

Manuela Cristina Dias Pinheiro

**Pesquisa de alterações no genoma nuclear e
mitocondrial e avaliação da sua relevância na
carcinogénese rectal**

Orientador: Prof. Doutor Manuel António Rodrigues Teixeira

Porto, 2007

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU
DE MESTRE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR E À
THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Manuel Teixeira, Director do Serviço de Genética e do Centro de Investigação do IPO-Porto, responsável pela orientação desta dissertação, toda a disponibilidade, rigor científico e compreensão demonstrados durante a sua execução.

À Dr.^a Isabel Veiga, responsável pela co-orientação desta tese, pelas ideias, dedicação e paciência demonstrada durante a sua execução.

Ao Dr. Laranja Pontes, Director do IPO-Porto, onde foi realizado o trabalho conducente a esta tese, e seus antecessores, pelo apoio concedido ao Mestrado em Oncologia.

Ao Prof. João Amado, ao Prof. Carlos Lopes e restante comissão coordenadora, assim como a todos os docentes do Mestrado em Oncologia e à D. Maria do Céu, pela qualidade e empenho demonstrados.

À Liga Portuguesa Contra o Cancro, pelo apoio financeiro prestado.

Ao Dr. Luís Afonso e ao Dr. Mateus Guilherme, patologistas, pela colaboração e disponibilidade para a realização deste estudo, como também à Dr.^a Paula Lopes e à Dr.^a Irene Pais pela preciosa colaboração na recolha dos casos.

À Dr.^a Maria Fragoso, Dr.^a Olga Sousa e Dr. Evaristo Sanches pelo valioso auxílio na área clínica e imensa disponibilidade.

À Carla Pinto, pela ajuda imprescindível na realização desta tese, mas principalmente pelo incentivo e amizade.

Aos colegas do Serviço de Genética não só pelo apoio disponibilizado mas também pelo bom ambiente proporcionado.

À Bárbara, pela ajuda, incentivo e boa disposição constantes ao longo destes seis anos de absoluta amizade.

À Anita, Lurdes, Maria José e Susana pelo constante apoio, paciência, boa disposição e principalmente pela amizade.

Agradeço finalmente aos restantes amigos e à minha família, especialmente aos meus pais e avô, pela paciência e apoio incondicional.

Índice

Abreviaturas	11
Resumo	17
<i>Summary</i>	21
Introdução	25
1 – Epidemiologia do carcinoma colo-rectal	27
1.1 – Taxas de incidência e mortalidade	27
1.2 – Factores de risco	28
1.2.1 – Factores ambientais	28
1.2.2 – História Familiar	29
2 – Tratamento	30
3 – Carcinogénese do CCR	31
3.1 – Alterações no genoma nuclear	31
3.1.1 – Vias de carcinogénese do CCR	31
3.1.1.1 – Via da instabilidade cromossómica (CIN)	33
3.1.1.2 – Via da instabilidade de microssatélites (MIN)	36
3.1.2 – Genes alvo da via MIN	38
3.1.3 – Alterações nos proto-oncogenes <i>BRAF</i> e <i>KRAS</i>	47
3.1.4 – Carcinogénese do CR	50
3.2 – Alterações no genoma mitocondrial	51

3.2.1 – Alterações no genoma mitocondrial em CCR	51
3.2.2 – Alterações no genoma mitocondrial em CR.....	54
Objectivos.....	55
Material e Métodos.....	59
1 – Material biológico	61
2 – Métodos.....	62
2.1 – Extracção de DNA a partir de cortes histológicos.....	62
2.1.1 – Microdissecção manual das áreas de tecido neoplásico e tecido normal	62
2.1.2 – Extracção de DNA de tecido neoplásico e normal incluído em parafina.....	63
2.2 – Extracção de DNA de Sangue Periférico.....	64
2.2.1 – Isolamento de células nucleadas a partir de sangue periférico	64
2.2.2 – Extracção de DNA de células nucleadas isoladas a partir de sangue periférico.....	65
2.3 – Análise de sequências microssatélite.....	66
2.3.1 – Avaliação da instabilidade de microssatélites	66
2.3.2 – Pesquisa de alterações em sequências microssatélites nos genes <i>TGFβRII</i> , <i>BAX</i> , <i>IGFIIR</i> , <i>MSH3</i> , <i>MSH6</i> e <i>β2M</i>	69
2.4 – Pesquisa de mutações no exão 15 do gene <i>BRAF</i> e no exão 1 do gene <i>KRAS</i>	70
2.4.1 – Sequenciação	70
2.4.2 – <i>Single stranded conformation polymorphism</i>	73

2.5 – <i>Methylation Specific – Multiplex Ligation Probe Amplification</i>	75
2.6 – Pesquisa de alterações no DNA mitocondrial	76
2.6.1 – Pesquisa de instabilidade na sequência microssatélite D310	76
2.6.2 – Pesquisa de alterações em sequências microssatélite dos genes <i>NADH dehydrogenase 1</i> e <i>NADH dehydrogenase 5</i>	76
2.7 – Análise estatística.....	77
Resultados	79
1 – Características clínico-patológicas dos casos de carcinoma do recto e do sigmóide	81
2 – Análise da instabilidade de microssatélites.....	83
3 – Pesquisa de mutações nos genes <i>BRAF</i> e <i>KRAS</i>	85
4 – Pesquisa de metilação do promotor do gene <i>MLH1</i> por MS-MLPA.....	90
5 – Pesquisa de alterações no genoma mitocondrial.....	90
6 – Comparação do padrão das alterações genéticas entre o carcinoma do recto e do sigmóide	97
Discussão	99
1– Carcinogénese do carcinoma colo-rectal	101
2 – Alterações no genoma nuclear	102
2.1 – Instabilidade de microssatélites.....	102
2.2 – Genes alvo da via MIN	104

2.3 – Alterações nos proto-oncogenes <i>BRAF</i> e <i>KRAS</i>	106
3 – Alterações no genoma mitocondrial	110
4 – Conclusão	114
Referências bibliográficas	117

Abreviaturas

Abreviaturas

A	- Adenina
Abs	- Absorvância
APC	- <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ARAF	- <i>V-RAF Murine Sarcoma 3611 Vrral Oncogene Homolog</i>
BAT	- <i>Big polyadenine tract</i>
BAX	- <i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCL2	- <i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>
β2M	- <i>β2 Microglobulin</i>
bp	- <i>Base pairs</i>
BRAF	- <i>V-RAF Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1</i>
C	- Citosina
CC	- Carcinoma do cólon
CCR	- Carcinoma colo-rectal
CIN	- <i>Cromossomal instability pathway</i>
CR	- Carcinoma do recto
CS	- Carcinoma do sigmóide
DCC	- <i>Deleted in colorectal cancer</i>
DdNTPs	- Didesoxinucleotídeos trifosfato
D-loop	- <i>Displacement loop</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	- Genoma mitocondrial

DNA_n	- Genoma nuclear
DNTPs	- Desoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetraacético
ERK-1	- <i>Mitogen Activated Protein Kinase 1</i>
ERK-2	- <i>Mitogen Activated Protein Kinase 2</i>
ELK-1	- <i>Member of ETS Oncogene Family</i>
FAP	- <i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
G	- Guanina
GDP	- Guanosina difosfato
GTP	- Guanosina trifosfato
H&E	- Hematoxilina–eosina
HNPCC	- <i>Hereditary Non- Polyposis Colo-Rectal Cancer</i>
HRAS	- <i>V-HA-RAS Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
ICG–HNPCC	- <i>International collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal Cancer</i>
IGFIIR	- <i>Insulin Growth Factor II Receptor</i>
JUN	- <i>V-JUN Avian Sarcoma Virus 17 Oncogene homolog</i>
KRAS	- <i>Kristen Rat Sarcoma Viral Oncogene homolog</i>
LOH	- <i>Loss of heterozygosity</i>
MAPK	- <i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEK-1	- <i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 1</i>
MEK-2	- <i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 2</i>
MGMT	- <i>O⁶ – methylguanine DNA methyltransferase</i>

MHC	- <i>Major histocompatibility complex</i>
Min	- Minutos
MIN	- <i>Microsatellite instability pathway</i>
MLH1	- <i>MutL E. Coli homolog of 1</i>
MMR	- <i>Mismatch repair genes</i>
MSH2	- <i>MutS E. Coli homolog of 2</i>
MSH3	- <i>MutS E. Coli homolog of 3</i>
MSH6	- <i>MutS E. Coli homolog of 6</i>
MSI-H	- <i>Microsatellite instability High</i>
MSI-L	- <i>Microsatellite instability Low</i>
MSI	- <i>Microsatellite instability</i>
MS-MLPA	- <i>Methylation Specific Multiplex Ligation Probe Amplification</i>
MSS	- <i>Microsatellite instability stable</i>
mtMSI	- <i>Mitochondrial Microsatellite Instability</i>
nMSI	- <i>Nuclear Microsatellite Instability</i>
ND1	- <i>NADH dehydrogenase 1</i>
ND5	- <i>NADH dehydrogenase 1</i>
NRAS	- <i>Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMS1	- <i>Postmeiotic segregation increased S. Cerevisiae 1</i>
PMS2	- <i>Postmeiotic segregation increased S. Cerevisiae 2</i>
RAF-1	- <i>V-RAF-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1</i>
RNA	- <i>Ácido ribonucleico</i>

ROS	- <i>Reactive oxygen species</i>
rpm	- Rotações por minuto
SMAD 2	- <i>Mothers Against Decapentaplegic Drosophila, Homolog of 2</i>
SMAD 4	- <i>Mothers Against Decapentaplegic Drosophila, Homolog of 4</i>
SSCP	- <i>Single stranded conformation polymorphism</i>
T	- Timina
TGF-β	- <i>Transforming Growth Factor β</i>
TGFβ-RII	- <i>Transforming Growth Factor β Receptor type II</i>
TP53	- <i>Tumour Protein 53</i>
Wnt	- <i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family</i>

Resumo

O carcinoma do recto (CR), tal como o carcinoma do cólon (CC), pode desenvolver-se predominantemente segundo a via da instabilidade cromossómica (*Cromossomal instability pathway* – CIN) ou a via da instabilidade de microssatélites (*Microsatellite instability pathway* – MIN). Contudo, está descrito para o recto um predomínio de tumores aneuplóides, com baixa frequência de instabilidade de microssatélites (*Microsatellite instability* – MSI) e presença de mutações nos genes *Adenomatous Polyposis Coli (APC)*, *Kirsten Rat Sarcoma (KRAS)*, *Tumour Protein 53 (TP53)*, evidenciando que esta neoplasia se desenvolve, predominantemente, segundo a via CIN (cerca de 80 a 98% dos casos). Todavia, os raros estudos moleculares que analisaram as vias de carcinogénese do CR demonstraram que estas podem variar, pelo menos em parte, do observado no CC. Assim, de modo a contribuir para a clarificação desta questão, pretendeu-se com este estudo caracterizar determinadas alterações genéticas (nucleares e mitocondriais) numa série de CR e carcinomas do sigmóide (CS). Dos casos de CR, 10,5% apresentaram uma elevada MSI (*Microsatellite instability-High* - MSI-H), enquanto nos casos de CS a frequência de MSI-H foi de 12%. Na série de CR, 50% e 25% dos carcinomas com MSI-H apresentaram mutações nas sequências microssatélite dos genes *Bcl2-associated X protein (BAX)* e *Insulin-like growth factor II receptor (IGFIIR)*, respectivamente, sugerindo que estes genes podem ser alvos da via MIN nesta neoplasia. Contrariamente, os casos de CS não apresentaram alterações nestas sequências, podendo tal ser devido à presença de alterações genéticas ou epigenéticas em outras regiões destes genes ou em outros genes na mesma via, ou evidenciar a irrelevância da sua função na carcinogénese dos CS da via MIN. Estas hipóteses poderão também explicar a ausência de mutações em ambas as séries, nos genes *Transforming Growth Factor β Receptor Type II*

(*TGF β RII*), *MutS E. Coli homolog of 3* (*MSH3*), *6* (*MSH6*), e β 2-Microglobulin (β 2M). Relativamente aos proto-oncogenes *V-RAF Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1* (*BRAF*) e *KRAS*, verificou-se uma maior frequência de mutações neste último, apontando que o envolvimento da via das *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) na carcinogénese do CR e do CS ocorre preferencialmente pela activação do oncogene *KRAS*. No que concerne ao DNA mitocondrial, foi detectada uma elevada frequência de mutações na sequência D310, tanto em CR como em CS. Nos casos de CS observou-se uma tendência de associação entre a presença de instabilidade de microssatélites nuclear (*nuclear microsatellite instability* – nMSI) e mitocondrial (*mitochondrial microsatellite instability* – mtMSI), contudo não podemos concluir que haja uma associação entre estes dois fenómenos, dado o número reduzido de casos e a inexistência desta tendência em CR. Concluindo, apesar de a maioria das diferenças observadas não serem significativas, os nossos resultados parecem evidenciar que as alterações genéticas envolvidas na carcinogénese do CR são parcialmente distintas das observadas em CS e CC direito.

Summary

Rectal cancer (RC), as colon cancer (CC), can develop mainly through the chromosomal instability pathway (CIN) or the microsatellite instability pathway (MIN). However, there is a predominance in RC of aneuploidy, low frequency of microsatellite instability (MSI) and a high mutation rate in the *Adenomatous Polyposis Coli (APC)*, *Kirsten Rat Sarcoma (KRAS)*, *Tumour Protein 53 (TP53)* and β -catenin genes. These data demonstrate that RC develops, predominantly, by the CIN pathway (80 to 98% of the cases). However, the few studies about the molecular pathways involved in RC carcinogenesis showed that these may vary, at least in part, from that observed in the CC. In order to contribute to the clarification of this issue, the aim of this study was the characterization of specific genetic alterations (nuclear and mitochondrial) in a series of RC and sigmoid cancer (SC). 10.5% and 12% of the RC and SC cases, respectively, were microsatellite instability-high (MSI-H). In the RC cases, 50% and 25% of the MSI-H carcinomas presented mutations in the microsatellite sequences of the *Bcl2-associated X protein (BAX)* and *Insulin-like growth factor II receptor (IGFIIIR)* genes, respectively, suggesting that these genes may be targets of the MIN pathway in this neoplasia. In contrast, the SC cases did not present alterations in these sequences, which may be due to the presence of genetic or epigenetic alterations in other regions of these genes or in other genes of the same pathway, or may demonstrate their irrelevance in the SC that develops through the MIN pathway. These assumptions may also explain the lack of alterations, in the RC and SC cases, in the *Transforming Growth Factor β Receptor Type II (TGF β RII)*, *MutS E. Coli homolog of 3 (MSH3)*, *6 (MSH6)*, and β 2-Microglobulin (β 2M) genes. Concerning the proto-oncogenes *V-RAF Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1*

(*BRAF*) and *KRAS*, it was detected a higher frequency of mutations in the latter, suggesting that the involvement of the *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) pathway in RC and SC carcinogenesis occurs preferentially by *KRAS* activation. Regarding mitochondrial DNA, it was detected a high mutational frequency in the D310 sequence in the RC and SC cases. In the SC series there was a trend toward an association between the presence of nuclear MSI (nMSI) and mitochondrial MSI (mtMSI); however we can not conclude that there is an association between these two phenomena, given the small number of cases and the absence of this trend in the RC cases. Concluding, although most of the observed differences are not statistically significant, our results indicate that the genetic changes involved in RC carcinogenesis are partially distinct from those observed in SC and in the right CC.

Introdução

1 – Epidemiologia do carcinoma colo-rectal

1.1 – Taxas de incidência e mortalidade

O carcinoma colo-rectal (CCR) é a terceira neoplasia maligna mais frequente nos países desenvolvidos, apenas precedido pelo cancro do pulmão nos homens e da mama nas mulheres, estimando-se que em 2002 tenham ocorrido 1023152 novos casos (9,4% do total de neoplasias) e 528978 mortes (7,9% das mortes por cancro) (Ferlay *et al*, 2004). Em Portugal, estima-se que a taxa de incidência de CCR em 2002 foi de $21,1/10^5$ habitantes no sexo feminino e de $36,0/10^5$ habitantes no sexo masculino (<http://www.dep.iarc.fr/globocan.html>). Em 2003 registaram-se 3321 mortes por CCR (1443 mulheres e 1778 homens), colocando esta neoplasia como a segunda causa de morte por cancro com uma taxa de mortalidade de $28,9/10^5$ habitantes (<http://www.dep.iarc.fr/WHO.html>).

O carcinoma do recto (CR) constitui cerca de 25 a 35% de todos os carcinomas do intestino grosso (Bleiberg *et al*, 2002). Segundo o Registo Oncológico Regional do Norte de 2001, o CR atingiu na região norte de Portugal uma taxa de incidência de $11,0/10^5$ habitantes, sendo os homens mais afectados que as mulheres ($15,3/10^5$ e $7,6/10^5$ habitantes, respectivamente). Em 2003, segundo a Organização Mundial da Saúde, registaram-se em Portugal 911 mortes por CR e ânus (368 mulheres e 543 homens), correspondendo a uma taxa de mortalidade de $8,5/10^5$ habitantes (<http://www.dep.iarc.fr/WHO.html>).

1.2 – Factores de risco

1.2.1 – Factores ambientais

Vários estudos demonstraram que as populações migrantes têm tendência a adquirir o risco relativo de desenvolver CCR das regiões para onde se deslocam, sugerindo que os factores ambientais possuem um papel importante na etiologia desta doença, sendo a dieta um dos factores mais estudados (Potter, 1996; Bleiberg *et al*, 2002).

A maioria dos estudos epidemiológicos consideram o CR e o carcinoma do cólon (CC) a mesma entidade, mas estudos recentes sugerem que existem diferenças nos factores de risco associados a cada uma destas neoplasias (Pedersen *et al*, 2003; Nakaji *et al*, 2003; Wei *et al*, 2004). Vários estudos evidenciaram que o excesso de gordura e de proteínas animais na dieta poderão estar associados com o desenvolvimento do CC (Potter, 1996; Bleiberg *et al*, 2002). Por outro lado, a actividade física, ocupacional ou lúdica, parece diminuir o risco desta neoplasia, provavelmente devido ao seu efeito no trânsito intestinal, no metabolismo dos ácidos biliares e no sistema imunitário (Bleiberg *et al*, 2002; Wei *et al*, 2004).

Segundo a bibliografia nenhum destes factores parece estar significativamente associado ao risco de desenvolver CR. Contudo, está descrita uma associação entre o consumo excessivo de álcool e o risco de desenvolver esta neoplasia, embora este pareça diminuir quando o vinho é incluído no tipo de bebida alcoólica consumida, sugerindo que este possui um efeito anticarcinogénico (Bleiberg *et al*, 2002; Pedersen *et al*, 2003; Wei *et al*, 2004).

Uma possível explicação para a diferente susceptibilidade aos factores ambientais é a origem embrionária do intestino grosso. Este apresenta duas origens distintas: o cólon ascendente e dois terços do cólon transversal têm origem no intestino médio primitivo (*midgut*), enquanto o último terço do cólon transversal, o cólon descendente e o recto têm origem no intestino caudal (*hindgut*) (Junqueira e Zago, 1977). O cólon e o recto também possuem funções diferentes, sendo que o recto está exposto a matéria fecal mais concentrada e de uma forma mais directa (Wei *et al*, 2004). Por outro lado, no cólon a matéria fecal encontra-se envolta por um muco alcalino, de modo que alterações no pH podem influenciar a susceptibilidade a determinados factores ambientais (Wei *et al*, 2004).

O risco de desenvolver CCR também é acrescido em indivíduos com doença inflamatória crónica do cólon, como é o caso da colite ulcerosa e da doença de Crohn (Trichopoulos *et al*, 1997; Skibber *et al*, 2000).

1.2.2 – História Familiar

Indivíduos com história familiar de CCR apresentam um risco aumentado de desenvolver a doença, especialmente se o caso índice for diagnosticado antes dos 45 anos. Estima-se que cerca de 10% dos casos de CCR são hereditários, ocorrendo predominantemente no contexto da Polipose Adenomatosa Familiar do Cólon (*Familial Adenomatous Polyposis* – FAP) e do Carcinoma Colo-rectal Hereditário não associado à Polipose (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* – HNPCC) (Lynch *et al*, 1997; Ilyas *et al*, 1999).

Do ponto de vista clínico, os indivíduos com FAP caracterizam-se por desenvolverem um número elevado de pólipos (>100) apresentando um risco cumulativo de desenvolver CCR aos 40 anos de cerca de 100% (Bishop *et al*, 1994; Kerr *et al*, 1999).

A síndrome HNPCC define-se clinicamente pela ocorrência precoce de CCR, apresentando os portadores desta síndrome um risco de desenvolverem esta neoplasia aos 60 anos de aproximadamente 80%. Estes doentes apresentam ainda um risco aumentado de desenvolver outras neoplasias, nomeadamente no endométrio, estômago e ovário (Lynch *et al*, 1997; Ilyas *et al*, 1999). Cerca de 60% dos CCRs que ocorrem no âmbito da HNPCC localizam-se no cólon direito, sendo a frequência de CR nesta síndrome de 11 a 24% (Rodriguez-Bigas *et al*, 1997; Lee *et al*, 2001).

2 – Tratamento

A distinção anatómica entre cólon e recto é de extrema importância na escolha do melhor tratamento. A cirurgia é a principal forma de tratamento dos doentes quer com CC quer com CR (Boland *et al*, 2000; *Colorectal cancer collaborative group*, 2001).

No entanto, apesar do elevado potencial curativo desta terapia na maior parte dos casos, a frequência de recorrência local no CR é cerca de 25%. Vários ensaios clínicos demonstraram que a radioterapia reduz o risco de recorrência local, no entanto não foi verificado qualquer aumento da taxa de sobrevivência global dos doentes. A utilização do tratamento adjuvante de radioterapia e quimioterapia com 5-Fluorouracilo (5-FU) apresenta uma eficácia elevada, contribuindo não só para a diminuição das taxas de recorrência local,

mas também para o aumento significativo da sobrevivência global (Krook *et al*, 1991; *Colorectal cancer collaborative group*, 2001; Boland *et al*, 2000; Sauer, 2002).

Por outro lado, no CC a progressão da doença deve-se geralmente à presença de metástases à distância. A quimioterapia sistêmica combinada é a principal terapia adjuvante para doentes com CC. A administração de 5-FU num regime adjuvante veio demonstrar uma diminuição da taxa de recorrência e aumentar a sobrevivência global, nomeadamente em doentes com CC no estágio III. O uso de radioterapia adjuvante é aconselhado em doentes com invasão dos nódulos linfáticos e em tumores no estágio III e IV localizados na porção retroperitoneal do cólon devido à taxa de recorrência local destes tumores (30%) (Moertel *et al*, 1995; Boland *et al*, 2000; Carethers *et al*, 2004)

3 – Carcinogénese do CCR

3.1 – Alterações no genoma nuclear

3.1.1 – Vias de carcinogénese do CCR

O primeiro modelo genético de carcinogénese colo-rectal foi proposto, em 1990, por Fearon e Vogelstein, baseando-se na observação de alterações genéticas específicas em lesões benignas e malignas primárias, envolvendo um número elevado de oncogenes e genes supressores tumorais (Fearon *and* Vogelstein, 1990). Tal permitiu identificar as sucessivas alterações genéticas presentes na transição adenoma para carcinoma e evidenciar

a importância da acumulação sequencial dos eventos genéticos no desenvolvimento neoplásico.

Porém, desde a descrição deste primeiro modelo, vários autores sugeriram a existência de múltiplas vias de carcinogénese, demonstrada pela observação de diferentes características clinicopatológicas e genéticas em CCR. Dos vários modelos genéticos de desenvolvimento do CCR actualmente descritos destacam-se, pela sua frequência, os designados por via da instabilidade cromossómica (*Cromossomal instability pathway* - CIN) ou via supressora e via da instabilidade de microssatélites (*Microsatellite instability pathway* - MIN) ou via mutadora (Ilyas *et al*, 1999; Narayan *et al*, 2003; Takayama *et al*, 2006) (Figura 1).

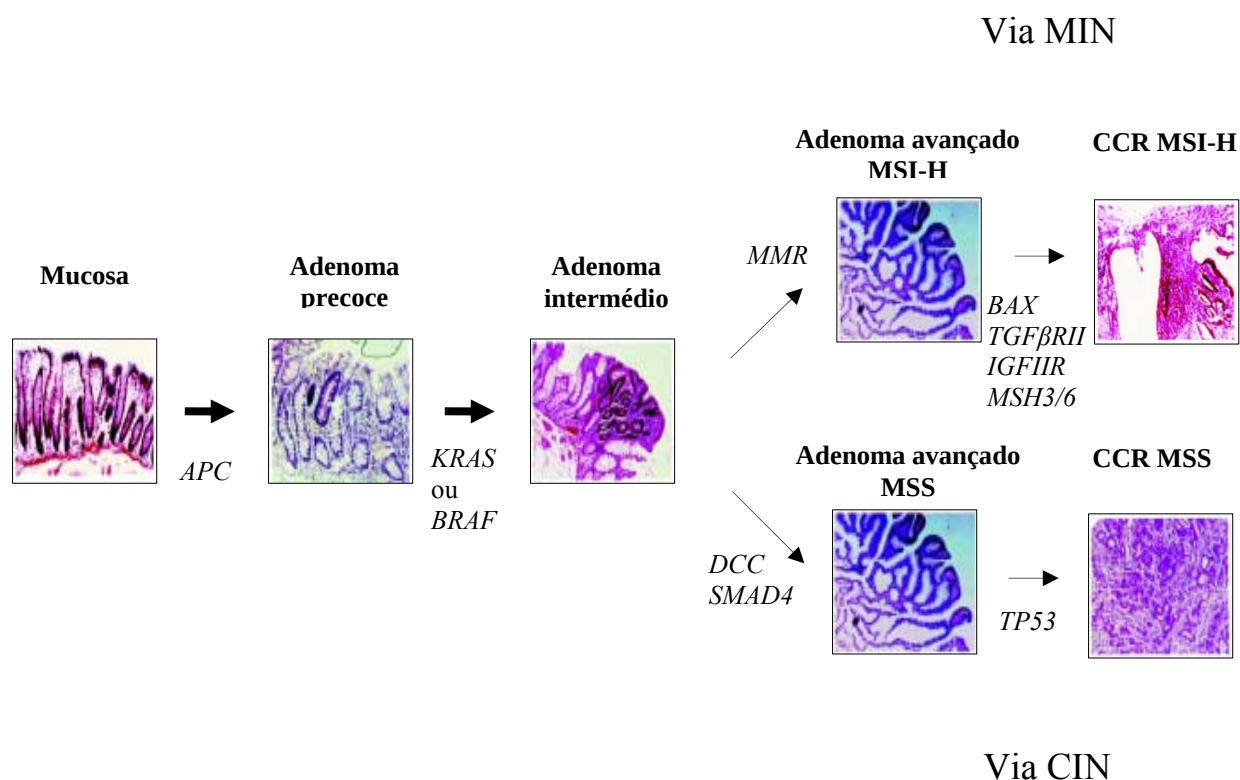


Figura 1 – Via da instabilidade cromossómica (Via CIN) e da instabilidade de microssatélites (Via MIN) da carcinogénese colo-rectal (adaptado de Ilyas *et al*, 1999).

As neoplasias que se desenvolvem segundo a via CIN caracterizam-se pela ocorrência de aneuploidia, presença de alterações estruturais cromossômicas e uma elevada frequência de perda de heterozigotia (*Loss of heterozygosity* - LOH). Ao nível molecular está associada, fundamentalmente, a mutações nos genes *Adenomatous Polyposis Coli* (*APC*), *Kristen Rat Sarcoma* (*KRAS*) e *Tumour Protein 53* (*TP53*) (Ilyas *et al*, 1999; Narayan *et al*, 2003; Grady *et al*, 2004; Takayama *et al*, 2006).

As neoplasias colo-rectais que se desenvolvem segundo a via MIN, caracterizam-se pela ocorrência de diploidia (ou pseudodiploidia), baixa frequência de LOH e presença de uma elevada instabilidade de microssatélites (*Microsatellite instability high* – MSI-H) – instabilidade generalizada de sequências repetitivas de DNA, ou sequências microssatélite, por adição ou deleção do número de repetições destas sequências (Ilyas *et al*, 1999; Narayan *et al*, 2003; Grady *et al*, 2004; Takayama *et al*, 2006).

3.1.1.1 – Via da instabilidade cromossômica (CIN)

As alterações inerentes à via CIN observam-se em cerca de 70 a 85% dos casos de CCR esporádico. Esta via caracteriza-se essencialmente por alterações estruturais cromossômicas, nomeadamente por perdas no braço longo do cromossoma 5 (5q) e 18 (18q) e no braço curto do cromossoma 17 (17p), onde se localizam respectivamente os genes *APC*, *Mothers Against Decapentaplegic Drosophila, Homolog of 2 e 4* (*SMAD2/SMAD4*) e *TP53*. Caracteriza-se também pela presença de mutações nos genes *APC*, *KRAS* e *TP53* (Ilyas *et al*, 1999; Arends, 2000).

O gene *APC* é um gene supressor tumoral cujas alterações germinativas estão na origem da síndrome hereditária FAP. Segundo a bibliografia, a ocorrência de mutações no gene *APC* é um dos primeiros eventos da iniciação e progressão da carcinogénese colo-rectal. A frequência de mutações em adenomas colo-rectais esporádicos é de 30 a 70% e em CCR esporádico é de 60 a 80% (Ilyas *et al*, 1999; Narayan *et al*, 2003; Worthley *et al*, 2007). A proteína codificada pelo gene *APC* tem como função inibir a proteína β -Catenina despoletando a via de sinalização das proteínas *Wingless-Type MMTV Integration Site Family* (Wnt) de modo a controlar o crescimento, a diferenciação celular e a apoptose (Smith *et al*, 2002; Worthley *et al*, 2007).

O proto-oncogene *KRAS* codifica uma proteína de transdução de sinal que no seu estado activo está complexado com um grupo guanosina trifosfato (GTP). Este complexo fica inactivo por hidrólise do GTP a guanosina difosfato (GDP). Se este gene sofrer uma mutação o complexo resultante será menos sensível à hidrólise, mantendo-se num estado constitutivamente activo, levando à proliferação celular por uma variedade de vias de sinalização, incluindo a via das *Mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) (Arends, 2000; Takayama *et al*, 2006). A frequência de mutações no proto-oncogene *KRAS* em CCR esporádico é cerca de 30 a 50% (Smith *et al*, 2002; Calistri *et al*, 2005). Uma elevada frequência de mutações neste gene em lesões benignas sugere que, apesar de fornecerem uma vantagem selectiva de crescimento às células, não é suficiente para despoletar a carcinogénese. A acumulação de alterações neste gene e em outros, nomeadamente no gene *APC*, dará presumivelmente uma vantagem selectiva às células alteradas, resultando na sua proliferação clonal (Leslie *et al*, 2002; Worthley *et al*, 2007).

Outro evento importante nesta via de carcinogénese é a ocorrência da deleção de 18q em 60 a 70% dos casos de CCR. Como foi referido anteriormente, nesta região cromossómica localizam-se vários genes importantes para este processo, como o *SMAD2* e o *SMAD4*. Estes genes estão envolvidos na via de sinalização do *Transforming Growth Factor β* (*TGF β*), com funções na regulação do crescimento celular e apoptose (Bardi *et al*, 1995; Liu *et al*, 1996; Yingling *et al*, 1996; Zhou *et al*, 1998; Liu, 2003).

Perda do gene supressor tumoral *TP53*, geralmente por deleção de 17p, é frequentemente um evento tardio nesta via de carcinogénese. De acordo com a literatura está associada à transição adenoma para carcinoma, comprovado por vários estudos que demonstram um aumento na frequência de alterações neste gene, quer por mutação quer por LOH, com o estágio histológico da lesão. Assim, estão descritas alterações neste gene numa frequência de 4 a 26% em adenomas colo-rectais e de 35 a 75% em CCR esporádico. A proteína codificada por este gene (p53) é um importante factor de transcrição que medeia a paragem do ciclo celular de modo a facilitar a reparação do DNA durante a replicação, ou que induz a apoptose caso essa reparação não seja possível (Rodrigues *et al*, 1990; Scott *et al*, 1993; Leslie *et al*, 2002; Smith *et al*, 2002; Worthley *et al*, 2007).

CCRs que se desenvolvem segundo a via MIN podem também apresentar mutações nestes genes, embora com uma frequência inferior. Cerca de 4,8 a 22,7% dos CCR esporádicos com MSI-H apresentam mutações no gene *APC* e aproximadamente 5 a 31% no gene *TP53* (Olschwang *et al*, 1997; Salahshor *et al*, 1999; Jass *et al*, 2003)

Apesar de estudos recentes indicarem que a alteração simultânea destes genes não é frequente em CCR e de vários autores sugerirem diferentes padrões moleculares relacionados com a via CIN, alterações nos genes *APC*, *KRAS* e *TP53* são eventos

essenciais na carcinogénese colorectal e este modelo de carcinogénese mantém-se um paradigma (Smith *et al*, 2002; Calistri *et al*, 2005).

3.1.1.2 – Via da instabilidade de microssatélites (MIN)

As sequências microssatélite são constituídas por unidades de repetição que variam de um a seis pares de bases de DNA e estão distribuídas de forma abundante e aleatória pelo genoma humano. Estas sequências apresentam taxas de mutação ligeiramente superiores à do genoma em geral, sendo, no entanto, transmitidas de forma estável de geração em geração (Weber *et al*, 1993; Farber *et al*, 1994; Vauris *et al*, 1997; Arzimanoglou *et al*, 1998).

A MSI foi descoberta em 1993 num grupo restrito de CCRs esporádicos e em CCRs de doentes com a síndrome HNPCC, tendo sido posteriormente descrita numa grande variedade de neoplasias humanas (Ionov *et al*, 1993; Thibodeau *et al*, 1993; Arzimanoglou *et al*, 1998; Aaltonen *et al*, 1998). Aproximadamente 92% dos CCRs que ocorrem em famílias HNPCC apresentam uma MSI-H, ao passo que no CCR esporádico essa frequência é apenas de 10 a 20% (Thibodeau *et al*, 1993; Bocker *et al*, 1996; Arzimanoglou *et al*, 1998). Nas descrições iniciais da MSI foi postulado que esta poderia ter origem em mutações em determinados genes de reparação do DNA, apesar de outros factores poderem estar envolvidos. Estudos em estirpes mutantes de *Escherichia coli* demonstraram uma associação entre a MSI e mutações nos genes do sistema de reparação de erros de emparelhamento do DNA (*Mismatch Repair* – MMR) *mutS* e *mutL* (Modrich, 1991; Toft *et*

al, 1998). Posteriormente foi demonstrado que a introdução de alelos normais dos genes deste sistema em linhas celulares mutantes para estes genes, restaurava a estabilidade genômica, indicando claramente que mutações nos genes do sistema MMR causavam MSI (Koi *et al*, 1994; Umar *et al*, 1997)

Até à data, foram detectadas em CCR (esporádico ou familiar) alterações em vários genes do sistema MMR, designadamente em 3 homólogos ao *mutS* bacteriano (*MutS E. Coli* homolog of 2 (*MSH2*), 3 (*MSH3*), e 6 (*MSH6*)) e em 3 homólogos ao *mutL* bacteriano (*MutL E. Coli* homolog of 1 (*MLH1*), *Postmeiotic segregation increased S. Cerevisiae 1* (*PMS1*) e 2 (*PMS2*)). Na síndrome HNPCC a maioria dos CCRs ocorrem devido a mutações germinativas nos genes do sistema MMR, nomeadamente nos genes *MLH1* e *MSH2* (Loukola *et al*, 2001; Lynch *et al*, 2003). A frequência de mutações nestes genes em CCR esporádico com MSI-H é apenas de 10% (Thibodeau *et al*, 1996), todavia, a frequência de CCRs com MSI-H que apresentam hipermetilação do promotor do gene *MLH1* é 70 a 90%. Este mecanismo epigenético resulta no silenciamento da transcrição do gene tendo como consequência a perda de expressão da proteína e um sistema MMR ineficaz (Esteller, 2000b, Arnold *et al*, 2004).

O sistema MMR é crítico para a manutenção da estabilidade genômica. Este aumenta a fidelidade da replicação do DNA através da identificação e remoção de erros de emparelhamento e de inserção/deleção de nucleotídeos que se podem originar neste processo (Peltomaki, 2001a, 2001b; Marti *et al*, 2002). A inativação dos genes do sistema MMR aumenta a probabilidade de ocorrência de mutações, principalmente nas sequências microssatélites dispersas no genoma ou inseridas em zonas codificantes de genes determinantes no desenvolvimento neoplásico (Perucho, 1996).

Vários estudos em CCR demonstraram que as neoplasias com MSI-H apresentam uma série de características histopatológicas e clínicas particulares, nomeadamente: localização preferencial no cólon proximal, menor diferenciação histológica, acentuada produção de muco, presença de infiltrado linfóide e elevada proporção de células em anel de sinete (Risio *et al*, 1996; Messerini *et al*, 1997; Senba *et al*, 1998; Smyrk *et al*, 2001; Gervaz *et al*, 2002). Do ponto de vista clínico, os doentes com este tipo de neoplasias apresentam geralmente maior sobrevivência global e menor incidência de metástases (Gryfe *et al*, 2000; Samowitz *et al*, 2001; Watanabe *et al*, 2001). Duas hipóteses têm sido sugeridas para explicar esta ocorrência. Conforme referido anteriormente, as células neoplásicas com MSI-H não possuem um sistema MMR funcional, logo os erros que ocorrem durante a replicação do DNA não são corrigidos. Consequentemente, as células vão acumulando um elevado número de mutações, podendo envolver genes essenciais para a viabilidade da célula. A inviabilidade das células neoplásicas, desencadeia o processo de morte celular programada (apoptose), sendo a evolução tumoral retardada (Hemminki *et al*, 2000). Por outro lado, o elevado número de mutações pode resultar na formação de proteínas mutantes cuja presença na superfície celular desencadeia uma resposta imune do hospedeiro contra o tumor, patente na presença de infiltrado linfóide (Banerjea *et al*, 2005).

3.1.2 – Genes alvo da via MIN

Tem sido observada em diversas neoplasias, nomeadamente em CCR, MSI em sequências repetitivas localizadas em regiões codificantes de genes. Esta instabilidade

resulta em mutações do tipo *frameshift* que conduzem à inativação da função destes genes, conferindo-lhes assim um potencial papel na carcinogénese destas neoplasias (Iacopetta *et al*, 1998, Woerner *et al*, 2001; Samowitz *et al*, 2002).

Contudo, a presença de MSI em determinadas sequências pode apenas representar eventos aleatórios, resultantes da instabilidade genómica que caracteriza estes tumores, e não genes alvo específicos. Para além disso, a frequência de mutações descrita é muito variável para diferentes sequências e diferentes tecidos. Em 1997 no consenso de Bethesda foram propostos cinco critérios de modo a esclarecer se um determinado gene alterado é um verdadeiro alvo da via de carcinogénese MIN. Os critérios propostos foram: elevada frequência de inativação; inativação bialélica; envolvimento do gene candidato na via CIN; ocorrência de alterações na mesma via de carcinogénese em tumores negativos para MSI; e estudos funcionais *in vivo* ou *in vitro* que confirmem o papel de genes supressores tumorais (Boland *et al*, 1998). Perucho (1998) questionou estes critérios na medida em que: a alteração bialélica não é único mecanismo pelo qual um gene supressor tumoral pode ser inativado, dando como exemplo o mecanismo de *imprinting* que pode eliminar a necessidade de uma mutação bialélica; refere também que alguns genes alvo podem ser específicos da via MIN e não estarem envolvidos na carcinogénese de tumores negativos para MSI; paralelamente, determinados genes alvo também não estão envolvidos na via CIN (por exemplo, o *MSH3* e o *MSH6*) (Perucho, 1998; Duval *et al*, 2002b).

Na ausência de critérios consensuais, a maioria dos estudos tem considerado um determinado gene como alvo da via MIN com base na frequência de alterações e na sua relevância na carcinogénese (Duval *et al*, 2002b). Por exemplo, os genes *Transforming Growth Factor β Receptor Type II (TGF β RII)*, *Bcl2-associated X protein (BAX)*, *Insulin-*

like growth factor II receptor (IGFIIR), *MSH3*, *MSH6*, e *β 2-Microglobulin (β 2M)* têm sido considerados genes alvo em várias neoplasias, nomeadamente em CCR (Boland *et al*, 1998; Perucho, 1998).

O TGF β é membro de uma família de factores de crescimento, que regulam os processos celulares através da sua ligação a três receptores de alta afinidade que existem na superfície celular, designados por tipo I, II, e III (Oto *et al*, 1997; Caestecker *et al*, 2000; Epstein *et al*, 2000). Numa célula epitelial normal, o TGF β liga-se quer ao receptor do tipo III, que o transfere ao receptor do tipo II, ou directamente a este último. Uma vez activado por este factor de crescimento, ocorre a ligação do receptor do tipo II ao receptor do tipo I, iniciando-se um processo de transdução de sinal, que irá regular a transcrição de vários genes envolvidos na inibição da proliferação celular, na indução da diferenciação ou na estimulação da apoptose. Alterações na via de sinalização do TGF β resultam na resistência à acção deste factor de crescimento, que culmina na perda de inibição da proliferação e, desta forma, contribui para a transformação neoplásica (Figura 2) (Derynck *et al*, 2001; Elliott *et al*, 2005). O gene *TGF β RII*, que codifica o receptor do tipo II do TGF β , possui dois locais de sequências repetitivas: uma sequência de dez adeninas consecutivas ((A)₁₀), denominada *big polyadenine tract-receptor type II* (BAT-RII), e uma outra constituída por uma sequência repetitiva de sete guaninas-timinas (GT)₇ (Togo *et al*, 1996). A observação em CCRs com MSI-H de uma elevada taxa de mutações (70 a 90%) na sequência repetitiva BAT-RII demonstra o envolvimento do gene *TGF β RII* na via de carcinogénese MIN (Togo *et al*, 1996; Iacopetta *et al*, 1998; Castecker *et al*, 2000; Epstein *et al*, 2000; Shin *et al*, 2000).

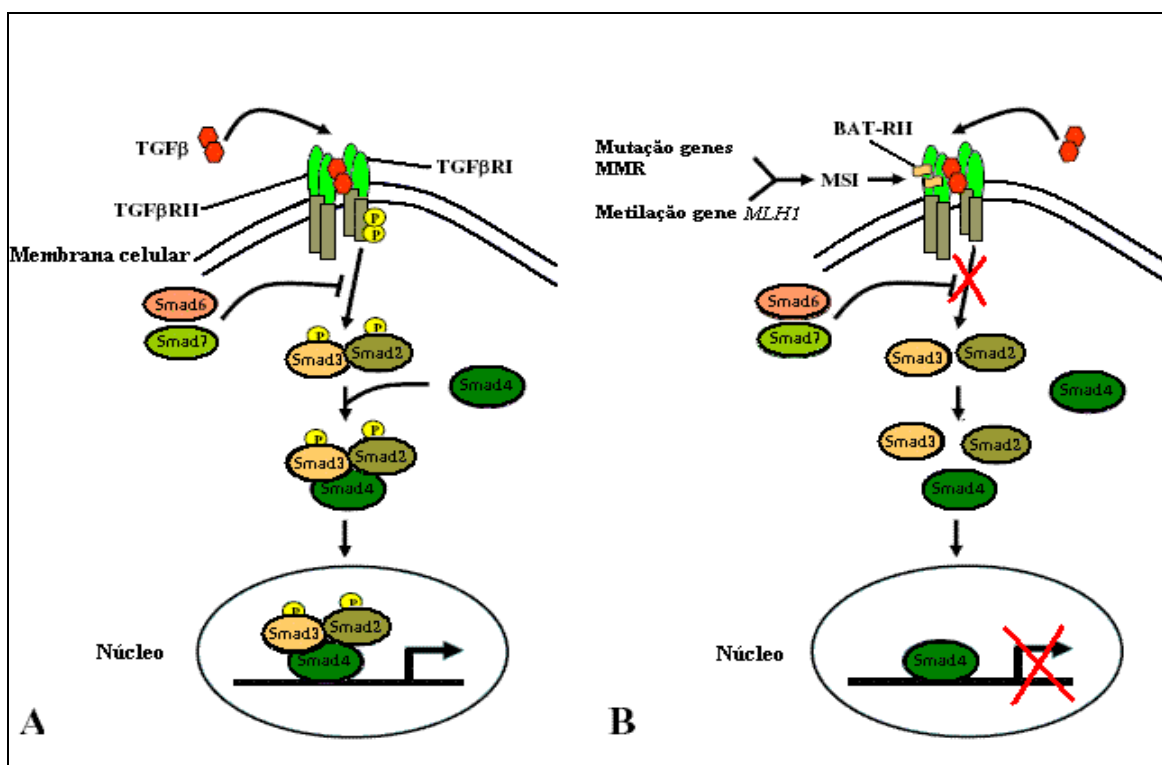


Figura 2 – Mecanismo de transdução de sinal mediado pelo TGF- β . A – No espaço extracelular o TGF- β liga-se ao receptor do tipo II. O receptor do tipo I liga-se, de seguida, a este complexo, ocorrendo a sua fosforilação. Esta fosforilação, activa a proteína cinase do receptor do tipo I, fosforilando os factores de transcrição Smad2 e Smad3. O complexo Smad2/Smad3 fosforilado liga-se ao Smad4 e o complexo resultante desloca-se para o núcleo. No núcleo, este complexo interage com vários factores de transcrição para regular a transcrição de genes que respondem ao TGF- β e medeiam os efeitos deste factor de crescimento ao nível celular. B – Alterações na via de sinalização do TGF- β resultam na resistência à acção deste factor de crescimento regulador da proliferação celular (adaptado de Narayan *et al*, 2003).

A proteína BAX é um factor pró-apoptótico da família de proteínas *B-Cell CLL/Lymphoma 2* (BCL2), que está envolvida na regulação da apoptose. Após indução por um estímulo apoptótico, a proteína BAX desloca-se do citoplasma para a mitocôndria onde sofre uma mudança conformacional. Nesse organelo, a BAX induz a abertura do canal de

aniões dependente de voltagem (*mitochondrial voltage-dependent anion channel* - VDAC), resultando na perda do potencial da membrana mitocondrial e na libertação do Citocromo c e de outros factores pro-apoptóticos, cuja consequência será a activação das caspases e consequente fragmentação nuclear (Figura 3) (Shimizu *et al*, 1999). O gene *BAX* possui uma sequência repetitiva de oito guaninas ((G)₈), para a qual está descrita uma frequência de mutações de 39 a 66% nos casos de CCR com MSI-H (Rampino *et al*, 1997; Samowitz *et al*, 2002; Potočnik *et al*, 2003; Trojan *et al*, 2004; Fernández-Peralta *et al*, 2005). Alterações nesta sequência resultam na síntese de proteínas não funcionais, contribuindo para a diminuição da apoptose e, consequentemente, para o aumento do número de células (Miquel *et al*, 2005).

O gene *Insulin-like growth factor II* (*IGFII*) codifica um factor de crescimento com elevada homologia estrutural à insulina e pertence a uma família de proteínas constituída por dois receptores de superfície celular (*IGFIR* e o *IGFIIR*), dois ligandos (*IGFI* e *IGFII*) e uma família de seis proteínas de elevada afinidade para o IGF (*high-affinity IGF binding proteins* (*IGFBP1-6*)). Esta família de proteínas participa na promoção da proliferação celular e na inibição da apoptose (Sandhu *et al*, 2002). O *IGFII* é um factor de crescimento essencial no desenvolvimento embrionário. O receptor (*IGFIIR*) deste factor de crescimento tem como função inibir a sua acção. Para tal, o *IGFIIR* interage quer com o *IGFII*, participando na sua internalização e degradação, quer com o *TGFβ1* latente, estimulando a activação deste factor de crescimento de modo a inibir a proliferação celular (Figura 4) (Scott *et al*, 2004; Hebert, 2006). O gene *IGFIIR* apresenta várias sequências microsatélite na sua região codificante, sendo que uma delas é uma repetição de oito guaninas ((G)₈). Segundo a bibliografia, esta sequência apresenta uma frequência de

mutações de 22 a 26% em CCRs com MSI-H (Calin *et al*, 2000; Potočnik *et al*, 2003). Estas mutações levam à perda de função do IGFIIR, podendo aumentar a proliferação celular devido à acumulação e activação do IGFII e à subregulação do TGFβ1 (Narayan *et al*, 2003).

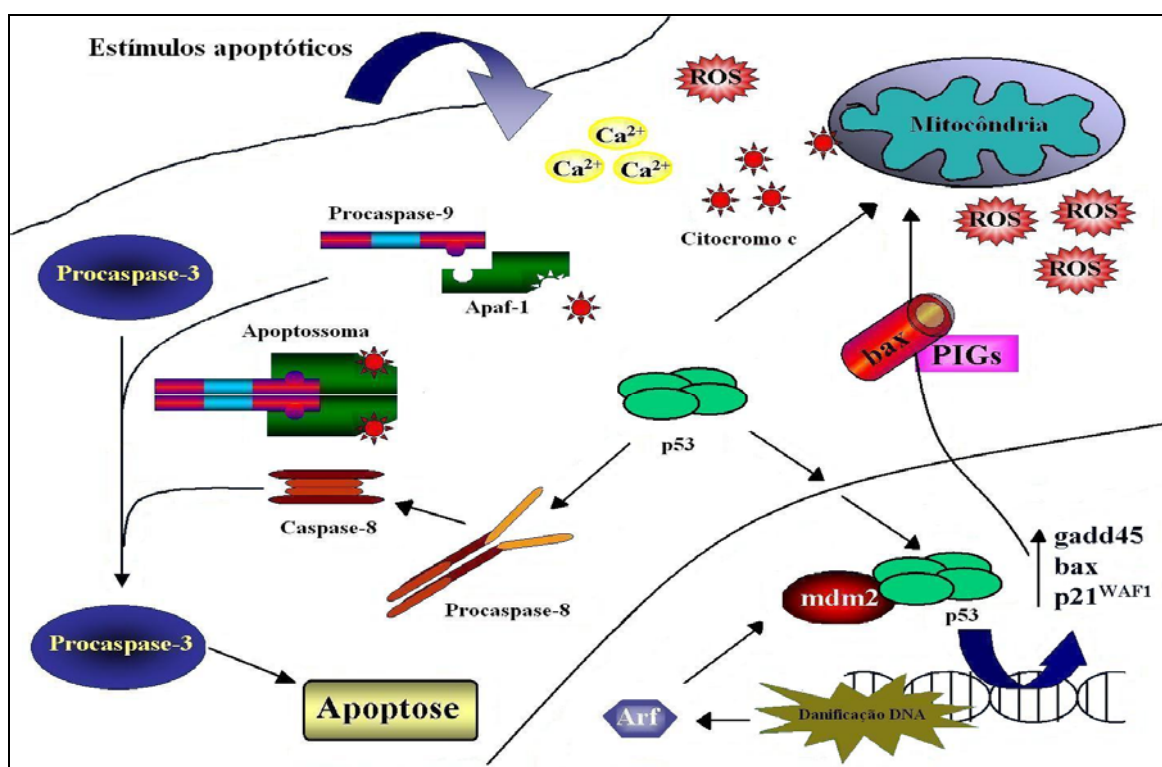


Figura 3 – Envolvimento da proteína Bax no mecanismo de apoptose pela via mitocondrial. Após indução por um estímulo apoptótico, a proteína BAX desloca-se do citoplasma para a mitocôndria onde sofre uma mudança conformacional. Nesse organelo, a BAX induz a abertura do canal de aniões dependente de voltagem (*mitochondrial voltage-dependent anion channel* - VDAC), resultando na perda do potencial da membrana mitocondrial e na libertação do citocromo c e de outros factores pro-apoptóticos, cuja consequência será a activação das caspases e consequente fragmentação nuclear (adaptado de Manfred O, 2007)

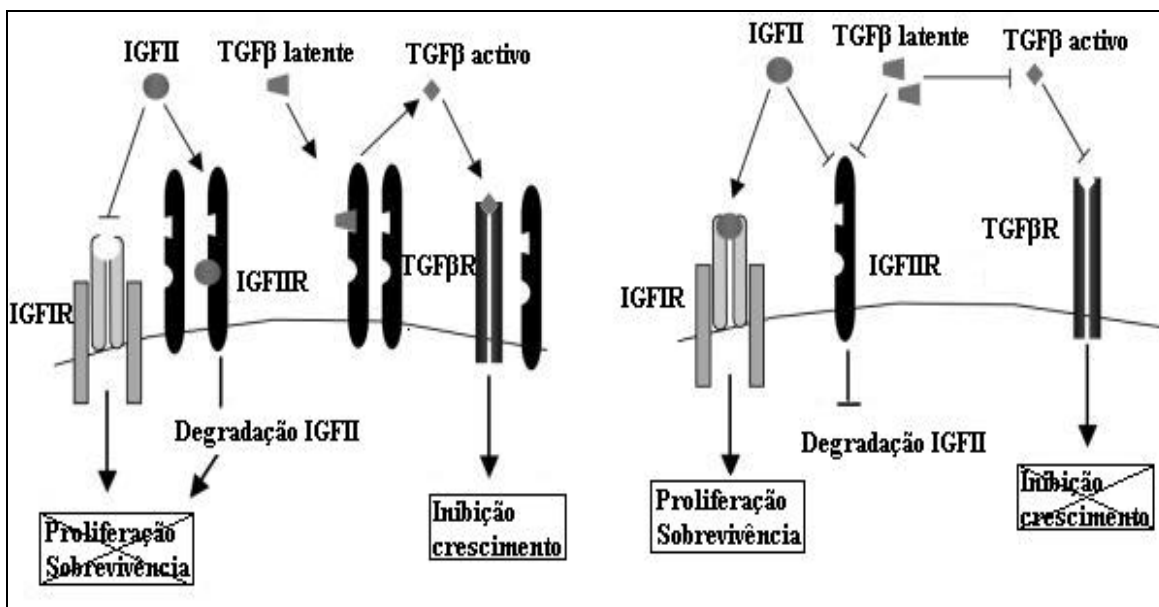


Figura 4 – Mecanismo de ação do IGFII. Este receptor interage quer com o IGFII, participando na sua internalização e degradação, quer com o TGFβ1 latente, estimulando a activação deste factor de crescimento de modo a inibir a proliferação celular. Mutações no IGFIR levam à perda de função deste receptor aumentando a proliferação celular devido à acumulação e activação do IGFII e à subregulação do TGFβ1 (adaptado de Scott *et al*, 2004).

Alguns estudos evidenciaram a existência de mutações *frameshift* nas sequências microssatélite (A)₈ no gene *MSH3* e (C)₈ no gene *MSH6*. A incidência de mutações em CCRs esporádicos com MSI-H varia de 20 a 39% para a sequência (A)₈ e 30 a 40% para a sequência (C)₈ (Malkhosyan *et al*, 1996; Duval *et al*, 1999; Orimo *et al*, 1999). Como foi referido anteriormente, a principal função dos genes do sistema MMR é eliminar erros de emparelhamento ou de inserção/deleção de um ou mais nucleotídeos durante a síntese do DNA. O reconhecimento do erro implica a ligação ao DNA da proteína MSH2 associada sob a forma de um heterodímero com a proteína MSH6 (denominando-se este complexo MutSa) se o erro a reparar está relacionado com erros de incorporação de um nucleotídeo,

ou com a MSH3 (denominando-se MutS β) ou MSH6 se o erro é inserção/deleção de nucleotídeos. Seguidamente, o heterodímero constituído pelas proteínas MLH1 e PMS2 é recrutado pela proteína MutS α ou MutS β para o complexo de reconhecimento do erro, ocorrendo a excisão, re-síntese e ligação do DNA (Peltomaki, 2001a, 2001b; Marti *et al*, 2002) (Figura 5). Uma vez que os genes *MSH3* e *MSH6* têm sido considerados alvos da via de carcinogénese MIN, mutações nestes genes do sistema MMR resultarão na acumulação exarcebada de alterações noutros genes alvo e consequentemente numa instabilidade severa (Orimo *et al*, 1999).

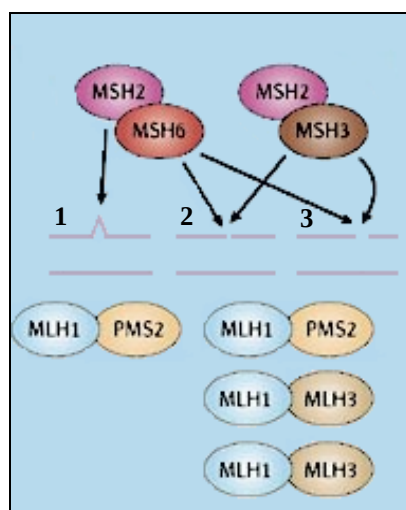


Figura 5 – Reparação de erros de emparelhamento pelo sistema MMR. Quando o erro a reparar está relacionado com erros de incorporação de um nucleotídeo (1), a proteína MSH2 associa-se, sob a forma de um heterodímero, com a proteína MSH6 (denominando-se este complexo MutS α); se o erro é devido a inserção/deleção de um (2) ou mais nucleotídeos (3), a proteína MSH2 também se associa à proteína MSH3 (denominando-se MutS β). Após ligação do heterodímero MutS α ou MutS β ao DNA, é recrutado o heterodímero constituído pelas proteínas MLH1 e PMS2 para o complexo de reconhecimento do erro, ocorrendo a excisão, re-síntese e ligação do DNA (adaptado de Shang, 2006).

O complexo maior de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex* - MHC) possui um papel central na resposta imunitária, tendo como função apresentar os antígenos aos linfócitos T. Existem dois tipos de MHC, o MHC classe I e o MHC classe II. O MHC I é constituído por duas cadeias polipeptídicas: a cadeia α e a cadeia β . A cadeia β interage com a região extracelular da cadeia α por uma ligação não covalente. Estas duas cadeias apresentam homologia estrutural com a imunoglobulina, sendo que a β 2-microglobulina constitui a cadeia β do MHC I (Figura 6) (Abbas *et al*, 1997). O gene β 2M apresenta uma frequência de alterações de 15%, nomeadamente em sequências microssatélite (como a sequência repetitiva (CT)₄ existente no exão 1) (Cabrera *et al*, 2003; Kloor *et al*, 2007). A inactivação do gene β 2M por mutação representa o mecanismo mais comum de perda de expressão do MHC I em CCRs com MSI-H (Bicknell *et al*, 1996; Cabrera *et al*, 2003; Kloor *et al*, 2007).

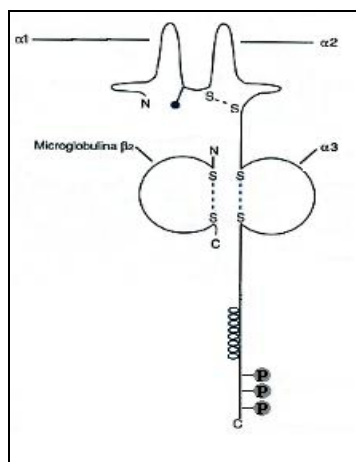


Figura 6 – O MHCI é constituído por duas cadeias polipeptídicas, a cadeia α e a cadeia β , sendo a β 2-microglobulina a cadeia β deste complexo (adaptado do URL: www.virtual.epm.br/material/tis/cunbio/trab99/mhc/estrut.htm).

Apesar da ausência de consenso relativamente à identificação de verdadeiros genes alvo, os geralmente descritos como alvos da via MIN codificam proteínas envolvidas na transdução de sinal (como o *TGF β RII* e o *IGFIR*), na apoptose (como o *BAX*), na reparação do DNA (como o *MSH3* e o *MSH6*) e no sistema imunitário (como a β 2M) (Boland *et al*, 1998; Perucho, 1998).

3.1.3 – Alterações nos proto-oncogenes *KRAS* e *BRAF*

Como foi referido anteriormente, as proteínas da família RAS possuem um papel central na activação de várias cascatas de transdução de sinal. Uma dessas cascatas é a via das MAPKs que medeia a resposta celular a sinais extracelulares que regulam a proliferação, diferenciação celular e a apoptose (Arends, 2000; Takayama *et al*, 2006).

Os genes da família *RAS* (*V-HA-RAS Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog* (*HRAS*), *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog* (*NRAS*) e *KRAS*) codificam proteínas *GTP-binding* de baixo peso molecular. Quando são activados induzem a cascata de transdução de sinal das MAPK, transferindo sinais da membrana celular para o núcleo. As proteínas codificadas pelo gene *RAS* activam proteínas da família RAF, nomeadamente a *V-RAF Murine Sarcoma 3611 Viral Oncogene Homolog* (*ARAF*), *V-RAF Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1* (*BRAF*) e *V-RAF-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1* (*RAF-1*), denominando-se *MAP kinase kinase kinases* (MAPKKKs) devido à sua função de fosforilar e activar as *MAP kinase kinases* (MAPKKs) MEK-1 e MEK-2. As MAPKKs fosforilam subsequentemente as MAPKs ERK-1 e ERK-2, que por

sua vez fosforilam substratos nucleares como os factores de transcrição *V-JUN Avian Sarcoma Virus 17 Oncogene homolog* (JUN) e *Member of ETS Oncogene Family* (ELK1) (Figura 7). A activação destes factores que regulam a transcrição leva à expressão de proteínas que controlam o ciclo celular (KerKhoff *et al*, 1998; Leslie *et al*, 2002; Chong *et al*, 2003).

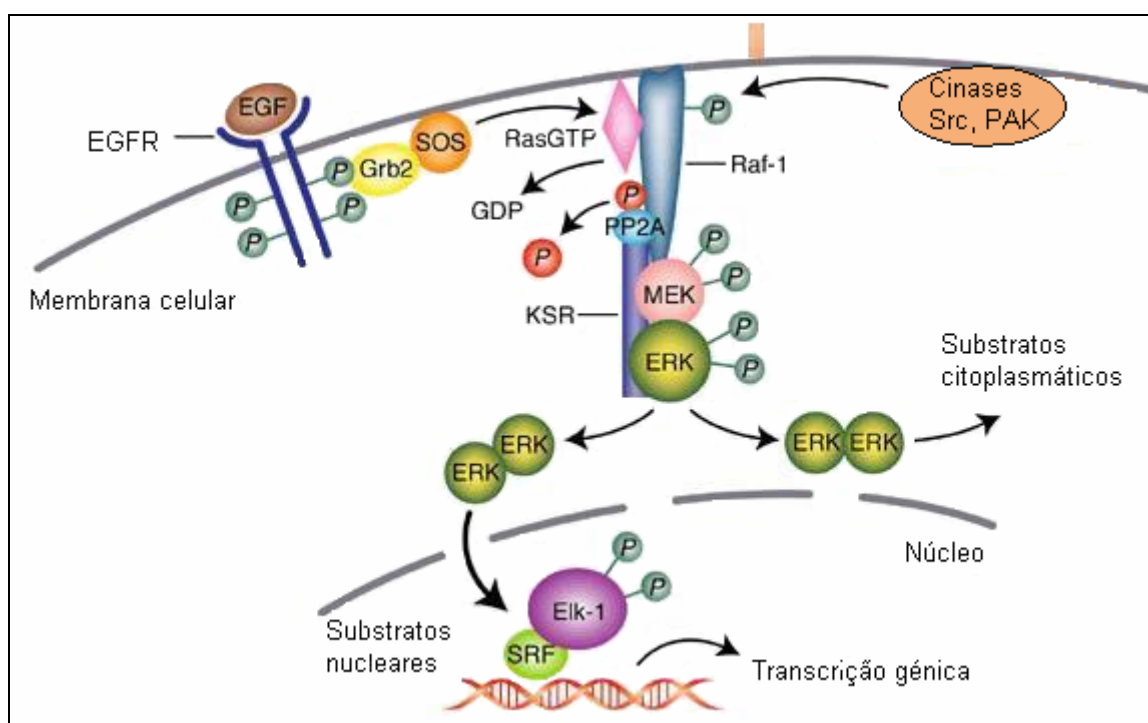


Figura 7 – Via de sinalização das proteínas MAPKs. Após a activação da proteína Ras pela conversão do GDP a GTP, este sofre uma mudança conformacional permitindo a ligação a proteínas da família RAF, nomeadamente a ARAF, BRAF e RAF-1. Estas proteínas activarão por fosforilação as proteínas MEK-1 e MEK-2, fosforilando estas últimas as proteínas ERK-1 e ERK-2, que fosforilam substratos nucleares como os factores de transcrição JUN e ELK1. A activação destes factores que regulam a transcrição leva à expressão de proteínas que controlam o ciclo celular (adaptado de: *The organisation and function of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway in: Expert Reviews in Molecular Medicine 2002 Cambridge University Press*).

A activação desregulada da via de sinalização das MAPKs ocorre como resultado de alterações nos genes que nela participam, nomeadamente nos genes da família *RAS*. O proto-oncogene *RAS* apresenta uma frequência de mutações de aproximadamente 30% nos tumores humanos (Bos, 1989). A presença de alterações nos diferentes genes da família *RAS* varia com o tipo de neoplasias. Assim, mutações no gene *KRAS* ocorrem frequentemente no cancro do pâncreas e CCR, enquanto mutações nos genes *HRAS* e *NRAS* ocorrem com maior frequência no cancro da bexiga e no melanoma, respectivamente (Bos, 1989; Omholt et al, 2003; Calistri *et al*, 2005). A frequência de mutações no gene *KRAS* em CCR esporádico é de 30 a 50%. A activação deste gene é devido frequentemente a mutações nos codões 12, 13 (exão 1) e 61 (exão 2) (Smith *et al*, 2002; van Engeland *et al*, 2002; Calistri *et al*, 2005). De acordo com a literatura, a presença de mutações no gene *KRAS*, nomeadamente transversões, estão associadas ao silenciamento epigenético do gene *O⁶ – methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)*, que codifica uma proteína de reparação do DNA (Esteller *et al*, 2000a; Nagasaka *et al*, 2004)

A activação desregulada da via de sinalização MAPK pode também ser resultado de mutações activadoras nos genes *RAF* (*RAF1*, *ARAF* e *BRAF*). O gene *BRAF* codifica uma proteína serina/treonina cinase da via de sinalização das MAPK. Recentemente, tem sido descrito em CCR esporádico mutações no gene *BRAF* numa frequência de 3,7% a 12% (Davies *et al*, 2002; Koinuma *et al*, 2004; Nagasaka *et al*, 2004; Maestro *et al*, 2007). Cerca de 80% das mutações no gene *BRAF* em CCR ocorrem no domínio cinase (exão 15) e resultam na substituição do aminoácido valina pelo glutamato no codão 600 (V600E). Vários estudos sugerem que esta mutação é biologicamente distinta de outras que ocorrem neste gene devido ao facto das células que possuem esta mutação conseguirem crescer

mesmo quando a proteína RAS não está funcional (Davies *et al*, 2002; Yuen *et al*, 2002; Koinuma *et al*, 2004). Além disso a presença desta mutação em CCR está inversamente associada a mutações no gene *KRAS* (Domingo *et al*, 2004; Koinuma *et al*, 2004). Por outro lado, estão descritas alterações no gene *BRAF* em tumores da via MIN com hipermetilação do promotor do gene *MLH1*, mas não em CCRs associados a mutações germinativas nos genes do sistema MMR (Wang *et al*, 2003; Domingo *et al*, 2004, 2005; Miyaki *et al*, 2004).

Mutações nos genes *KRAS* e *BRAF* podem resultar na activação desregulada da via de sinalização MAPK, e consequentemente aumentar a proliferação celular e a inibição da apoptose, contribuindo para o desenvolvimento neoplásico (Arends, 2000; Yuen *et al*, 2002; Takayama *et al*, 2006).

3.1.4 – Carcinogénese do CR

Os raros estudos moleculares que analisaram as vias de carcinogénese do CR demonstraram que, tal como no CC, esta neoplasia pode desenvolver-se, predominantemente, segundo a via CIN ou a via MIN (Kapiteijn *et al*, 2001; Colombino *et al*, 2002; Fernebro *et al*, 2002). Porém, está descrito para o recto um predomínio de tumores aneuplóides, com baixa frequência de MSI e presença de mutações nos genes *TP53*, *KRAS* e β -*catenin* (Kapiteijn *et al*, 2001; Fernebro *et al*, 2002). Estes dados evidenciam que o CR se desenvolve, predominantemente, segundo a via CIN, estando descrita uma frequência de cerca de 80 a 98% (Fernebro *et al*, 2002; Gervaz *et al*, 2002). A frequência de mutações no gene *APC*, *KRAS* e *TP53* no CR é de aproximadamente 46 a

82%, 21 a 39% e 51 a 68% respectivamente (Smith *et al*, 2002; Worthley *et al*, 2007).

Segundo a bibliografia, a frequência de MSI-H no CR varia entre 1 a 10% (Nilbert *et al*, 1999; Colombino *et al*, 2002). Alguns autores referem que parte dos doentes que apresentam neoplasias com este tipo de alteração possui uma predisposição genética para o seu desenvolvimento (Nilbert *et al*, 2001; Colombino *et al*, 2002; Fernebro *et al*, 2002).

Relativamente ao gene *BRAF*, os estudos são escassos no que concerne o CR, mas parece apresentar uma frequência de mutações inferior em relação ao CC. Calistri *et al* (2005) detectou uma frequência de mutações de 4%, enquanto Maestro *et al* (2007) não detectou mutações neste gene em CR.

3.2 – Alterações no genoma mitocondrial

3.2.1 – Alterações no genoma mitocondrial em CCR

Nos últimos anos vários estudos têm descrito, para além de alterações no genoma nuclear (DNAn), alterações no genoma mitocondrial (DNAm) em diversas neoplasias humanas, nomeadamente no CCR, bem como no cancro do estômago, mama, fígado, e prostata (Habano *et al*, 1998; Bianchi *et al*, 2001; Sanchez-Cespedes *et al*, 2001; Lee *et al*, 2004).

A mitocôndria é um organelo semi-autónomo com funções essenciais no metabolismo celular e na regulação da apoptose. Possui o seu próprio genoma e toda a maquinaria necessária para a transcrição, tradução e produção de proteínas. O genoma

mitocondrial humano é uma molécula de DNA circular de dupla cadeia com 16569 pares de bases, que codifica 13 polipéptidos componentes da cadeia respiratória, dois RNAs ribossômicos e 22 RNAs de transferência (Figura 8) (Anderson *et al*, 1981; Andrews *et al*, 1999).

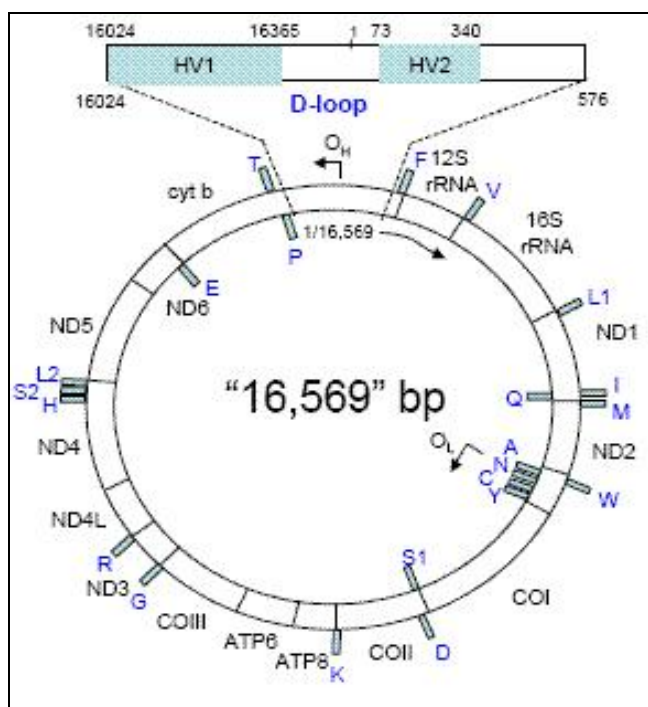


Figura 8 – Mapa do genoma mitocondrial humano. Este é constituído por genes que codificam proteínas da cadeia respiratória, nomeadamente: sete subunidades do complexo NADH desidrogenase (ND), uma subunidade do citocromo *c* oxidoreductase (Cyt *b*), três subunidades do citocromo *c* oxidase (CCO), e duas subunidades de ATP sintetase (ATP). Codifica também dois RNAs ribossômicos (12S e 16S, e 22 RNAs de transferência (indicados por letras). Estão também indicados a origem de replicação da cadeia leve (O_L) e da cadeia pesada (O_H) e o *Displacement loop* (D-loop) (adaptado de Butler, 2005).

Cada mitocôndria possui duas a dez cópias do seu genoma, apresentando uma taxa de mutação 10 a 20 vezes superior à do DNA nuclear, devido essencialmente à ausência de

histonas, a mecanismos de reparação limitada, baixa *proofreading* da polimerase γ e à presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Bianchi *et al*, 2001; Carew *et al*, 2002). Vários autores têm estudado o envolvimento da instabilidade mitocondrial (mtMSI) na carcinogénese colo-rectal (Polyak *et al*, 1998; Habano *et al*, 1998, 1999). O genoma mitocondrial possui duas sequências microssatélites na região do D-loop: uma sequência dinucleotídica (CA)_n e uma sequência mononucleotídica (C)_n, (denominada D310), para a qual está descrita uma frequência de alterações de 28 a 44%. Tal facto sugere que este local é um *hotspot* mutacional e que estas alterações podem ter um impacto ao nível da função da mitocôndria, uma vez que nesta região do D-loop se situa a origem de replicação e vários promotores da transcrição do DNAm (Habano *et al*, 1998, 1999; Bianchi *et al*, 2001).

O DNAm apresenta também sequências microssatélite em regiões codificantes de genes como o *NADH dehydrogenase 1* (ND1), 2 (ND2) e 5 (ND5), estando descritas mutações nas sequências microssatélites (C)₆ e (A)₈ do gene ND5 e na sequência (C)₆ do gene ND1. Alguns autores sugerem que os genes ND1 e ND5 são genes alvo da mtMSI nos CCRs, situação similar à do genoma nuclear, onde se observam preferencialmente mutações nos genes *TGF β R2*, *BAX* e *IGFIR* em CCRs com MSI-H. Os produtos codificados pelos genes ND5 e ND1 são subunidades do complexo NADH desidrogenase. Mutações nestes genes resultam em alterações da cadeia respiratória e na consequente libertação de níveis elevados de ROS, podendo danificar o DNA nuclear e mitocondrial, constituindo um possível mecanismo de iniciação e/ou progressão da carcinogénese colo-rectal (Habano *et al*, 1998, 1999). Apesar de controverso, está descrito em alguns tipos de carcinomas, nomeadamente nos carcinomas renais, o envolvimento de alterações no

metabolismo oxidativo na sua patogénese, como consequência de mutações em genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais, como por exemplo a fumarato hidratase (Alam *et al*, 2003).

3.2.2 – Alterações no genoma mitocondrial em CR

Os estudos que discriminam cólon de recto relativamente a alterações em sequências específicas do DNAm são escassos. Contudo, segundo dois estudos recentes, a frequência de mutações na sequência D310 é cerca de 28,4 a 31% no CR (Guleng *et al*, 2005; Lievre *et al*, 2005). No que concerne a alterações em sequências microsatélite em regiões codificantes de genes, Guleng *et al* (2005) estudou a frequência de mutações nas sequências (C)₆ e (A)₈ do gene *ND5* e na sequência (C)₆ do gene *ND1*, não detectando mutações nos CR analisados.

Como o processo de carcinogénese no recto parece envolver, pelo menos em parte, mecanismos diferentes dos do cólon, nomeadamente os do cólon direito, considerou-se relevante avaliar em detalhe a importância para a carcinogénese rectal de alguns dos mecanismos genéticos acima descritos.

Objetivos

Este trabalho teve como objectivo principal caracterizar alterações no genoma nuclear e mitocondrial numa série consecutiva de CRs esporádicos.

Relativamente ao genoma nuclear pretendeu-se avaliar os seguintes parâmetros:

- frequência de instabilidade de microssatélites;
- frequência de mutações em sequências microssatélites dos genes *TGF β RII*, *BAX*, *IGFIIR*, *MSH3*, *MSH6* e *β 2M*;
- frequência de mutações no exão 15 do gene *BRAF*;
- frequência de mutações no exão 1 do gene *KRAS*.

Relativamente ao genoma mitocondrial pretendeu-se avaliar:

- a presença de alterações na sequência microssatélite D310 e nas sequências microssatélite (C)₆ do gene *ND1* e (C)₆ e (A)₈ do gene *ND5*.

Os resultados obtidos foram comparados com os descritos na literatura para CC e CR. Contudo, dada a escassez de estudos relativamente ao genoma mitocondrial, foram também analisados 25 carcinomas esporádicos do cólon sigmóide admitidos no Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil.

Material e Métodos

1 – Material biológico

No presente estudo foram analisados 38 amostras de carcinoma do recto, obtidas por ressecção cirúrgica realizada no Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, bem como o sangue periférico ou mucosa normal respectiva. Todos os fragmentos de tecido foram fixados em formaldeído 10% e incluídos em parafina. Cortes histológicos do material incluído em parafina e corado com hematoxilina e eosina (H&E) foram revistos por um patologista para confirmação do diagnóstico de carcinoma rectal e avaliação das características histopatológicas. Foram considerados carcinomas do recto as lesões que ocorreram até 15 cm a partir da margem anal.

Foram também analisados 25 amostras de carcinoma do cólon sigmóide, obtidas por ressecção cirúrgica realizada no Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, em conjunto com o sangue periférico ou mucosa normal respectiva.

A história clínica destes doentes foi obtida a partir da consulta dos respectivos processos clínicos. As características clínicas da presente série estão apresentadas na tabela 1. No estadiamento dos tumores foram utilizados os critérios do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC).

Nenhum dos doentes incluídos nesta série apresentava história familiar sugestiva das síndromes FAP ou HNPCC.

Tabela 1 – Características clínicas dos doentes com carcinoma do recto ou do sigmóide.

Características	Nº de doentes com carcinoma do recto (%)	Nº de doentes com carcinoma do sigmóide (%)
Total de indivíduos analisados	38	25
Sexo:		
Feminino	20 (52,6)	10 (40)
Masculino	18 (47,4)	15 (60)
Idade		
Média	60	61
Amplitude	34-79	47-78
Estádio		
I	7 (18,4)	2 (8,3)
II	14 (36,8)	15 (62,5)
III	13 (34,2)	4 (16,6)
IV	4 (10,5)	3 (12,5)
Tratamento		
Cirurgia	5 (13,2)	11 (44)
Cirurgia + quimioterapia	12 (31,6)	14 (56)
Cirurgia + radioterapia	5 (13,2)	0 (0)
Cirurgia + quimioterapia + radioterapia	16 (42,1)	0 (0)

2 – Métodos

2.1 – Extracção de DNA a partir de cortes histológicos

2.1.1 – Microdissecção manual das áreas de tecidos neoplásico e normal

A partir da análise dos cortes histológicos corados com H&E, um patologista

delimitou uma área tecidular onde estava assegurada a presença de pelo menos 80% de células tumorais. Em seguida, realizaram-se cortes em série de 10 µm do respectivo bloco de parafina do caso, estenderam-se em lâminas revestidas com Poli-L-lisina [Sigma Chemical Co.®] 0,1%, e foram posteriormente secos a 37°C *overnight*. Por sobreposição aos cortes corados com H&E onde tinha sido delimitada a área da neoplasia, realizou-se a microdissecção nos cortes de 10 µm.

Nos casos de CR e de CS sem sangue periférico correspondente foi analisada a mucosa normal. Para tal, um patologista delimitou uma área de tecido normal nos cortes histológicos corados com H&E. Em seguida, efectuou-se o procedimento usado no tecido tumoral.

2.1.2 – Extracção de DNA de tecidos neoplásico e normal incluídos em parafina

Procedeu-se à extracção de DNA dos cortes histológicos utilizando uma adaptação do método de Lungu *et al* (1992). As lâminas foram colocadas numa estufa a 55-60°C durante 10 min, de modo a derreter a parafina que envolvia os cortes. Preparou-se o tampão de lise (volume total de 1 mL) com 50 µL de Tris-HCl [SIGMA No T-3523] 1M (pH 8,5), 10 µL de EDTA [E-5134], 5 µL de Tween 20 [GIBCO BRL 9005-64-5] e 935 µL de água bidestilada [Braun]. Colocando uma gota desse tampão sobre os cortes, de modo a humedecê-los, raspam-se as zonas de tecido tumoral previamente delimitadas. As amostras foram colocadas em tubos *ependorf*, onde se adicionaram 75 µL de tampão de lise e 4 µL de proteinase K [GIBCO BRL

P2308] (10 mg/mL), incubando-se depois a 55°C durante 2 horas. Após este período, inibiu-se a proteinase K a 95°C, durante 10 min. Colocaram-se os tubos *ependorf* em gelo durante cerca de 15 min e posteriormente centrifugaram-se a 14000 rpm durante 5 min. Retirou-se o máximo de sobrenadante para um outro tubo *ependorf* de 1,5 mL e adicionou-se 30 µL de água bidestilada [Braun] ao *pellet* obtido. A qualidade do DNA extraído foi avaliada através de electroforese em gel de agarose [GIBCO BRL 15510-027] 0,8% (p/v), corado com solução de brometo de etídeo [SIGMA E7637] 5µg/µL.

2.2 – Extracção de DNA de sangue periférico

2.2.1 – Isolamento de células nucleadas a partir de sangue periférico

As amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos esterilizados, contendo o anticoagulante EDTA e conservadas a 4°C para uso imediato ou a -80°C quando guardadas por períodos longos.

De modo a obter a lise dos eritrócitos, adicionou-se uma solução hipotónica (AKE: NH₄Cl [Merck1.01145] 155 mM; KHCO₃ [Merck48540] 10 mM; EDTA [Sigma E-5134] 0,1 mM; pH=7,4) a 3-5 mL de sangue numa proporção de 9 a 10 vezes esse volume, seguida de incubação a 4°C durante 30 min. As amostras foram, então, centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min [centrifuga Sigma 4K15]. Removeu-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento anteriormente descrito até que o sedimento ficasse livre de hemoglobina. Por fim, desprezou-se novamente o sobrenadante e transferiram-se os *pellets* contendo as células nucleadas para

tubos *ependorfs*. Adicionou-se mais uma vez AKE e centrifugou-se a 4000 rpm durante 5 min [microcentrifuga eppendorf-5417R]. Retirou-se o sobrenadante e armazenou-se a -80°C até extracção do DNA.

2.2.2 – Extracção de DNA de células nucleadas isoladas a partir de sangue periférico

O isolamento do DNA genómico foi efectuado pela técnica mista *salting-out*-clorofórmio (Müllenbach *et al*, 1989) a partir de células nucleadas de sangue periférico. Este protocolo combina a técnica clássica de extracção fenol/clorofórmio com a técnica de *salting-out*, eliminando, assim, as desvantagens da utilização de fenol e das múltiplas transferências do DNA da técnica clássica, e a perda de DNA por precipitação com as proteínas na técnica de *salting-out*.

Ao precipitado de células nucleadas adicionou-se 500 µL de tampão SE (NaCl [Merck 1 06404 1000] 6 M; EDTA [Sigma E-5134] 0,5 M; pH=8,0) e 25 µL de SDS [GIBCO BRL 15525-025] (10%), misturou-se vigorosamente e adicionou-se 40 µL de proteinase K [GIBCO BRL P2308] (10 mg/mL). Misturou-se suavemente e incubou-se a 55°C *overnight*. Adicionou-se 125 µL de NaCl [Merck 1 06404 1000] 6 M e voltou-se a incubar a 55°C durante 10 min. Adicionou-se 750 µL de clorofórmio [Merck 1 02445 1000] e colocou-se a agitar durante 30 min. Centrifugou-se a 14000 rpm a 4°C durante 10 min, recolheu-se o sobrenadante e precipitou-se com um volume de isopropanol [Merck 1 09634 1011]. O DNA obtido foi lavado 2 vezes com etanol [Merck 1

00983 2511] a 70% (v/v) e no final foi eluído em água bidestilada [Braun].

A concentração do DNA extraído de cada amostra foi determinada por leitura espectrofotométrica [espectrofotômetro Pharmacia Biotech-Ultrospec®2000] a 260 nm, tendo como referência que 1 unidade de densidade óptica a 260 nm corresponde, aproximadamente, a 50 µg/mL de DNA de cadeia dupla. Simultaneamente verificou-se o grau de contaminação proteica, calculando o valor da razão Abs260 nm/Abs280 nm, sendo os valores localizados no intervalo 1,65-2,00 considerados aceitáveis.

2.3 – Análise de sequências microssatélite

2.3.1 – Avaliação da instabilidade de microssatélites

Para avaliar a instabilidade de microssatélites (*Microsatellite instability* - MSI) utilizou-se a reacção em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR) com *primers* específicos para cada *locus*, marcados com um determinado fluorocromo, que flanqueiam as diferentes sequências microssatélite, mono e dinucleotídicas. Os tumores foram classificados como *Microsatellite Instability High* (MSI-H) quando apresentavam instabilidade em $\geq 30\%$ dos *loci* analisados, *Microsatellite Instability Low* (MSI-L) quando apresentavam instabilidade em $< 30\%$ dos *loci* analisados e *Microsatellite Stable* (MSS) quando não apresentavam instabilidade nos *loci* analisados,

Os marcadores de instabilidade de microssatélites utilizados neste estudo (painel recomendado pelo ICG-HNPCC: BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S250; e na

ausência de controlo normal correspondente: BAT25, BAT26, NR21, NR22 e NR24), a sequência dos *primers* e respectivas temperaturas de *annealing* estão discriminados na tabela 2 (Weber *et al*, 1990; Spirio *et al*, 1991; Weissenbach *et al*, 1992; Papadopoulos *et al*, 1995; Boland *et al*, 1998; Suraweera *et al*, 2002).

Tabela 2 – Marcadores microssatélites utilizados na análise de MSI e respectivos *primers*.

Marcador	Localização cromossômica (gene)	Sequência dos <i>primers</i> 1 - <i>forward</i> 2 - <i>reverse</i>	Fluorocromo	Temperatura <i>annealing</i> (°C)	Produto de amplificação (bp)
BAT25	4q12 (<i>CKIT</i>)	1 - TCGCCTCCAAGAATGTAAGT 2 - TCTGCATTTTAACTATGGCTC	6-FAM	55	110-130
BAT26	2p16.3p21 (<i>MSH2</i>)	1 - TGACTACTTTTGACTTCAGCC 2 - AACCATTCAACATTTTAAACCC	TET	58	100-120
D2S123	2p16 (<i>MSH2</i>)	1 - AAACAGGATGCCTGCCTTTA 2 - GGACTTTCCACCTATGGGAC	6-FAM	55	200-230
D5S346	5q21/22 (<i>APC</i>)	1 – ACTCACTCTAGTATAAATCGGG 2 – AGCAGATAAGACAAGTATTACTAGTT	HEX	55	100-130
D17S250	17q11.2-q12 (<i>BRC1</i>)	1 – GGAAGAATCAAATAG ACAAT 2 – GCTGGCCATATATATATTTAAACC	TET	55	140-170
NR21	14q11.2 (<i>SLC7A8</i>)	1 – TAAATGTATGTCTCCCCTGG 2 – ATTCCTACTCCGCATTACACA	HEX	55	103
NR22	11q23.3 (<i>ITM1</i>)	1 – GAGGCTTGTC AAGGACATAA 2 – AATTCGGATGCCATCCAGTT	FAM	55	142
NR24	2q11.2 (<i>ZNF-2</i>)	1 – CCATTGCTGAATTTTACCTC 2 – ATTGTGCCATTGCATTCCAA	HEX	55	132

Nota: 6-FAM – 6-carboxifluoresceína; TET – 4,7,2',7'-tetracloro-6-carboxifluoresceína; HEX – 4,7,2',4',5',7'-Hexacloro-6-Carboxifluoresceína.

A reacção de amplificação ocorreu num volume total de 20 µL de uma solução contendo: 2 µL de *Taq reaction buffer* [Perkin-Elmer 55603-11/95] (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl), 1,5 µL de MgCl₂ [Perkin-Elmer 55611-1/93] (1,5 mM), 1,2 µL de dNTP's [Perkin-Elmer no-36227510017] (250 µM dTTP, 250 µM dATP, 250 µM dGTP, 250 µM dCTP), 2 µL de cada *primer* [GibcoBRL] (0,5 µM), 0,1 µL de *Taq DNA polymerase* [Perkin-Elmer part.no.N808-0101] (0,2 U) e 30 a 50 ng de DNA genómico, perfazendo-se o volume com água bidestilada [Braun].

Num termociclador [Perkin-Elmer, Gene Amp PCR System 9700] as amostras foram sujeitas a uma desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificação de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* à temperatura indicada para cada marcador (ver tabela 2) e 90 segundos de extensão a 72°C. A extensão final desenvolveu-se a 72°C durante 10 min. A verificação dos produtos amplificados realizou-se por electroforese em gel de agarose [GIBCO BRL 15510-027] 2% (p/v) e corado com solução de brometo de etídeo [SIGMA E7637] 5 µg/µL.

A 25 µL de formamida [Merk 1.12027] e 1 µL de *standard TAMRA (internal fluorescence size standard - N,N,N,N'-tetrametil-6-carboxiroadamina)* [PE Applied Biosystems 401733], adicionou-se 1 µL do produto de PCR, homogeneizando-se suavemente. Após desnaturação a 95°C durante 5 min, os produtos de PCR foram sujeitos a análise de fragmentos num sequenciador automático *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser* [PE Applied Biosystems 310-00-100/120-W]. Esta técnica consiste em submeter as amostras a uma electroforese em coluna capilar, contendo um polímero onde os diferentes oligonucleótidos migram consoante o respectivo peso molecular. O aparelho regista os espectros de emissão construindo um diagrama.

Foram considerados positivos os tumores que apresentavam diferente mobilidade electroforética, quando comparados com o respectivo controlo normal. Todos os *loci* que apresentavam MSI foram confirmados com mais uma reacção de PCR seguida de análise de fragmentos.

2.3.2 – Pesquisa de alterações em sequências microssatélites nos genes *TGF β RII*, *BAX*, *IGFIIR*, *MSH3*, *MSH6* e *β 2M*

Na análise de instabilidade nas sequências repetitivas dos genes *TGF β RII* (nomeadamente na sequência (A)₁₀), *BAX* (na sequência (G)₈), *IGFIIR* (na sequência (G)₈), *MSH3* (na sequência (A)₈), *MSH6* (na sequência (C)₈) e *β 2M* (na sequência (CT)₄), foram utilizados marcadores específicos de cada *locus*. A sequência dos *primers* e respectivas temperaturas de *annealing* estão discriminados na tabela 3 (Malkhosyan *et al*, 1996; Oliveira, *et al* 1998).

A análise destes *loci* foi realizada por PCR e análise de fragmentos, segundo as condições acima descritas (ver capítulo 2.3.1). Foram considerados positivos os casos que apresentavam diferente padrão electroforético, quando comparados com o respectivo controlo normal.

Tabela 3 – Características das sequências microssatélites dos genes *TGFβRII*, *BAX*, *IGFRII*, *MSH3*, *MSH6* e *β2M* e respectivos *primers*.

Gene (exão)	Tipo de repetição	Sequência dos <i>primers</i> 1 - <i>forward</i> 2 - <i>reverse</i>	Fluorocromo	Temperatura <i>annealing</i> (°C)	Produto de amplificação (bp)
<i>TGFβRII</i> (1)	(A) ₁₀	1 - AGATGCTGCCTTCCTCCAAAGTGC 2 - TTGCACTCATCAGAGCTACAGG	HEX	60	90
<i>BAX</i> (3)	(G) ₈	1 - ATCCAGGATCGAGCAGGGCG 2 - ACTCGCTCAGCTTCTTGGTG	HEX	62	94
<i>IGFIR</i> (28)	(G) ₈	1 - GCAGGTCTCCTGACTCAGAA 2 - GAAGAAGATGGCTGTGGAGC	TET	55	110
<i>MSH3</i> (8)	(A) ₈	1 - TGACTGATACTTCTACCAGC 2 - AACATTTGTTCTCCTCACCTGC	TET	55	122
<i>MSH6</i> (5)	(C) ₈	1 - GGGTGATGGTCCTATGTGTC 2 - CGTAATGCAAGGATGGCGT	6-FAM	55	94
<i>B2M</i> (1)	(CT) ₄	1 - GCGTTTAATATAAGTGGAGGCG 2 - GAGAGAAGGACCAGAGCGG	6-FAM	55	169

Nota: HEX – 4,7,2',4',5',7'-Hexafluoro-6-Carboxifluoresceína ; TET – 4,7,2',7'-tetrafluoro-6-carboxifluoresceína; 6-FAM – 6-carboxifluoresceína.

2.4 – Pesquisa de mutações no exão 15 do gene *BRAF* e no exão 1 do gene *KRAS*

2.4.1 – Sequenciação

A pesquisa de mutações no exão 15 do gene *BRAF* e no exão 1 do gene *KRAS* foi efectuada por sequenciação baseada no método de Sanger.

Para tal, procedeu-se a uma primeira reacção de amplificação numa solução contendo: 2,5 µL de *Taq reaction buffer* [Perkin-Elmer 55603-11/95] (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl), 2,0 µL de MgCl₂ [Perkin-Elmer 55611-1/93] (1,5 mM), 1,0 µL de dNTP's [Perkin-Elmer no-36227510017] (250 µM dTTP, 250 µM dATP, 250 µM dGTP, 250 µM dCTP), 1 µL de cada *primer* [GibcoBRL] (0,5 µM), 0,2 µL de *Taq DNA polymerase* [Perkin-Elmer part.no.N808-0101] (0,2 U) e 30 a 50 ng de DNA genómico, perfazendo o volume de 20 µL com água bidestilada [Braun]. A sequência dos *primers* e respectivas temperaturas de *annealing* estão discriminados na tabela 4 (Davies *et al*, 2002).

Tabela 4 – *Primers* usados na pesquisa de mutações no exão 15 do gene *BRAF* e no exão 1 do gene *KRAS*.

Gene (exão)	Sequência dos <i>primers</i>	Temperatura <i>annealing</i> (°C)	Produto de amplificação (bp)
<i>BRAF</i> (15)	1 – TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA 2 – GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA	56	224
<i>KRAS</i> (1)	1 – GACTGAATATAAACTTGTGG 2 – CTATTGTTGGATCATATTCG	55	107

Num termociclador [Perkin-Elmer, Gene Amp PCR System 9700] as amostras foram sujeitas a uma desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificação de: 1 min de desnaturação a 94°C; 1 min de *annealing* à temperatura descrita na tabela 4 e 2 min de extensão a 72°C. A extensão final desenvolveu-se a 72°C durante 10 min. A verificação dos produtos amplificados realizou-se por electroforese em gel de agarose [GIBCO BRL 15510-027] 2% (p/v) e corado com solução de brometo de etídeo [SIGMA E7637] 5 µg/µL.

De seguida, o produto de PCR obtido foi purificado com o *GFX PCR DNA and Gel*

Band Purification Kit [GE Healthcare 27-9602-01] de modo a remover os sais, enzimas, nucleótidos e *primers* não incorporados. As amostras foram purificadas de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante e eluídas em água bidestilada [Braun]. O produto purificado foi quantificado através de uma nova electroforese em gel de agarose [GIBCO BRL 15510-027] 2% (p/v) e corado com solução de brometo de etídeo [SIGMA E7637] 5 µg/µL.

Na reacção de sequenciação usaram-se 30 a 90 ng de DNA purificado com 4 µL de *Terminator Ready Reaction Mix* [Applied Biosystems part nº 4336774] (dNTPs, ddNTPs-fluorocromos, MgCl₂, Tris-HCl buffer), 0,7 µL de primer e água bidestilada [Braun] até perfazer o volume de 20 µL. Esta reacção, realizada num termociclador, consistiu numa desnaturação inicial a 96°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 96°C durante 10 segundos, *annealing* a 52°C durante 5 segundos e extensão a 60°C durante 4 minutos.

O produto de sequenciação foi purificado de modo a remover o excesso de dNTPs, ddNTPs marcados e *primers* não incorporados. Para tal, adicionou-se a cada produto de sequenciação 2 µL de acetato de sódio [Merck 1.06267] 3 M e 50 µL de etanol [Merck 1 00983 2511] a 96% (v/v). Agitaram-se os tubos *eppendorfs* num vórtex e colocaram-se em gelo durante 30 min. De seguida, centrifugaram-se as amostras a 14000 rpm durante 30 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e de modo a lavar o DNA adicionou-se ao precipitado 250 µL de etanol [Merck 1 00983 2511] a 70% (v/v). Centrifugaram-se novamente as amostras a 14000 rpm durante 20 min. Desprezou-se novamente o sobrenadante e deixou-se secar o precipitado à temperatura ambiente.

O precipitado foi eluído em formamida desionizada [Applied Biosystems part nº 4311320] e, após desnaturação a 95°C durante 5 min, colocaram-se as amostras num sequenciador

automático *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser* [Applied Biosystems part nº 310-00-100/120-W]. Neste aparelho os produtos de sequenciação são submetidos a uma electroforese em coluna capilar. Os diferentes oligonucleótidos migram consoante o respectivo peso molecular e o aparelho regista os espectros de emissão enviados construindo um diagrama que depois de analisado indica a sequência do DNA estudado.

2.4.2 – *Single stranded conformation polymorphism*

Como foi referido anteriormente, a pesquisa de mutações no exão 1 do gene *KRAS* foi efectuada por sequenciação directa. Contudo, um caso apresentava duas mutações e, de modo a esclarecer se ocorreram no mesmo alelo foi utilizada a técnica de *Single stranded conformation polymorphism* (SSCP). O objectivo era extrair o DNA das bandas com padrão alterado, reamplificar e sequenciar. Para tal, procedeu-se à amplificação do DNA genómico segundo as condições descritas anteriormente. Seguidamente, diluíram-se os produtos da amplificação na proporção 1:1 num tampão desnaturante (constituído por formamida desionizada [BioGene FORMD0003], xileno cianol [Sigma X4126] a 0,025% e azul bromofenol [Sigma B-6131 a 0,025%) e colocaram-se a 97°C durante 7 min. Os produtos de PCR foram sujeitos a electroforese no gel de poliacrilamida *Mutation Detection Enhancement* (MDE [Cambrex Cat n ° 50620]) à concentração 1x para um volume final de 30mL (ver tabela 5). A electroforese foi efectuada a 23W durante 3 horas em solução tampão TBE 1x ($C_4H_{11}NO_3$ [SIGMA 066K5426]; EDTA [SIGMA 035K0119]; H_3BO_3 [MERCK 1.00165.1000]) a 8°C, usando o sistema *Protean II xi Cell* [Bio-Rad]. Os géis foram corados com o método de nitrato de prata

de acordo com as especificações do *DNA Silver Staining Kit* [Pharmacia Biotech Cat n ° 17-6000-30].

Tabela 5 – Componentes e respectivas quantidades do gel de poliacrilamida usado na técnica de SSCP.

Componente	Volume
Solução do gel MDE [Cambrex Cat n ° 50620]	15mL
TBE 10x	1.8mL
TEMED [Sigma T7024]	12 µL
APS 10% [Sigma A9164]	120µL
Água destilada [Braun]	13.08mL

No caso com padrão alterado foi extraído DNA da banda correspondendo ao alelo mutado. Para tal, utilizou-se um protocolo adaptado do descrito por Abbaszadegan *et al* (2003) (<http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/DNA-extraction-from-Mutation-Detection-Enhancement--MDE--Gel-Stained-with-Silver-Nitrate-2826.html>). Para tal, adicionou-se 300 µL de uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamil [Sigma P-3803] numa proporção de 25:54:1 e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 min. Seguidamente colocou-se a 100°C durante 15 min e centrifugou-se a 14000 rpm durante 1 min. Retirou-se o sobrenadante para outro tubo *ependorf* e, de modo a precipitar o DNA, adicionou-se 3,5 volumes de etanol [Merck 1 00983 2511] a 100% (v/v), 1/10 do volume de acetato de sódio [Merck 1.06267] 3 M e 10 µL de glicogénio [Roche 901393] (10mg/mL) seguido de uma incubação a -70°C durante 30 min. Procedeu-se a uma centrifugação a 14000 rpm durante 10 min e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol [Merck 1 00983 2511] a 70% (v/v) e no final foi eluído em água bidestilada [Braun]. O DNA foi reamplificado e sequenciado segundo as condições anteriormente referidas (ver capítulo 2.4.1).

2.5 – *Methylation Specific – Multiplex Ligation Probe Amplification*

A análise de metilação do promotor do gene *MLH1* foi efectuada pela técnica de *Methylation Specific-Multiplex Ligation Probe Amplification* (MS-MLPA) de acordo com as instruções do *SALSA MS-MLPA KIT ME001B Tumor suppressor-1* [MRC-Holland]. Este método permite detectar padrões de metilação numa série de genes supressores tumorais, para além da semi-quantificação do número de cópias das sequências analisadas. A sequência na qual a sonda MS-MLPA híbrida, contém uma região de reconhecimento para a enzima de restrição específica para metilação HhaI. Apenas ocorrerá amplificação da sequência hibridada se após digestão do produto de hibridação a sequência de reconhecimento apresentar metilação.

Para tal, procedeu-se à desnaturação, do DNA das amostra e de um controlo positivo, e hibridação durante 16 horas com as sondas MLPA. Seguidamente o produto de hibridação foi dividido por dois tubos: no primeiro ocorreu a reacção de ligação das sondas hibridadas, seguido de amplificação por PCR; no segundo ocorreu a reacção de digestão com a enzima HhaI em simultâneo com a reacção de ligação, seguido de amplificação por PCR. A análise do produto de amplificação foi realizada por análise de fragmentos em sequenciador automático *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser* [Applied Biosystems part nº 310-00-100/120-W]. Para tal, adicionou-se a 0,75µL do produto de amplificação, 0,75µL de água bidestilada [Braun], 0,5µL de TAMRA [PE Applied Biosystems 401733] e 13,5µL de formamida desionizada [Applied Biosystems part nº 4311320]. A quantificação do estado de metilação foi efectuada pela comparação da área relativa do produto de amplificação da amostra digerida

sob a não digerida. A comparação da área do produto de amplificação de uma amostra de DNA não digerida com o produto de amplificação de uma amostra de DNA de um controlo normal não digerido permitiu detectar ganhos ou perdas no número de cópias das sequências analisadas, tendo-se considerado deleção quando apresentou uma redução de 35 a 50% na área.

2.6 – Pesquisa de alterações no DNA mitocondrial

2.6.1 – Pesquisa de instabilidade na sequência microssatélite D310

Para avaliar alterações na sequência microssatélite D310 utilizou-se a reacção de PCR com *primers* específicos, marcados com um determinado fluorocromo, que flanqueiam esta sequência microssatélite. A sequência dos *primers* e respectiva temperatura de *annealing* está discriminada na tabela 6.

A análise desta sequência foi realizada por PCR e análise de fragmentos, segundo as condições acima descritas. Foram considerados positivos os casos que apresentavam diferente padrão electroforético, quando comparados com o respectivo controlo normal. Os resultados foram confirmados por sequenciação, segundo as condições acima descritas.

Tabela 6 – Características das sequências mitocondriais D310, ND1 e ND5 e respectivos *primers*.

Sequência	Localização mitocondrial (sequência repetitiva)	Sequência dos <i>primers</i>	Fluorocromo	Temperatura	Produto de amplificação (bp)
		1 - <i>forward</i> 2 - <i>reverse</i>		<i>annealing</i> (°C)	
D310 ¹	303-315 (C _n TC _n)	1 – ACAGCCACTTTCCACACAG ^a 2 – TGG TTAGGCTGGTGTAGGG	6-FAM	55	125-127
D310 ²	303-315 (C _n TC _n)	1 – GGACATAATAATAACAATTGAATGTCTGC ^b 2 – GATTAGTAGTATGGGAGTGGGAGGG	–	57	254
ND1	3566-3571 (C ₆)	1 – CCGACCTTAGCTCTCACCAT ^a 2 – AATAGGAGGCCTAGGTTGAG	–	55	100
ND5	12388-12393 (C ₆) 12418-12425 (A ₈)	1 – CTGCTAACTCATGCCCCCA ^b 2 – TGTGGCTCAGTGTTCAGTTCGA	–	56	323

Nota: 6-FAM – 6-carboxifluoresceína. ¹ Análise de fragmentos; ² sequenciação. ^a Descrito na literatura (Guleng *et al*, 2005); ^b Sequência do *primer* elaborada neste estudo pelo programa *Primer Express* (versão 2.0, Applied Biosystems).

2.6.2 – Pesquisa de alterações em sequências microssatélite dos genes *ND1* e *ND5*

As alterações nas sequências microssatélite C(6) do gene *NADH dehydrogenase 1* e C(6) e A(8) do gene *NADH dehydrogenase 5* foram estudadas pela técnica de sequenciação automática, segundo as condições acima descritas.

A sequência dos *primers* e respectiva temperatura de *annealing* está discriminada na tabela 6 (Guleng *et al*, 2005).

2.7 – Análise estatística

O estudo estatístico foi efectuado com o programa informático SPSS (SPSS versão

15). Os resultados foram expressos em frequências absolutas e percentagens. As comparações entre as diferentes variáveis foram efectuadas pelos testes do χ^2 e teste exacto de Fisher quando apropriado. Apenas foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

Resultados

1 – Características clínico-patológicas dos casos de carcinoma do recto e do sigmóide

Neste estudo foram analisados 38 carcinomas do recto (CR) e 25 carcinomas do sigmóide (CS). A relação entre localização tumoral e as características clínico-patológicas estudadas estão discriminadas na Tabela 7.

A análise dos dados demonstrou uma distribuição similar de casos do sexo feminino e masculino pelos dois grupos de doentes. A idade média dos doentes com CR foi de 60 anos e a dos doentes com CS foi de 61, não se tendo verificado diferenças significativas na distribuição da idade pelos dois grupos de doentes (Tabela 7). Verificou-se, também, uma distribuição homogénea pelos diferentes estádios, morfologias e padrões histológicos dos tumores (Tabela 7), apesar de nestas duas últimas características não ter sido efectuada nenhuma análise estatística devido à baixa amostragem. Relativamente ao grau de diferenciação 91,9% e 88% dos casos de CR e de CS, respectivamente, apresentaram-se moderadamente ou bem diferenciados (Tabela 7). Em relação ao padrão de crescimento 86,5% dos casos de CR eram do tipo expansivo enquanto 70,8% dos casos de CS eram do tipo infiltrativo (Tabela 7). Observaram-se diferenças significativas entre os casos de CR e de CS no que respeita à presença de reacção inflamatória no tumor. Nos casos de CR, 86,5% apresentaram uma reacção inflamatória moderada ou marcada enquanto que em 58,4% dos casos de CS esta reacção foi ligeira ou ausente, sendo o valor de $P = 0.0005$ (Tabela 7).

Tabela 7 – Relação entre a localização do tumor e as diferentes características clínico-patológicas dos doentes.

Características dos doentes	Recto N (%)	Sigmóide N (%)	P
Total doentes	38	25	
Sexo			
Feminino	20 (52,6)	10 (40,0)	0,440 ¹
Masculino	18 (47,4)	15 (60,0)	
Idade (anos)			
≤ 60 anos	18 (47,4)	13 (52,0)	0,799 ¹
> 60 anos	20 (52,6)	12 (48,0)	
Estádio ^a			
I/II	21 (55,3)	17 (70,8)	0,288 ¹
III/IV	17 (44,7)	7 (29,2)	
Morfologia do tumor ^b			
Vegetante	2 (5,9)	3 (13,0)	NE
Ulcerada	15 (44,1)	11 (47,8)	
Infiltrativa	1 (2,9)	0 (0,0)	
Ulcerovegetante	10 (29,4)	5 (21,7)	
Ulceroinfiltrativa	5 (14,7)	4 (17,4)	
Mista	1 (2,9)	0 (0,0)	
Grau de diferenciação ^c			
Bem/moderado	34 (91,9)	22 (88,0)	0,678 ¹
Pouco	3 (8,1)	3 (12,0)	
Padrão de crescimento ^d			
Expansivo	32 (86,5)	2 (8,3)	NE
Infiltrativo	5 (13,5)	17 (70,8)	
Misto	0 (0,0)	5 (20,8)	
Variação histológica ^d			
Padrão cribiforme negativo	10 (27,0)	12 (50,0)	NE
Padrão cribiforme positivo	21 (56,8)	11 (45,8)	
Mucinoso	6 (16,2)	1 (4,2)	
Reacção inflamatória ^d			
Ausente/ligeira	5 (13,5)	14 (58,3)	0,0005 ¹
Moderada/marcada	32 (86,5)	10 (41,7)	

Nota: ^a Informação não disponível num caso de CS. ^b Informação não disponível em 4 casos de CR; informação não disponível em 2 casos de CS. ^c Informação não disponível num caso de CR. ^d Informação não disponível num caso de CR e de CS. NE – não efectuado (amostra muito baixa). ¹ Foi efectuado o teste exacto de Fisher.

2 – Análise da instabilidade de microssatélites

Dos 38 casos de CR analisados para MSI, quatro (10,5%) apresentaram MSI-H, cinco (13,2%) MSI-L e os restantes 29 (76,3%) eram MSS. Nos 25 casos de CS analisados, três (12%) apresentaram MSI-H, três (12%) MSI-L e 19 eram MSS (76%). Na figura 9 estão representados dois casos analisados para o marcador de MSI BAT26.

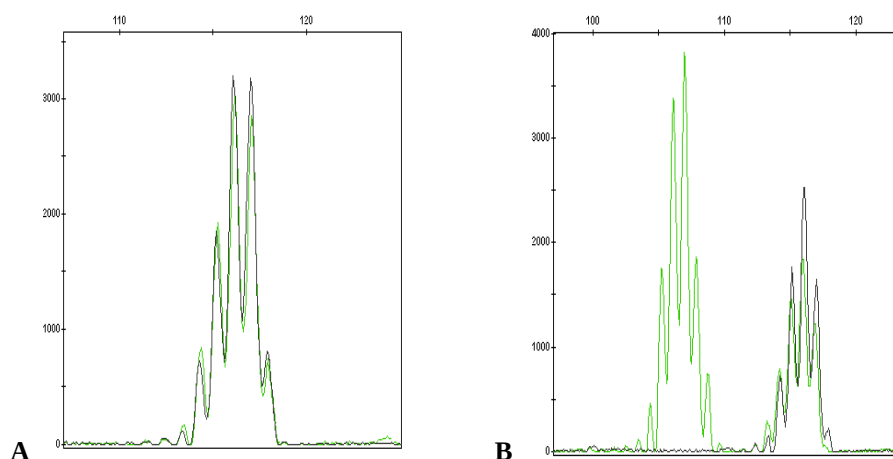


Figura 9 – Electroforogramas de análise de fragmentos da sequência microssatélite BAT26. A – Caso Negativo, B – Caso positivo. A verde está representado o electroforograma desta sequência microssatélite analisado no tumor e a preto no controlo normal respectivo.

Relativamente à frequência de mutações nas sequências microssatélite dos genes *TGF β RII* (A_{10}), *BAX* (G_8), *IGFIIR* (G_8), *MSH3* (A_8), *MSH6* (C_8) e $\beta 2M$ (CT_4), foram detectadas alterações nos genes *BAX* (5,3%) e *IGFIIR* (2,6%) nos casos de CR (Figura 10 e 11 respectivamente). A frequência de alterações no gene *BAX* e *IGFIIR* em carcinomas MSI-H foi de 50% e 25%, respectivamente (Tabela 8), verificando-se uma associação

estatisticamente significativa entre a presença de alterações no gene BAX e a presença de MSI-H ($P=0,009$). Na série de CS não foram detectadas alterações em nenhuma das sequências microssatélite estudadas.

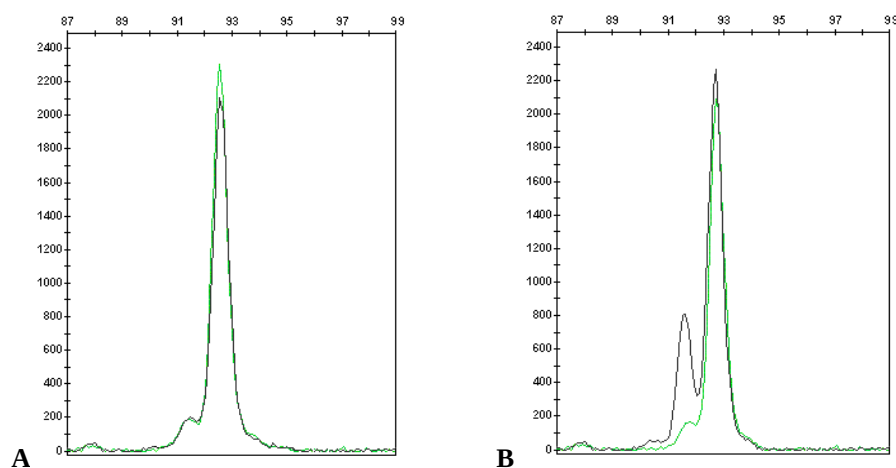


Figura 10 – Electroforograma de análise de fragmentos da sequência microssatélite (G)₈ localizada no gene *BAX*. A – Caso Negativo, B – Caso positivo. A preto está representado o electroforograma desta sequência microssatélite analisado no tumor e a verde no controlo normal respectivo.

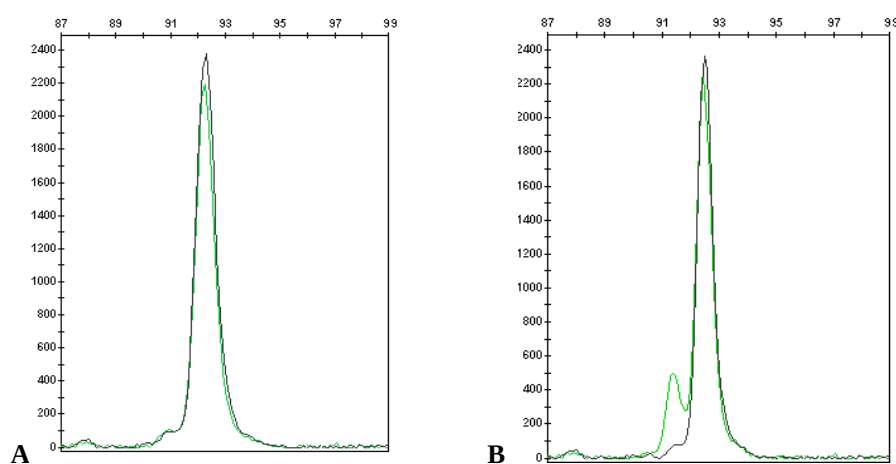


Figura 11 – Electroforograma de análise de fragmentos da sequência microssatélite (G)₈ localizada no gene *IGF1R*. A – Caso Negativo, B – Caso positivo. A verde está representado o electroforograma desta sequência microssatélite analisado no tumor e a preto no controlo normal respectivo.

Tabela 8 – Relação entre a MSI-H e a presença de alterações nos genes alvo analisados.

Caso	Localização do tumor	MSI	Alterações nos genes alvo					
			<i>TGFβRII</i>	<i>BAX</i>	<i>IGFIIR</i>	<i>MSH3</i>	<i>MSH6</i>	<i>B2M</i>
CR8	Recto	MSI-H	-	+	-	-	-	-
CR20	Recto	MSI-H	-	-	-	-	-	-
CR41	Recto	MSI-H	-	+	+	-	-	-
CR45	Recto	MSI-H	-	-	-	-	-	-
CS27	Sigmóide	MSI-H	-	-	-	-	-	-
CS33	Sigmóide	MSI-H	-	-	-	-	-	-
CS35	Sigmóide	MSI-H	-	-	-	-	-	-

Nota: MSI-H: *Microsatellite instability high*.

Não se observaram associações estatisticamente significativas entre a presença de MSI-H e cada uma das seguintes características: sexo, idade, estágio, grau de diferenciação, padrão de crescimento, e reacção inflamatória do tumor, tanto nos casos de CR como nos de CS analisados.

3 – Pesquisa de mutações nos genes *BRAF* e *KRAS*

Na série de CR não foram detectadas mutações no exão 15 do gene *BRAF*. No exão um do gene *KRAS* foram detectadas mutações somáticas em 13 casos (34,2%) de CR. As mutações detectadas estão descritas na Tabela 9 e demonstradas nas Figuras 12 e 13. As mutações detectadas ocorreram nos codões 12 (69,2%) e 13 (30,8%) que codificam o domínio *GTP-binding* da proteína RAS. A mutação mais frequente foi a transição de uma guanina para adenina no nucleótido 35 (c.35G>A), que resulta na substituição do

aminoácido glicina pelo aspartato no codão 12 (G12D) (Tabela 10). Nenhum dos casos positivos para mutações no gene *KRAS* apresentou MSI-H e dois casos (15,4%) apresentaram MSI-L.

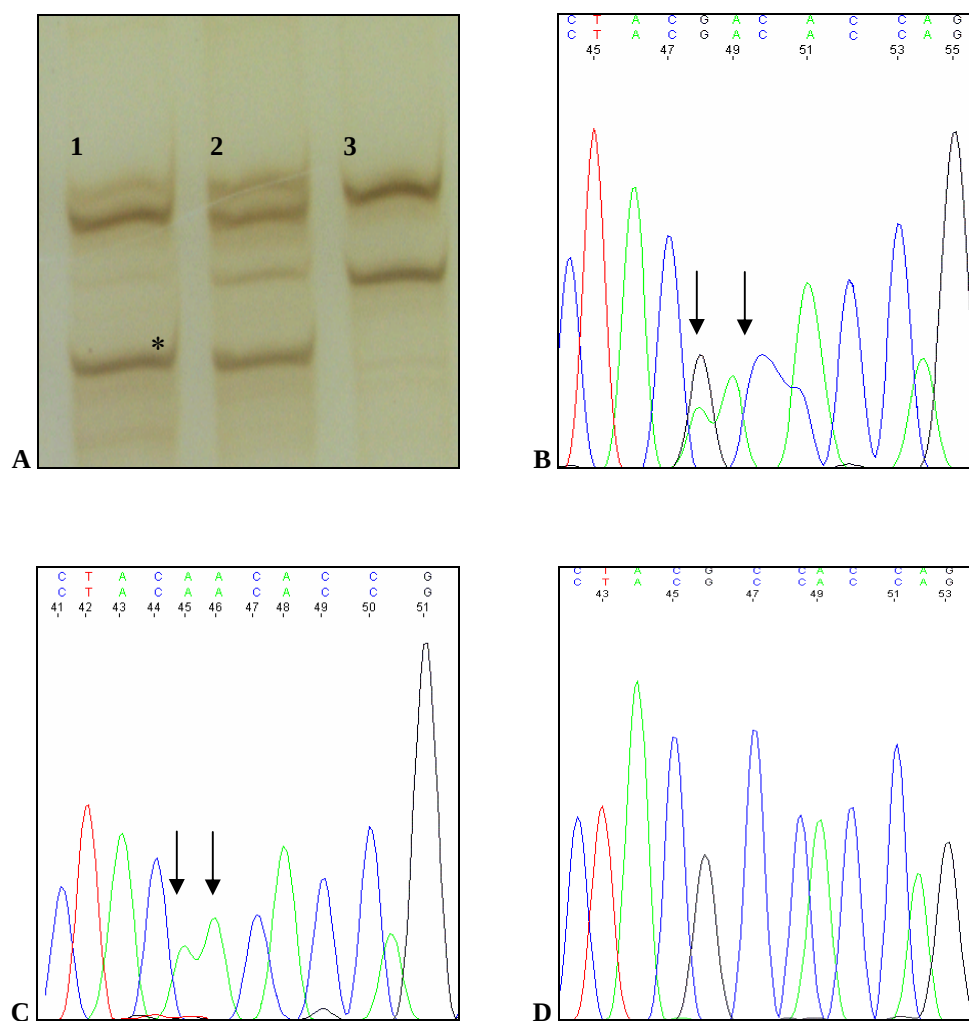


Figura 12 – A – Padrão electroforético de um caso com duas mutações no exão 1 do gene *KRAS* detectado por SSCP (1- alelo mutado; 2- alelo mutado e normal; 3- alelo normal). Electroforogramas das sequenciações do caso com as duas mutações (↓) c.[38G>T; 39C>T] (G13V) B – em heterozigotia (cadeia dupla) e C – em cadeia simples, após extracção e reamplificação do DNA mutado (banda assinalada por * na figura A), demonstrando que as duas mutações estão no mesmo alelo. D – Controlo normal. A sequência apresentada é a *reverse*.

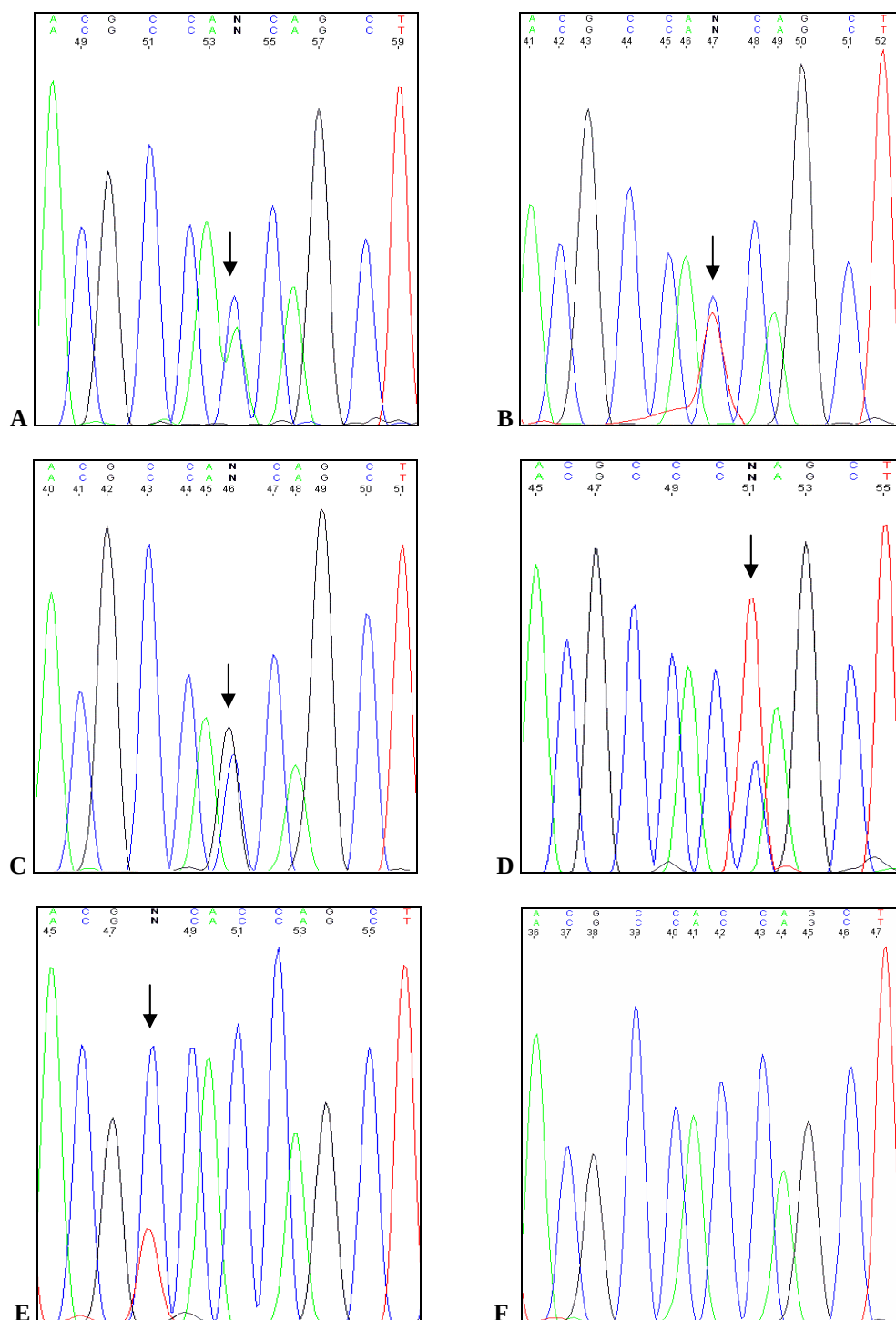


Figura 13 – Electroforogramas das sequências dos casos positivos para as mutações G12V, G12D, G12A, G12S e G13D (A a E; ↓ mutação) detectadas no exão 1 do gene *KRAS* e de um controle normal (F). A sequência apresentada é a *reverse*.

Tabela 9 – Mutações somáticas detectadas no exão 15 do gene *BRAF* e no exão um do gene *KRAS*.

Caso	Localização do tumor	Gene (exão)	Mutação	Efeito ¹	Efeito ²
CR2,CR4,CR50	Recto	<i>KRAS</i> (1)	c.38G>A	p.Gly13Asp	(G13D)
CR47	Recto	<i>KRAS</i> (1)	c.[38G>T; 39C>T]	p.Gly13Val	(G13V)
CR29,CR36,CR39	Recto	<i>KRAS</i> (1)	c.34G>A	p.Gly12Ser	(G12S)
CR6	Recto	<i>KRAS</i> (1)	c.35G>C	p.Gly12Ala	(G12A)
CR12,CR16,CR26,CR43	Recto	<i>KRAS</i> (1)	c.35G>A	p.Gly12Asp	(G12D)
CR35	Recto	<i>KRAS</i> (1)	c.35G>T	p.Gly12Val	(G12V)
CS35	Sigmóide	<i>BRAF</i> (15)	c.1799T>A	p.Val600Glu	(V600E)
CS32	Sigmóide	<i>KRAS</i> (1)	c.38G>A	p.Gly13Asp	(G13D)
CS24	Sigmóide	<i>KRAS</i> (1)	c.35G>C	p.Gly12Asp	(G12A)
CS11,CS25,CS33	Sigmóide	<i>KRAS</i> (1)	c.35G>A	p.Gly12Asp	(G12D)

Nota: ¹ Descrição segundo a nomenclatura do Human Genome Variation Society (HGVS). ² Descrição segundo a literatura.

Tabela 10 – Frequência das mutações somáticas detectadas no exão um do gene *KRAS*.

Localização do tumor	Mutação	Frequência N (%) ^a
Recto	G12D	4 (30,8)
Recto	G12S	3 (23,1)
Recto	G13D	3 (23,1)
Recto	G12A	1 (7,7)
Recto	G12V	1 (7,7)
Recto	G13V	1 (7,7)
Sigmóide	G12D	3 (60)
Sigmóide	G12A	1 (20)
Sigmóide	G13D	1 (20)

Nota: ^a Percentagem dos casos com mutação.

Foi detectada uma (4%) mutação (Figura 14) no exão 15 do gene *BRAF* nos 25 casos de CS analisados. A mutação detectada consiste numa transversão de uma timina para adenina no nucleótido 1799 (c.1799T>A), cujo efeito é a substituição do aminoácido valina

pelo aminoácido glutamato no codão 600 (V600E). Esta alteração afecta a activação do domínio cinase da proteína. Este caso apresentou MSI-H. Foram detectadas mutações no exão um do gene *KRAS* em cinco (20%) dos 25 casos de CS analisados. As mutações detectadas localizaram-se nos codões 12 (80%) e 13 (20%), sendo a mais frequente a G12D (Tabela 10). Um (20%) dos cinco casos com mutação no gene *KRAS* apresentou MSI-H. O caso de CS positivo para mutação no gene *BRAF* não apresentou mutação no gene *KRAS*.

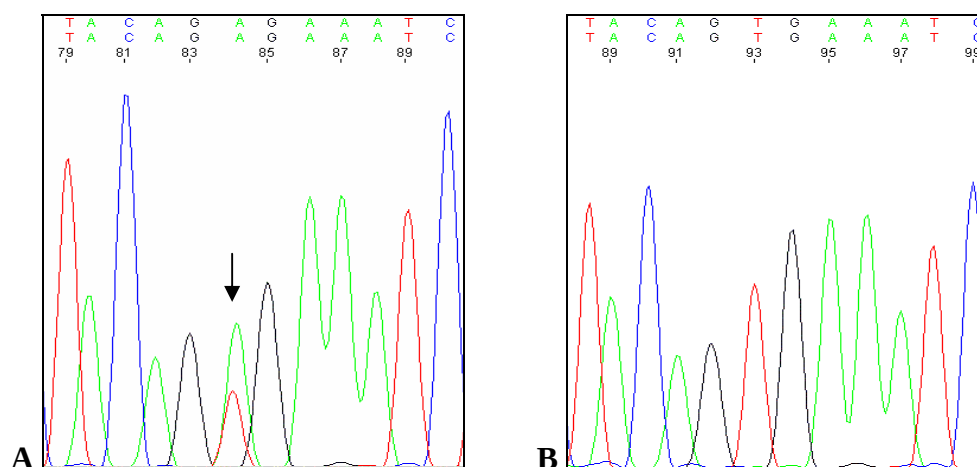


Figura 14 – Electroforograma da sequência: A – caso positivo para a mutação V600E (↓ mutação) presente no exão 15 do gene *BRAF*; e B – controlo normal.

Não se observaram associações estatisticamente significativas entre a presença de mutações no exão um do gene *KRAS* e cada uma das seguintes características clínico-patológicas: sexo, idade, estágio, grau de diferenciação, padrão de crescimento e reacção inflamatória do tumor, tanto nos casos de CR como nos de CS analisados.

4 – Pesquisa de metilação no promotor do gene *MLH1* por MS-MLPA

Nenhum dos casos de CR e de CS com MSI-H apresentou metilação no promotor do gene *MLH1*.

5 – Pesquisa de alterações no genoma mitocondrial

A sequência repetitiva D310 localizada na região do D-Loop do genoma mitocondrial foi avaliada apenas nos casos de CR e CS com controle normal correspondente, ou seja em 35 casos de CR e 24 casos de CS. Segundo a base de dados MITOMAP (www.mitomap.org), que apresenta a sequência de DNA mitocondrial de referência, a sequência repetitiva D310 é constituída por sete citosinas, seguida de uma timina na posição 310 e cinco citosinas (C₇TC₅), correspondendo também à sequência descrita no número de acesso do GenBank AC_000021 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>). Contudo, esta sequência mononucleotídica é polimórfica, sendo geralmente constituída por C₇₋₉TC₅₋₆, e as alterações mais frequentes na sequência repetitiva ocorrem a jusante da base timina.

Nos controles normais (sangue periférico ou mucosa normal) dos 35 casos de CR analisados, a sequência D310 apresentou sete a 10 citosinas na sequência repetitiva a jusante da base timina (C₇₋₁₀TC₆), sendo a sequência C₈TC₆ a mais frequente (Tabela 11). A

frequência de heteroplasmia nestas amostras normais foi de 42,9%. Nos casos de CR, o número de citosinas na sequência repetitiva a jusante da base timina variou de 4 a 10 (C₄-₁₀TC₆), sendo a sequência C₈TC₆ a mais frequente (Tabela 11). A frequência de heteroplasmia nos CR foi de 48,6%. Foram detectadas alterações na sequência D310 em 12 (34,3%) dos 35 casos de CR quando comparados com o respectivo sangue periférico ou mucosa normal (Tabela 12). Sete casos (58,3%) apresentaram deleções, quatro (33,3%) inserções e um (8,3%) apresentou concomitantemente deleções e inserções (Figura 15, CR17). Dos 12 CR com alteração na sequência D310, nove (75%) apresentaram alterações em heteroplasmia e os restantes três (25%) em homoplasmia. Dos 15 casos que apresentavam heteroplasmia no tecido normal, sete (46,7%) apresentaram alterações no tecido tumoral. Não foi detectada nenhuma associação entre a presença de alterações nesta sequência e a presença de nMSI (Tabela 13).

Tabela 11 – Frequência das sequências D310 observadas nos controlos normais e nos casos de CR e CS.

Sequência D310	Recto N=35		Sigmóide N=24	
	Normal (%)	Tumor (%)	Normal (%)	Tumor (%)
C ₄ TC ₆	0 (0)	1 (2,9)	0 (0)	0 (0)
C ₅ TC ₆	0 (0)	1 (2,9)	0 (0)	0 (0)
C ₆ TC ₆	0 (0)	1 (2,9)	0 (0)	1 (4,2)
C ₇ TC ₆	16 (45,7)	20 (57,1)	20 (83,3)	19 (79,2)
C ₈ TC ₆	24 (68,6)	22 (62,9)	11 (45,8)	8 (33,3)
C ₉ TC ₆	10 (28,6)	11 (31,4)	3 (12,5)	5 (20,8)
C ₁₀ TC ₆	2 (5,7)	2 (5,7)	0 (0)	1 (4,2)

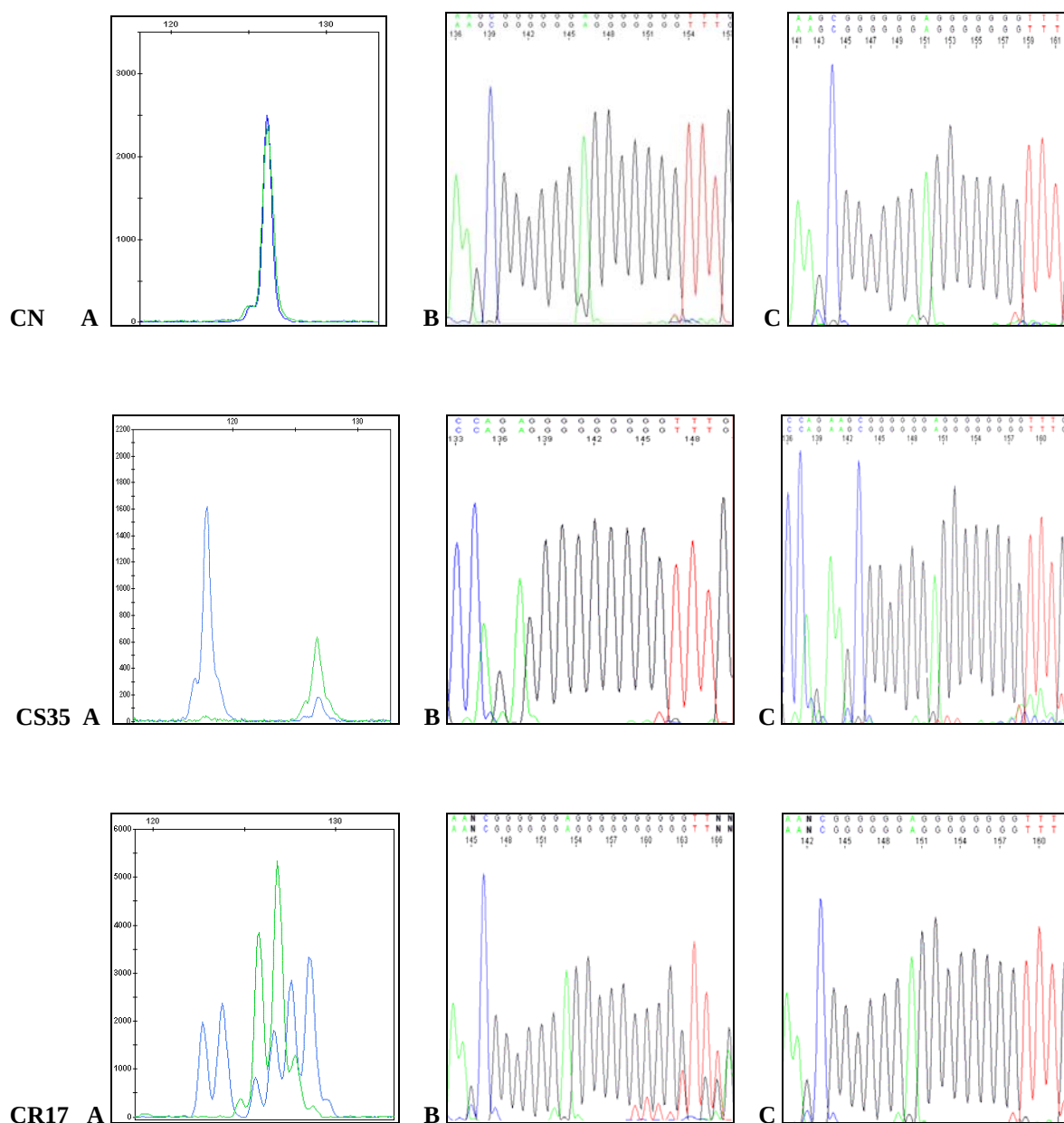


Figura 15 – Eletroforogramas para a sequência D310 de: A – análise de fragmentos do DNA tumoral (azul) e do DNA do controlo normal (verde) respectivo; B – sequenciação do DNA tumoral. CN – caso normal; CS35 – carcinoma do sigmóide com deleção de 10 bp e inserção de 1 bp; CR17 – carcinoma do recto com inserção de 1 e 2 bp e deleção de 1, 3 e 4 bp. C – sequenciação do DNA do controlo normal. A sequência apresentada é a *reverse*.

Tabela 12 – Alterações detectadas na sequência D310 em carcinoma do recto e carcinoma do sigmóide.

Caso CR	Normal	Tumor	Tipo de mutação	Caso CS	Normal	Tumor	Tipo de mutação
CR2	C ₈ TC ₆	C ₈ TC ₆	Ins 1e/ou 2 C	CS4	C ₇ TC ₆	C ₇ TC ₆	Ins 1 e 2 C
	C ₉ TC ₆	C ₉ TC ₆				C ₈ TC ₆	
		C ₁₀ TC ₆				C ₉ TC ₆	
CR3	C ₇ TC ₆	C ₇ TC ₆	Ins 2 C	CS6	C ₇ TC ₆	C ₇ TC ₆	Del 1C
		C ₉ TC ₆				C ₈ TC ₆	
CR5	C ₈ TC ₆	C ₇ TC ₆	Del 1 C	CS7	C ₇ TC ₆	C ₈ TC ₆	Ins 1 e/ou 2 C
		C ₈ TC ₆				C ₉ TC ₆	
CR7	C ₇ TC ₆	C ₇ TC ₆	Del 1 e/ou 2 e/ou 3 C	CS20	C ₇ TC ₆	C ₇ TC ₆	Del 1 C
	C ₈ TC ₆	C ₈ TC ₆			C ₈ TC ₆		
	C ₉ TC ₆	C ₉ TC ₆					
	C ₁₀ TC ₆						
CR9	C ₈ TC ₆	C ₇ TC ₆	Del 1 C	CS22	C ₈ TC ₆	C ₉ TC ₆	Ins 1e/ou 2 C
		C ₈ TC ₆			C ₉ TC ₆	C ₁₀ TC ₆	
CR10	C ₇ TC ₆	C ₇ TC ₆	Ins 1e/ou 2 C	CS25	C ₇ TC ₆	C ₆ TC ₆	Del 1 e/ou 2 e/ou 3 C
	C ₈ TC ₆	C ₈ TC ₆			C ₈ TC ₆	C ₇ TC ₆	
		C ₉ TC ₆			C ₉ TC ₆	C ₈ TC ₆	
CR17	C ₈ TC ₆	C ₄ TC ₆	Ins 1 e 2 C e del 1, 3 e 4 C	CS27	C ₇ TC ₆	C ₇ TC ₆	Del 1 e/ou 2 C
		C ₅ TC ₆			C ₈ TC ₆	C ₈ TC ₆	
		C ₇ TC ₆			C ₉ TC ₆		
		C ₈ TC ₆					
		C ₉ TC ₆					
CR21	C ₇ TC ₆	C ₈ TC ₆	Ins 1 C	CS33	C ₇ TC ₆	C ₇ TC ₆	Ins 1 e/ou 2 C
	C ₈ TC ₆				C ₈ TC ₆	C ₈ TC ₆	
						C ₉ TC ₆	
CR35	C ₈ TC ₆	C ₈ TC ₆	Del 1 C	CS35	C ₈ TC ₆	Alteração Complexa	Del 10 bp e ins 1 C
	C ₉ TC ₆						
CR42	C ₈ TC ₆	C ₇ TC ₆	Del 1e/ou 2 C				
	C ₉ TC ₆						
CR43	C ₇ TC ₆	C ₆ TC ₆	Del 1e/ou 2 C				
	C ₈ TC ₆	C ₇ TC ₆					
CR46	C ₈ TC ₆	C ₇ TC ₆	Del 1C				
		C ₈ TC ₆					

Nota: Na sequência de referência da base de dados MITOMAP a sequência D310 é C₇TC₅ (Genbank AC_000021). Ins – inserção; Del – deleção; C – citosina.

Tabela 13 – Relação entre a MSI e a presença de alterações na sequência D310.

Localização do tumor	MSI	D310		P
		Positivo	Negativo	
Recto	MSI-H	0	4	0.275
	MSI-L/MSS	12	19	
Sigmóide	MSI-H	3	0	0.059
	MSI-L/MSS	7	14	

Nota: MSI-H: *Microsatellite instability high*; MSI-L: *Microsatellite instability low*; MSS: *Microsatellite stable*.

Na série de controlos normais dos 24 casos de CS analisados, o número de citosinas na sequência repetitiva a jusante da base timina variou de sete a nove ($C_{7-9}TC_6$), sendo a sequência C_7TC_6 a mais frequente (Tabela 11). A frequência de heteroplasmia nestes controlos normais foi de 33,3%. Nos CS, o número de citosinas na sequência repetitiva a jusante da base timina variou de seis a 10 ($C_{6-10}TC_6$), sendo a sequência C_7TC_6 a mais frequente. A frequência de heteroplasmia nos CS foi de 29,2%. Foram detectadas alterações na sequência D310 em nove (37,5%) dos 24 CS estudados quando comparados com o sangue periférico ou mucosa normal respectiva (Tabela 12). Dos nove casos com alteração, quatro (44,4%) apresentaram inserções, quatro (44,4%) deleções e um (11,1%) caso apresentou uma mutação complexa (deleção de 10 bases e inserção de uma) (Figura 15, CS35). Dos nove CS com alterações na sequência D310, seis (66,7%) apresentaram alterações em heteroplasmia e três (33,3%) em homoplasmia. Dos oito casos que apresentavam heteroplasmia no tecido normal, sete (87,5%) apresentaram alterações no tecido tumoral. Todos os CS com nMSI-H apresentaram alterações na sequência D310 (Tabela 13).

Não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa entre a presença de alterações na sequência D310 e as características clínico-patológicas analisadas (sexo, idade, estágio, grau de diferenciação, padrão de crescimento e reacção inflamatória do tumor) para os casos de CR e CS.

Foram também analisadas a sequência mononucleotídica (C)₆ situada no gene *NADH dehydrogenase 1* (ND1) e as sequências (C)₆ e (A)₈ localizadas no gene *NADH dehydrogenase 5* (ND5) nos 38 casos de CR e nos 25 casos de CS. Na série de CR foi detectada uma (2,6%) mutação *frameshift* (Figura 16) na sequência (C)₆ do gene ND1, consistindo na inserção de uma citosina. No gene ND5 foram detectadas duas (5,3%) mutações *frameshift* (Figura 17) na sequência (A)₈, nomeadamente uma inserção e uma deleção de uma adenina (Tabela 14). Nos 25 CS estudados não foram detectadas alterações na sequência (C)₆ do gene ND1. No gene ND5 foram detectadas duas (8%) mutações *frameshift* (Figura 17), nomeadamente inserção de uma citosina na sequência (C)₆, e inserção de uma adenina na sequência (A)₈ (Tabela 14).

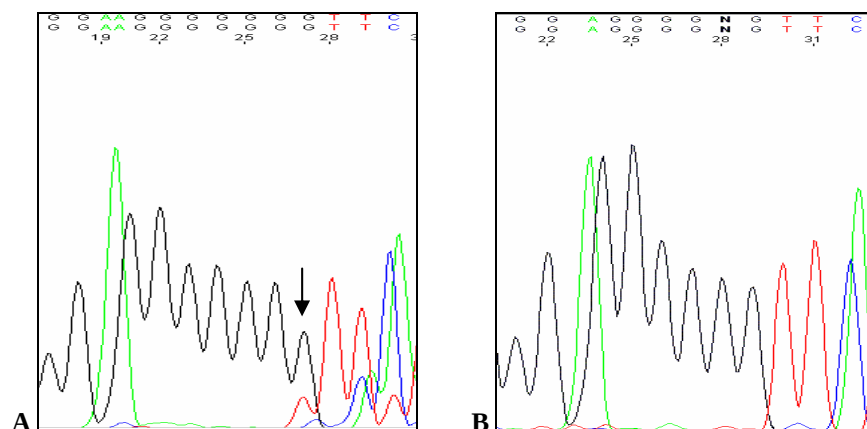


Figura 16 – Electroforogramas das sequenciações: A – caso com uma mutação *frameshift* (↓ inserção de uma citosina) na sequência microssatélite C₆ localizada no gene ND1 e B – controlo normal respectivo. A sequência apresentada é a *reverse*.

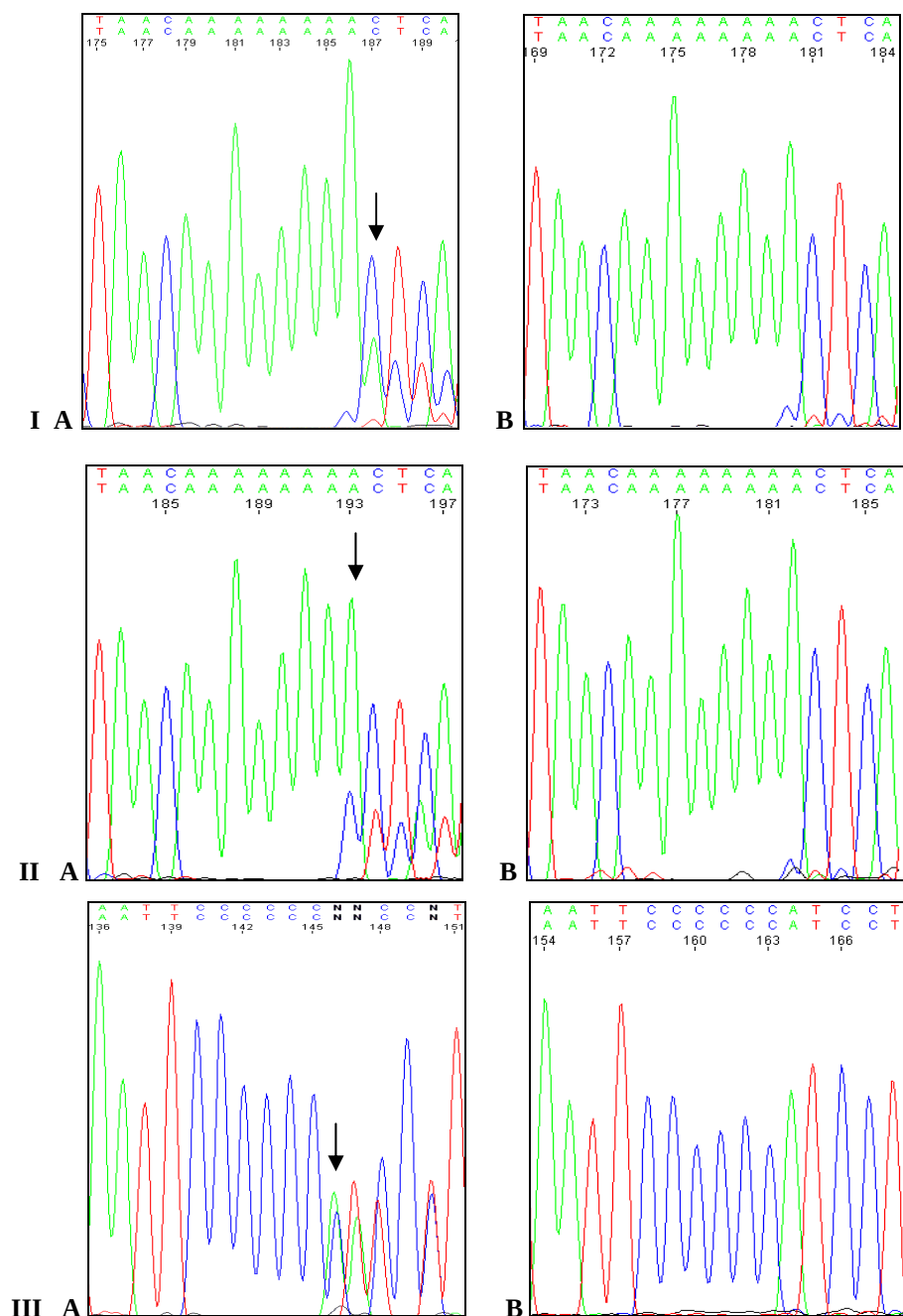


Figura 17 – Electroforogramas das sequenciações de: IA – caso com mutação *frameshift* (↓ inserção de uma adenina) na sequência microssatélite A₈ localizada no gene *ND5* e IB – controlo normal respectivo; IIA – caso com mutação *frameshift* (↓ deleção de uma adenina) na sequência A₈ localizada no gene *ND5* e IIB – controlo normal respectivo; IIIA – caso com mutação *frameshift* (↓ inserção de uma citosina) na sequência C₆ localizada no gene *ND5* e IIIB – controlo normal respectivo.

Tabela 14 – Alterações detectadas nas sequências repetitivas C₆ do gene *ND1* e A₈ e C₆ do gene *ND5*.

Localização do tumor	Caso	Gene	Mutação	População	Efeito	Alteração seq. D310	MSI
Recto	CR23	ND1	(C) ₆ →(C) ₇	Heteroplasmia	<i>frameshift</i>	Não	MSS
Recto	CR4	ND5	(A) ₈ →(A) ₉	Heteroplasmia	<i>frameshift</i>	Não	MSS
Recto	CR36	ND5	(A) ₈ →(A) ₇	Heteroplasmia	<i>frameshift</i>	Sim	MSS
Sigmóide	CS9	ND5	(A) ₈ →(A) ₉	Heteroplasmia	<i>frameshift</i>	Não	MSS
Sigmóide	CS33	ND5	(C) ₆ →(C) ₇	Heteroplasmia	<i>frameshift</i>	Sim	MSI-H

Nota: MSI-H: *Microsatellite instability high*; MSI-L: *Microsatellite instability low*; MSS: *Microsatellite stable*.

Não se verificou nenhuma associação entre a presença de alterações nas sequências mononucleótidas dos genes *ND1* e *ND5* ou alterações na sequência D310 e a presença de nMSI (Tabela 14).

6 – Comparação do padrão de alterações genéticas entre carcinoma do recto e do sigmóide

Na tabela 15 apresenta-se o sumário da comparação entre as alterações genéticas detectadas no CR e CS.

Tabela 15 – Frequência das alterações genéticas detectadas nos casos de CR e CS.

Localização			
Características genéticas	Recto N (%)	Sigmóide N (%)	P
MSI			
MSS	29 (76,3)	19 (76)	NE
MSI-L	5 (13,2)	3 (12)	
MSI-H	4 (10,5)	3 (12)	
MSS/MSI-L	34 (89,5)	22 (88)	1,000
MSI-H	4 (10,5)	3 (12)	
BAX			
mt	2 (5,3)	0 (0)	0,514 ¹
wt	36 (94,7)	25 (100)	
IGF			
mt	1(2,6)	0 (0)	1,000 ¹
wt	37(97,4)	25 (100)	
KRAS			
mt	13 (34,2)	5 (20)	0,265 ¹
wt	25 (65,8)	20 (80)	
BRAF			
mt	0(0)	1 (4)	0,397 ¹
wt	38 (100)	24 (96)	
D310 ¹			
mt	12 (34,3)	10 (41,7)	0,594 ¹
wt	23 (65,7)	14 (58,3)	
NDI			
mt	1 (2,6)	0 (0)	1,000 ¹
wt	37 (97,4)	25 (100)	
ND5			
mt	2 (5,3)	2 (8)	1,000 ¹
wt	36 (94,7)	23 (92)	

Nota: MSI-H: *Microsatellite instability high*; MSI-L: *Microsatellite instability low*; MSS: *Microsatellite stable*; mt: com mutação, wt: sem mutação; ^a Informação não disponível em 3 casos de CR e em um caso de CS. NE – não efectuado nenhum teste estatístico devido à baixa mostragem. ¹ Teste de Fisher.

Discussão

1 – Carcinogénese colo-rectal

Vários estudos têm demonstrado diferenças entre os carcinomas do cólon direito e esquerdo relativamente a características epidemiológicas, morfológicas, clínicas e moleculares, sugerindo que os mecanismos de carcinogénese podem variar, pelo menos em parte, com a origem do tumor (Glebov *et al*, 2003; Nakaji *et al*, 2003; Wei *et al*, 2004).

Os tumores do cólon direito são maioritariamente mucinosos, diplóides e apresentam MSI. Os tumores do cólon esquerdo apresentam geralmente alterações cromossómicas estruturais, nomeadamente perdas no braço longo do cromossoma 5 (5q) e 18 (18q) e no braço curto do cromossoma 17 (17p), aneuploidia, uma elevada frequência de LOH e baixa frequência de MSI (Lleonart *et al*, 1998; Gervaz *et al*, 2004; Sugai *et al*, 2006).

Recentemente, alguns estudos sobre a carcinogénese colo-rectal têm considerado as diferentes regiões do intestino grosso (cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente, sigmóide e recto) e não simplesmente cólon direito e cólon esquerdo. Birkenkamp-Demtroder *et al* (2005) observaram diferenças na expressão génica entre a mucosa normal de diferentes regiões do intestino grosso (designadamente nos genes *Trefoil factor I (TFF1)* e *S100 calcium-binding protein P (S100P)*, mais expressos no sigmóide e rectosigmóide), e também entre os adenocarcinomas do cego, sigmóide e rectosigmóide (nomeadamente no gene *Cytochrome c oxidase subunit IV (COX-2)*, mais expresso no sigmóide e rectosigmóide). Kapiteijin *et al* (2001) estudaram diferentes genes envolvidos na carcinogénese do CC e CR, especificamente a presença de mutações nos genes *TP53* e

APC, e a expressão das proteínas MLH1, MSH2, Bcl-2, E-caderina, β -catenina e p53. Nesse estudo observaram uma maior frequência de mutações no gene *TP53* em CR do que em CC (68% e 50%, respectivamente), sugerindo os autores que a via da p53 parece ser mais relevante na carcinogênese rectal. Porém, a comparação do cólon esquerdo com o cólon direito revelou as mesmas diferenças observadas entre CC em geral e CR.

Dada a escassez de estudos que discriminam as diferentes origens dos carcinomas do intestino grosso e alguma evidência de diferenças ao nível biológico e/ou molecular entre o CC direito, o CC esquerdo e o CR, é relevante aprofundar o estudo das diferentes vias genéticas subjacentes ao seu desenvolvimento de modo a contribuir para a clarificação desta questão. Este estudo caracterizou alterações genéticas (nucleares e mitocondriais) numa série de CR e CS.

2 – Alterações no genoma nuclear

2.1 – Instabilidade de microsatélites

As sequências microsatélite são sequências repetitivas de DNA, constituídas por unidades de repetição que variam de um a seis pares de base e estão distribuídas de forma abundante e aleatória em regiões codificantes e não codificantes do genoma humano. Está descrito que anomalias no sistema MMR estão na origem do fenómeno designado por MSI – instabilidade generalizada das sequências microsatélite, por adição ou deleção do seu número de repetições (Weber *et al*, 1993; Farber *et al*, 1994; Koi *et al*, 1994; Umar *et al*,

1997; Vauris *et al*, 1997; Arzimanoglou *et al*, 1998).

A frequência de MSI-H em CCR esporádico varia de 10 a 20% e em CCR associado à síndrome HNPCC é de cerca de 92% (Thibodeau *et al*, 1993; Bocker *et al*, 1996; Arzimanoglou *et al*, 1998). No CR esporádico está descrita uma frequência de MSI-H que varia entre 1 a 10% (Nilbert *et al*, 1999; Colombino *et al*, 2002). Na presente série, a frequência de MSI foi de 10,5%, o que corrobora a evidência de que a frequência de CR que se desenvolvem segundo a via mutadora é baixa, tal como está referido na bibliografia. Na série de casos de CS esporádico, a frequência de MSI-H foi de 12%, o que também está de acordo com o descrito para CCR em geral. Os dados disponíveis validam a evidência de que a frequência de MSI-H em CCR diminui do cólon direito para o cólon esquerdo e recto (Ikeda *et al*, 2001; Gervaz *et al*, 2002; Benatti *et al*, 2005; Maestro *et al*, 2007).

Vários estudos em CCR demonstraram que as neoplasias positivas para MSI apresentam determinadas características histopatológicas e clínicas, nomeadamente: localização preferencial no cólon direito, menor diferenciação histológica, acentuada produção de muco, presença de infiltrado linfóide e elevada proporção de células em anel de sinete. Do ponto de vista clínico, os doentes com este tipo de neoplasias apresentam geralmente maior sobrevivência global e menor incidência de metástases (Risio *et al*, 1996; Messerini *et al*, 1997; Senba *et al*, 1998; Gryfe *et al*, 2000; Watanabe *et al*, 2001; Smyrk *et al*, 2001). No presente estudo, não se verificaram associações significativas entre o fenótipo de MSI e as características clínico-patológicas analisadas, quer na série de CR quer na de CS, o que poderá reflectir a baixa amostragem.

2.2 – Genes alvo da via MIN

Tem sido observada em diversas neoplasias, nomeadamente em CCR, MSI em sequências repetitivas localizadas em regiões codificantes de genes. Esta instabilidade resulta em mutações do tipo *frameshift* que conduzem à inativação da sua função, conferindo-lhes assim um potencial papel na carcinogénese destas neoplasias (Iacopetta *et al*, 1998, Woerner *et al*, 2001; Samowitz *et al*, 2002). Neste estudo foram analisados os genes alvo da via MIN em CCR *TGF β RII*, *BAX*, *IGFIIR*, *MSH3*, *MSH6* e *β 2M*.

Na série de casos de CR foram detectadas apenas alterações nas sequências microssatélite dos genes *BAX* (5,3%) e *IGFIIR* (2,6%). A frequência de mutações nestas sequências nos CR com MSI-H foi de 50% para o gene *BAX* e 25% para o gene *IGFIIR*, estando de acordo com o descrito para o CCR esporádico (39 a 66% para o gene *BAX* e 22 a 26% para o gene *IGFIIR*) (Rampino *et al*, 1997; Calin *et al*, 2000; Samowitz *et al*, 2002; Potočník *et al*, 2003; Trojan *et al*, 2004). Vários autores, detectaram uma associação significativa entre mutações no gene *BAX* e a presença de MSI-H em CCR, demonstrando que alterações neste gene são devidas a deficiências no sistema MMR e que estão envolvidas no desenvolvimento tumoral dos carcinomas da via MIN (Rampino *et al*, 1997; Samowitz *et al*, 2002; Potočník *et al*, 2003; Trojan *et al*, 2004; Fernández-Peralta *et al*, 2005). Neste estudo foi também detectada uma associação estatisticamente significativa entre a presença de mutações no gene *BAX* e a presença de MSI-H ($P=0,009$), indicando que este é um gene alvo da via MIN em CR.

Na presente série de CR não se observou instabilidade na sequência BAT-RII do

gene *TGFβRII*. Está descrito na literatura uma elevada taxa de mutações (70 a 90%) na sequência repetitiva BAT-RII em CCR com MSI-H, demonstrando desta forma o envolvimento do gene *TGFβRII* na via de carcinogénese MIN (Togo *et al*, 1996; Iacopetta *et al*, 1998; Castecker *et al*, 2000; Epstein *et al*, 2000; Shin *et al*, 2000). O facto de não terem sido detectadas mutações nesta sequência nos casos de CR com MSI-H poderá evidenciar que o factor de crescimento TGFβ não é essencial no desenvolvimento deste grupo de carcinomas. Um estudo recente, em carcinomas gástricos com MSI-H, detectou hipermetilação do promotor do gene *TGFβRI* em cerca de 63% dos casos, evidenciando a existência de um mecanismo alternativo de inactivação do TGFβ (Pinto *et al*, 2003).

Tal como no *TGFβRII*, não foram detectadas mutações nas sequências repetitivas dos genes *MSH3*, *MSH6* e *β2M* nos CR. Segundo a bibliografia, a frequência de mutações nestas sequências em CCR MSI-H é 20 a 39% para o gene *MSH3*, 30 a 40% para o gene *MSH6* e cerca de 15% para o gene *β2M* (Malkhosyan *et al*, 1996; Orimo *et al*, 1999; Cabrera *et al*, 2003; Kloor *et al*, 2007). Todavia, a maioria dos estudos foram realizados apenas em carcinomas com MSI-H e apresentam séries superiores à nossa. Logo, a ausência de mutações neste trabalho pode dever-se ao reduzido número de casos. No entanto, esta discrepância de resultados também pode sugerir que estes genes não estão envolvidos na carcinogénese dos CR com MSI-H. Segundo alguns autores a observação de diferenças qualitativas (tipo de gene alvo) e quantitativas (número e frequência de genes alvo alterados) entre diferentes tipos de neoplasias, sugere que o grau de envolvimento dos genes alvo na carcinogénese pode diferir consoante a localização tumoral. Por exemplo, a frequência de mutações no gene *TGFβRII* é superior no CC relativamente ao carcinoma do

endométrio (70 a 90% e 17 a 19%, respectivamente), enquanto a frequência de mutações no gene *MSH6* em CC é inferior ao observado em carcinoma gástrico (22% e 38%, respectivamente) (Myeroff *et al*, 1995; Catusus *et al*, 2000; Duval *et al*, 2002a), demonstrando a existência de alvos moleculares alternativos em diferentes neoplasias que se desenvolvem segundo a via MIN.

Na série de casos de CS não foram detectadas alterações em nenhum dos genes analisados, nomeadamente nos carcinomas com MSI-H. A generalidade dos estudos na literatura não discriminam as regiões do intestino grosso analisadas, o que não nos permite comparar convenientemente os nossos resultados com outras séries. A frequência de CC esquerdo que se desenvolvem segundo a via MIN é inferior à do CC direito, o que se reflecte nas baixas frequências de MSI-H e de mutações nos genes *TGF β R2*, *BAX*, *MSH3*, *MSH6*, *IGF1R* e *β 2M* (Togo *et al*, 1996, 2001). No entanto, apesar do número reduzido de CS analisados, a frequência destas neoplasias que supostamente se desenvolveram segundo a via MIN (evidenciado pela presença de MSI-H, 12%) faria prever a ocorrência de alterações em algum destes genes em alguns casos, tal como se observou na série de CR. Hipoteticamente, estes genes podem apresentar alterações genéticas ou epigenéticas em outras regiões ou não desempenharem um papel relevante na carcinogénese dos CS que seguem a via MIN.

2.3 – Alterações nos proto-oncogenes *BRAF* e *KRAS*

Vários estudos têm referido a importância da via de sinalização das MAPKs em

CCR. Alterações nos genes desta via, nomeadamente nos proto-oncogenes *KRAS* e *BRAF*, podem resultar na sua activação desregulada, tendo como consequência o aumento da proliferação celular e a inibição da apoptose, contribuindo desta forma para o desenvolvimento neoplásico (Arends, 2000; Yuen *et al*, 2002; Takayama *et al*, 2006).

Nos casos de CR estudados não foram detectadas mutações no exão 15 do gene *BRAF*, enquanto que nos casos de CS foi detectada uma mutação (4%). Fransen *et al* (2004) observaram uma frequência de mutações no exão 15 do gene *BRAF* de 17,8% em CC enquanto que nos casos de CR a frequência foi de 3,6%. Estes autores observaram também que no grupo de tumores com mutação no gene *BRAF* se verificava uma associação significativa entre a presença de mutação e localização no cólon direito (87% dos casos; $P= 0.014$). Porém, quando compararam a frequência de mutações entre o cólon direito e esquerdo não observaram diferenças significativas. Yuen *et al* (2002) observaram uma frequência de mutações similar no cólon direito e esquerdo (5,3% e 4,4% respectivamente), mas quando se considera apenas o grupo de casos com mutação, a frequência de CC direito com mutação foi 18,2% e de CC esquerdo 81,8%. Contudo, a maioria dos estudos está de acordo com o obtido por Fransen *et al* (2004), na medida que a presença de mutações ocorre com mais frequência em CC direito (Wang *et al*, 2003; Domingo *et al*, 2004; Maestro *et al*, 2007). Os resultados do nosso estudo estão em concordância com o descrito, uma vez que não detectamos nenhuma mutação em CR e uma baixa frequência (4%) nos casos de CS. A mutação detectada resulta na substituição do aminoácido valina pelo aminoácido glutamato no codão 600 (V600E) e apresenta uma frequência de 50 a 80% em CCR (Davies *et al*, 2002; Lubomierski *et al*, 2005). O aminoácido valina está conservado ao longo da evolução e localiza-se no domínio cinase do

gene *BRAF*. Estudos *in vitro* demonstraram que esta variante apresenta um aumento da actividade cinase dez vezes superior ao observado na proteína normal (Davies *et al*, 2002). Tem sido sugerido que esta mutação possui um papel crucial na activação do gene *BRAF* pois, para além da sua elevada frequência, ocorre em diversas neoplasias (Davies *et al*, 2002; Lubomierski *et al*, 2005). Segundo a bibliografia, tem sido observada uma correlação entre a presença de mutações no gene *BRAF*, nomeadamente a mutação V600E, e a presença de MSI-H (Fransen *et al*, 2002; Wang *et al*, 2003; Koinuma *et al*, 2004; Lubomierski *et al*, 2005). Neste estudo, o caso de CS com mutação no gene *BRAF* também apresentou MSI-H. Porém, a presença de MSI-H nestes tumores não está associada a mutações nos genes do sistema MMR, mas à hipermetilação do promotor do gene *MLH1* (Wang *et al*, 2003; Koinuma *et al*, 2004; Lubomierski *et al*, 2005). No nosso estudo nenhum dos tumores com MSI-H apresentou hipermetilação do gene *MLH1*. Watanabe *et al* (2006) observaram uma associação estatisticamente significativa ($P=0,0317$) entre a presença de metilação do promotor do gene *MLH1* e a localização do tumor no cólon direito, sugerindo os autores que esta via epigenética é pouco frequente na carcinogénese dos tumores com MSI-H do cólon esquerdo, podendo estes carcinomas constituir um subgrupo entre os carcinomas esporádicos com MSI-H. Contudo, não podemos excluir (pois não foi avaliado) a existência de uma mutação somática ou germinativa, sendo esta última pouco provável, num gene do sistema MMR nestes casos (Borresen *et al*, 1995).

A frequência de mutações em CCR no gene *KRAS* é cerca de 30 a 50%, ocorrendo geralmente no domínio *guanosine triphosphate (GTP)-binding* (codões 12 e 13) ou no domínio *GTPase* (codão 61) (Smith *et al*, 2002; Calistri *et al*, 2005). Neste estudo, 34,2% dos casos de CR apresentaram mutações neste gene, sendo a mais frequente a G12D. Esta

frequência está de acordo com o resultado obtido por Frattini *et al* (2004) em CR (33.3%), apesar de o número de amostras (N=27) ser inferior ao analisado no presente estudo e de terem incluído na análise o exão 2. Nos casos de CS observou-se a presença de mutações em 20% dos casos, sendo a mais frequente, tal como no CR, a G12D. Apesar de observarmos uma frequência de mutações superior no CR, a diferença não foi estatisticamente significativa. Os nossos resultados estão de acordo com o descrito por Lin *et al* (2006), pois estes autores não detectaram diferenças significativas na frequência de mutações neste gene para o carcinoma do cólon direito, esquerdo e recto (48,9%, 40,2% e 45%, respectivamente; $P=0,465$). Por outro lado, Frattini *et al* (2004) detectaram uma frequência de mutações no gene *KRAS* superior no CC em relação ao CR (61,3% no cólon direito, 53,3% no cólon esquerdo e 33,3% no recto; $P=0.037$).

Neste estudo, 20% dos casos de CS com mutação no gene *KRAS* apresentaram MSI-H. Nagasaka *et al* (2004) detectaram uma frequência de 7% de casos de CCR com mutação no gene *KRAS* e com MSI-H. Na presente série de casos de CR foi ainda observada a presença de MSI-L em 15,4% dos casos com mutação no gene *KRAS*. Está descrito na literatura a existência de tumores com MSI-L e mutações no gene *KRAS* como um evento frequente em CCR, detectando alguns autores frequências de 33% (Nagasaka *et al*, 2004). Alguns estudos evidenciaram a presença concomitante destas alterações genéticas com alterações cromossómicas, nomeadamente perda de 5q, sugerindo que estes tumores se desenvolvem pela via CIN, apesar de outros estudos não o terem confirmado (Halford *et al*, 2002; Pawlik *et al*, 2004). Outros autores detectaram metilação no gene de reparação de DNA O-6-methylguanine DNA methyltransferase (*MGMT*) em tumores com MSI-L, evidenciando que o mecanismo de reparação envolvido pode ser diferente do observado nos

tumores com MSI-H (Whitehall *et al*, 2001; Soreide *et al*, 2006). Todas as mutações detectadas no gene *KRAS* neste estudo estão descritas na literatura e localizaram-se no domínio *GTP-binding* (codões 12 e 13) (Davies *et al*, 2002; Edkins *et al*, 2006; *Trust Sanger Institute*). Este domínio fica inactivo por hidrólise do GTP a GDP. As mutações detectadas resultam na perda de sensibilidade à hidrólise, tendo como consequência a activação constitutiva da proteína RAS, levando à proliferação celular pela via das MAPKs (Bos, 1989; Crespo *and* Leon, 2000).

3 – Alterações no genoma mitocondrial

O genoma mitocondrial humano é constituído por uma molécula de DNA circular de dupla cadeia com 16,569 pares de bases, que codifica 13 polipéptidos componentes da cadeia respiratória, dois RNAs ribossómicos e 22 RNAs de transferência. Apresenta também uma região não codificante denominada D-loop, que contém os locais de origem da replicação e os promotores para a transcrição (Anderson *et al*, 1981; Andrews *et al*, 1999).

Vários estudos têm avaliado a presença de alterações genéticas no DNAm, que estão geralmente associadas a doenças degenerativas e metabólicas (Alberio *et al*, 2007; Wong, 2007). A taxa de mutação do DNAm é 10 a 20 vezes superior à do DNAn, essencialmente devido à formação de ROS, ausência de histonas e mecanismos de reparação limitados (Bianchi *et al*, 2001; Carew *et al*, 2002). Têm também sido detectadas mutações somáticas em determinadas neoplasias, nomeadamente em CCR. O envolvimento

da mtMSI na carcinogénese do CCR tem sido muito estudado, nomeadamente, na sequência mononucleotídica C₇₋₉T₅₋₆, presente na região do D-loop (D310) (Habano *et al*, 1998; Bianchi *et al*, 2001; Sanchez-Cespedes *et al*, 2001; Guleng *et al*, 2005; Lièvre *et al*, 2005). Está descrita em CCR uma frequência de alterações de 28 a 44% para a sequência D310, local considerado um *hotspot* mutacional (Habano *et al*, 1998, 1999; Bianchi *et al*, 2001; Guleng *et al*, 2005; Lièvre *et al*, 2005). Neste estudo foi detectada uma frequência de mutações na sequência D310 de 34,3 % nos casos de CR. Este valor está de acordo com o observado por Guleng *et al* (2005) e Lièvre *et al* (2005) (28,4% e 31%, respectivamente) em CR. Como foi referido anteriormente, a região do D-loop possui funções a nível da replicação e transcrição do DNAm_t. Em particular, a sequência D310 situa-se numa região conservada onde se localiza a origem de replicação da cadeia pesada do DNAm_t, sugerindo vários autores que mutações nesta sequência podem afectar a taxa de replicação do DNAm_t (Anderson *et al*, 1981; Lee *et al*, 2004). Lee *et al* (2004) observaram uma diminuição do número de cópias de DNAm_t em 70,8% dos casos com mutação na região do D-loop em carcinomas hepatocelulares. Contudo, 42,9% dos casos sem mutação também apresentaram diminuição do número de cópias, sugerindo os autores que outros factores não identificados estão na sua origem (Lee *et al*, 2004). No entanto, a região do D-loop é a porção mais variável do genoma mitocondrial e variações intra e inter-individuais têm sido descritas (Horai *et al*, 1990; Kirches *et al*, 2001; Nekhaeva *et al*, 2002). Apesar de algumas das alterações poderem reflectir uma heterogeneidade intra-individual e não estarem envolvidos no desenvolvimento tumoral, outras podem alterar a funcionalidade da mitocôndria de modo a comprometer o processo de apoptose, contribuindo para a carcinogénese. Na série de CR a maioria das alterações detectadas estão descritas como polimórficas (C₆-C₁₀) (Base

de dados Mitomap, 2007); contudo, um caso apresentou alterações que excederam este limite (C_4C_5), o que poderá eventualmente afectar a taxa de replicação da mitocôndria.

Na série de casos de CS a frequência de alterações na sequência D310 foi de 37,5%. Tal como nos casos de CR, a maioria das alterações observadas são polimorfismos. Porém, um caso apresentou uma mutação complexa (deleção de 10 bp e inserção de um) que elimina a sequência de citosinas a montante da timina, podendo também esta mutação afectar a replicação mitocondrial. Dos oito casos de CS que apresentavam heteroplasmia no tecido normal (sangue periférico ou mucosa normal), sete (87,5%) apresentaram alterações no tecido tumoral, sendo que em seis dos sete casos foi analisada a mucosa normal. Jones *et al* (2001) também observaram em carcinoma do pâncreas, que os casos com alterações no DNAmT do tumor apresentavam heteroplasmia no DNAmT da mucosa normal. Uma possível explicação pode ser o facto de a mucosa histologicamente normal analisada poder apresentar já alterações moleculares, dado corroborado por Tan *et al* (2006) em carcinoma do esófago. Esta hipótese explicaria a diferença observada entre os casos de CR e CS, uma vez que no primeiro o tecido normal analisado foi maioritariamente sangue periférico, enquanto no segundo foi mucosa normal. Para além disso, Lièvre *et al* (2005) observaram que o número de citosinas na sequência D310 em tecidos normais influencia a prevalência de mutações nesta sequência.

O DNAmT apresenta também sequências microssatélite em regiões codificantes de genes como o *ND1* e *ND5*, estando descritas mutações na sequência microssatélite $(C)_6$ do gene *ND1* e $(C)_6$ e $(A)_8$ do gene *ND5* (Habano *et al*, 1998). A frequência de mutações somáticas nos casos de CR estudados nas sequências microssatélite dos genes *ND1* e *ND5* foram 2,6% e 5,3% respectivamente. Nos casos de CS apenas foram detectadas mutações

somáticas no gene *ND5*, com uma frequência de 8%. Todas as mutações detectadas são do tipo *frameshift*, levando à síntese de proteínas não funcionais e podem consequentemente contribuir para a alteração da cadeia respiratória. Estes resultados estão de acordo com o obtido por Habano *et al* (1998), que detectaram mutações *frameshift* nas sequências microsatélites dos genes *ND1* e *ND5* (2,2% e 4,4% respectivamente) em CCR.

Habano *et al* (1998) detectaram uma correlação entre a presença de mutações na sequência D310 e mutações nas sequências repetitivas dos genes *ND1* e *ND5*, sugerindo uma deficiência na reparação de erros similar ao observado nos carcinomas com nMSI. Lièvre *et al* (2005) não encontraram evidência de tal correlação. No nosso estudo não se verificou nenhuma associação entre a presença de alterações nas sequências mononucleotídicas dos genes *ND1* e *ND5* e alterações na sequência D310, quer na série de CR quer na de CS. Também tem sido estudada, uma possível relação entre a presença de mtMSI e nMSI (Habano *et al*, 1998; Schwartz *et al*, 2000; Fang *et al*, 2004). Enquanto no genoma nuclear a MSI está associada à perda de função dos genes do sistema MMR, o mecanismo subjacente à mtMSI não está elucidado. Alguns autores sugerem que a mtMSI pode ser causada por mecanismos similares, apesar de ainda não ter sido identificado em mamíferos nenhum sistema MMR mitocondrial (Habano *et al*, 1998, 1999; Bohr *et al*, 2002). Habano *et al* (1998) observaram uma associação entre a nMSI e instabilidade na sequência D310, sugerindo inicialmente que o genoma nuclear e mitocondrial podiam partilhar, em parte, o sistema MMR. Contudo não detectaram uma associação entre a presença de mutações nos genes *ND5* e *ND1* e a presença de nMSI, sugerindo então um mecanismo MMR específico para a manutenção do DNAm, apontando para uma situação similar à observada em leveduras, onde a integridade do DNAn é garantida pela proteína

MSH2 e a do DNAm_t pela MSH1. Em oposição, Guleng *et al* (2005) não detectaram nenhuma associação significativa entre a presença de instabilidade na sequência D310 e a nMSI em CCR. Na presente série não foi detectada nenhuma associação entre a presença de alterações na sequência D310 e a presença de nMSI no CR. Na série de casos de CS, observou-se uma tendência de associação entre alterações na sequência D310 e MSI-H ($P=0,059$). No entanto, os resultados obtidos neste estudo não permitem concluir que haja uma associação entre nMSI e mtMSI (sugerindo um mecanismo de reparação partilhado), uma vez que na série de CR não obtivemos qualquer associação entre aquelas variáveis e na série de CS, apesar de alguma evidência, o número de casos é reduzido.

4 – Conclusão

As principais conclusões deste trabalho são:

- 1 – A frequência de MSI-H é ligeiramente inferior no CR comparativamente ao CS e ao CC em geral.
- 2 – As respectivas sequências microssatélite dos genes alvo *BAX* e *IGF1R* apresentam mutações no CR com MSI-H mas não no CS.
- 3 – Existe uma maior frequência de mutações no gene *KRAS* relativamente ao gene *BRAF*, sugerindo que o envolvimento da via das MAPKs na carcinogénese do CR e do CS ocorre preferencialmente pela activação do oncogene *KRAS*.

4 – Há uma elevada frequência de mutações na sequência D310 do DNAmT tanto em CR como em CS, com tendência para a associação entre a presença de nMSI e mtMSI no CS mas não no CR.

5 – Apesar de a generalidade das diferenças observadas não serem significativas, os nossos resultados parecem evidenciar que as alterações genéticas envolvidas na carcinogénese do CR são parcialmente distintas das observadas no CS e CC direito, o que só poderá ser esclarecido com estudos genéticos mais abrangentes num elevado número de tumores com origem em cada uma das regiões do intestino grosso.

Referências Bibliográficas

Aaltonen LA, Salovaara R, Cristo P, *et al.* Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Eng J Med* 1998; 338: 1481-7.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology, 3rd Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1997.

Alam NA, Rowan AJ, Wortham NC, *et al.* Genetic and functional analyses of FH mutations in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis, hereditary leiomyomatosis and renal cancer, and fumarate hydratase deficiency. *Hum Mol Genet* 2003; 12:1241-52.

Alberio S, Mineri R, Tiranti V, Zeviani M. Depletion of mtDNA: syndromes and genes. *Mitochondrion* 2007; 7:6-12.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-65.

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, *et al.* Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999; 23: 147.

Arends J.W. Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal cancer. *J Pathol* 2000; 190: 412-16.

Arnold CN, Goel A, Compton C, *et al.* Evaluation of microsatellite instability, hMLH1 expression and hMLH1 promoter hypermethylation in defining the MSI phenotype of colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 73-8.

Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HR. Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 1998; 82: 1808-20.

Banerjea A, Bustin SA, Dorudi S. The immunogenicity of colorectal cancers with high degree microsatellite instability. *World J Surg Oncol* 2005; 3: 26.

Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, *et al.* Karyotypic Characterization of Colorectal Adenocarcinomas. *Genes Chrom Cancer* 1995; 12: 97-109.

Benatti P, Gafà R, Barana D, *et al.* Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8332-40.

Bohr VA, Stevnsner T, de Souza-Pinto NC. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene* 2002; 286: 127-34.

Bianchi NO, Bianchi MS, Richard SM. Mitochondrial genome instability in human cancers. *Mutat Res* 2001; 488: 9-23.

Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sorensen FB, *et al.* Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 2005; 54: 374-84.

Bishop DT, Hall NR. The genetics of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1946-55.

Bleiberg H, Kemeny N, Rougier P, *et al.* Colorectal Cancer – A clinical guide to therapy. Martin Dunitz Ltd, United Kingdom 2002.

Bocker T, Schlegel J, Kullmann F, *et al.* Genomic instability in colorectal carcinomas: comparison of different evaluation methods and their biological significance. *J Pathol* 1996; 179: 15-9.

Boland CR, Sinicrope FA, Brenner DE, *et al.* Colorectal cancer prevention and treatment. *Gastroenterology* 2000; 118: S115-28.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-57.

Børresen AL, Lothe RA, Meling GI, *et al.* Somatic mutations in the hMSH2 gene in microsatellite unstable colorectal carcinomas. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2065-72.

Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-9.

Butler JM. *Forensic DNA Typing*, 2nd Edition 2005 Elsevier Academic Press 2005.

Cabrera CM, Jiménez P, Cabrera T, *et al.* Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 2003; 61: 211-9.

Caestecker MP, Piek E, Roberts AB. Role of transforming growth factor- β signaling in cancer;. *J Natl Inst* 2000; 92: 1388-402.

Calin GA, Gafa R, Tibiletti MG, *et al.* Genetic progression in microsatellite instability high (MSI-H) colon cancers correlates with clinico-pathological parameters: A study of the TGRbetaR2, BAX, hMSH3, hMSH6, IGFIIR and BLM genes. *Int J Cancer* 2000; 89: 230-5.

Calistri D, Rengucci C, Seymour I, *et al.* Mutation analysis of p53, K-ras, and BRAF genes in colorectal cancer progression. *J Cell Physiol* 2005; 204: 484-8.

Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, *et al.* Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; 126: 394-401.

Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 2002; 1:9.

Catasus L, Matias-Guiu X, Machin P, *et al.* Frameshift mutations at coding mononucleotide repeat microsatellites in endometrial carcinoma with microsatellite instability. *Cancer* 2000; 88: 2290-7.

Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 2003; 15: 463-9.

Colombino M, Cossu A, Manca A, *et al.* Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13: 1447-53.

Colorectal cancer collaborative group. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8507 patients from 22 randomised trials. *The Lancet* 2001; 358: 1291-1304.

Crespo P, León J. Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1613-36.

Davies H, Bignell GR, Cox C, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-54.

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001; 29: 117-129.

Domingo E, Espín E, Armengol M, *et al.* Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chrom Cancer* 2004; 39: 138-42.

Duval A, Reperant M, Compoin A, *et al.* Target gene mutation profile differs between gastrointestinal and endometrial tumors with mismatch repair deficiency. *Cancer Res* 2002a; 62: 1609-12.

Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res.* 2002b; 62: 2447-54.

Duval A, Iacopetta B, Ranzani GN, *et al.* Variable mutation frequencies in coding repeats of TCF-4 and other target genes in colon, gastric and endometrial carcinoma showing microsatellite instability. *Oncogene* 1999; 18: 6806-9.

Edkins S, O'Meara S, Parker A, *et al.* Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 928-32.

Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2078-93.

Epstein FH, Blobe GC, Sciemann WP, *et al.* Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350-8.

Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, *et al.* Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2000a; 60: 2368-71.

Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 2000b; 36: 2294-300.

Estrutura do *Major Histocompatibility Complex*, [online 2 de Outubro de 2007]. In: URL: www.virtual.epm.br/material/tis/cun-bio/trab99/mhc/estrut.htm.

Fang DC, Fang L, Wang RQ, *et al.* Nuclear and mitochondrial DNA microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in Chinese. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 371-5.

Farber RA, Petes TD, Dominska M, *et al.* Instability of simple sequence repeats in a mammalian cell line. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 253-6.

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

Ferlay J, Bray F, Pisani P, *et al.* GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase nº5, version 2.0, IARCPress, Lyon, 2004.

Fernandez-Peralta AM, Nejda N, Oliart S, *et al.* Significance of mutations in TGFBR2 and BAX in neoplastic progression and patient outcome in sporadic colorectal tumors with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 157: 18-24.

Fernebro E, Halvarsson B, Baldetorp B, *et al.* Predominance of CIN versus MSI in the development of rectal cancer at young age. *BMC Cancer* 2002; 2: 25.

Fransen K, Klintenas M, Osterstrom A, *et al.* Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2004; 25: 527-33.

Frattini M, Balestra D, Suardi S, *et al.* Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4015-21.

GenBank, National Center for Biotechnology Information. [online 28 de Setembro de 2007]. *In:* URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>.

Gervaz P, Cerottini JP, Bouzourene H, *et al.* Comparison of microsatellite instability and chromosomal instability in predicting survival of patients with T3N0 colorectal cancer. *Surg* 2002; 131: 190-7.

Gervaz P, Bucher P, Morel P. Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. *J Surg Oncol* 2004; 88: 261-6.

Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K, *et al.* Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 755-62.

Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 11-27.

Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK, *et al.* Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77.

Guleng G, Lovig T, Meling GI, *et al.* Mitochondrial microsatellite instability in colorectal carcinomas--frequency and association with nuclear microsatellite instability. *Cancer Lett* 2005; 219: 97-103.

Habano W, Nakamura S, Sugai T. Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: Evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. *Oncogene* 1998; 17: 1931-7.

Habano W, Sugai T, Yoshida T, *et al.* Mitochondrial gene mutation, but not large-scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instability. *Int J Cancer* 1999; 83: 625-9.

Halford S, Sasieni P, Rowan A, et al. Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res* 2002; 62: 53–7.

Hebert E. Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor expression and tumor development. *Biosci Rep* 2006; 26: 7-17.

10

Hemminki A., Mecklin JP, Järvinen H., *et al.* Microsatellite Instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000; 119: 921-8.

Horai S, Hayasaka K. Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 828-42.

Iacopetta BJ, Welch J, Soong R, *et al.* Mutation of the transforming growth factor- β type II receptor gene in right-sided colorectal cancer: relationship to clinicopathological features and genetic alterations. *J Path* 1998; 184: 390-5.

Ikeda Y, Oda S, Abe T, *et al.* Features of microsatellite instability in colorectal cancer: comparison between colon and rectum. *Oncology* 2001; 61: 168-74.

Ilyas M, Straub J, Tomlinson IPM, *et al.* Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1986-2002.

Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil. Registo Oncológico Regional do Norte, RORENO, 2001.

International Agency for Research on Cancer (IARC); Cancer Databases; IARC Cancer Epidemiology Database; WHO [online 28 de Janeiro de 2007]. In: URL: <http://www.dep.iarc.fr/WHO.html>.

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

Jass JR, Barker M, Fraser L, *et al*. APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2003; 56: 69-73.

Jones JB, Song JJ, Hempen PM, *et al*. Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a "mass"-ive advantage over detection of nuclear DNA mutations. *Cancer Res* 2001; 61: 1299-304.

Junqueira LC, Zago D. Fundamentos de Embriologia Humana, Segunda edição. Editora Guanabara Koogan: 130, 1977.

Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, *et al*. Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Path* 2001; 195: 171-8.

Kerr D, Midgley R. Colorectal cancer. *The Lancet* 1999; 353: 391-9.

Kerkhoff E, Rapp UR. Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* 1998; 17: 1457-62.

Kirches E, Michael M, Warich-Kirches M, *et al.* Heterogeneous tissue distribution of a mitochondrial DNA polymorphism in heteroplasmic subjects without mitochondrial disorders. *J Med Genet* 2001; 38: 312-7.

Kloor M, Michel S, Buckowitz B, *et al.* Beta2-microglobulin mutations in microsatellite unstable colorectal tumors. *Int J Cancer* 2007; 121: 454-8.

Koi M, Umar A, Chauhan DP, *et al.* Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res* 1994; 54: 4308-12.

Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, *et al.* Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2004; 108: 237-42.

Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, *et al.* Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 709-15.

Lee HC, Li SH, Lin JC, *et al.* Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutat Res* 2004; 547: 71-8.

Lee JS, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas MA. Rectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Surg* 2001; 181: 207-10.

Leslie A, Carey FA, Pratt NR, *et al.* The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 2002; 89: 845-60.

Lièvre A, Chapusot C, Bouvier AM, *et al.* Clinical value of mitochondrial mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3517-25.

Lin JK, Chang SC, Wang HS, *et al.* Distinctive clinicopathological features of Ki-ras mutated colorectal cancers. *J Surg Oncol* 2006; 94: 234-41.

Liu F, Hata A, Baker JC, *et al.* A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 1996; 381: 620-3.

Liu F. Receptor-regulated Smads in TGF-beta signaling. *Front Biosci* 2003; 8: s1280-303.

Lleonart ME, García-Foncillas J, Sánchez-Prieto R, *et al.* Microsatellite instability and p53 mutations in sporadic right and left colon carcinoma: different clinical and molecular implications. *Cancer* 1998; 83: 889-95.

Loukola A, Eklin K, Laiho P, *et al.* Microsatellite Marker Analysis in Screening for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001; 61: 4545-9.

Lubomierski N, Plotz G, Wormek M, *et al.* BRAF mutations in colorectal carcinoma suggest two entities of microsatellite-unstable tumors. *Cancer* 2005; 104: 952-61.

Lungu O, Wright TC Jr, Silverstein S. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 145-52.

Lynch HT, Smyrk T, Lynch J. An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer genet Citogenet* 1997; 93: 84-99.

Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-32.

Maestro ML, Vidaurreta M, Sanz-Casla MT, *et al.* Role of the BRAF mutations in the microsatellite instability genetic pathway in sporadic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:1229-36.

Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, *et al.* Frameshift mutator mutations. *Nature* 1996; 382: 499-500.

Manfred O. Neuronal cell death / Neurodegenerative disorders [*online* 2 de Outubro de 2007]. *In* URL: www.cup.uni-muenchen.de/pb/aks/ewagner/neuropharmacology.htm.

Messerini L, Viteli F, De Vitis LR, *et al.* Microsatellite instability in sporadic mucinous colorectal carcinomas relationship to clinico-pathological variables. *J Pathol* 1997; 182: 380-4.

Marti TM, Kunz C, Fleck O. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol* 2002; 191: 28-41.

Miquel C, Borrini F, Grandjouan S, *et al.* Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 562-70.

MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database [*online* 28 de Setembro de 2007]. *In*: URL: <http://www.mitomap.org>.

Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1991; 25: 229-53.

Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, *et al.* Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2936-43.

Müllенbach R, Lagoda PJ, Welter C, *et al.* Efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends in Genet* 1989; 5: 391.

Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, *et al.* A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1995; 55 5545-7.

Miyaki M, Iijima T, Yamaguchi T, *et al.* Both BRAF and KRAS mutations are rare in colorectal carcinomas from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Lett* 2004; 211: 105-9.

Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K, *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: 4584-94.

Nakaji S, Umeda T, Shimoyama T, *et al.* Environmental factors affect colon carcinoma and rectal carcinoma in men and women differently. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 481-6.

Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer* 2003; 2: 41.

Nekhaeva E, Bodyak ND, Kraytsberg Y, *et al.* Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 5521-6.

Nilbert M, Planck M, Fernebro E, *et al.* Microsatellite instability is rare in rectal carcinomas and signifies hereditary cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35: 942-5.

Oliveira C, Seruca R, Seixas M, *et al.* The clinicopathological features of gastric carcinomas with microsatellite instability may be mediated by mutations of different "target genes": a study of the TGFbeta RII, IGFII R, and BAX genes. *Am J Pathol* 1998; 153: 1211-9.

Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, *et al.* Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 12122-7.

Omholt K, Platz A, Kanter L, *et al.* NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 6483-8.

Orimo H, Nakajima E, Ikejima M, *et al.* Frameshift mutations and a length polymorphism in the hMSH3 gene and the spectrum of microsatellite instability in sporadic colon cancer. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 1310-5.

Oto M, Koguchi A, Yuasa Y. Analyses of a polyadenine tract of the transforming growth factor- β type II receptor gene in colorectal cancers by non-gel-sieving capillary electrophoresis. *Clin Chemistry* 43: 759-63, 1997.

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Liu B, *et al.* Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science* 1995; 268: 1915-7.

Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers* 2004; 20:199–206.

Pedersen A, Johansen C, Gronbaek M. Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut* 2003; 52: 861-7.

Peltomaki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res* 2001a; 488: 77-85.

Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001b; 10: 735-40.

Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* 1996; 377: 675-84.

Perucho M. Correspondence re: C.R. Boland et al., A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-57.

Pinto M, Oliveira C, Cirnes L, *et al.* Promoter methylation of TGFbeta receptor I and mutation of TGFbeta receptor II are frequent events in MSI sporadic gastric carcinomas. *J Pathol* 2003; 200: 32-8.

Polyak K, Li Y, Zhu H, *et al.* Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 1998; 20: 291-3.

Potočnik U, Glavac D, Ravnik-Glavac M. Identification of novel genes with somatic frameshift mutations within coding mononucleotide repeats in colorectal tumors with high microsatellite instability. *Genes Chrom Cancer* 2003; 36: 48-56.

Potter JD. Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Causes and Control* 1996; 7: 127-46.

Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, *et al.* Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275: 967-9.

Risio M, Reato G, Francia di celle P, *et al.* Microsatellite instability is associated with the histological features of the tumor in nonfamilial colorectal cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 5470-4.

Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, *et al.* p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 7555-9.

Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Pekka-Mecklin J, *et al.* Rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy. International Collaborative Group on HNPCC. *Ann Surg* 1997; 225: 202-7.

Salahshor S, Kressner U, Pählman L, *et al.* Colorectal cancer with and without microsatellite instability involves different genes. *Genes Chrom Cancer* 1999; 26: 247-52.

Samowitz WS, Curtin K, Ma K, *et al.* Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2001; 10: 917-23.

Samowitz WS, Curtin K, Neuhausen S, *et al.* Prognostic implications of Bax and TGF- β RII mutations in colon cancers with microsatellite instability. *Genes Chrom Cancer* 2002; 35: 368-71.

Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Nomoto S, *et al.* Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 7015-9.

Sandhu MS, Dunger DB, Giovannucci EL. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 972-80.

Sauer R. Adjuvant and neo-adjuvant radiotherapy and concurrent radiochemotherapy for rectal cancer. *Pathology Oncology Research* 2002; 8: 7-17.

Scott CD, Firth SM. The role of the M6P/IGF-II receptor in cancer: tumor suppression or garbage disposal? *Horm Metab Res* 2004; 36: 261-71.

Scott N, Bell SM, Sagar P, *et al.* p53 expression and K-ras mutation in colorectal adenomas. *Gut* 1993; 34: 621-4.

Schwartz S Jr, Perucho M. Somatic mutations in mitochondrial DNA do not associate with nuclear microsatellite instability in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 2000; 119: 1806-8.

Senba S, Konishi F, Okamoto T, *et al.* Clinicopathologic and genetic features of nonfamilial colorectal carcinomas with DNA replication errors. *Cancer* 1998; 82: 279-85.

Shang Y. Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. Nat Rev Cancer 2006; 6: 360-8.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature 1999; 399: 483-7.

Shin K-H., Park Y.J., Park J-G. Mutational Analyses of the transforming growth factor β receptor type II gene in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and early-onset colorectal cancer patients. Clin Cancer Res 2000; 6: 536-40.

Skibber JM, Minsky BD, Hoff PM, Cancer of the colon. In: DeVita Jr. VT, Helman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: Principle and practice of oncology, 6^a Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 2000.

Smith G, Carey FA, Beattie J, *et al.* Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 9433-8.

Smyrk TC, Watson P, Kaul K, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. American Cancer Society 2001; 91: 2417-22.

Spirio L, Joslyn G, Nelson L, *et al.* A CA repeat 30-70 KB downstream from the adenomatous polyposis coli (APC) gene. Nucleic Acids Res 1991; 19: 6348.

Söreide K, Janssen EA, Söiland H, Körner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 2006; 93: 395-406.

Sugai T, Habano W, Jiao YF, *et al.* Analysis of molecular alterations in left- and right-sided colorectal carcinomas reveals distinct pathways of carcinogenesis: proposal for new molecular profile of colorectal carcinomas. *J Mol Diagn* 2006; 8: 193-201.

Suraweera N, Duval A, Reperant M, *et al.* Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002; 123: 1804-11.

Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, *et al.* Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol* 2006; 41: 185-92.

Tan DJ, Chang J, Liu LL, *et al.* Significance of somatic mutations and content alteration of mitochondrial DNA in esophageal cancer. *BMC Cancer* 2006; 6: 93.

The organisation and function of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway Expert Reviews in Molecular Medicine 2002 Cambridge University Press.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-9.

Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, *et al.* Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996; 56: 4836-40.

Toft NJ, Arends MJ. DNA mismatch repair and colorectal cancer. *J Pathol* 1998; 185: 123-9.

Togo G, Toda N, Kanai F, *et al.* A transforming growth factor β type II receptor gene mutation common in sporadic cecum cancer with microsatellite instability. *Cancer Research* 1996; 56: 5620-3.

Togo G, Shiratori Y, Okamoto M, *et al.* Relationship between grade of microsatellite instability and target genes of mismatch repair pathways in sporadic colorectal carcinoma. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1615-22.

Trichopoulos D, Lipworth L, Petridou E, *et al.* Epidemiology of Cancer. *In*: Vincent T, DeVita, editor. *Cancer principle of Oncology*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1997.

Trojan J, Brieger A, Raedle J, *et al.* BAX and caspase-5 frameshift mutations and spontaneous apoptosis in colorectal cancer with microsatellite instability. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 538-44.

Trust sanger Institute [online 28 de Setembro de 2007]. In URL: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

Umar A, Koi M, Risinger JI, *et al*. Correction of hypermutability, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine resistance, and defective DNA mismatch repair by introducing chromosome 2 into human tumor cells with mutations in MSH2 and MSH6. *Cancer Res* 1997; 57: 3949-55.

van Engeland M, Roemen GM, Brink M, *et al*. K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer. *Oncogene* 2002; 21: 3792-5.

Vaurs C, Bignon YJ. [What's new about microsatellite instability significance in human carcinogenesis?] *Bull Cancer* 1997; 84: 1061-71.

Wang L, Cunningham JM, Winters JL, *et al*. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 2003; 63: 5209-12.

Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, *et al*. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 1196-206.

Watanabe T, Kobunai T, Toda E, *et al*. Distal colorectal cancers with microsatellite instability (MSI) display distinct gene expression profiles that are different from proximal MSI cancers. *Cancer Res* 2006; 66: 9804-8.

Weber JL, Kwitek AE, May PE, *et al.* Dinucleotide repeat polymorphisms at the D17S250 and D17S261 loci. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 4640.

Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1123-8.

Wei EK, Giovannucci E, Wu Kana, *et al.* Comparison of risk factors for cplon and rectal cancer. *Int J Cancer* 2004; 108: 433-42.

Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, *et al.* A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992; 359: 794-801.

Whitehall VL, Walsh MD, Young J, *et al.* Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; 61: 827-30.

Woerner SM, Gebert J, Yuan YP, *et al.* Systematic identification of genes with coding microsatellite mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells; *Int J Cancer* 2001; 93: 1112-9.

Wong LJ. Diagnostic challenges of mitochondrial DNA disorders. *Mitochondrion* 2007; 7: 45-52.

Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, *et al.* Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 3784-91.

Yingling JM, Das P, Savage C, *et al.* Mammalian dwarfins are phosphorylated in response to transforming growth factor beta and are implicated in control of cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 8940-4.

Yuen ST, Davies H, Chan TL, *et al.* Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 2002; 62: 6451-5.

Zhou S, Buckhaults P, Zawel L, *et al.* Targeted deletion of Smad4 shows it is required for transforming growth factor beta and activin signaling in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 2412-6.

.

