marcador BAT26 as amostras apresentaram alelos que variavam entre 114 e 117 pb e apresentou-se alterado em sete (58,33%) delas. Nas amostras tumorais em que foi observada instabilidade o alelo adicional observado variou de 105 a 110 pares de base (FIGURA 7).

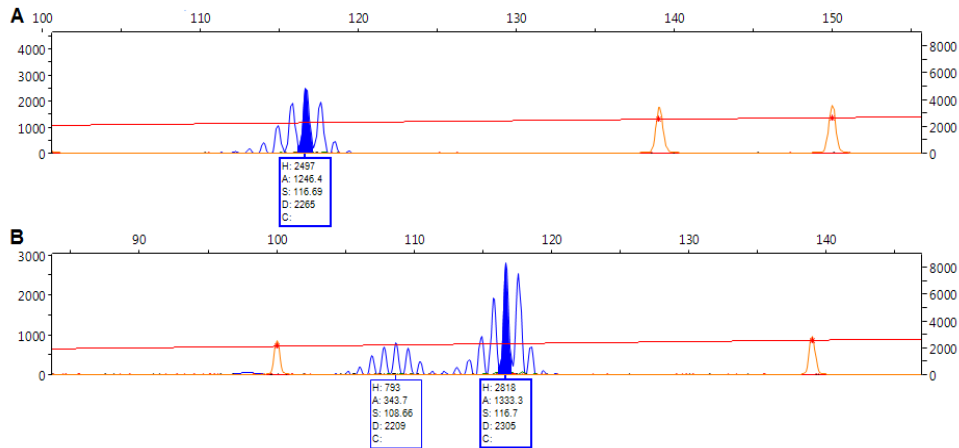


FIGURA 7 AMOSTRAS GENOTIPADAS PARA O MARCADOR BAT 26. (A) PRESENÇA DE UM ALELO, DO TAMANHO ESPERADO, PARA O MARCADOR BAT 26, EM AMOSTRA NORMAL; (B) DOIS ALELOS PARA O MARCADOR BAT 26.

FONTE: A autora (2016)

Quando considerada a genotipagem do marcador CAT25 as amostras apresentaram uma variação entre 145 a 149 pares de bases e apresentou-se alterado em sete (58,33%) dos casos de MSI. Entre os pacientes com instabilidade para este marcador, os alelos adicionais observados variaram entre 136 a 139 pares de base (FIGURA 8).

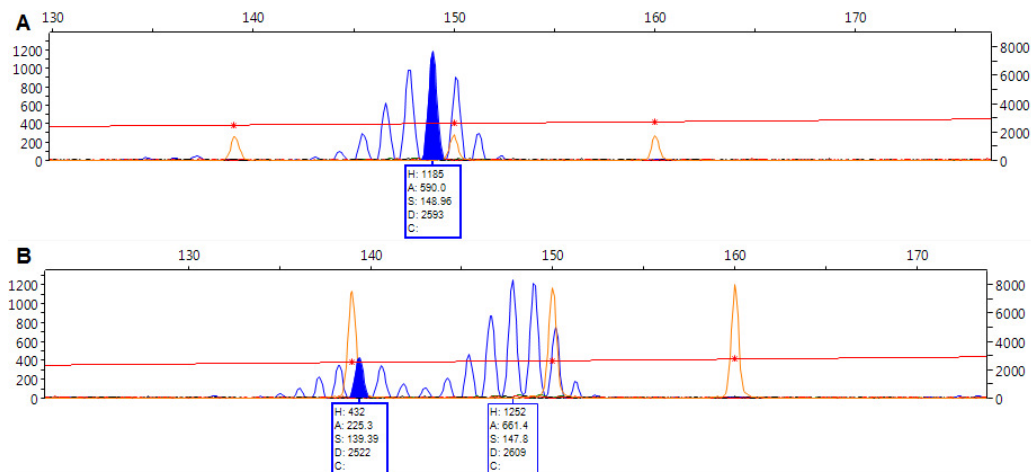


FIGURA 8 AMOSTRAS GENOTIPADAS PARA O MARCADOR CAT25. (A) PRESENÇA DE UM ALELO, DO TAMANHO ESPERADO, PARA O MARCADOR CAT25, EM AMOSTRA NORMAL; (B) DOIS ALELOS PARA O MARCADOR CAT25.

FONTE: A autora (2016)

7 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram caracterizadas 84 amostras fixadas em parafina cedidas pelo CITOLAB de Curitiba. A seleção das amostras foi feita aleatoriamente entre os casos classificados como CCRs esporádicos.

A incidência de câncer de cólon aumenta após os 40 anos e tem picos entre as idades de 60-75 anos (HAN-SHIANG, 1999; ALICI *et al.*, 2003; ASAAD, JUBELIRER e WELCH, 2005). Corroborando esses estudos, a média de idade observada nesta pesquisa foi de 65 anos, sendo 10 (11,90%) com idade inferior ou igual a 50 anos, 35 (41,67%) entre 51-69 anos e, o restante, 31 (36,90%) com idade superior ou igual a 70. (Koehler-Santos *et al.* (2011), sugeriram que a idade média para o aparecimento do câncer colorretal é de cerca de 45 anos para os pacientes que apresentam a forma hereditária da doença. Em contrapartida, o diagnóstico da forma esporádica da doença é feito em torno dos 65 anos de idade, conforme citado anteriormente.

Dentre os pacientes estudados, 46 (54,76%) eram do sexo feminino e 38 (45,24%) do sexo masculino numa razão de 1:0,82. Essa distribuição da doença de acordo com o gênero, observada neste estudo foi semelhante à observada por Akkoca *et al.* (2014) onde uma maior frequência de mulheres (56,47%) foi observada. Um estudo feito em Porto Alegre – RS observou que entre 212 pacientes 53,3% eram do sexo feminino (KOEHLER-SANTOS *et al.*, 2011). Um levantamento do Sistema Único de Saúde (SUS), entre 1996 e 2008, analisou 297.108 casos, e observou-se uma razão estável entre homens/mulheres de 1996-2001 com leve predominância do sexo feminino, sendo de 0,95:1,0. Já a partir de 2002 houve uma leve prevalência do sexo masculino (1,06:1,0), sendo observada uma reversão desta proporção a partir de 2008 (TORRES, ALMEIDA e NETINHO, 2010).

A detecção da mutação *BRAF* V600E tem sido proposta como um marcador de diagnóstico para distinguir o câncer esporádico com instabilidade de microssatélites, do câncer de cólon e reto hereditário não-polipomatoso (HNPCC) (PICHLER *et al.*, 2009).

Existe um consenso a partir de diversos estudos, de que cerca de 10 a 15% dos pacientes com CCR esporádico apresentam a mutação *BRAF* V600E

(DAVIES *et al.*, 2002; LIÈVRE, BLONS e LAURENT-PUIG, 2010; TEJPAR *et al.*, 2010; BARRAS, 2015; FANG *et al.*, 2016; SUEDA *et al.*, 2016). Em um estudo feito por Hang *et al.*, (2015) numa população do Taiwan, a frequência encontrada foi de 5,4% em 425 casos analisados. Asaka *et al.* (2009) encontraram uma frequência ainda menor, de 4,5% em 940 amostras analisadas numa população japonesa. Estudos com a população brasileira também demonstraram uma menor frequência dessa mutação. Rasuck *et al.* (2012) analisaram 77 amostras provenientes de Belo Horizonte – Minas Gerais, região Sudeste, e encontraram BRAF V600E numa frequência de 6,5%. Em 2014, Yamane *et al.* (2014) também observaram 6,5% da mutação V600E em BRAF num total de 47 amostras provenientes do Hospital do Câncer de Barretos – São Paulo. Das 84 amostras analisadas em nosso trabalho numa população de Curitiba – Paraná, Sul do Brasil, nenhuma apresentou esta mutação. Nosso resultado se assemelha aos dados de Naghibalhossaini *et al.* (2011) que também não encontraram a mutação após a análise de 110 casos de CCR esporádico em uma população do Irã. Um estudo realizado por Brim *et al.* (2008), demonstrou uma diferença na frequência desta mutação em diferentes populações, onde a mesma foi observada em 10% (8/82) dos tumores em Afro-americanos, 2% (1/53) dos tumores em Iranianos, e 19% (11/59) dos tumores em Omanianos.

A variação da frequência da mutação BRAF V600E nas populações, pode justificar porque não a encontramos em nosso estudo, considerando que o Brasil é um país formado por diversas etnias e tem uma grande miscigenação. A população do Sul do Brasil, de onde se originam nossas amostras, é formada predominantemente por imigrantes europeus, porém neste estudo específico, não obtivemos informações concretas sobre a origem étnica dos pacientes, tornando difícil a comparação com estudos de populações selecionadas. Desta forma, outros estudos precisam ser conduzidos no Brasil a fim de validar o uso deste marcador como critério de distinção do tumor esporádico. Além disso, fatores ambientais, como tipo de alimentação e hábito de vida também podem influenciar na frequência dessa mutação, já que ela é uma mutação somática.

A mutação V600E no gene BRAF é encontrada em torno de 43 a 76% dos casos esporádicos de CCR que apresentam MSI (DOMINGO *et al.*, 2004;

KOINUMA *et al.*, 2004; NAGASAKA *et al.*, 2004; SAMOWITZ, ALBERTSEN, *et al.*, 2005; HALVARSSON *et al.*, 2008; DE VOGEL *et al.*, 2009; PARSONS *et al.*, 2012) e em 5 a 10% dos casos MSS (RAJAGOPALAN *et al.*, 2002; NAGASAKA *et al.*, 2008; OGINO *et al.*, 2009). Analisando as nossas amostras, dos 12 casos que apresentaram MSI, seria esperado que aproximadamente seis casos apresentassem a mutação V600E. Porém, não foi possível fazer essa comparação no nosso trabalho, já que não observamos a presença da mutação em nossas amostras.

A análise de instabilidade de microssatélites no nosso trabalho foi realizada através da utilização de três marcadores: BAT25, BAT26 (que compõem o painel de Bethesda) e CAT25, um marcador *quasi* monomórfico. Esse painel *tríplex* foi proposto por Findeisen *et al.* (2005) como tendo a mesma sensibilidade e especificidade que o painel indicado por Bethesda.

Na maioria dos estudos a comparação com tecido normal deve ser feita para evitar erros de interpretação em casos de polimorfismos, principalmente numa população tão heterogênea como a população brasileira. Campanella *et al.* (2014) realizaram um estudo com o objetivo de estabelecer uma faixa de variação *quasi* monomórfica (QMVR) para cada marcador de um painel *pentaplex* de mononucleotídeos (NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25 e BAT-26) em uma população saudável brasileira. Desta forma, este painel poderia ser utilizado para avaliar a presença de MSI em tumores sem o pareamento com o DNA normal. Além disso, os autores também avaliaram a ascendência dos indivíduos utilizando marcadores de ancestralidade específicos (AIMS) e os correlacionaram com QMVR. Seguindo os índices estabelecidos de QMVR, foi observado que 23 indivíduos apresentaram alelos fora da QMVR, sendo que nenhum deles apresentou mais do que um marcador fora do índice. Portanto, os indivíduos com instabilidade em dois ou mais marcadores poderiam ser precisamente classificados como MSI-H. A proporção de ascendência Europeia foi a mais frequente (67,5%), seguida pela Africana (19,6%). Na comparação dos indivíduos com alelos dentro (n=191) e fora (n=23) da gama de índices, o QMVR mostrou diferenças estatísticas nas proporções de alelos europeus e africanos, confirmando a natureza mais polimórfica da ancestralidade Africana. Em conclusão, este estudo sugere que essa metodologia é precisa para avaliar

o estado MSI sem comparação com DNA de tecido normal independentemente da etnia, mesmo numa população altamente heterogênea como a do Brasil.

Com relação ao terceiro marcador utilizado em nosso estudo, CAT25, Findeisen *et al.* (2005) detectaram um padrão *quasi* monomórfico em 381 indivíduos de diferentes origens étnicas, tendo uma maior sensibilidade e especificidade que BAT26 particularmente quando se trata de indivíduos de origem Africana. Além disso, os autores compararam a eficiência de CAT25, com o *pentaplex* anteriormente sugerido, contendo os marcadores mononucleotídicos NR-21, NR-22, e NR-24, os mesmos analisados no trabalho de Campanella, e marcadores mononucleotídicos adicionais como MONO-27 e BAT-34c4, e aparentemente CAT25 possui uma maior sensibilidade e especificidade para detectar o fenótipo MSI-H em CCRs. Por fim, os autores sugerem um painel *tríplex* composto pelos mononucleotídeos BAT25, BAT26 e CAT25, o qual não há necessidade de comparação com tecido normal para detecção de MSI.

As mutações em CAT25 foram detectadas em todos os cânceres colorrectais MSI-H analisados, 56 dos 57 (98,2%), assim como Findeisen *et al.* (2005), Deschoolmeester *et al.* (2008) observaram a presença de alterações em CAT25 em todos os tumores MSI-H. Dos 13 pacientes que foram considerados MSI-H através do painel de Bethesda, todos também apresentaram alterações em CAT25 (BIANCHI *et al.*, 2009). Corroborando esses estudos, em nosso trabalho CAT25 apresentou-se instável nos tumores MSI-H em que foi possível sua análise (5 casos).

Numa outra análise, tanto Findeisen *et al.* (2005) quanto Deschoolmeester *et al.* (2008) observaram que em nenhum caso de MSS e MSI-L houve alterações em CAT25. Na nossa análise, os dois casos, classificados certamente como MSI-L apresentaram alterações em CAT25, não corroborando os autores acima citados.

De acordo com a maioria dos autores uma amostra é considerada MSI-H quando dois ou mais marcadores apresentam instabilidade, MSI-L quando apenas um marcador é instável e MSS quando nenhuma alteração é encontrada nos marcadores, e foi assim que nossas amostras foram classificadas (BOLAND *et al.*, 1998; RIBIC *et al.*, 2003; AL-SUKHNI, ARONSON e GALLINGER, 2008; HUANG *et al.*, 2010; PUERTA-GARCÍA,

CAÑADAS-GARRE e CALLEJA-HERNÁNDEZ, 2015). O significado clínico de MSI-L ainda é controverso, por isso, muitas vezes eles são agrupados com tumores estáveis (MSS). No nosso trabalho optamos por não agrupar os tumores MSS e MSI-L, seguindo vários outros autores (IINO *et al.*, 2000; POPAT, HUBNER e HOULSTON, 2005; DOMINGO *et al.*, 2013; SIMONS *et al.*, 2013; ARMELAO e DE PRETIS, 2014).

Em uma revisão feita por Richman, (2015), 10 a 15% dos CCRs esporádicos apresentam MSI. Neste trabalho foi observado que 14,28% (12/84) pacientes apresentaram MSI, desses 58,33% (7/12) foram classificados como de alta instabilidade (MSI-H), por apresentarem dois ou mais marcadores com instabilidade, e 41,67% (5/12) foram classificados como de baixa instabilidade por apresentarem apenas um marcador instável.

Os tumores MSI-H tanto esporádicos quanto aqueles com HNPCC têm uma localização preferencial do lado direito/proximal (LEITE *et al.*, 2010; GONZALEZ-PONS e CRUZ-CORREA, 2015; HURTADO *et al.*, 2015; PUERTA-GARCÍA, CAÑADAS-GARRE e CALLEJA-HERNÁNDEZ, 2015). No nosso trabalho, 62,5% dos tumores MSI-H estão localizados no lado direito/proximal. Além disso, segundo Leite *et al.* (2010), os tumores proximais acometem principalmente pacientes com mais de 60 anos de idade, embora o significado deste resultado não possa ser estatisticamente verificado, provavelmente devido ao pequeno tamanho da população amostral estudada. A maior incidência de CCR no cólon proximal de pacientes com mais de 60 anos, em comparação com pacientes mais jovens foi relatada anteriormente por Rossi *et al.* (2004). No nosso trabalho foi observada que a média de idade dos pacientes com tumores no cólon proximal e MSI foi de 65 anos, e quando separamos entre MSI-H e MSI-L, encontramos uma média de 61 e 71,67 anos, respectivamente.

Dentre outras características dos tumores com MSI-H, estes apresentam uma histologia com células em anel de sinete ou mucinoso (GONZALEZ-PONS e CRUZ-CORREA, 2015), células pouco diferenciadas, um melhor prognóstico, menor risco de metástases e com estadiamento menos avançado (GRYFE *et al.*, 2000; POPAT, HUBNER e HOULSTON, 2005; CHANG *et al.*, 2006; MALESCI *et al.*, 2007; CORSO *et al.*, 2013). Além disso, estão associados à mutação V600E (JASS *et al.*, 2002; IACOPETTA, ELSALEH e ZEPS, 2003;

PICHLER *et al.*, 2009; ROTH *et al.*, 2010). Em nosso estudo, 71,4% dos tumores MSI-H apresentaram metástase; e nenhum tumor mucinoso apresentou MSI e encontramos alguma associação com um estágio mais avançado do tumor. Com relação à associação com a mutação V600E nada podemos afirmar, pois esta não foi encontrada em nossas amostras.

Ainda há controvérsias se os tumores MSI-L constituem um subtipo isolado de CCR (GONZALEZ-PONS e CRUZ-CORREA, 2015). Lee *et al.* (2015) analisaram 3019 casos de CCR com MSI sendo 2.621 (86,8%) MSS, 200 (6,6%) MSI-L; e os restantes 198 (6,6%) MSI-H. Casos MSI-L e MSS foram comparáveis em relação às suas características clínico patológicas, com a exceção do local do tumor, tendo o MSI-L uma preferência por uma localização proximal e maior tamanho do que aqueles MSS. Além disso, a presença de MSI-L está associada a um pior prognóstico de sobrevida nos CCRs esporádicos. Em outro estudo feito por Zeinalian *et al.* (2015) foi observado uma idade média de 51,7 anos para pacientes MSI-L e a maioria dos tumores estavam localizados no reto. Em nosso estudo, encontram-se dois casos que podemos afirmar ser MSI-L; o primeiro, uma mulher de 69 anos, com tumor do tipo histológico tubular, localizado no cólon direito e apresentando metástase. O segundo, uma mulher de 55 anos, com tumor localizado no cólon esquerdo do tipo histológico tubular, sem metástase e no estágio IIA (4º e 5º casos na TABELA 10).

Evidências sugerem que o *status* MSI pode ser além de um marcador prognóstico, um marcador preditivo de CCRs esporádicos (GONZALEZ-PONS e CRUZ-CORREA, 2015), podendo prever a resposta à quimioterapia adjuvante. Relatórios de ensaios clínicos, uma retrospectiva de uma série de casos, e uma meta-análise têm relatado que pacientes com tumores MSI não se beneficiam da quimioterapia adjuvante com 5-fluorouracil (5-FU) em comparação com pacientes que possuem tumores MSS (RIBIC *et al.*, 2003; BENATTI *et al.*, 2005; JO E CARETHERS, 2006; JOVER *et al.*, 2006; GUASTADISEGNI *et al.*, 2010). Em outros estudos também foi proposto que o *status* MSI serve como marcador preditivo para a resposta ao irinotecano, já que tumores MSI-H apresentam uma melhor resposta a este tratamento (FALLIK *et al.*, 2003; BERTAGNOLLI *et al.*, 2009).

Por fim o *status* de MSI deve ser considerado entre os fatores de risco de CCR, orientando assim a tomada de decisões clínicas, em relação à utilização de uma quimioterapia adjuvante, juntamente com as características relacionadas ao alto risco de recorrência (FANG *et al.*, 2004; POPAT, HUBNER e HOULSTON, 2005).

8 CONCLUSÃO

A identificação de parâmetros que refletem o comportamento biológico do câncer é determinante no prognóstico e no incremento da terapia oncológica. Por isso, muitos estudos buscam entender os mecanismos moleculares de desenvolvimento e progressão do câncer, porém poucos marcadores biológicos foram identificados como tendo um valor prognóstico.

O objetivo deste trabalho foi descrever a frequência da mutação V600E em cânceres de cólon e reto esporádicos em uma população do Sul do Brasil e sua correlação com a instabilidade de microssatélites (MSI) correlacionando os resultados com os dados clínicos e anátomo patológicos.

A mutação *BRAF* V600E não foi observada na população de indivíduos estudada neste trabalho, o que sugere que esta pode não ser um bom marcador para esta região do nosso país se esta baixa frequência for confirmada em outros estudos com amostras maiores. A proporção de MSI encontrada neste estudo foi a esperada e demonstrou associação com o local do tumor, reafirmando sua importância na abordagem inicial dos pacientes com CCR se caracterizar como auxiliar prognóstico e preditivo.

REFERÊNCIAS

- AALTONEN, L. A. et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. **Science**, v. 260, n. 5109, p. 812-6, May 1993. ISSN 0036-8075.
- AALTONEN, L. A. et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. **N Engl J Med**, v. 338, n. 21, p. 1481-7, May 1998. ISSN 0028-4793.
- ABE, Y.; MASUDA, H.; OKUBO, R. Microsatellite instability of each tumor in sporadic synchronous multiple colorectal cancers. **Oncol Rep**, v. 8, n. 2, p. 299-304, 2001 Mar-Apr 2001. ISSN 1021-335X.
- AKKOCA, A. N. et al. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. **Int J Clin Exp Med**, v. 7, n. 9, p. 2828-35, 2014. ISSN 1940-5901
- AL-SUKHNI, W.; ARONSON, M.; GALLINGER, S. Hereditary colorectal cancer syndromes: familial adenomatous polyposis and lynch syndrome. **Surg Clin North Am**, v. 88, n. 4, p. 819-44, vii, Aug 2008. ISSN 0039-6109.
- ALBERTS B, J. A., LEWIS J, ET AL. **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition. New York: Garland Science, 2002.
- ALICI, S. et al. Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome. **Tohoku J Exp Med**, v. 199, n. 2, p. 85-93, Feb 2003. ISSN 0040-8727.
- ANDRADE, S. M. D. S.; PEREIRA, F. L. **Câncer colorretal sincrônico - relato de caso e revisão de literatura**. Revista Brasileira de Coloproctologia. Rio de Janeiro. 27 2007.
- ANG, P. W. et al. BRAF mutation is associated with the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer from young patients. **Cancer Lett**, v. 273, n. 2, p. 221-4, Jan 2009. ISSN 1872-7980.
- ARAÚJO, S.; SEID, V. **Câncer Colorretal**. <http://www.colorretal.com.br/> 2013.
- ARMELAO, F.; DE PRETIS, G. Familial colorectal cancer: A review. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 28, p. 9292-9298, Jul 2014. ISSN 2219-2840.

ASAAD, S. M.; JUBELIRER, S. J.; WELCH, C. A. Prognostic indicators for stage II (Dukes' stage B) adenocarcinoma of the colon. **W V Med J**, v. 101, n. 5, p. 210-3, 2005 Sep-Oct 2005. ISSN 0043-3284.

ASAKA, S. et al. Microsatellite instability-low colorectal cancer acquires a KRAS mutation during the progression from Dukes' A to Dukes' B. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 3, p. 494-9, Mar 2009. ISSN 1460-2180.

BALMAÑA, J. et al. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Ann Oncol**, v. 24 Suppl 6, p. vi73-80, Oct 2013. ISSN 1569-8041.

BALMAÑA, J. et al. Familial colorectal cancer risk: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Ann Oncol**, v. 21 Suppl 5, p. v78-81, May 2010. ISSN 1569-8041.

BARRAS, D. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. **Biomark Cancer**, v. 7, n. Suppl 1, p. 9-12, 2015. ISSN 1179-299X.

BAUCOM, R. B.; WISE, P. E. Endoscopic and surgical management of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Clin Colon Rectal Surg**, v. 25, n. 2, p. 90-6, Jun 2012. ISSN 1531-0043.

BENATTI, P. et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 23, p. 8332-40, Dec 2005. ISSN 1078-0432.

BENLLOCH, S. et al. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. **J Mol Diagn**, v. 8, n. 5, p. 540-3, Nov 2006. ISSN 1525-1578.

BERTAGNOLLI, M. M. et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 11, p. 1814-21, Apr 2009. ISSN 1527-7755.

BETTSTETTER, M. et al. Distinction of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic microsatellite-unstable colorectal cancer through quantification of MLH1 methylation by real-time PCR. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 11, p. 3221-8, Jun 2007. ISSN 1078-0432.

BIANCHI, F. et al. CAT25 is a mononucleotide marker to identify HNPCC patients. **J Mol Diagn**, v. 11, n. 3, p. 248-52, May 2009. ISSN 1943-7811.

BOLAND, C. 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**, v. 58, n. 22, p. 5248-57, Nov 1998. ISSN 0008-5472.

BRIM, H. et al. Impact of BRAF, MLH1 on the incidence of microsatellite instability high colorectal cancer in populations based study. **Mol Cancer**, v. 7, p. 68, 2008. ISSN 1476-4598.

BUHARD, O. et al. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. **Dis Markers**, v. 20, n. 4-5, p. 251-7, 2004. ISSN 0278-0240.

CAMPANELLA, N. C. et al. Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers. **Eur J Hum Genet**, v. 22, n. 7, p. 875-80, Jul 2014. ISSN 1476-5438.

CAPPER, D. et al. BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal cancer. **Int J Cancer**, v. 133, n. 7, p. 1624-30, Oct 2013. ISSN 1097-0215.

CARETHERS, J. M. et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 126, n. 2, p. 394-401, Feb 2004. ISSN 0016-5085.

CEDERQUIST, K. **GENETIC AND EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF HEREDITARY COLORECTAL CANCER** 2005. UMEÅ UNIVERSITY

CHANG, E. Y. et al. A prospective analysis of microsatellite instability as a molecular marker in colorectal cancer. **Am J Surg**, v. 191, n. 5, p. 646-51, May 2006. ISSN 0002-9610.

CHEN, D. et al. BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90607, 2014. ISSN 1932-6203.

CHURCH, J. M. Prophylactic colectomy in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Ann Med**, v. 28, n. 6, p. 479-82, Dec 1996. ISSN 0785-3890.

CLARKE, C. N.; KOPETZ, E. S. BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. **J Gastrointest Oncol**, v. 6, n. 6, p. 660-7, Dec 2015. ISSN 2078-6891.

COMPTON, C. C. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. **Mod Pathol**, v. 16, n. 4, p. 376-88, Apr 2003. ISSN 0893-3952.

CORDEIRO, F. Anatomia e Fisiologia do Intestino Grosso. UNIDADE INTEGRADA DE GASTROLOGIA. Disponível em: <http://www.unigastrocampinas.com.br/artigos/anatomia.pdf> Consultado em: 20 de abril de 2016.

CORSO, G. et al. Oncogenic mutations and microsatellite instability phenotype predict specific anatomical subsite in colorectal cancer patients. **Eur J Hum Genet**, v. 21, n. 12, p. 1383-8, Dec 2013. ISSN 1476-5438.

CUNNINGHAM, J. M. et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. **Cancer Res**, v. 58, n. 15, p. 3455-60, Aug 1998. ISSN 0008-5472.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949-54, Jun 2002. ISSN 0028-0836.

DE CUBA, E. M. et al. Prognostic value of BRAF and KRAS mutation status in stage II and III microsatellite instable colon cancers. **Int J Cancer**, v. 138, n. 5, p. 1139-45, Mar 2016. ISSN 1097-0215.

DE LA CHAPELLE, A. Genetic predisposition to colorectal cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 10, p. 769-80, Oct 2004. ISSN 1474-175X.

DE LA CHAPELLE, A.; HAMPEL, H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 20, p. 3380-7, Jul 2010. ISSN 1527-7755.

DE LA CHAPELLE, A.; PALOMAKI, G.; HAMPEL, H. Identifying Lynch syndrome. **Int J Cancer**, v. 125, n. 6, p. 1492-3, Sep 2009. ISSN 1097-0215.

DE VOGEL, S. et al. MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events. **Ann Oncol**, v. 20, n. 7, p. 1216-22, Jul 2009. ISSN 1569-8041.

DENG, G. et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 1 Pt 1, p. 191-5, Jan 2004. ISSN 1078-0432.

DESCHOLMEESTER, V. et al. Detection of microsatellite instability in colorectal cancer using an alternative multiplex assay of quasi-monomorphic mononucleotide markers. **J Mol Diagn**, v. 10, n. 2, p. 154-9, Mar 2008. ISSN 1525-1578.

DI NICOLANTONIO, F. et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 35, p. 5705-12, Dec 2008. ISSN 1527-7755.

DOMINGO, E. et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. **J Med Genet**, v. 41, n. 9, p. 664-8, Sep 2004. ISSN 1468-6244.

DOMINGO, E. et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. **Oncogene**, v. 24, n. 24, p. 3995-8, Jun 2005. ISSN 0950-9232.

DOMINGO, E. et al. Use of multivariate analysis to suggest a new molecular classification of colorectal cancer. **J Pathol**, v. 229, n. 3, p. 441-8, Feb 2013. ISSN 1096-9896.

DUKES, C. E.; BUSSEY, H. J. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. **Br J Cancer**, v. 12, n. 3, p. 309-20, Sep 1958. ISSN 0007-0920.

ELISEI, R. et al. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 10, p. 3943-9, Oct 2008. ISSN 0021-972X.

FALLIK, D. et al. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 63, n. 18, p. 5738-44, Sep 2003. ISSN 0008-5472.

FANG, M. et al. Common BRAF(V600E)-directed pathway mediates widespread epigenetic silencing in colorectal cancer and melanoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 5, p. 1250-5, Feb 2016. ISSN 1091-6490.

FANG, Y. M. et al. [Induction of HSF1 expression and sporadic colorectal cancer]. **Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 33, n. 5, p. 390-4, Sep 2004. ISSN 1008-9292.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-67, Jun 1990. ISSN 0092-8674.

FERLAY J, S. I., ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY, F. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. International Agency for Research on Cancer; 2013.:** <http://globocan.iarc.fr> p. 2012.

FINDEISEN, P. et al. T25 repeat in the 3' untranslated region of the CASP2 gene: a sensitive and specific marker for microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 65, n. 18, p. 8072-8, Sep 2005. ISSN 0008-5472.

FLEMING, M. et al. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **J Gastrointest Oncol**, v. 3, n. 3, p. 153-73, Sep 2012. ISSN 2219-679X.

GERVAZ, P. et al. Comparison of microsatellite instability and chromosomal instability in predicting survival of patients with T3N0 colorectal cancer. **Surgery**, v. 131, n. 2, p. 190-7, Feb 2002. ISSN 0039-6060.

GONZALEZ-PONS, M.; CRUZ-CORREA, M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 149014, 2015. ISSN 2314-6141.

GOSS, P. E. et al. Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 5, p. 391-436, Apr 2013. ISSN 1474-5488.

GRYFE, R. et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. **N Engl J Med**, v. 342, n. 2, p. 69-77, Jan 2000. ISSN 0028-4793.

GUASTADISEGNI, C. et al. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 15, p. 2788-98, Oct 2010. ISSN 1879-0852.

HALVARSSON, B. et al. Clinicopathologic factors identify sporadic mismatch repair-defective colon cancers. **Am J Clin Pathol**, v. 129, n. 2, p. 238-44, Feb 2008. ISSN 0002-9173.

HAMPEL, H. et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). **N Engl J Med**, v. 352, n. 18, p. 1851-60, May 2005. ISSN 1533-4406.

HAN-SHIANG, C. Curative resection of colorectal adenocarcinoma: multivariate analysis of 5-year follow-up. **World J Surg**, v. 23, n. 12, p. 1301-6, Dec 1999. ISSN 0364-2313.

HANG, J. F. et al. Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein in colorectal cancers in Taiwan is highly concordant with the molecular test.

Histopathology, Nov 2015. ISSN 1365-2559.

HARDY, R. G.; MELTZER, S. J.; JANKOWSKI, J. A. ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risk factors. **BMJ**, v. 321, n. 7265, p. 886-9, Oct 2000. ISSN 0959-8138.

HERRÁIZ, M.; MUÑOZ-NAVAS, M. Recognition and management of hereditary colorectal cancer syndromes. **Rev Esp Enferm Dig**, v. 101, n. 2, p. 125-32, Feb 2009. ISSN 1130-0108.

HEWISH, M. et al. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 7, n. 4, p. 197-208, Apr 2010. ISSN 1759-4782.

HUANG, Y. Q. et al. Comparative features of colorectal and gastric cancers with microsatellite instability in Chinese patients. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 11, n. 9, p. 647-53, Sep 2010. ISSN 1862-1783.

HURTADO, C. et al. [Molecular analysis of sporadic colon cancer]. **Rev Med Chil**, v. 143, n. 3, p. 310-9, Mar 2015. ISSN 0717-6163.

IACOPETTA, B.; ELSALEH, H.; ZEPS, N. Microsatellite instability in colon cancer. **N Engl J Med**, v. 349, n. 18, p. 1774-6; author reply 1774-6, Oct 2003. ISSN 1533-4406.

IINO, H. et al. DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Gut**, v. 47, n. 1, p. 37-42, Jul 2000. ISSN 0017-5749.

INCA. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância: Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro 2011.

INCA. Estimativa 2012- Incidência de câncer no Brasil., www.inca.gov.br, 2012.

ISOLA, J. et al. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am J Pathol**, v. 145, n. 6, p. 1301-8, Dec 1994. ISSN 0002-9440

ISSA, J. P. CpG island methylator phenotype in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 12, p. 988-93, Dec 2004. ISSN 1474-175X.

JARRY, A. et al. Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E. **Mol Cell Probes**, v. 18, n. 5, p. 349-52, Oct 2004. ISSN 0890-8508.

JASS, J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. **Histopathology**, v. 50, n. 1, p. 113-30, Jan 2007. ISSN 0309-0167..

JASS, J. R. et al. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. **Eur J Cancer**, v. 38, n. 7, p. 858-66, May 2002. ISSN 0959-8049.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011 Mar-Apr 2011. ISSN 1542-4863.

JO, W. S.; CARETHERS, J. M. Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. **Cancer Biomark**, v. 2, n. 1-2, p. 51-60, 2006. ISSN 1574-0153.

JOVER, R. et al. Predictive value of microsatellite instability for benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. **Gut**, v. 55, n. 12, p. 1819-20, Dec 2006. ISSN 0017-5749.

JUBB, A. M.; BELL, S. M.; QUIRKE, P. Methylation and colorectal cancer. **J Pathol**, v. 195, n. 1, p. 111-34, Sep 2001. ISSN 0022-3417.

KAWAKAMI, H.; ZANANAN, A.; SINICROPE, F. A. Implications of mismatch repair-deficient status on management of early stage colorectal cancer. **J Gastrointest Oncol**, v. 6, n. 6, p. 676-84, Dec 2015. ISSN 2078-6891.

KIM, E. R.; CHANG, D. K. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 29, p. 9872-9881, Aug 2014. ISSN 2219-2840.

KINZLER, K. W. et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. **Science**, v. 251, n. 4999, p. 1366-70, Mar 1991. ISSN 0036-8075.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**, v. 87, n. 2, p. 159-70, Oct 1996. ISSN 0092-8674.

KOEHLER-SANTOS, P. et al. Identification of patients at-risk for Lynch syndrome in a hospital-based colorectal surgery clinic. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 6, p. 766-73, Feb 2011. ISSN 2219-2840.

KOINUMA, K. et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. **Int J Cancer**, v. 108, n. 2, p. 237-42, Jan 2004. ISSN 0020-7136.

KOLCH, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 827-37, Nov 2005. ISSN 1471-0072.

LAGHI, L. et al. Re: Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst**, v. 96, n. 18, p. 1402-3; author reply 1403-4, Sep 2004. ISSN 1460-2105.

LEACH, F. S. et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cell**, v. 75, n. 6, p. 1215-25, Dec 1993. ISSN 0092-8674.

LEE, S. Y. et al. Low-Level Microsatellite Instability as a Potential Prognostic Factor in Sporadic Colorectal Cancer. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 50, p. e2260, Dec 2015. ISSN 1536-5964.

LEITE, S. M. et al. Assessment of microsatellite instability in colorectal cancer patients from Brazil. **Mol Biol Rep**, v. 37, n. 1, p. 375-80, Jan 2010. ISSN 1573-4978.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 643-9, Dec 1998. ISSN 0028-0836.

LI, W. Q. et al. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. **Mol Cancer**, v. 5, p. 2, 2006. ISSN 1476-4598.

LIÈVRE, A.; BLONS, H.; LAURENT-PUIG, P. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 21, p. 3033-43, May 2010. ISSN 1476-5594.

LOCHHEAD, P. et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. **J Natl Cancer Inst**, v. 105, n. 15, p. 1151-6, Aug 2013. ISSN 1460-2105.

LOSSO, G. M. **IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS CARCINOGENÉTICA CLÁSSICA E MUTADORA E CORRELAÇÃO COM O FENÓTIPO NEOPLÁSICO DE CARCINOMAS COLORRETAIS ESPORÁDICOS**. 2009. 107 (Mestrado). Programa de Pósgraduação em Microbiologia Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde., Universidade Federal do Paraná

LOUGHREY, M. B. et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Fam Cancer**, v. 6, n. 3, p. 301-10, 2007. ISSN 1389-9600.

LYNCH, H. T.; DE LA CHAPELLE, A. Hereditary colorectal cancer. **N Engl J Med**, v. 348, n. 10, p. 919-32, Mar 2003. ISSN 1533-4406.

LYNCH, P. M. Chemoprevention with special reference to inherited colorectal cancer. **Fam Cancer**, v. 7, n. 1, p. 59-64, 2008. ISSN 1389-9600.

MALESCI, A. et al. Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 13, p. 3831-9, Jul 2007. ISSN 1078-0432.

MECKLIN, J. P.; JÄRVINEN, H. J. Surveillance in Lynch syndrome. **Fam Cancer**, v. 4, n. 3, p. 267-71, 2005. ISSN 1389-9600.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia Orientada para a Clínica**. 5^a edição. Guanabara Koogan, 2007.

MORANDI, L. et al. T([20]) repeat in the 3'-untranslated region of the MT1X gene: a marker with high sensitivity and specificity to detect microsatellite instability in colorectal cancer. **Int J Colorectal Dis**, v. 27, n. 5, p. 647-56, May 2012. ISSN 1432-1262.

MOREIRA, L. et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. **JAMA**, v. 308, n. 15, p. 1555-65, Oct 2012. ISSN 1538-3598.

MORRISON, L. F. N. **Genetic Home References - Your Guide to Understanding Genetic Conditions** 2015.

MORÁN, A. et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. **World J Gastrointest Oncol**, v. 2, n. 3, p. 151-8, Mar 2010. ISSN 1948-5204.

MÜSSNICH, H. G. SOBREVIDA E FATORES PROGNÓSTICOS EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA PRIMÁRIO DE RETO 2000.

(Mestre). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NAGASAKA, T. et al. Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer. **Gastroenterology**, v. 134, n. 7, p. 1950-60, 1960.e1, Jun 2008. ISSN 1528-0012.

_____. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 22, p. 4584-94, Nov 2004. ISSN 0732-183X.

NAGHIBALHOSSAINI, F. et al. High frequency of genes' promoter methylation, but lack of BRAF V600E mutation among Iranian colorectal cancer patients. **Pathol Oncol Res**, v. 17, n. 4, p. 819-25, Dec 2011. ISSN 1532-2807.

NETO, C. S. **Adenocarcinoma Colorretal: aspectos anatomopatológicos e imunohistoquímicos do crescimento tumoral, citoesqueleto e de marcadores de regulação do pH intracelular.** 2008. (Doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP)

NIVATVONGS, P. H. G. A. S. **Principles and practices of surgery for the Colon, Rectum and Anus.** second. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, 1999.

OGINO, S. et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. **Gut**, v. 58, n. 1, p. 90-6, Jan 2009. ISSN 1468-3288.

PAI, R. K. et al. Immunohistochemistry for annexin A10 can distinguish sporadic from Lynch syndrome-associated microsatellite-unstable colorectal carcinoma. **Am J Surg Pathol**, v. 38, n. 4, p. 518-25, Apr 2014. ISSN 1532-0979.

PANCIONE, M.; REMO, A.; COLANTUONI, V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. **Patholog Res Int**, v. 2012, p. 509348, 2012. ISSN 2042-003X.

PAPADOPOULOS, N. et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. **Science**, v. 263, n. 5153, p. 1625-9, Mar 1994. ISSN 0036-8075.

PARSONS, M. T. et al. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature

review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. **J Med Genet**, v. 49, n. 3, p. 151-7, Mar 2012. ISSN 1468-6244.

PELTOMÄKI, P.; VASEN, 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**, v. 113, n. 4, p. 1146-58, Oct 1997. ISSN 0016-5085.

PEREA, J. et al. Approach to early-onset colorectal cancer: clinicopathological, familial, molecular and immunohistochemical characteristics. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 29, p. 3697-703, Aug 2010. ISSN 2219-2840.

PHILLIPS, B.; KALADY, M.; KIM, R. BRAF testing in advanced colorectal cancer: is it ready for prime time? **Clin Adv Hematol Oncol**, v. 8, n. 6, p. 437-44, Jun 2010. ISSN 1543-0790..

PICHLER, M. et al. Evaluation of high-resolution melting analysis as a diagnostic tool to detect the BRAF V600E mutation in colorectal tumors. **J Mol Diagn**, v. 11, n. 2, p. 140-7, Mar 2009. ISSN 1525-1578.

PINHO, M. Câncer colorretal com instabilidade de microssatélites: Uma doença diferente. Rev bras Coloproct. 22(2): 139-144 p. 2002.

PIÑOL, V. et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **JAMA**, v. 293, n. 16, p. 1986-94, Apr 2005. ISSN 1538-3598.

PONZ DE LEON, M.; DI GREGORIO, C. Pathology of colorectal cancer. **Dig Liver Dis**, v. 33, n. 4, p. 372-88, May 2001. ISSN 1590-8658.

POPAT, S.; HUBNER, R.; HOULSTON, R. S. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 3, p. 609-18, Jan 2005. ISSN 0732-183X.

POPOVICI, V. et al. Context-dependent interpretation of the prognostic value of BRAF and KRAS mutations in colorectal cancer. **BMC Cancer**, v. 13, p. 439, 2013. ISSN 1471-2407.

PRETO, A. et al. BRAF provides proliferation and survival signals in MSI colorectal carcinoma cells displaying BRAF(V600E) but not KRAS mutations. **J Pathol**, v. 214, n. 3, p. 320-7, Feb 2008. ISSN 0022-3417.

PUERTA-GARCÍA, E.; CAÑADAS-GARRE, M.; CALLEJA-HERNÁNDEZ, M. Molecular biomarkers in colorectal carcinoma. **Pharmacogenomics**, p. 1-33, Aug 2015. ISSN 1744-8042.

RAJAGOPALAN, H. et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 934, Aug 2002. ISSN 0028-0836.

RASUCK, C. G. et al. Association between methylation in mismatch repair genes, V600E BRAF mutation and microsatellite instability in colorectal cancer patients. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 3, p. 2553-60, Mar 2012. ISSN 1573-4978.

RIBIC, C. M. et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. **N Engl J Med**, v. 349, n. 3, p. 247-57, Jul 2003. ISSN 1533-4406.

RICHMAN, S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). **Int J Oncol**, v. 47, n. 4, p. 1189-202, Oct 2015. ISSN 1791-2423.

ROBERTS, P. J.; DER, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3291-310, May 2007. ISSN 0950-9232.

ROSSI, B. et al. **Câncer de cólon, reto e ânus**. Lemar e Tecmedd. São Paulo 2004.

ROTH, A. D. et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 3, p. 466-74, Jan 2010. ISSN 1527-7755.

SAMOWITZ, W. S. et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. **Gastroenterology**, v. 129, n. 3, p. 837-45, Sep 2005. ISSN 0016-5085

SAMOWITZ, W. S. et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, n. 9, p. 917-23, Sep 2001. ISSN 1055-9965.

SAMOWITZ, W. S. et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. **Cancer Res**, v. 65, n. 14, p. 6063-9, Jul 2005. ISSN 0008-5472.

SANTINI, D. et al. High concordance of BRAF status between primary colorectal tumours and related metastatic sites: implications for clinical practice. **Ann Oncol**, v. 21, n. 7, p. 1565, Jul 2010. ISSN 1569-8041.

SEPPÄLÄ, T. T. et al. Combination of microsatellite instability and BRAF mutation status for subtyping colorectal cancer. **Br J Cancer**, v. 112, n. 12, p. 1966-75, Jun 2015. ISSN 1532-1827.

SHEMIRANI, A. I. et al. Simplified MSI marker panel for diagnosis of colorectal cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, n. 8, p. 2101-4, 2011. ISSN 1513-7368.

SIMONS, C. C. et al. A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability: implications for prognosis. **Ann Oncol**, v. 24, n. 8, p. 2048-56, Aug 2013. ISSN 1569-8041.

SMYRK, T. C. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. **Cancer**, v. 91, n. 12, p. 2417-22, Jun 2001. ISSN 0008-543X.

SNELL, K. R. **Investigating the role of BRAF V600E in the serrated neoplastic pathway of colorectal cancer** 2012. (doctor). Department of Biochemistry, University of Leicester

SPENCE, A. P. **Basic Human Anatomy**. 2nd. 1991.

STEINKE, V. et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. **Dtsch Arztebl Int**, v. 110, n. 3, p. 32-8, Jan 2013. ISSN 1866-0452.

SUEDA, T. et al. BRAF(V600E) inhibition stimulates AMP-activated protein kinase-mediated autophagy in colorectal cancer cells. **Sci Rep**, v. 6, p. 18949, 2016. ISSN 2045-2322.

SURYA, R. et al. Red Meat and Colorectal Cancer: Nrf2-Dependent Antioxidant Response Contributes to the Resistance of Preneoplastic Colon Cells to Fecal Water of Hemoglobin- and Beef-Fed Rats. **Carcinogenesis**, Mar 2016. ISSN 1460-2180.

SYNGAL, S. et al. Phenotypic characteristics associated with the APC gene I1307K mutation in Ashkenazi Jewish patients with colorectal polyps. **JAMA**, v. 284, n. 7, p. 857-60, Aug 2000. ISSN 0098-7484.

TEJPAR, S. et al. Prognostic and predictive biomarkers in resected colon cancer: current status and future perspectives for integrating genomics into biomarker discovery. **Oncologist**, v. 15, n. 4, p. 390-404, 2010. ISSN 1549-490X.

THIBODEAU, S. N.; BREN, G.; SCHAID, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science**, v. 260, n. 5109, p. 816-9, May 1993. ISSN 0036-8075.

THIBODEAU, S. N. et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. **Cancer Res**, v. 58, n. 8, p. 1713-8, Apr 1998. ISSN 0008-5472.

TORRES, U. O. S.; ALMEIDA, T. E.; NETINHO, J. G. Increasing hospital admission rates and economic burden for colorectal cancer in Brazil, 1996-2008. **Rev Panam Salud Publica**, v. 28, n. 4, p. 244-8, Oct 2010. ISSN 1680-5348.

TOYOTA, M. et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 15, p. 8681-6, Jul 1999. ISSN 0027-8424.

TÁRRAGA LÓPEZ, P. J.; ALBERO, J. S.; RODRÍGUEZ-MONTES, J. A. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. **Clin Med Insights Gastroenterol**, v. 7, p. 33-46, 2014. ISSN 1179-5522.

UEDA, M. et al. Mutational analysis of the BRAF gene in human tumor cells. **Hum Cell**, v. 21, n. 2, p. 13-7, May 2008. ISSN 0914-7470.

UMAR, A. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst**, v. 96, n. 4, p. 261-8, Feb 2004. ISSN 1460-2105.

VALLE, L. Genetic predisposition to colorectal cancer: Where we stand and future perspectives. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 29, p. 9828-9849, Aug 2014. ISSN 2219-2840.

VASEN, H. F. et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). **Dis Colon Rectum**, v. 34, n. 5, p. 424-5, May 1991. ISSN 0012-3706.

VASEN, H. F. et al. MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. **J Clin Oncol**, v. 19, n. 20, p. 4074-80, Oct 2001. ISSN 0732-183X.

VASEN, H. F. et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. **Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1453-6, Jun 1999. ISSN 0016-5085.

VELHO, S. et al. BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? **BMC Cancer**, v. 8, p. 255, 2008. ISSN 1471-2407.

VOGELSTEIN, B. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med**, v. 319, n. 9, p. 525-32, Sep 1988. ISSN 0028-4793.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-58, Mar 2013. ISSN 1095-9203.

WANG, L. et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. **Cancer Res**, v. 63, n. 17, p. 5209-12, Sep 2003. ISSN 0008-5472.

WARD, R. et al. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. **Gut**, v. 48, n. 6, p. 821-9, Jun 2001. ISSN 0017-5749.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. 2008. 844.

WEISENBERGER, D. J. et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. **Nat Genet**, v. 38, n. 7, p. 787-93, Jul 2006. ISSN 1061-4036.

WELLBROCK, C.; KARASARIDES, M.; MARAIS, R. The RAF proteins take centre stage. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 11, p. 875-85, Nov 2004. ISSN 1471-0072.

WINAWER, S. J. et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. **Gastroenterology**, v. 112, n. 2, p. 594-642, Feb 1997. ISSN 0016-5085.

WU, C.; BEKAI-SAAB, T. CpG Island Methylation, Microsatellite Instability, and BRAF Mutations and Their Clinical Application in the Treatment of Colon Cancer. **Chemother Res Pract**, v. 2012, p. 359041, 2012. ISSN 2090-2115.

YACOUB, G.; NAGALLA, S.; AKLILU, M. Oncologic management of hereditary colorectal cancer. **Clin Colon Rectal Surg**, v. 25, n. 2, p. 118-22, Jun 2012. ISSN 1531-0043.

YAMAGISHI, H. et al. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. **Chin J Cancer**, v. 35, n. 1, p. 4, 2016. ISSN 1000-467X.

YAMANE, L. S. et al. KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy. **Oncol Rep**, v. 32, n. 4, p. 1419-26, Oct 2014. ISSN 1791-2431.

ZANDONAI, A. P.; SONOBE, H. M.; SAWADA, N. O. Os fatores de riscos alimentares para câncer colorretal relacionado ao consumo de carnes. **Rev Esc Enferm USP** 2012; 46(1):234-9

ZEINALIAN, M. et al. Tumor microsatellite instability and clinicopathologic features in Iranian colorectal cancer patients at risk for Lynch syndrome. **J Res Med Sci**, v. 20, n. 2, p. 154-60, Feb 2015. ISSN 1735-1995.

APÊNDICE

TABELA 11 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS E MOLECULARES DAS AMOSTRAS.

Amostra	Idade	Gênero	Tipo de Tumor	Local do Tumor	Metástase	Estádio	BRAF V600E	BAT25	BAT26	CAT25	MSI
121184	66	M	Tubular	Retossigmoide	Ausente	IIA	Ausente	120,9602	115,7927	147,8086	MSS
1215592	55	F	-	Retossigmoide	Ausente	-	Ausente	121,0582	116,7148	149,0385	MSS
12799	-	F	Tubular	Cólon Esquerdo	Presente	IIIB	Ausente	120,9343	115,8496	-	MSS
1216336	47	F	Tubular	Cólon Ascendente	Presente	IIIB	Ausente	114,7564/121,9655	105,9195/115,707 9	-	MSI-H
1110882	86	F	Tubular	Retossigmoide	Ausente	IIA	Ausente	120,8155	116,7097	-	-
1214834	65	F	Tubular	Reto	Presente	IIB	Ausente	-	-	-	-
121192	73	F	Tubular	Cólon Ascendente	Presente	IIIB	Ausente	120,9485	115,7214	149,0466	MSS
12686	87	F	Tubular	Retossigmoide	Ausente	-	Ausente	120,9817	116,7904	-	-
1133148	51	F	Tubular	Reto	Presente	IIIB	Ausente	120,9219	115,7578	-	-
125836	59	M	Tubular	Cólon Sigmóide	-	IIIA	Ausente	-	-	-	-
1214823	47	M	Tubular	Cólon direito	Presente	IIIB	Ausente	121,8946	116,6314	148,9600	MSS
1214592		M	Tubular	Retossigmoide	Ausente	-	Ausente	121,9543	116,6615	148,9504	MSS
1214800	57	M	Tubular	Cólon	Ausente	IIA	Ausente	-	116,6569	148,9518	-
1215191	36	M	Tubular	Retossigmoide	Presente	-	Ausente	-	115,6464	146,5571	-
1112672	66	M	Tubular	Cólon Sigmóide	Presente	-	Ausente	-	115,6840	-	-
12623124	76	F	Tubular	Cólon Esquerdo	-	-	Ausente	-	116,5215	147,8054	-
1261352	50	F	Tubular	Retossigmoide	Ausente	IIA	Ausente	121,8965	116,6861	-	-
1265732		M	Tubular	Ceco	Presente	-	Ausente	122,9172	114,7495	148,9566	MSS
1252241	68	M	Tubular	Cólon direito	Presente	IIIC	Ausente	121,9493	116,5350	-	-

CONTINUAÇÃO TABELA 11 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS E MOLECULARES DAS AMOSTRAS

1280675IF	76	M	Tubular	Reto Alto	Presente	IV	Ausente	-	116,6902	145,6956	-
1248851		F	Tubular	Retossigmóide	Presente	IIIB	Ausente	-	116,5543	147,7864	-
12804451	55	F	Tubular	Cólon Esquerdo	Presente	IIIB	Ausente	-	116,6174	149,0457	-
1241512	55	F	Tubular	Cólon Sigmóide	Presente	IIIA	Ausente	-	116,6260	147,8058	-
1249961	58	M	Tubular	Angulo esplênico	Ausente	0	Ausente	-	115,6733	-	-
1234062	75	F	Tubular	Ceco	Ausente	-	Ausente	123,0234	116,5737	-	-
1232192	54	M	Tubular	Retossigmóide	Presente	IIIB	Ausente	121,8782	116,5680	-	-
11157892	56	M	Tubular	Ceco	Ausente	I	Ausente	115,6571/123,9311	-	139,6002/145,4036	MSI-H
11336802	70	F	Tubular	Reto	Presente	IIIB	Ausente	-	116,6267	-	-
11142932	51	M	Tubular	Ceco	Presente	IIIB	Ausente	-	115,7454	-	-
11160342	74	F	Tubular	Reto	Ausente	I	Ausente	122,9127	117,4981	148,9502	MSS
11144202	57	F	-	-	Ausente	0	Ausente	121,9728	116,6174	-	-
11142012	59	M	Tubular	Cólon Transverso	Presente	IIIC	Ausente	114,61/121,9312	105,037/116,5846	-	MSI-H
11156452	55	F	Tubular	Cólon Sigmóide	Ausente	IIA	Ausente	121,9074	116,5373	137,1803/147,8209	MSI-L
1191782	69	F	Tubular	Cólon direito	Presente	-	Ausente	121,8909	116,5041	137,3502/148,9611	MSI-L
11102142	62	M	Tubular	Ceco	-	-	Ausente		110,4142/116,6204	148,9578	-
1184753	80	F	Tubular	Reto Baixo	Ausente	IIA	Ausente	114.654/121,9074	115,6105	139,3909/147,8017	MSI-H
11131032	71	F	Tubular	Cólon Esquerdo	Presente	IV	Ausente	-	116,6096	-	-
11130992	61	M	Tubular	Angulo esplênico	Ausente	IIA	Ausente	120,8155	115,7699	-	-
11153533	89	F	Tubular	Ceco	-	-	Ausente	122,0510	-	-	-
11181622	84	F	Tubular	Ceco	Presente	IIB	Ausente	116,8393/122,0335	117,5175	-	-
1119444	44	F	-	Ceco	Presente	IV	Ausente	-	-	-	-

CONTINUAÇÃO TABELA 121 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS E MOLECULARES DAS AMOSTRAS.

123091A	75	F	Mucinoso	Reto	Ausente	IIA	Ausente	116,6412	122,9243	147,7233	MSS
11204131	80	F	Tubular	Cólon Esquerdo	Presente	IIIB	Ausente	-	-	-	-
11191322	59	M	Mucinoso	Reto	Presente	IIIC	Ausente	116,7011	-	-	-
11190632	59	M	Tubular	Cólon Ascendente	Ausente	-	Ausente	116,6461	-	-	-
1292295	65	F	-	Ceco	-	-	Ausente	120,9485	123,0008	-	-
129187R1	70	M	Tubular	-	Ausente	0	Ausente	115,9299	121,9104	-	-
1293265		M	-	-	Ausente	IIA	Ausente	122,9452	106,8832/116,6078	-	-
11174082	64	M	Tubular	Reto	Ausente	I	Ausente	120,8743	115,7647	148,9509	-
12140162	66	F	Tubular	Cólon Ascendente	Presente	-	Ausente	115,7664/124,019	108,6637/116,6953	137,1603/149,0455	MSI-H
1268412	78	M	Mucinoso	Ceco	Presente	IIIC	Ausente	124,0044	-	-	-
1270451C	80	F	Tubular	Reto	Ausente	IIB	Ausente	122,9068	117,5351	147,8017	MSS
12144432	77	M	Tubular	-	Ausente	0	Ausente	122,9894	115,7329	147,7233	MSS
1272302	70	M	Tubular	Ceco	Presente	IIIB	Ausente	122,9709	116,6495	148,9576	MSS
11164842	78	M	Mucinoso	Ceco	Presente	-	Ausente	120,8372	116,6828	-	-
11164582	39	F	Tubular	Cólon Sigmóide	Ausente	-	Ausente	-	116,6989	-	-
11170312	61	F	Tubular	Retossigmóide	Presente	IIIB	Ausente	123,0453	116,6712	149,0556	MSS
1270912	48	F	Tubular	Cólon Descendente	Ausente	IIA	Ausente	121,9866	116,6936	-	-
129870	68	F	Tubular	-	Ausente	0	Ausente	-	115,6733	-	-
123140	84	M	Tubular	Colon Transverso	Ausente	I	Ausente	-	-	-	-
127623	39	F	Tubular	Retossigmóide	Presente	-	Ausente	-	-	-	-
1212768	-	M	Tubular	Cólon Ascendente	Ausente	I	Ausente	-	116,7096	148,9572	-
123212	58	M	Tubular	Retossigmóide	Ausente	-	Ausente	-	115,7685	-	-

CONTINUAÇÃO TABELA 131 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS E MOLECULARES DAS AMOSTRAS.

1210267	67	M	Tubular	Cólon Sigmóide	Ausente	-	Ausente	-	117,6054	-	-
1211807	64	F	Tubular	Retossigmóide	Ausente	-	Ausente	-	116,6142	-	-
1212228	80	M	Tubular	Retossigmóide	Ausente	IIA	Ausente	-	116,6794	-	-
1212636	72	M	Mucinoso	Retossigmóide	Ausente	I	Ausente	123,0523	116,6670	149,0457	MSS
1213339	75	F	Tubular	Colon Ascendente	Ausente	-	Ausente	-	116,7359	147,8183	-
1211650	49	F	Tubular	Cólon Sigmóide	Presente	-	Ausente	122,1011	115,7792	-	-
1226171	59	F	Tubular	Reto	Ausente	IIB	Ausente	-	-	148,9591	-
123090	77	F	Tubular	Cólon Ascendente	Presente	IV	Ausente		108,5156/115,784	136,1622/146,6831	MSI-H
121201	-	F	Tubular	Reto	Presente	IV	Ausente	120,8743	108.4368/116,6444	139,387/148,958	MSI-H
121379	83	M	Tubular	Cólon Sigmóide	Ausente	IIA	Ausente	120,7786	115,8430	145,4001	MSS
1120503	68	F	Tubular	Cólon Sigmóide	Ausente	I	Ausente	120,7614	115,8283	148,9578	MSS
127626	68	F	Tubular	Reto	-	-	Ausente	120,8267	115,8534	145,7287	MSS
122599	53	F	Tubular	Reto	Presente	-	Ausente	120,8513	-	-	-
121856	72	M	-	-	-	-	Ausente	120,8581	115,8057	145,3460	MSS
123104	39	F	Tubular	Ceco	Presente	IIIC	Ausente	121,9076	116,6637	-	-
121713	-	M	Tubular	Cólon Direito	Ausente	IIA	Ausente	120,8528	116,7214	149,0538	MSS
1121129	72	F	Mucinoso	Retossigmóide	Presente	-	Ausente	-	115,7647	149,0365	-
1111305	82	M	Tubular	Cólon Direito	Ausente	-	Ausente	120,8965	115,8762	149,0457	MSS
1133349	77	M	Tubular	Cólon Transverso	Ausente	I	Ausente	120,8372	115,8530	149,0535	MSS
128868	71	F	Tubular	Cólon Ascendente	Ausente	-	Ausente	120,9709	115,8504	149,0435	MSS
1111685	53	M	Tubular	Cólon Sigmóide	Ausente	I	Ausente	120,9485	116,7944	149,0604	MSS

FONTE: A autora (2016).

ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA PATHOLOGY AND
ONCOLOGY RESEARCH.

BRAF V600E MUTATION AND MICROSATELLITE INSTABILITY
EVALUATION IN SPORADIC COLORECTAL CANCER IN A SOUTHERN
BRAZILIAN SAMPLE

Érika P. Zambalde¹, Juliano J. Lourenço², Igenir J. Cavalli¹, Miguel A. M. Moreira³, Teresa
C.S.Cavalcanti⁴, Enilze M. S. F. Ribeiro^{1*}

1 - Cytogenetics and Oncogenetics Laboratory - Department of Genetics, Federal University of
Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

2 - Foundation Regional University of Blumenau, FURB , Blumenau, Santa Catarina, Brazil

3 - Genetics Division, National Institute of Cancer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil.

4. CITOLAB Laboratory, Curitiba, Paraná, Brazil.

* Corresponding author:

Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Departamento de Genética

Universidade Federal do Paraná

81531-990 Curitiba, Brazil

(+55 41) 3361 1555

email: eribeiro@ufpr.br

Acknowledgments

We acknowledgment the National Cancer Institute (INCA) for the support and the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) for financial support.

Compliance with Ethical Standarts

Conflict of Interest

The authors have declared no conflicts of interest

Abstract

Colorectal Cancer (CRC) is one of the most frequent cancer worldwide. It comprises sub-groups characterized by genetic and pathological alterations and can be divided into sporadic and hereditary. The most common form of hereditary CRC, is the Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC). The main feature of this syndrome is the microsatellite instability (MSI), but MSI also have been reported in 10-15% of sporadic CRC. The *BRAF* V600E mutation has been proposed to identify sporadic CRC with MSI, and distinguish it from HNPCC. The aim of this study was to determine the frequency of V600E mutation in sporadic CRCs in a sample of the Southern Brazil, its association with MSI and evaluate if there is association between clinical and anatomic pathological data. Eighty-four samples were sequenced to search for the V600E mutation, which was not detected in any sample. For the microsatellite analysis, three markers were genotyped: BAT25, BAT26 and CAT25. MSI was observed in 12 samples (14.28%). We observed correlation of MSI-H with clinical and pathological anatomical data, where one (10%) patient was ≤ 50 years old; three (8.33%) were between 51-69 years old; and two (6.45%) were ≥ 70 years old. Of the seven patients with MSI-H, five (10.87%) of them were female and 17.85% of the tumors were located in right/proximal colon. The proportion of MSI in this study was as expected and demonstrated association with the tumor location, reaffirming its importance in the initial approach to patients with CRC for assisting in a prognostic and predictive way.

Keywords

Colorectal Cancer - *BRAF* V600E - Microsatellite Instability - Gene Frequency

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed cancer in males and the second in females in the world (Ferlay J, 2012). In Brazil, it is the third most frequent type of cancer with an estimated 30,000 new cases of CRCs in 2016. It is the second most frequent type of cancer in the Southern (22.67/ 100,000) and third in the South (20.43/100,000) for males, and it is the second most frequent in the Southern (24.56/100,000) and South (21.85/100,000) for females (Inca, 2011). In addition, CRC is the second leading cause of mortality worldwide and the fifth in Brazil (Jemal *et al.*, 2011; Ferlay J, 2012). Therefore, it is highly important to improve strategies for CRC prevention and early detection with the aim of reducing its incidence and mortality (Goss *et al.*, 2013).

Colorectal cancer (CRC) is both clinically and biologically a heterogeneous disease with molecular phenotypes which reflect distinct forms of genetic instability (Kawakami, Zaanani e Sinicrope, 2015; De Cuba *et al.*, 2016). The classic adenoma-to-carcinoma pathway that involves chromosomal instability (CIN) is the most common phenotype, accounting for 85% of all sporadic CRCs (Vogelstein *et al.*, 1988;

Kawakami, Zaanani e Sinicrope, 2015). An alternative pathway is a microsatellite instability (MSI) phenotype that represents 80-90% of HNPCC and around 15% of all sporadic CRCs. It is caused by deficient DNA mismatch repair (MMR) because of germline mutations in MMR genes (hereditary cases) or by epigenetic silencing of the *MLH1* gene (sporadic cases) (Thibodeau, Bren e Schaid, 1993; Thibodeau *et al.*, 1998; Kawakami, Zaanani e Sinicrope, 2015). *BRAF* (v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B1) seems to act by a third pathway: the serrated/methylator pathway (Toyota *et al.*, 1999; Issa, 2004; Weisenberger *et al.*, 2006). These tumors are characterized by the methylation of CpG islands that cause the silencing of critical tumor suppressor genes which are named CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) tumors (Clarke e Kopetz, 2015).

BRAF oncogene encodes a serine/threonine kinase which acts downstream of KRAS in the MAPK pathway. *BRAF* mediates its effect by activating mitogen-activated protein kinase (MAPK or MEK), promoting cell proliferation. Ninety percent (90%) of all observed *BRAF* mutations in CRC are mutations in the V600E position (Rajagopalan *et al.*, 2002; Jarry *et al.*, 2004; Benlloch *et al.*, 2006). It results in a transversion of thymidine to adenine at nucleotide 1799 in the kinase domain, causing a valine to glutamate substitution. The consequence is the constitutive activation of MEK and the lack of inhibition of EGFR-independent cellular proliferation (Davies *et al.*, 2002; Roberts e Der, 2007). The *BRAF* V600E mutation can be used to complement the molecular pattern which will allow better monitoring of patients with CRC, and it can be considered as a bad prognostic marker (Chen *et al.*, 2014). Moreover, its presence has been considered for the decision of a target treatment since patients with this mutation have a poor response to the treatment with Panitumumab® or Cetuximab® (Di Nicolantonio *et al.*, 2008; Santini *et al.*, 2010).

MSI is observed in about 10% to 15% of sporadic colorectal carcinomas and in about 90% of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) patients that harbor germline mutations in DNA mismatch repair genes. In addition, MSI status can be a prognostic and predictive marker for sporadic CRC (Gonzalez-Pons e Cruz-Correa, 2015).

Colorectal cancers display a high level of MSI (MSI-H) that holds particular pathologic and clinical features. MSI-H colorectal cancers are often localized in the proximal colon, present a dense tumor lymphocyte infiltration, and often show poor differentiation and an increased mucin formation (Smyrk *et al.*, 2001; Fleming *et al.*, 2012). Furthermore, MSI-H colorectal cancers have a better prognosis (Gryfe *et al.*, 2000; Samowitz *et al.*, 2001). Most importantly, some studies indicate that the benefit of adjuvant 5-fluorouracil chemotherapy may be restricted to non-MSI-H colorectal cancer patients (Ribic *et al.*, 2003; Carethers *et al.*, 2004). MSI status is therefore likely to become a routine diagnostic procedure in the pathology laboratory (Findeisen *et al.*, 2005).

Considering the wide divergence in the frequency of *BRAF* mutations in sporadic CRC, the MSI status as a potential marker and the scarcity of information in the Brazilian population, the aim of this study was to

determine the frequency of *BRAF* mutation and MSI phenotype in a South Brazilian population. Also, try to associate molecular alterations with clinical and histopathological characteristics.

Material & Methods

Clinical Samples

A hundred samples were donated by CITOLAB Laboratory of Curitiba, Paraná. The samples consisted of formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue from patients previously diagnosed with sporadic colorectal cancer. The clinical information was obtained from the laboratory reports, and included age, sex, location of tumor, TNM stage, type of lesion and presence of metastasis. The proximal colon was defined as ascending and transverse colon and the cecum. The distal colon was defined as descending and sigmoid colon and rectum.

We described 84 patients according to their clinical and molecular characteristics. Forty-six (54.76%) patients were female and 38 (45.24%) were male. The age was informed in 76 patients, ranging from 36 to 89 years old, with mean and median of 65 and 62.5 years, respectively. Ten patients (13.16%) patients were ≤ 50 years old, 35 (46.05%) were between 51-69 years old and 31 (40.79%) were ≥ 70 years old. Among the 74 cases with information, the tumor had a proximal location in 28 (37.84%) and a distal location in 46 (62.16%). Besides location, the type of tumor was also classified being six (7.59%) of them mucinous and 73 (92.41%) tubular. Metastasis was present in 35 (45.45%) of the 77 patients. The tumor staging was determined based on the pTNM system in 56 (66.67%) of the cases where 30 (53.57%) was in stages 0-II and 26 (46.42%) in stages III-IV.

DNA isolation and Quantification

The DNA was extracted from paraffin-embedded formalin-fixed tumor tissue following the phenol-chloroform protocol modified by (Isola *et al.*, 1994).

Shortly, it was added a volume of phenol, chloroform and isoamyl alcohol (at ratio 25: 24: 1), homogenized and centrifuged for 5 min at 20817.16 g, and the supernatant was transferred to another eppendorf (1.5 mL). It was added 2 volumes of 100% ethanol and 0.27 volumes of 7.5M ammonium acetate. The sample was left for about 18 hours at 20°C. Next day, the eppendorf was centrifuged for 20 min at 21913 g, and the supernatant was discarded. The cell pellet was washed with 70% ethanol and centrifuged for 5 min at 20817.16 g. Finally, the cell pellet was rinsed with 70% ethanol and, then, re-suspended in 50mL of TE. DNA quantity and quality was evaluated by Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). DNA samples were diluted to a final concentration of 10 ng/ μ L and stored at -20°C for further molecular analysis.

V600E *BRAF* Mutation Analysis

For *BRAF* sequencing the PCR (polymerase chain reaction) reaction was realized in a final volume of 25 μ l, containing 1,5X of *Taq Platinum Buffer*[®] (Invitrogen); 1,5 mM of MgCl₂; 0,25 mM of dNTPs; 1 μ M of each primer (Forward: 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' and Reverse: 5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3'); 1 U of *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen). The PCR conditions were: initial holding stage at 94°C for 3 minutes, following by 38 cycles of 94°C for 30 seconds, 59°C for one minute and 72°C for one minute, and another holding stage at 72°C for 10 minutes.

Products of PCR were sequenced using the kit *Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems[®]) according to the manufacturer's recommendations. The conditions of the sequencing reaction were: initial holding at 96°C for one minute, following by 35 cycles at 96°C for 15 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 4 minutes and a final holding at 72°C for 5 minutes. The softwares Bioedit[®] and MEGA 6.06[®] were used for bioinformatic analysis.

MSI Analysis

Three reference microsatellite markers, BAT25, BAT26, and CAT25, were used according to Findeisen *et al.* (Findeisen *et al.*, 2005) in order to determine the MSI.

For each marker a PCR was performed using the following reagents for a final volume of 20 μ l: 1X of *Taq Platinum Buffer*[®] (Invitrogen), 1,25 mM of MgCl₂, 0,02 mM of dNTPs, 1,2 μ M of each primer fluorescently labeled (sense and antisense): BAT25 (F: 5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3' and R: 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'), BAT26 (F: 5'-TGACTACTTT TGACTTCAGCC-3' and R: 5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC-3'), CAT25 (F: 5'-CCTAGAAACCTTTATCCCTGCTT-3' and R: 5'-GAGCTTGCAGTGAGCT GAGA-3'), 1,25 U of *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen).

The PCR condition were different for each marker, and it is described below:

BAT25: Initial holding at 95°C for 10 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for one minute, 57°C for 10 minutes and 72°C for 45 seconds with a final holding of 72°C for 10 minutes.

BAT26: first holding at 95°C for 10 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for one minute, 56°C for 10 minutes and 72°C for 45 seconds with a final holding of 72°C for 10 minutes.

CAT25: first holding at 94°C for 5 minutes, followed by 38 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds with a final holding of 72°C for 7 minutes.

Genotyping was performed by ABI3130xl automated sequencer (Applied Biosystems[®]), and the samples were analyzed using the software "Peak Scanner" (Applied Biosystems[®]). Two or more markers showing instability were considered as high microsatellite instability (MSI-H). When just one marker showed instability, the tumor was considered as low microsatellite instability (MSI-L).

Statistical Analysis

The analysis was performed using Chi-squared and Fisher tests. Individual association was based on the following variables: microsatellites status, tumor localization, type of tumor, presence or absence of metastasis, tumor stage, age and gender. The values of $p \leq 0,05$ were considered significant.

Results

BRAF Mutation

Samples were analyzed searching for the presence of a point mutation T to A that frequently occurs in the *BRAF* oncogene leading to a change of valine to glutamic acid at position 600 of the BRAF protein. The *BRAF* gene had no detectable mutation in all 84 studied samples studied using the sequencing assay (Fig. 1).

Fig. 1

Electropherogram of amplified DNA sequence. The highlighted base T indicates that this sample does not have the V600E mutation.

MSI Analysis

The microsatellite instability (MSI) was observed in 12 (14.28%) of 84 patients, seven of these (58.33%) were classified as MSI-H and five (41.67%) as MSI-L. The clinical and histopathological characteristics are in Table 1.

Table 1

Clinicopathological characteristics and markers of patients with MSI

Sample	Age	Gender	Tum.Loc.	Type of Tum.	Met	Stage	BAT 25	BAT 26	CAT 25	Classification
1216336	47	F	PC	Tub.	P	IIIB	MSI	MSI	-	MSI-H
11157892	56	M	PC	Tub.	A	I	MSI	-	MSI	MSI-H
11142012	59	M	PC	Tub.	P	IIIC	MSI	MSI	-	MSI-H
11156452	55	F	DC	Tub.	A	IIA	MSS	MSS	MSI	MSI-L
1191782	69	F	PC	Tub.	P	-	MSS	MSS	MSI	MSI-L
11102142	62	M	PC	Tub.	-	-	-	MSI	MSS	MSI-L
1184753	80	F	DC	Tub.	A	IIA	MSI	MSS	MSI	MSI-H
11181622	84	F	PC	Tub.	P	IIIB	MSI	MSS	-	MSI-L
1293265	-	M	-	-	A	IIA	MSS	MSI	-	MSI-L
12140162	66	F	PC	Tub.	P	-	MSI	MSI	MSI	MSI-H
123090	77	F	PC	Tub.	P	IV	-	MSI	MSI	MSI-H
121201	-	F	DC	Tub.	P	IV	MSS	MSI	MSI	MSI-H

Legend: M – male; F- female; Tum. Loc. – tumor location; PC –proximal colon; DC- distal colon; Tub – tubular; Met. – metastasis; P – present; A – absent; MSI –microsatellite instability; MSS – microsatellite stability; MSI-H – high microsatellite instability;; MSI-L – low microsatellite instability;

The presence and absence of MSI was not equally distributed in proximal and distal tumors ($X^2_1=6.47$, $p<0.05$). The main difference was due to the excess of MSI observed in patients with proximal tumors, the X^2 partial of this class represent 52% (3.39/6.47) of the X^2 total. The Fisher's test showed no statistically significant difference in the location when we compared MSI-H and MSI-L ($p=1.0$). The presence or absence of metastases was equally distributed in patients with and without MSI ($X^2_1=1.71$, $p>0.10$). The Fisher's test showed no statistically significant difference in the presence or absence of metastases when we compared MSI-H and MSI-L ($p=0.57$). In addition, there was no statistically significant difference in the distribution of tumors stage I/II and III/IV in patients with and without MSI ($X^2_1=0.20$; $p>0.30$). The Fisher's test showed no statistically significant difference among tumors in the same stage when comparing MSI-H and MSI-L. Considering the type of tumor (tubular or mucinous), patients with and without MSI were equally distributed ($X^2_1=1.05$; $p>0.75$). The presence or absence of MSI is also equally distributed in male and female patients ($X^2_1=0.79$; $p>0.30$), and among patients MSI-H and MSI-L when we used Fisher's test ($p=0.58$). Considering the age of the patients (≤ 50 years old, 51-69 years old and ≥ 70 years old) with and without microsatellite instability the groups were also equally distributed ($X^2_2=0.90$; $p>0.50$).

Genotyping for microsatellite instability analysis showed five (50%) samples positive for BAT25, seven (58.33%) for BAT26 and seven (58.33%) for CAT25. The BAT25 alleles ranging from 120 to 124 bp in length referred to “wild-type allele”, a range from 114 to 116 was detected in the samples that showed MSI and referred to “mutated allele”. For the BAT26, the length of “wild-type allele” ranged from 114 to 117 bp and when the samples showed MSI for this marker the length ranged from 105 to 110pb. When we analyze the CAT25 marker the length of the “wild-type allele” ranged from 145 to 149pb, and the

length of the “mutated allele” ranged from 136 to 139pb, which indicates the length of this samples is MSI (Fig. 2).

Fig. 2

Genotyped samples markers for BAT25 (a and b), BAT26 (c and d) and CAT25 (e and f). a, c, e - Presence of one allele with expected size of the markers BAT25, BAT26 and CAT25 respectively, in a normal sample; ,b d, f - Two alleles with expected size of the markers BAT25, BAT26 and CAT25 respectively, representing MSI.

Discussion

The detection of *BRAF* V600E mutation has been proposed as a diagnostic marker to distinguish sporadic cancer with microsatellite instability from Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC) (Pichler *et al.*, 2009).

It is considered that none of HNPCC and about 10 to 15% of sporadic CRC patients have the *BRAF* V600E mutation (Davies *et al.*, 2002; Lièvre, Blons e Laurent-Puig, 2010; Tejpar *et al.*, 2010; Barras, 2015; Fang *et al.*, 2016; Sueda *et al.*, 2016) but the frequency is variable among different population. A study in the Taiwan population, the frequency of V600E mutation was 5.4% in 425 cases analyzed (Hang *et al.*, 2015). Another study, found a lower frequency in the Japanese population, 4.5% in 940 samples (Asaka *et al.*, 2009). Some studies in Brazilian population also showed a lower frequency of this mutation. In a study where 77 samples from Belo Horizonte – Minas Gerais, Southeast region were analyzed a frequency of 6.5% was found (Rasuck *et al.*, 2012). In 2014, another study found the same frequency (6.5%) of *BRAF* V600E in a total of 47 samples from the Hospital do Câncer de Barretos – São Paulo (Yamane *et al.*, 2014). We analyzed 84 samples of the population of Curitiba, Paraná, South of Brazil, and none of the samples showed the mutation. Our results are similar to the data of Naghibalhossaini *et al.* (Naghibalhossaini *et al.*, 2011) who did not find mutation after the analysis of 110 cases of sporadic CRC in the Ira population. A variable frequency was demonstrated among population by Brim *et al.* (Brim *et al.*, 2008), which described the mutation in 10% (8/82) of tumors in African-Americans, 2% (1/53) in Iranian, and 19% (11/59) in Omanianos. This frequency variation among population may justify our result. In spite Brazil is a country composed by several ethnic groups, the Southern population consists mainly by European immigrants, but in this particular study we did not access the ancestrality. Thus, further studies need to be conducted in Brazil in order to validate the use of this mutation as a marker to distinguish the sporadic tumors.

The frequency of *BRAF* V600E mutation in sporadic CRC with MSI is much higher, around 43 to 76% (Domingo *et al.*, 2004; Koinuma *et al.*, 2004; Nagasaka *et al.*, 2004; Samowitz, Albertsen, *et al.*, 2005; Halvarsson *et al.*, 2008; De Vogel *et al.*, 2009; Parsons *et al.*, 2012) and in five to 10% of the MSS

(Rajagopalan *et al.*, 2002; Nagasaka *et al.*, 2008; Ogino *et al.*, 2009). Unfortunately, we could not contribute to this data since we did not find the mutation in our sample.

MSI status can itself be a prognostic and predictive marker for sporadic CRCs, which is associated to increased level of survival and a good prognostic (Gonzalez-Pons e Cruz-Correa, 2015).

Although, BRAF V600E is considered a bad prognostic marker and MSI a good one, the association between these two features is not clear (Wu e Bekaii-Saab, 2012; Popovici *et al.*, 2013). Some studies demonstrated that tumors BRAF V600E/MSI have a better prognostic than tumors BRAF V600E/MSS (Lochhead *et al.*, 2013; Seppälä *et al.*, 2015).

In a review study, 10 to 15% of sporadic CRCs displayed MSI (Richman, 2015). We observed that 14.28% (12/84) patients showed the MSI pattern, 58.33% (7/12) of those were classified as MSI-H, and the remaining 41.67% (5/12) as MSI-L.

Both, sporadic and HNPCC, MSI-H tumors, have a proximal location (Leite *et al.*, 2010; Gonzalez-Pons e Cruz-Correa, 2015; Hurtado *et al.*, 2015; Puerta-García, Cañadas-Garre e Calleja-Hernández, 2015). Our data showed that 62.5% ($X^2_1=6.47$, $p<0.05$) of MSI-H tumors had a proximal location. Furthermore, Leite *et al.* (Leite *et al.*, 2010), suggested that the proximal tumors affect mainly patients with 60 years old or older. The major incidence of CRC in the proximal colon of patients older than 60 years old in comparison with younger patients were reported previously (Rossi *et al.*, 2004). In our study we observed that the median age of patients with tumors MSI at a proximal location was 65 years old, and when we separated these tumors into groups MSI-H and MSI-L, we found a mean and median of 71.67 and 61 years old, respectively.

Among other characteristics of MSI-H tumors, it is possible to observe the histology which is divided into signet ring cell and mucinous (Gonzalez-Pons e Cruz-Correa, 2015), the poorly differentiated cells, a good prognostic, lower risk of metastasis and better stage (Gryfe *et al.*, 2000; Popat, Hubner e Houlston, 2005; Chang *et al.*, 2006; Malesci *et al.*, 2007; Corso *et al.*, 2013). Moreover, the MSI-H tumors are associated with the mutation V600E (Jass *et al.*, 2002; Iacopetta, Elsaleh e Zeps, 2003; Pichler *et al.*, 2009; Roth *et al.*, 2010). In our study, 71.4% of MSI-H tumors had metastasis; none of them was mucinous, and we did not find any association with the tumor.

There is a controversy if the MSI-L tumors is a CRC subtype (Gonzalez-Pons e Cruz-Correa, 2015). A study analyzed 3019 cases of sporadic MSI CRC where 2.621 (86,8%) were MSS, 200 (6,6%) were MSI-L, and 198 (6,6%) were MSI-H. MSI-L and MSS cases were correlated according their clinical and pathologic characteristics. In addition, MSI-L is associated to a poor prognosis of survival in sporadic CRCs (Lee *et al.*, 2015). In another study, we observed a median age of 51.7 for MSI-L and the most of tumors were located in the rectum (Zeinalian *et al.*, 2015). In our study, the only case of MSI-L was found in a 69 years old woman, who had a tubular type, a proximal location and metastasis.

MSI classification also can predict response to adjuvant chemotherapy. A review of serial clinical reports and a meta-analysis reported that patients with MSI tumors do not have benefits of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil (5-FU) (Ribic *et al.*, 2003; Benatti *et al.*, 2005; Jo e Carethers, 2006; Jover *et al.*, 2006; Guastadisegni *et al.*, 2010). Another studies suggested that MSI status is a predictive marker to the treatment with irinotecan (Fallik *et al.*, 2003; Bertagnolli *et al.*, 2009).

Finally, the MSI status should be considered among the CRC risk factors, thereby guiding the clinical decision. It is possible to regard the use of adjuvant chemotherapy, with the characteristics related to high risk of recurrence (Fang *et al.*, 2004; Popat, Hubner e Houlston, 2005).

In conclusion, MSI status should be analyzed in all cases of CRC, once it is a critical characteristic of the tumor and associated with a good prognostic. Further studies are required to validate the presence of *BRAF* V600E mutation in sporadic CRC in the Brazilian population.

References

1. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.: Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. 2012.
2. INCA: Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA).Coordenação Geral de AçõesEstratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância: Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. In. Rio de Janeiro; 2011.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011, 61(2):69-90.
4. Goss PE, Lee BL, Badovinac-Crnjevic T, Strasser-Weippl K, Chavarri-Guerra Y, St Louis J, Villarreal-Garza C, Unger-Saldaña K, Ferreyra M, Debiassi M *et al*: Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. *Lancet Oncol* 2013, 14(5):391-436.
5. de Cuba EM, Snaebjornsson P, Heideman DA, van Grieken NC, Bosch LJ, Fijneman RJ, Belt E, Bril H, Stockmann HB, Hooijberg E *et al*: Prognostic value of BRAF and KRAS mutation status in stage II and III microsatellite instable colon cancers. *Int J Cancer* 2016, 138(5):1139-1145.
6. Kawakami H, Zaanani A, Sinicrope FA: Implications of mismatch repair-deficient status on management of early stage colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 2015, 6(6):676-684.
7. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988, 319(9):525-532.
8. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993, 260(5109):816-819.
9. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Michels VV *et al*: Microsatellite

- instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998, 58(8):1713-1718.
10. Issa JP: CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004, 4(12):988-993.
 11. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP: CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(15):8681-8686.
 12. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D *et al*: CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006, 38(7):787-793.
 13. Clarke CN, Kopetz ES: BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. *J Gastrointest Oncol* 2015, 6(6):660-667.
 14. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE: Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002, 418(6901):934.
 15. Jarry A, Masson D, Cassagnau E, Parois S, Laboisie C, Denis MG: Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E. *Mol Cell Probes* 2004, 18(5):349-352.
 16. Benlloch S, Payá A, Alenda C, Bessa X, Andreu M, Jover R, Castells A, Llor X, Aranda FI, Massutí B: Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J Mol Diagn* 2006, 8(5):540-543.
 17. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W *et al*: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002, 417(6892):949-954.
 18. Roberts PJ, Der CJ: Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007, 26(22):3291-3310.
 19. Chen D, Huang JF, Liu K, Zhang LQ, Yang Z, Chuai ZR, Wang YX, Shi DC, Huang Q, Fu WL: BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014, 9(3):e90607.
 20. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S *et al*: Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26(35):5705-5712.
 21. Santini D, Spoto C, Loupakis F, Vincenzi B, Silvestris N, Cremolini C, Canestrari E, Graziano F, Galluccio N, Salvatore L *et al*: High concordance of BRAF status between primary colorectal tumours and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Ann Oncol* 2010, 21(7):1565.
 22. Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M: Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int* 2015, 2015:149014.
 23. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT: Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* 2001, 91(12):2417-2422.
 24. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL: Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012, 3(3):153-173.

25. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S: Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000, 342(2):69-77.
26. Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, Slattery ML: Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, 10(9):917-923.
27. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE *et al*: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003, 349(3):247-257.
28. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, Cabrera BL, Goel A, Arnold CA, Miyai K *et al*: Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004, 126(2):394-401.
29. Findeisen P, Kloor M, Merx S, Sutter C, Woerner SM, Dostmann N, Benner A, Dondog B, Pawlita M, Dippold W *et al*: T25 repeat in the 3' untranslated region of the CASP2 gene: a sensitive and specific marker for microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 2005, 65(18):8072-8078.
30. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F: Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 1994, 145(6):1301-1308.
31. Pichler M, Balic M, Stadelmeyer E, Ausch C, Wild M, Guelly C, Bauernhofer T, Samonigg H, Hoefler G, Dandachi N: Evaluation of high-resolution melting analysis as a diagnostic tool to detect the BRAF V600E mutation in colorectal tumors. *J Mol Diagn* 2009, 11(2):140-147.
32. Lièvre A, Blons H, Laurent-Puig P: Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene* 2010, 29(21):3033-3043.
33. Tejpar S, Bertagnolli M, Bosman F, Lenz HJ, Garraway L, Waldman F, Warren R, Bild A, Collins-Brennan D, Hahn H *et al*: Prognostic and predictive biomarkers in resected colon cancer: current status and future perspectives for integrating genomics into biomarker discovery. *Oncologist* 2010, 15(4):390-404.
34. Sueda T, Sakai D, Kawamoto K, Konno M, Nishida N, Koseki J, Colvin H, Takahashi H, Haraguchi N, Nishimura J *et al*: BRAF(V600E) inhibition stimulates AMP-activated protein kinase-mediated autophagy in colorectal cancer cells. *Sci Rep* 2016, 6:18949.
35. Fang M, Hutchinson L, Deng A, Green MR: Common BRAF(V600E)-directed pathway mediates widespread epigenetic silencing in colorectal cancer and melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, 113(5):1250-1255.
36. Barras D: BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Biomark Cancer* 2015, 7(Suppl 1):9-12.
37. Hang JF, Li AF, Chang SC, Liang WY: Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein in colorectal cancers in Taiwan is highly concordant with the molecular test. *Histopathology* 2015.
38. Asaka S, Arai Y, Nishimura Y, Yamaguchi K, Ishikubo T, Yatsuoka T, Tanaka Y, Akagi K: Microsatellite instability-low colorectal cancer acquires a KRAS mutation during the progression from Dukes' A to Dukes' B. *Carcinogenesis* 2009, 30(3):494-499.
39. Rasuck CG, Leite SM, Komatsuzaki F, Ferreira AC, Oliveira VC, Gomes KB: Association between methylation in mismatch repair genes, V600E BRAF

- mutation and microsatellite instability in colorectal cancer patients. *Mol Biol Rep* 2012, 39(3):2553-2560.
40. Yamane LS, Scapulatempo-Neto C, Alvarenga L, Oliveira CZ, Berardinelli GN, Almodova E, Cunha TR, Fava G, Colaiacovo W, Melani A *et al*: KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy. *Oncol Rep* 2014, 32(4):1419-1426.
 41. Naghibalhossaini F, Hosseini HM, Mokarram P, Zamani M: High frequency of genes' promoter methylation, but lack of BRAF V600E mutation among Iranian colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2011, 17(4):819-825.
 42. Brim H, Mokarram P, Naghibalhossaini F, Saberi-Firoozi M, Al-Mandhari M, Al-Mawaly K, Al-Mjeni R, Al-Sayegh A, Raeburn S, Lee E *et al*: Impact of BRAF, MLH1 on the incidence of microsatellite instability high colorectal cancer in populations based study. *Mol Cancer* 2008, 7:68.
 43. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB: Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* 2012, 49(3):151-157.
 44. de Vogel S, Weijenberg MP, Herman JG, Wouters KA, de Goeij AF, van den Brandt PA, de Bruïne AP, van Engeland M: MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events. *Ann Oncol* 2009, 20(7):1216-1222.
 45. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, Wolff RK, Slattery ML: Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2005, 129(3):837-845.
 46. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, Ohki R, Choi YL, Wada T, Konishi F *et al*: Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2004, 108(2):237-242.
 47. Halvarsson B, Anderson H, Domanska K, Lindmark G, Nilbert M: Clinicopathologic factors identify sporadic mismatch repair-defective colon cancers. *Am J Clin Pathol* 2008, 129(2):238-244.
 48. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ, Westra J, Frebourg T, Espín E, Armengol M *et al*: BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004, 41(9):664-668.
 49. Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K, Cullings HM, Takeda M, Kimura K, Kambara T, MacPhee DG, Young J, Leggett BA *et al*: Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J Clin Oncol* 2004, 22(22):4584-4594.
 50. Nagasaka T, Koi M, Kloor M, Gebert J, Vilkin A, Nishida N, Shin SK, Sasamoto H, Tanaka N, Matsubara N *et al*: Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2008, 134(7):1950-1960, 1960.e1951.
 51. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, Giovannucci EL, Fuchs CS: CpG island methylator phenotype, microsatellite

- instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009, 58(1):90-96.
52. Wu C, Bekaii-Saab T: CpG Island Methylation, Microsatellite Instability, and BRAF Mutations and Their Clinical Application in the Treatment of Colon Cancer. *Chemother Res Pract* 2012, 2012:359041.
 53. Popovici V, Budinska E, Bosman FT, Tejpar S, Roth AD, Delorenzi M: Context-dependent interpretation of the prognostic value of BRAF and KRAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2013, 13:439.
 54. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R, Qian ZR, Morikawa T, Shen J, Meyerhardt JA *et al*: Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst* 2013, 105(15):1151-1156.
 55. Seppälä TT, Böhm JP, Friman M, Lahtinen L, Väyrynen VM, Liipo TK, Ristimäki AP, Kairaluoma MV, Kellokumpu IH, Kuopio TH *et al*: Combination of microsatellite instability and BRAF mutation status for subtyping colorectal cancer. *Br J Cancer* 2015, 112(12):1966-1975.
 56. Richman S: Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol* 2015, 47(4):1189-1202.
 57. Puerta-García E, Cañadas-Garre M, Calleja-Hernández M: Molecular biomarkers in colorectal carcinoma. *Pharmacogenomics* 2015:1-33.
 58. Leite SM, Gomes KB, Pardini VC, Ferreira AC, Oliveira VC, Cruz GM: Assessment of microsatellite instability in colorectal cancer patients from Brazil. *Mol Biol Rep* 2010, 37(1):375-380.
 59. Hurtado C, Wielandt AM, Zárate AJ, Kronberg U, Castro M, Yamagiwa K, Ito T, Eishi Y, Contreras L, López-Köstner F: [Molecular analysis of sporadic colon cancer]. *Rev Med Chil* 2015, 143(3):310-319.
 60. Rossi B, Nakagawa W, Ferreira F, Aguiar J, Lopes A: Câncer de cólon, reto e ânus. In: *Lemar e Tecmedd*. 1 edn. São Paulo; 2004.
 61. Popat S, Hubner R, Houlston RS: Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005, 23(3):609-618.
 62. Malesci A, Laghi L, Bianchi P, Delconte G, Randolph A, Torri V, Carnaghi C, Doci R, Rosati R, Montorsi M *et al*: Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13(13):3831-3839.
 63. Corso G, Pascale V, Flauti G, Ferrara F, Marrelli D, Roviello F: Oncogenic mutations and microsatellite instability phenotype predict specific anatomical subsite in colorectal cancer patients. *Eur J Hum Genet* 2013, 21(12):1383-1388.
 64. Chang EY, Dorsey PB, Johnson N, Lee R, Walts D, Johnson W, Anadiotis G, Kiser K, Frankhouse J: A prospective analysis of microsatellite instability as a molecular marker in colorectal cancer. *Am J Surg* 2006, 191(5):646-651.
 65. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, Dietrich D, Biesmans B, Bodoky G, Barone C *et al*: Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010, 28(3):466-474.
 66. Jass JR, Walsh MD, Barker M, Simms LA, Young J, Leggett BA: Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *Eur J Cancer* 2002, 38(7):858-866.
 67. Iacopetta B, Elsaleh H, Zeps N: Microsatellite instability in colon cancer. *N Engl J Med* 2003, 349(18):1774-1776; author reply 1774-1776.

68. Lee SY, Kim DW, Lee HS, Ihn MH, Oh HK, Min BS, Kim WR, Huh JW, Yun JA, Lee KY *et al*: Low-Level Microsatellite Instability as a Potential Prognostic Factor in Sporadic Colorectal Cancer. *Medicine (Baltimore)* 2015, 94(50):e2260.
69. Zeinalian M, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Salehi R, Kazemi M, Emami MH: Tumor microsatellite instability and clinicopathologic features in Iranian colorectal cancer patients at risk for Lynch syndrome. *J Res Med Sci* 2015, 20(2):154-160.
70. Benatti P, Gafà R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, Maestri I, Guerzoni L, Roncucci L, Menigatti M *et al*: Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2005, 11(23):8332-8340.
71. Jo WS, Carethers JM: Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. *Cancer Biomark* 2006, 2(1-2):51-60.
72. Jover R, Castells A, Llor X, Andreu M: Predictive value of microsatellite instability for benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut* 2006, 55(12):1819-1820.
73. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E: Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer* 2010, 46(15):2788-2798.
74. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, Jewell SD, Mayer RJ, Goldberg RM, Saltz LB *et al*: Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol* 2009, 27(11):1814-1821.
75. Fallik D, Borrini F, Boige V, Viguier J, Jacob S, Miquel C, Sabourin JC, Ducreux M, Praz F: Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2003, 63(18):5738-5744.
76. Fang YM, Dong Q, Cen H, Tang XP, Zheng S: [Induction of HSF1 expression and sporadic colorectal cancer]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2004, 33(5):390-394.

FIGURES

Figure 1 Electropherogram of amplified DNA sequence

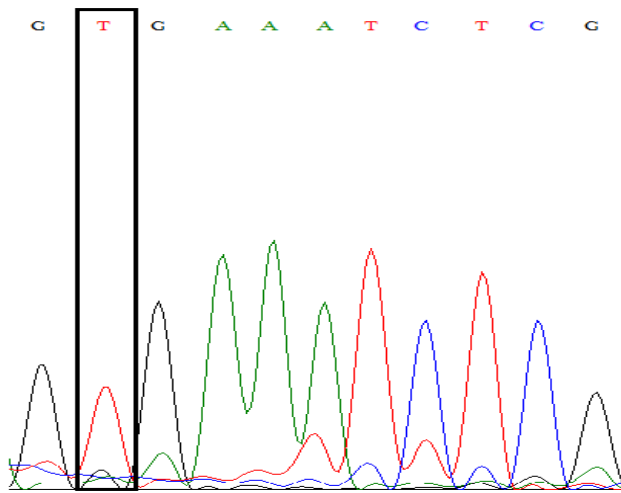


Figure 2 Genotyped samples markers for BAT25, BAT26 and CAT25.

