

ERNANDA RAQUEL DE QUEIRÓS GONÇALVES DE SOUSA E FERNANDES

**INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA
MOLECULAR EM AMOSTRAS DE PACIENTES JOVENS COM CARCINOMA
COLORRETAL PROCESSADAS ROTINEIRAMENTE PARA DIAGNÓSTICO
ANÁTOMOPATOLÓGICO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2007

ERNANDA RAQUEL DE QUEIRÓS GONÇALVES DE SOUSA E FERNANDES

**INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA
MOLECULAR EM AMOSTRAS DE PACIENTES JOVENS COM CARCINOMA
COLORRETAL PROCESSADAS ROTINEIRAMENTE PARA DIAGNÓSTICO
ANÁTOMOPATOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Patologia da Universidade Federal de Minas
Gerais, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientadora: Profa. Dra. Ana Margarida Miguel

Ferreira Nogueira

Belo Horizonte

2007

F363i Fernandes, Ernanda Raquel de Queirós Gonçalves de Sousa e.
Instabilidade de microssatélites em carcinoma colorretal de pacientes jovens por técnicas de biologia molecular em amostras processadas rotineiramente para diagnóstico anátomo-patológico [manuscrito] / Ernanda Raquel de Queirós Gonçalves de Sousa e Fernandes. – 2007.
xx f., enc. : il.

Orientadora : Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira.

Área de concentração: Patologia Geral.

Linha de pesquisa: Patologia Gastrointestinal.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

Bibliografia: f. xx-xx.

Apêndices: f. xx-xx.

Anexos: f. xx-xx.

1. Carcinoma – Teses. 2. Neoplasias retais – Teses. 3. Reto – Câncer – Teses.
4. Microssatélites (Genética) – Teses. 5. Reação em cadeia da polimerase – Teses.
6. Inclusão em parafina – Teses. 7. Patologia – Teses. 8. Adolescente – Teses.
9. Câncer – Pacientes – Teses. I. Nogueira, Ana Margarida Miguel Ferreira.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WI 610

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Reitor

Prof. Ronaldo Tadêu Pena

Vice-Reitora

Profa. [Heloisa Maria Murgel Starling](#)

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Jaime Arturo Ramirez

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Carlos Faria Santos Amaral

Sub-coordenador do Centro de Pós-Graduação

João Lúcio dos Santos Jr.

Chefe do Departamento de Anatomia Patológica em Medicina Legal

Profa. Ana Maria Arruda Lana

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia

Prof. Geovanni Dantas Cassali

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia

Profa. Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA**

Prof. Geovanni Dantas Cassali

Profa. Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira

Prof. Anílton César Vasconcelos

Prof. Edilberto Nogueira Mendes

Profa. Helenice Gobbi

Prof. Wagner Luiz Tafuri

Enio Ferreira (representante discente)

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, **Joaquim**, pelo investimento na minha formação intelectual e pelos anos de convivência. À minha mãe, **Maria do Amparo**, por todo amor, dedicação e suporte emocional em todos os momentos da minha vida. Ao meu querido irmão **Eugênio**, por toda a ajuda que me foi prestada nesse caminhar. A todos os meus queridos **familiares** pelo apoio e pela presença permanentes.

Dedico a vocês com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Foram tantas as ajudas prestimosas e o empenho das pessoas envolvidas nesse trabalho que é com grande alegria que venho agradecer especialmente a cada uma delas.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira, por ter me aceito em seu laboratório de pesquisa e ter me proporcionado o acesso a uma riqueza de conhecimentos e o envolvimento com a pesquisa científica. Além de exemplo de exímio profissionalismo e competência.

Agradeço ao Dr. José Nélio Januário, diretor do NUPAD, pelo financiamento do referido projeto e por ter uma capacidade visionária de investir na pesquisa acadêmica dentro de um dos laboratórios mais bem conceituados de Minas Gerais, pertencente à Faculdade de Medicina da UFMG.

Muito especialmente e com grande apreço, agradeço à Dra. Dora Mendez del Castillo, coordenadora do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do NUPAD, pelo apoio incondicional, por ser exemplo prático de profissionalismo, inteligência, conhecimento e humanidade. Agradeço não só por este momento, mas por todos os anos de rica convivência e aprendizado.

Agradeço ao Dr. Carlos Perone, supervisor do setor de biologia molecular do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do NUPAD, pelos conhecimentos e pela assessoria científica prestada no desenvolvimento laboratorial deste trabalho.

Agradeço à Gilsimary Lessa Pereira, supervisora técnica do setor de biologia molecular do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do NUPAD, pela ajuda no desenvolvimento técnico de bancada deste trabalho. Sua experiência foi fundamental para o andamento do projeto.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Citogenética do HC – UFMG, especialmente à Marlene Campos Rodrigues Rezende e Raquel Roque Souza pelo apoio, compreensão e pela valorização do conhecimento.

Agradeço ao Professor Doutor Aloísio Sales da Cunha pela generosa contribuição ao meu ingresso no programa de pós-graduação. Além da presença constante nos momentos de dúvidas e questionamentos.

Agradeço à doutoranda Christiane Teixeira Cartelle pela experiente ajuda que me foi prestada nos momentos finais da execução intelectual deste trabalho.

Agradeço aos meus queridos familiares, que diariamente foram meu suporte emocional e sustentáculo nos momentos de necessidade. Especialmente ao meu irmão Eugênio Paccelli Fernandes. A ajuda de vocês é primordial e imprescindível na minha vida.

Agradeço a Deus, pela sua infinita bondade e constante paciência em nos orientar e conduzir.

PARCERIA ENTRE OS LABORATÓRIOS

Este trabalho foi realizado graças à parceria entre os Laboratórios abaixo:

Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico – NUPAD, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG.

Laboratório de Patologia Gastrointestinal, Departamento de Anatomia Patológica e Medicina
Legal, Faculdade de Medicina, UFMG.

“Não acrediteis em coisa alguma
Pelo fato de vos mostrarem o testemunho escrito
De algum sábio antigo;
Não acrediteis em coisa alguma
Com base na autoridade de mestres e sacerdotes;
Aquilo, porém, que se enquadrar na vossa razão,
E depois de minucioso estudo
For confirmado pela vossa experiência,
Conduzindo ao vosso próprio bem
E ao de todas as outras coisas vivas;
A isso aceitai como verdade:
Por isso, pautai vossa conduta!”

BUDA

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vii
AGRADECIMENTOS	viii
PARCERIA ENTRE OS LABORATÓRIOS	x
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE GRÁFICOS	xv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. A genética e o carcinoma colorretal	4
3.2. Genes de reparo do DNA e instabilidade de microssatélites	7
3.3. Carcinoma colorretal hereditário e esporádico	12
3.4. Características clínico-patológicas dos carcinomas colorretais em relação ao <i>status</i> erros de replicação do DNA	18
3.5. Carcinoma colorretal no Brasil	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Seleção dos casos de carcinoma colorretal	23

4.2. Dissecção, extração e amplificação do DNA	24
4.3. Reação em cadeia da polimerase	27
4.3.1. Padronização em amostra de sangue	27
4.3.2. Casos de carcinoma colorretal	31
4.4. Instabilidade de microssatélites – análise da presença de erros de replicação do DNA	32
4.5. Correlação com características anátomo-patológicas dos carcinomas colorretais	32
4.6. Análise estatística	33
4.7. Aspectos éticos	33
5. RESULTADOS	34
5.1. Extração e amplificação do DNA	34
5.2. Análise da instabilidade de microssatélites – classificação do <i>status</i> erros de replicação do DNA	34
5.3. Correlação da instabilidade microssatélites com os dados clínico-patológicos dos carcinomas colorretais	46
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
Anexos	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Amplificação alélica dos cinco microssatélites estudados numa amostra de sangue. Eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% corado com solução de nitrato de prata 30
- Figura 2:** Caso de carcinoma colorretal com estabilidade em todos os microssatélites estudados. Eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% corado com solução de nitrato de prata 42
- Figura 3:** Caso de carcinoma colorretal com instabilidade em todos os microssatélites estudados, caracterizando alta instabilidade. As setas indicam os alelos extras que surgem a partir dos erros de replicação do DNA na amostra do tumor. Eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% corado com solução de nitrato de prata 43
- Figura 4:** Caso de carcinoma colorretal com instabilidade nos microssatélites BAT25, BAT26, D5S346 e D17S250[Mfd15CA], caracterizando alta instabilidade. As setas indicam os alelos extras que surgem a partir dos erros de replicação do DNA na amostra do tumor. Eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% corado com solução de nitrato de prata 44
- Figura 5:** Caso de carcinoma colorretal com instabilidade no microssatélite D17S250[Mfd15CA], caracterizando baixa instabilidade. A seta indica os alelos extras que surgem a partir dos erros de replicação do DNA na amostra do tumor. Eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% corado com solução de nitrato de prata 45

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Classificação do *status* erros de replicação do DNA em 48 casos de carcinoma colorretal 36
- Gráfico 2:** Frequência alta e baixa instabilidade de microssatélites em 24 casos de casos de carcinoma colorretal 37
- Gráfico 3:** Frequência de erros de replicação do DNA nos cinco microssatélites estudados em 15 casos de carcinoma colorretal com alta instabilidade de microssatélites 38
- Gráfico 4:** Frequência de erros de replicação do DNA nos cinco microssatélites estudados em sete casos de carcinoma colorretal com baixa instabilidade de microssatélites 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos cinco microssatélites estudados e seqüência dos <i>primers</i> e <i>primers</i> reverso	11
Tabela 2: Frequência de erros de replicação do DNA em cinco microssatélites estudados em 48 casos de carcinoma colorretal	35
Tabela 3: Frequência de microssatélites instáveis por tipo de instabilidade encontrada em 24 casos de carcinoma colorretal	40
Tabela 4: Número de microssatélites instáveis em 24 casos de carcinoma colorretal	41
Tabela 5: Correlação entre as características clínico-patológicas e o <i>status</i> erros de replicação do DNA nos casos de carcinoma colorretal estudados	47

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>APC</i>	Gene da adenomatose familiar polipóide
<i>BRCA1</i>	Gene do câncer de mama tipo 1
CCR	Câncer colorretal
<i>c-kit</i>	Gene <i>c-kit</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EUA	Estados Unidos da América
<i>FAP</i>	Polipose adenomatosa familiar
FMM	Fenótipo mutador microssatélite
HC	Hospital das Clínicas
h	Horas
<i>hMLH1</i>	Gene <i>human mutL homolog 1</i>
<i>hMLH3</i>	Gene <i>human mutL homolog 3</i>
<i>hMSH2</i>	Gene <i>human mutS homolog 2</i>
<i>hMSH3</i>	Gene <i>human mutS homolog 3</i>
<i>hMSH6</i>	Gene <i>human mutS homolog 6</i>
<i>HNPCC</i>	Câncer colorretal não poliposo hereditário
<i>hPMSH1</i>	Gene <i>human postmeiotic segregation 1</i>
<i>hPMSH2</i>	Gene <i>human postmeiotic segregation 2</i>
IMS	Instabilidade de microssatélites
IMS-A	Instabilidade de microssatélites de alta frequência
IMS-B	Instabilidade de microssatélites de baixa frequência

<i>K-ras</i>	Gene <i>K-ras</i>
<i>LOH</i>	Perda de heterozigosidade
μ l	Microlitro
M	Molar
mM	Milimolar
min	Minutos
ml	Mililitro
<i>MMR</i>	Genes de reparo do DNA
MSE	Microssatélites estáveis
<i>NCI</i>	<i>Nacional Cancer Institute</i>
ng	Nanograma
pb	Pares de base
<i>PCR</i>	Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomol
<i>RER</i>	Erros de replicação do DNA
rpm	Rotações por minuto
seg	Segundos
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal (CCR) é a segunda neoplasia mais comum nos países em desenvolvimento depois do câncer de pulmão em homens e do câncer de mama em mulheres. Os microssatélites são seqüências curtas repetitivas de nucleotídeos presentes em todo genoma humano, susceptíveis a expandir-se ou contrair-se durante a replicação do DNA. Nos tumores com deficiência nos genes de reparo do DNA (*MMR*), essas expansões ou contrações não são reparadas, ocasionando o fenômeno de instabilidade de microssatélites (IMS), que pode ser alta (IMS-A) ou baixa (IMS-B). Os microssatélites são considerados marcadores fenotípicos de prognóstico, de resposta terapêutica e de identificação de pacientes com mutações nos *MMR*. Pacientes com mutações nos *MMR* estão predispostos a desenvolver a síndrome do câncer colorretal não-poliposo hereditário (*HNPCC*). A IMS foi descrita na maioria dos CCR de pacientes com *HNPCC* (5%) e em cerca de 15% dos tumores esporádicos. Assim, a avaliação da IMS no CCR reveste-se de enorme importância prática e há a idéia de que, num futuro próximo, sua pesquisa seja sugerida como complemento do diagnóstico e prognóstico nestes tumores. **Objetivos:** Padronizar o método de biologia molecular para a detecção de IMS em amostras de CCR de pacientes jovens processadas rotineiramente para diagnóstico anátomo-patológico, caracterizar a IMS em alta ou baixa, correlacionar a presença e o tipo de IMS com as características anátomo-patológicas do CCR. **Material e métodos:** Foram estudados 48 CCR de pacientes com idade igual ou inferior a 40 anos. Os casos selecionados foram provenientes de material embocado em parafina. Selecionaram-se à microscopia óptica, as áreas mais adequadas do tumor e da mucosa normal, de um mesmo paciente, para a realização dos testes moleculares, feitos através da reação em cadeia da polimerase (*PCR*). As extrações foram feitas utilizando-se kit comercial. As eletroforeses foram feitas em gel de poliacrilamida. Os microssatélites testados foram BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S250[Mfd15CA]. **Resultados:** Extraiu-se DNA adequado para a pesquisa de IMS em todos os casos, à exceção de um caso, pois apenas um microssatélite amplificou (BAT26). O microssatélite com maior frequência de ampliações foi o BAT26 (100%) e o menos frequente foi o D2S123 (83,3%); 21 casos (43,8%) apresentaram-se microssatélites estáveis (MSE), 24 casos (50%) apresentaram-se com IMS, 15 casos (62,5%) com IMS-A e sete casos (29,2%) com IMS-B. A maioria dos CCR (60,5%) localizava-se no cólon esquerdo, eram predominantemente anulares-constritivos (39,6%). A resposta linfocítica era discreta ou ausente na maior parte dos casos (58,1%). A maioria dos tumores foi estadiada como pT3 (67,4%) e 14 casos (38,9%) tinham metástases em linfonodos. Os tumores com instabilidade eram mais frequentes em homens, localizavam-se preferencialmente no cólon direito e a resposta linfocítica era mais frequentemente encontrada. **Conclusões:** O resultado da detecção da amplificação alélica do DNA variou conforme o microssatélite testado. O microssatélite mais sensível foi o BAT26 (100%) e o menos sensível foi o D2S123 (83,3%). A frequência de casos MSE foi menor que a de casos com IMS. Entre os casos instáveis, a frequência de casos com IMS-A foi maior que a de casos com IMS-B. Nos casos com IMS-B não foi encontrada instabilidade nos microssatélites mononucleotídeos (BAT25 e BAT26). Os CCR com IMS foram mais frequentes em homens, localizavam-se preferencialmente no cólon direito, com macroscopia anular-constritiva, com resposta linfocítica peritumoral de discreta a moderada.

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer (CCR) is the second most common neoplasia in the developing countries, after lung cancer in men and breast cancer in women. Microsatellites are repetitive short sequences of nucleotides in all human being genome, susceptible to enlarged or contract itself during DNA replication. Tumors that present deficiency in DNA repair genes (*MMR*), these expansions or contractions are not repaired, causing microsatellites instability (MSI), that can be high (MSI-H) or low (MSI-L). Microsatellites are considered phenotype markers for prognostic, therapeutic reply and identification of patients with mutations in *MMR*. Patients with mutations in *MMR* are supposed to develop hereditary non-polyposis colorectal cancer (*HNPCC*) syndrome. MSI was present in the majority of the CCR patients with *HNPCC* (5%) and about 15% in sporadic tumors. Therefore, MSI evaluation in CCR shows practical importance and in near future its research may be suggested as a complement for diagnosis and prognostic in these tumors. **Objectives:** To standardize molecular biology method for the detection of MSI in CCR samples from young patients performed routinely for anatomic-pathologic diagnosis, to characterize MSI as high or low, to correlate presence and type of MSI with the anatomic-pathologic characteristics of CCR. **Material and methods:** A total of 48 patients, 40 years old or less, presenting CCR was studied. Selected cases were gotten from material embedded in paraffin. Most adequate tumor areas and normal mucosa from the same patient were selected through optic microscopy in order to perform molecular tests by polymerase chain reaction (*PCR*). The extractions were carried out using commercial kit. Electrophoreses were performed in [polyacrilamide](#) gel. Microsatellites: BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 and D17S250[Mfd15CA] were tested. **Results:** Adequate DNA for MSI research was extracted in almost all cases, except for one case in which only one microsatellite amplified (BAT26). Microsatellite BAT26 presented higher amplification frequency (100%) and D2S123 presented lower amplification frequency (83.3%), from the total, 21 cases (43.8%) presented stable microsatellites (MSE), 24 cases (50%) presented MSI, 15 cases (62.5%) with MSI-H and 7 cases (29.2%) MSI-L. The majority of CCR (60.5%) was located in left colon and was predominantly annular-constrictive (39.6%). Lymphocytic reply was discrete or absent in the majority of the cases (58.1%). The majority of the tumors was considered as pT3 (67.4%) and 14 cases (38.9%) showed metastasis in lymphonodes. Tumors with instability were more frequent in men and were located preferentially in right colon and lymphocytic reply was the most frequent found. **Conclusions:** The result of the detention of DNA allelic amplification varied according to the tested microsatellites. The most sensible microsatellite was BAT26 (100%) and the least sensible was D2S123 (83.3%). The frequency of MSE cases was lower than MSI cases. Among unstable cases, the frequency of MSI-H cases was higher than MSI-L cases. In MSI-L cases the instability in the mononucleotides microsatellites was not found (BAT25 and BAT26). CCR with MSI was more frequent in men and was located preferentially in right colon, with annular-constrictive macroscopy, peritumoral lymphocytic reply from discrete to moderate.

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é a segunda neoplasia mais comum nos países em desenvolvimento depois do câncer de pulmão em homens e do câncer de mama em mulheres.

Dois mecanismos patogênicos diferentes são propostos para o CCR. Um, chamado de via supressora, é o mais comum e depende de eventos mutacionais adicionais múltiplos (somáticos e/ou germinativos) nos oncogenes e nos genes supressores de tumor, frequentemente envolvendo deleções cromossômicas em regiões genômicas chaves. Metodologicamente, esta via é reconhecida pelo fenômeno de perda de heterozigosidade (*LOH – loss of heterozygosity*). O outro mecanismo, chamado de via mutadora, depende da perda mutacional inicial do sistema de reparo (somático e/ou germinativo) levando a aceleração do acúmulo de mutações em regiões gênicas críticas e à progressão da malignidade. Metodologicamente, esta segunda via é reconhecida pelo fenômeno de instabilidade de microssatélites (IMS). Os microssatélites são seqüências curtas repetitivas de nucleotídeos presentes em todo genoma humano. Essas repetições tornam-se susceptíveis a expandir-se ou contrair-se durante a replicação do DNA. Nos tumores com deficiência nos genes de reparo do DNA (*mismatch repair system – MMR*), essas expansões ou contrações não são reparadas, ocasionando o fenômeno de IMS, que pode ser diferenciada em alta freqüência de instabilidade (IMS-A) quando é detectada em dois ou mais dos microssatélites estudados, ou baixa freqüência de instabilidade (IMS-B) quando é detectada em apenas um microssatélite estudado.

No câncer colorretal não-poliposo hereditário (*hereditary non-poliposis colorectal cancer – HNPCC*) há mutações nos *MMR* humanos, principalmente nos genes *hMLH1* e *hMSH2*, que

levam a um defeito na correção do reparo durante a replicação do DNA, com um subsequente acúmulo de mutações por todo o genoma, incluindo oncogenes e genes supressores de tumor, os quais podem causar transformação maligna.

A IMS foi inicialmente descrita na maioria dos CCR de pacientes com *HNPCC* e em cerca de 15% dos tumores esporádicos. O mecanismo exato da inativação dos *MMR* associado à IMS em CCR de pacientes com *HNPCC* comparado com a IMS de pacientes com CCR esporádico ainda não está esclarecido. Por outro lado, está relativamente bem esclarecido que o comportamento biológico e a resposta à quimioterapia do CCR associado a IMS são diferentes daqueles CCR sem IMS. Os tumores esporádicos com IMS estão associados a um melhor prognóstico e pior resposta à quimioterapia com 5-Fluorouracil. Do ponto de vista anátomo-patológico, o CCR esporádico com IMS apresenta freqüentemente componente mucinoso, com ou sem células em “anel de sinete” e localiza-se preferencialmente no cólon direito. Além disso, é relatado que tumores indiferenciados ou menos diferenciados são mais freqüentes no grupo com IMS.

Assim, a avaliação da IMS no CCR reveste-se de enorme importância prática e há a idéia de que, num futuro próximo, sua pesquisa será sugerida como complemento do diagnóstico nestes tumores. Essa análise molecular terá que ser realizada em material processado rotineiramente para exame anátomo-patológico. No nosso Serviço, a freqüência de CCR em pacientes jovens, abaixo de 40 anos, é relativamente alta (10%). Isto sugere a possibilidade de existirem pacientes com *HNPCC* não diagnosticados pelos critérios clínicos. O objetivo desse trabalho é a padronização de técnicas de biologia molecular para a detecção de IMS em CCR, a

partir de amostras de pacientes jovens processadas rotineiramente para diagnóstico anátomo-patológico.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é padronizar o método de biologia molecular para a detecção de IMS em amostras de CCR de pacientes jovens processadas rotineiramente para diagnóstico anátomo-patológico.

São objetivos específicos:

- a. Padronizar o método de extração, *PCR* e eletroforese convencional utilizando gel de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% corado pelo nitrato de prata para a detecção de IMS.
- b. Caracterizar a IMS em alta ou baixa.
- c. Correlacionar a presença e o tipo de IMS com as características anátomo-patológicas do CCR.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A genética e o carcinoma colorretal

O CCR é uma das mais freqüentes causas de morte por câncer no mundo ocidental (DIETMAIER *et al.*, 1999). A desestabilização do genoma é um pré-requisito precoce na carcinogênese do CCR (RAUT *et al.*, 2004), pois o acúmulo de alterações genéticas substancia a teoria mutacional do câncer. Mas as alterações epigenéticas também são relevantes para o desenvolvimento tumoral (YAMASHITA *et al.*, 2003). Os tumores colorretais constituem um excelente sistema para estudar a carcinogênese, assim como os eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento de um tumor, pois pode-se obter nas amostras desde adenomas até tumores metastáticos (CLARENS, 2004). Tanto os fatores hereditários como os ambientais contribuem de forma significativa para o seu desenvolvimento, permitindo o estudo de alterações genéticas tanto somáticas quanto herdadas (CLARENS, 2004).

O câncer é o resultado de um processo de múltiplas etapas, dirigidas por alterações genéticas que levam ao surgimento de um clone de células com vantagens proliferativas sobre as demais. Essas alterações podem estar presentes desde em linhagens germinativas, como já descrito em determinadas síndromes predisponentes ao câncer, como sob a forma de mutações somáticas, sendo responsáveis pela grande maioria dos casos esporádicos de neoplasias (PEREZ *et al.*, 1998). A inabilidade do organismo de reparar mutações genéticas somáticas aumenta a possibilidade do acúmulo de outras mutações dentro da célula. Este acúmulo de mutações é a base do entendimento para o desenvolvimento dos processos tumorais instalados (YEARSLEY *et al.*, 2006).

Nos últimos tempos, houve significativo progresso no entendimento das alterações moleculares que acompanham as transformações malignas. O processo de carcinogênese ocorre em etapas, com acúmulo de alterações genéticas múltiplas, incluindo a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor (HONCHEL *et al.*, 1995). Esta expressão pode ocorrer através da produção de proteínas anômalas que potencializam o efeito de fatores de crescimento ou, a expressão de proteínas transdutoras de sinais intracelulares. Normalmente, a expressão de oncogenes durante etapas específicas do ciclo celular é controlada de maneira rígida, participando de fenômenos de crescimento e diferenciação celulares. A sua ativação ou expressão anormal é que está relacionada com seu potencial oncogênico. Genes supressores de tumor funcionam como reguladores negativos de crescimento e quando sofrem uma mutação que leva à perda de sua função ou inativação, deixam de expressar um determinado produto (PEREZ *et al.*, 1998). O silenciamento desses genes tem sido associado a processos de hipermetilação do DNA (YAMASHITA *et al.*, 2003).

O modelo chamado de “two-hit theory”, proposto por Knudson (KNUDSON, 1971), foi de grande importância para o entendimento do câncer e, em especial, para as síndromes de predisposição ao câncer ou câncer hereditário. Segundo este modelo, o indivíduo herda um alelo inativo (mutado) e um alelo normal para um determinado gene supressor de tumor. Uma mutação somática que inativasse o alelo normal contribuiria de forma determinante para o desenvolvimento de uma neoplasia. Assim, dois eventos genéticos seriam necessários para o surgimento de doença, por isso o nome “two-hit theory” (KNUDSON, 1971). Nos casos esporádicos, duas mutações somáticas seriam necessárias, uma vez que o indivíduo herdou dois alelos normais (KNUDSON, 1971). Indivíduos que são heterozigotos para um determinado gene supressor de tumor podem apresentar um alelo normal e outro mutado cuja

presença não traz repercussões biológicas graças à presença do alelo normal. Quando ocorrem mutações que podem afetar o alelo normal desse gene, há repercussões biológicas para a célula (KNUDSON, 1971).

Do ponto de vista da genética molecular é bem conhecido que o fenótipo maligno dos tumores sólidos depende da aquisição de múltiplas alterações genéticas (JASS, 1999). Tem sido sugerido que a geração de mutações depende previamente do estabelecimento de um estado de instabilidade genética (JASS, 1999). No CCR, duas vias de instabilidade genética foram reconhecidas e descritas (JASS, 1999): a) via supressora – que surge através da inativação dos genes supressores de tumor (*APC*, *p53*, *DCC*, dentre outros) com presença de instabilidade cromossômica (CUTAIT *et al.*, 2002; COURA *et al.*, 2005; XICOLA *et al.*, 2007), com freqüentes anormalidades citogenéticas e perdas alélicas (COURA *et al.*, 2005; XICOLA *et al.*, 2007) e ativação de proto-oncogenes (*K-ras* e *myc*) (RAUT *et al.*, 2004). Pertencem a este grupo em torno de 85% dos casos de CCR esporádicos e os hereditários originados da polipose adenomatosa familiar (*familiar adenomatous poliposis – FAP*); b) via mutadora – decorrente de IMS, originada por mutações nos *MMR* com conseqüente inativação das proteínas de reparo. Essa é a base molecular da síndrome do *HNPCC* e de cerca de 15% dos CCR esporádicos (CUTAIT *et al.*, 2002; COURA *et al.*, 2005; XICOLA *et al.*, 2007).

A despeito de décadas de pesquisa, o estadió do tumor é a única variável prognóstica usada como estratégias de decisões clínicas (SINICROPE *et al.*, 2006). Os marcadores prognósticos são necessários para permitir a estratificação de pacientes dentro de grupos que apresentam um risco aumentado ou diminuído de recorrência e metástases e, influenciam estratégias para a vigilância e quimioterapias adjuvantes (SINICROPE *et al.*, 2006). A existência de vias genéticas distintas para a carcinogênese colônica sugere que as características moleculares e

celulares podem ser usadas como marcadores prognósticos ou preditivos (SINICROPE *et al.*, 2006).

3.2. Genes de reparo do DNA e instabilidade de microssatélites

Os *MMR* agem como controladores de qualidade, mantendo a fidelidade do DNA durante a divisão celular (CARRETERO *et al.*, 2001; ROSSI *et al.*, 2004). É um sistema de reparo necessário para a manutenção da estabilidade genômica (PELTOMAKI, 2003). Ao serem ativados, os *MMR* induzem a expressão de uma série de proteínas cuja função é controlar a correta seqüência de pares de bases na cadeia de DNA. Quando detectam uma incorreção, põem em prática os mecanismos necessários para corrigir esse erro e restituem a cadeia de bases em sua seqüência correta (CARRETERO *et al.*, 2001; PELTOMAKI, 2003). Ao ocorrerem mutações nesses genes, as proteínas expressadas perdem sua função de correção da cadeia de DNA, produzindo modificações na seqüência das bases conferindo à célula o aparecimento de instabilidade genômica. As mutações podem ser de diferentes tipos, como desaparecimento de pares de bases, inserção de pares de bases, substituição das mesmas por outras. A instabilidade genômica associada a defeitos nos *MMR* ocasiona o aparecimento do fenômeno de IMS (CARRETERO *et al.*, 2001). Esse fenômeno é também chamado de erros de replicação do DNA (*replication errors – RER*) ou fenótipo mutador microssatélite (FMM).

Os microssatélites são seqüências curtas repetitivas de nucleotídeos presentes em todo genoma humano, preferencialmente em regiões não codificadoras. São chamados de mononucleotídeos se há repetição de uma base, dinucleotídeos se as repetições são de duas bases e assim por diante até o agrupamento de seis bases. A IMS é causada pela falência dos *MMR* e é caracterizada por um acúmulo acelerado de mutações nos nucleotídeos e por

alterações no comprimento das seqüências repetitivas microssatélites (BOLAND *et al.*, 1998; HATCH *et al.*, 2005). Estudos bioquímicos feitos por Parsons *et al* (1993) forneceram uma ligação entre a IMS e *MMR* (PELTOMAKI, 1997). Em torno de 13% de todos os casos de CCR acumulam de cem a milhares de mutações somáticas em seqüências microssatélites (IONOV *et al.*, 1993; YAMASHITA *et al.*, 2003). Os tumores com IMS exibem um fenótipo mutador caracterizado por uma taxa mutacional com uma magnitude duas vezes maior que em células normais (YAMASHITA *et al.*, 2003). Em contrapartida, a presença de instabilidade cromossômica é demonstrada em tumores microssatélites estáveis (MSE) que frequentemente mostram aneuploidias e rearranjos cromossômicos (MARKOWITZ *et al.*, 2002).

Diversos *MMR* foram descritos como responsáveis pelo fenômeno de IMS: o *hMLH1* (*human mutL homolog 1*) localizado no cromossomo 3p21, o *hMSH2* (*human mutS homolog 2*) localizado no cromossomo 2p16, o *hMSH6/GTBP* (*human mutS homolog 6*) localizado no cromossomo 2p16, o *hPMS1* (*human postmeiotic segregation 1*) localizado no cromossomo 2q31-33, o *hPMS2* (*human postmeiotic segregation 2*) localizado no cromossomo 7p22, o *hMLH3* (*human mutL homolog 3*) localizado no cromossomo 14q24.3 e o *hMSH3* (*human mutS homolog 3*) localizado no cromossomo 5q11-12 (THIBODEAU *et al.*, 1998; PARC *et al.*, 2000; LINDOR *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2002; PARC *et al.*, 2007).

Mutações germinativas nos *MMR* parecem corresponder à grande maioria dos casos de CCR em indivíduos portadores da síndrome *HNPCC*. Mutações nos *MMR* também foram encontradas em casos esporádicos de CCR, porém numa menor freqüência (BOLAND *et al.*, 1998). A presença de IMS em tumores é associada com certas características clínicas e patológicas específicas e foi necessário desenvolver critérios uniformes para sua detecção e reconhecimento.

A IMS no CCR foi inicialmente descrita por três grupos independentes de pesquisadores em publicações que apareceram quase que simultaneamente em 1993 e cada um deles usando descrições isoladas para seus achados. Thibodeau *et al.* (1993) citaram o processo de IMS e reconheceram que tumores com IMS ocorriam predominantemente no cólon proximal, estavam associados com uma sobrevida aumentada e apresentavam notavelmente uma ausência de *LOH*. Peltomaki *et al.* (1993) usaram o termo fenótipo *RER*, o mesmo utilizado pelo Grupo Colaborativo Internacional (*Internacional Collaborative Group on HNPCC – ICG/HNPCC*) (VASEN *et al.*, 1991). Aaltonen *et al.* (1993) relacionaram a IMS com um *locus* que mais tarde seria considerado como a respectiva localização dos *MMR*, que são os responsáveis pela síndrome do *HNPCC*. Ionov *et al.* (1993) referiram-se aos processos como mutações somáticas ubíquas em seqüências simples repetitivas (microsatélites) ligados ao aparecimento de câncer familiar (IONOV *et al.*, 1993; BOLAND *et al.*, 1998).

A IMS então foi definida como uma mudança de qualquer extensão, ou deleção ou inserção, de unidades repetitivas de bases em um microsatélite no tecido do tumor em comparação com o tecido normal de um mesmo paciente (BOLAND *et al.*, 1998). A anormalidade aparece como alelos extras observados no DNA do tumor quando comparados com o DNA normal de um mesmo indivíduo (PELTOMAKI, 1997).

A estabilidade e a instabilidade de microsatélites foram definidas em concordância numa conferência realizada em 1997 pelo *Nacional Cancer Institute (NCI)* (BOLAND *et al.*, 1998). A análise da IMS é o primeiro passo para identificar pacientes que devam ser testados para mutações nos *MMR*, de acordo com os critérios adotados nessa conferência (BOLAND *et al.*, 1998). Para efeito de unificar critérios, o *NCI* decidiu relacionar cinco microsatélites como os

mais informativos para a detecção de instabilidade em CCR, e classificou o grau de instabilidade em três níveis: IMS de alta frequência (IMS-A) quando é detectada em dois ou mais microssatélites, IMS de baixa frequência (IMS-B) quando é detectada em um microssatélite e microssatélites estáveis (MSE) quando não se detecta a instabilidade em nenhum deles (BOLAND *et al.*, 1998; PELTOMAKI, 2003). Os cinco microssatélites usados como referência no painel estabelecido pelo NCI estão detalhados na Tabela 1 (BOLAND *et al.*, 1998; FENG *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2006) e as informações foram extraídas do *GeneBank* e do *Genomic Data Bases*.

Tabela 1: Descrição dos cinco microssatélites estudados e seqüência dos *primers* e *primers* reverso.

Microssatélite	Número de bases	Localização	Tamanho	Primer	Primer reverso
BAT25	mononucleotídeo	gene <i>c-kit</i> cr. 4q12	110-130 pb	5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3'	5'-TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3'
BAT26	mononucleotídeo	gene <i>hMSH2</i> cr. 2p	100-120 pb	5'-TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC-3'	5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3'
D2S123	dinucleotídeo	gene <i>hMSH2</i> cr. 2p	200-230 pb	5'-AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA-3'	5'-GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC-3'
D5S346	dinucleotídeo	gene <i>APC</i> cr. 5q21q22	100-130 pb	5'-AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T-3'	5'-ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG-3'
D17S250[Mfd15CA]	dinucleotídeo	gene <i>BRCA1</i> cr. 17q11.2-q12	140-170 pb	5'-GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT-3'	5'-GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC-3'

Os indivíduos em que se detecta IMS, de alta ou baixa frequência, se classificam dentro de um fenótipo caracterizado pela presença de *RER* (BOLAND *et al.*, 1998). Esta classificação molecular correlaciona-se à morfogênese, histopatologia, comportamento e investigação de biomarcadores de prognóstico em CCR (JASS, 1999). A distinção entre IMS-A e IMS-B não é meramente quantitativa (JASS, 1999). Os microssatélites mononucleotídeos são relativamente estáveis e não polimórficos (JASS *et al.*, 2002). Não obstante, o aparecimento ou o deslocamento das bandas ocorre com alta frequência em microssatélites como BAT25, BAT26, BAT34 e BAT40 em tumores com IMS-A (JASS *et al.*, 2002). Em tumores com IMS-B, a instabilidade é essencialmente restrita a dinucleotídeos, como o D2S123, D5S346 e D17S250[Mfd15CA] e também a outros microssatélites dinucleotídeos, inclusive a microssatélites com longas repetições, que inclui o *MYCL* (que contém repetições tetranucleotídicas) (JASS *et al.*, 2002). Além disso, os tumores com IMS-B raramente mostram o fenótipo de instabilidade em microssatélites mononucleotídeos como no BAT25 ou BAT26 (JASS, 1999).

3.3. Carcinoma colorretal hereditário e esporádico

O *HNPCC*, anteriormente chamado de síndrome de Lynch, é a forma mais comum de CCR hereditário com uma incidência de 1:1000 nos USA (COURA *et al.*, 2005; XICOLA *et al.*, 2007). No Brasil não há dados sobre incidência ou prevalência de portadores de *HNPCC* (COURA *et al.*, 2005).

O *HNPCC* é uma doença autossômica dominante de alta penetrância (em torno de 80%-90%) causada por mutação germinativa nos genes responsáveis pelo reparo do pareamento do DNA e é responsável por cerca de 5% do total de casos de CCR (CUTAIT *et al.*, 2002; ROSSI *et*

al., 2002; COURA *et al.*, 2005). Caso uma segunda mutação somática ocorra no alelo normal correspondente ao defeito herdado, a célula afetada poderá acumular novas mutações rapidamente, aumentando a chance do aparecimento do câncer (ROSSI *et al.*, 2002).

Os portadores de *HNPCC* desenvolvem CCR numa idade precoce, aproximadamente em torno de 45 anos de idade, os tumores localizam-se preferencialmente próximos à flexura esplênica e apresentam uma tendência a desenvolver cânceres sincrônicos e metacrônicos (CUTAIT *et al.*, 2002; LYNCH & CHAPELLE, 2003). A síndrome é caracterizada também pela ocorrência de tumores extracolônicos (endométrio, ovário, estômago, baixo intestino, sistema hepatobiliar, trato urinário superior e raramente no cérebro) nas famílias afetadas, frequentemente diagnosticados em indivíduos jovens (VASEN *et al.*, 1999; COURA *et al.*, 2005; GRUBER, 2006). A morbidade e mortalidade da doença podem ser significativamente reduzidas se os tumores benignos ou malignos forem removidos a tempo (COURA *et al.*, 2005). Histologicamente apresentam-se pouco diferenciados em relação à formação de glândulas, com excesso de produção de muco, com presença de células em “anel de sinete” e infiltrado de linfócitos nas bordas do tumor (LYNCH & CHAPELLE, 2003). A carcinogênese acelerada ocorre no *HNPCC*, pois adenomas colônicos podem transformar-se em carcinomas dentro de 2 a 3 anos, sendo que, este mesmo processo leva de 8 a 10 anos numa população geral (LYNCH, 2004).

A maioria das mutações nos *MMR* na síndrome do *HNPCC* são pontuais, resultando na formação de proteínas truncadas (PELTOMAKI, 1997). Aproximadamente, dois terços dos pacientes com diagnóstico de *HNPCC* apresentam mutações germinativas em um dos diversos genes envolvidos no reparo do DNA (PELTOMAKI, 1997; BAUDHUIN *et al.*, 2005), principalmente nos genes *hMLH1* e *hMSH2*, que constituem aproximadamente 80%-

90% das alterações genéticas descritas em famílias portadoras da síndrome (CUTAIT *et al.*, 2002; BAUDHUIN *et al.*, 2005; GRUBER, 2006; OLLILA *et al.*, 2006; XICOLA *et al.*, 2007). Por isso, a triagem de mutações germinativas nesses genes é tão importante para o diagnóstico da síndrome (MITCHELL *et al.*, 2002; BAUDHUIN *et al.*, 2005). O gene *hMSH6/GTBP* é responsável por uma pequena fração de casos, em torno de 10% (BAUDHUIN *et al.*, 2005), e está mais fortemente associado ao câncer de endométrio e a uma menor frequência de aparecimento de IMS (HATCH *et al.*, 2005; GRUBER, 2006; XICOLA *et al.*, 2007). Uma pequena porcentagem de casos está associada com o gene *hPMS2* (BAUDHUIN *et al.*, 2005).

Os critérios clínicos inicialmente propostos para o diagnóstico do *HNPCC* foram baseados na história familiar e na idade do paciente. Os “Critérios de Amsterdam”, desenvolvidos em 1991 pelo *ICG/HNPCC*, foram propostos com o intuito de permitir a uniformidade da identificação de grupos de famílias que poderiam ser reconhecidas e estudadas (BOLAND *et al.*, 1998). Preconizaram que, pelo menos três membros de uma mesma família com diagnóstico de CCR, preenchessem os seguintes critérios:

- um dos membros seja parente em primeiro grau dos outros dois;
- pelo menos duas gerações sucessivas tenham sido acometidas;
- pelo menos um dos casos de CCR diagnosticado tenha idade abaixo de 50 anos;
- a polipose adenomatosa familiar deve ser excluída (VASEN *et al.*, 1991; BOLAND *et al.*, 1998).

Em 1998, os “Critérios de Amsterdam” foram revistos e alguns itens foram acrescentados para melhorar a possibilidade de triagem de famílias portadoras de *HNPCC*, com a inclusão de tumores extracolônicos associados ao *HNPCC*, dentre eles os adenocarcinomas de

endométrio e de intestino delgado e o carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais (BOLAND *et al.*, 1998). Tumores de estômago e ovário não foram incluídos por sua baixa incidência dentro da síndrome (BOLAND *et al.*, 1998).

Entretanto, persistiram dificuldades do diagnóstico clínico em famílias pequenas com poucos descendentes. A descoberta de genes envolvidos no desenvolvimento do *HNPCC* e a possibilidade de testes genéticos para confirmar os dados clínicos duvidosos levaram à necessidade de implantação de novos critérios. Dentro desse enfoque, o *NCI* publicou os “Critérios de Bethesda”, desenvolvidos em 1997, para aqueles indivíduos em que, caso não preenchessem completamente os “Critérios de Amsterdam”, deveriam ser submetidos a testes genéticos (BOLAND *et al.*, 1998). São eles:

- pacientes com câncer que preencham os “Critérios de Amsterdam”;
- pacientes com dois cânceres relacionados com *HNPCC*, incluindo CCR metacrônicos e sincrônicos ou cânceres extra-cólicos associados;
- pacientes portadores de CCR e com um tumor extracolônico relacionado ao *HNPCC* e idade menor que 45 anos ou com adenomas colorretais e idade menor que 40 anos;
- pacientes com CCR e idade menor que 45 anos, com atenção para os tumores indiferenciados ou com células em anel de sinete;
- pacientes com adenocarcinoma de endométrio e idade menor que 45 anos;
- pacientes com adenomas colorretais, antes dos 40 anos de idade (BOLAND *et al.*, 1998).

Os “Critérios de Bethesda” também foram revistos e incluíram-se a realização de testes moleculares para o diagnóstico do *HNPCC* (JASS, 1999; GONZALEZ-GARCIA *et al.*, 2000). Dentre estes testes, está a pesquisa molecular de IMS, utilizado como um marcador

genético para a triagem de pacientes portadores da síndrome e a pesquisa da expressão das proteínas dos *MMR*, principalmente dos genes *hMLH1* e *hMSH2* (JASS, 1999), por imunohistoquímica, para aqueles pacientes que apresentarem IMS positiva (BOLAND *et al.*, 1998). Devido ao caráter ubíquo da IMS nos CCR, a instabilidade somática intrínseca das seqüências microssatélites e ao uso de abordagens heterogêneas para definir a presença dos *RER* nos tumores (GONZALEZ-GARCIA *et al.*, 2000), sua pesquisa poderá ser adotada como rotina para a definição do fenótipo de IMS. É provável que os testes para os *MMR* sejam também utilizados para o estudo dos CCR, pois auxiliarão na distinção do comportamento e da patobiologia dos tumores MSE, IMS-A e IMS-B. (JASS, 1999). Lagerstedt Robinson *et al.* (2007), estudando o *status* genético molecular de um grande registro de pacientes suecos com *HNPCC*, contribuíram de forma significativa para a demonstração de um papel central para a pesquisa de IMS combinada com imunohistoquímica, para selecionar indivíduos portadores de mutações nos *MMR* (LYNCH *et al.*, 2007).

Os CCR esporádicos usualmente não apresentam uma história familiar de câncer de cólon (LIU *et al.*, 1995). Os tumores ocorrem unicamente no cólon e acometem indivíduos numa idade mais avançada (LIU *et al.*, 1995; JASS *et al.*, 2002). Nos CCR esporádicos, um número de estudos sugere que o processo de carcinogênese procede de uma série de alterações genéticas as quais incluem a ação dominante de oncogenes e a inativação dos genes supressores de tumor (HONCHEL *et al.*, 1995). Por outro lado, em torno de 10% a 15% dos CCR esporádicos também exibem IMS com perda da expressão de uma ou mais das proteínas dos *MMR* (MESSERINI *et al.*, 1999; HATCH *et al.*, 2005). Relativamente poucas mutações nos *MMR* têm sido relatadas em CCR esporádicos com IMS, mas a metilação do gene *hMLH1*, recentemente observada em alguns casos, foi sugerida como a causa primária do aparecimento do fenótipo IMS nestes tumores (TOYOTA *et al.*, 1999). Segundo Jass (2003),

a maioria dos tumores esporádicos IMS-positivos estão associados com uma metilação aberrante da região promotora do gene *hMLH1* e silenciamento do mesmo gene (WAHLBERG *et al.*, 2002). A existência de um fenótipo metilador *CpG island* tem sido postulado para explicar a hipermetilação somática associada com o silenciamento do gene *hMLH1* e diversos outros genes supressores de tumor (YAMASHITA *et al.*, 2003). Esse mesmo fenótipo metilador tem sido proposto ser o responsável pela manifestação do FMM, que é característico dos tumores com IMS (YAMASHITA *et al.*, 2003). A perda da expressão do *hMSH2* também tem sido descrita, mas pelo fato do promotor *hMSH2* não tornar-se metilado, é mais provável a ocorrência de uma mutação germinativa em um dos alelos desses pacientes (MITCHELL *et al.*, 2002; HATCH *et al.*, 2005; OLLILA *et al.*, 2006). Defeitos nos genes *hMSH6* e *hPMS2* foram raramente vistos nos casos esporádicos (HATCH *et al.*, 2005).

Os tumores no contexto do *HNPCC* e os tumores esporádicos com deficiência nos *MMR* podem apresentar um comportamento similar, pois eles têm diversas características que diferem daqueles tumores em que a IMS é negativa (HATCH *et al.*, 2005). Ambos têm tendência a serem poucos diferenciados e/ou mucinosos, são geralmente diplóides e mutações nos genes *p53*, *APC*, *Kras* e *LOH* no cromossomo 18q são menos frequentes que em tumores MSE (HATCH *et al.*, 2005). A maioria das alterações genéticas que são comuns em tumores MSE, mas não nos CCR esporádicos IMS-positivos, tem sido associada a um pior prognóstico. Além disso, tem sido relatado que pacientes portadores de *HNPCC* apresentam um prognóstico mais favorável que aqueles com CCR esporádico (HATCH *et al.*, 2005).

Dentro da categoria dos CCR com IMS-A, os casos *HNPCC* e esporádicos têm sido vistos como contrapartes, que relacionam uma história familiar e não-familiar de um mesmo processo patológico subjacente (análogos à *FAP* e aos CCR MSE) (JASS *et al.*, 2002). Há

novas evidências de que os tumores esporádicos IMS-A e o *HNPCC* diferem em termos de características demográficas, histogênese, perfil molecular e morfologia microscópica (JASS *et al.*, 2002) e por isso, devem ser estudados separadamente. Jass (2003) observou que os CCR esporádicos com IMS-A apresentavam uma preponderância maior entre o sexo feminino, uma predileção aumentada pelo cólon proximal, envolviam mais exclusivamente o gene *hMLH1*, apresentavam uma menor frequência de mutação no *APC*, beta-catenina e *K-ras* e uma frequência aumentada de metilação do DNA, além de serem mais frequentemente pouco diferenciados e/ou mucinosos e de associarem-se a pólipos (adenomas) serrilhados.

Os CCR associados ao *HNPCC* e os esporádicos com defeitos nos genes de reparo apresentam um defeito genético analisável pelo teste de IMS (YEARSLEY *et al.*, 2006), que representa uma importante ferramenta de triagem e diagnóstico desses tumores (YEARSLEY *et al.*, 2006). Portanto, o teste para a pesquisa de IMS é importante não somente para a detecção de pacientes com possíveis mutações germinativas nos *MMR*, mas também para o estudo de tumores esporádicos IMS-positivos (HATCH *et al.*, 2005).

O reconhecimento dos CCR com defeito nos *MMR* apresenta aspectos importantes, considerando que esses tumores podem apresentar um prognóstico distinto, uma resposta diferenciada a determinadas drogas citotóxicas e, quando caracterizados como hereditários, terem implicações na assistência médica requerida à família dos pacientes. (MARKOWITZ, 2000).

3.4. Características clínico-patológicas dos carcinomas colorretais em relação ao *status* erros de replicação do DNA

A maioria dos casos de CCR, em torno de 85% (UMAR, 2004), apresenta-se MSE e a IMS-A aparece em torno de 12% a 16% dos casos (LAIHO *et al.*, 2002). Cálculos baseados na frequência de IMS-A em CCR e a incidência anual sugerem que aproximadamente 20.000 a 26.000 CCR com alta instabilidade ocorrem a cada ano nos EUA (ALEXANDER *et al.*, 2001). A classificação molecular dos CCR baseada na ausência ou presença de IMS tem importantes implicações clínicas (LAIHO *et al.*, 2002). As características clínicas e biológicas, incluindo o prognóstico dos tumores MSE, IMS-B e IMS-A são notavelmente diferentes (LAIHO *et al.*, 2002). Os tumores MSE e IMS-B possuem muito mais similaridades entre si, demonstrando um mesmo perfil genético (JASS *et al.*, 2002; LAIHO *et al.*, 2002). Devido às taxas de mutações de base dos microssatélites não serem precisamente conhecidas e as características clínicas desses dois grupos serem parecidas, muitos autores consideram-nos em conjunto (LAIHO *et al.*, 2002; UMAR, 2004). Em contrapartida, Umar *et al.* (2004) consideraram que os tumores com IMS-B existissem como um grupo distintamente separado dos tumores MSE. Entretanto, há evidências que sugerem que todos os CCR possuem uma instabilidade inerente e se, amplos microssatélites fossem testados, quase todos os CCR teriam algum grau de IMS (UMAR *et al.*, 2004). Os tumores com IMS-B encontram-se principalmente do lado esquerdo e são menos agressivos que os tumores MSE (JASS *et al.*, 2002). Os CCR com alta instabilidade têm fundamentalmente características clínicas e patológicas distintas daqueles com IMS-B ou MSE (JASS *et al.*, 2002; SINICROPE *et al.*, 2006). Abrangem um grupo de tumores com predileção pelo cólon proximal, apresentam diploidia com um comportamento de alto grau, pouco diferenciados e estão mais associados ao sexo feminino (PELTOMAKI, 2003; SINICROPE *et al.*, 2006).

Os CCR com IMS-A, independentemente se hereditários ou esporádicos, possuem características importantes em relação ao diagnóstico ou resposta terapêutica, pois apresentam melhor prognóstico em relação aos tumores MSE e com IMS-B (SINICROPE *et al.*, 2006),

um prognóstico menos favorável pela quimioterapia utilizando 5-Fluorouracil, menos metástases, uma frequência maior de tumores extra-colônicos e uma frequência maior de tumores metacrônicos (ISHIKUBO *et al.*, 2004). Frequentemente incluem estágios tumorais múltiplos e acometem indivíduos jovens (SINICROPE *et al.*, 2006). Pacientes com estes tumores apresentam uma melhor sobrevida (PELTOMAKI, 2003).

A maioria dos CCR com IMS-A apresenta inativação do gene *hMLH1*, que pode ser detectada em lesões da mucosa colorretal que antecedem ao aparecimento do tumor, indicando um evento precoce ao surgimento do câncer. Por outro lado, nos CCR com IMS-B não foi demonstrado o envolvimento dos genes *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* ou *hMSH3* previamente ao aparecimento da neoplasia invasora (PELTOMAKI, 2003). Diversos estudos enfatizam a importância de distinguir as características dos tumores que apresentam IMS-A, IMS-B ou MSE. Particularmente, é sugerido que a metilação do DNA tenha um importante papel na determinação do fenótipo com alta e baixa instabilidades (PELTOMAKI, 2003).

Publicações de estudos de CCR com alta instabilidade usam o termo esporádico em dois sentidos: primeiro, a ausência de uma história familiar e segundo, a indicação de que o câncer não ocorre em um indivíduo com uma condição autossômica dominante como ocorre no *HNPCC* (JASS, 2003). Isto é problemático, pois a ausência de uma história familiar positiva não exclui o diagnóstico de *HNPCC* (JASS, 2003).

A detecção de IMS em CCR esporádicos tem um valor prognóstico, pois os tumores microsatélites instáveis apresentam ou tem um aumento na sobrevida e podem ter uma resposta diferente a terapias adjuvantes (YEARSLEY *et al.*, 2006). Além disso, estudos têm sugerido uma associação entre CCR com IMS-B a uma pior sobrevida câncer-específica

(YEARSLEY *et al.*, 2006). Certas características histológicas de tumores com IMS têm sido descritas, incluindo dois padrões de adenocarcinomas, um mucinoso e outro pouco diferenciado. O primeiro ocorre predominantemente no cólon ascendente, em tumores circunscritos, bem ou moderadamente diferenciados e com infiltrado linfocitário peritumoral que pode ser evidenciado em áreas não-mucinosas (YEARSLEY *et al.*, 2006). No subtipo pouco diferenciado, também descrito como indiferenciado ou medular, as células neoplásicas dispõem-se em blocos pequenos e trabéculas irregulares ou agregados largos, formando tumores bem circunscritos e com pouco estroma e, por vezes, apresentando infiltração linfocítica peritumoral (YEARSLEY *et al.*, 2006). Dentro das características histológicas, a histologia mucinosa e o infiltrado linfocitário correlacionam-se com a maioria dos CCR com IMS (YEARSLEY *et al.*, 2006).

3.5. Carcinoma colorretal no Brasil

O CCR é a quarta neoplasia maligna mais incidente no Brasil (NETO *et al.*, 2006; INCA, 2006). O número de casos novos de CCR estimados no Brasil em 2006 é de 11.390 em homens e de 13.970 em mulheres (INCA, 2006). Estes valores correspondem a um risco estimado de 12 casos novos a cada 100.000 homens e 15 para cada 100.000 mulheres (INCA, 2006).

No Brasil, já foram realizados estudos, tanto na pesquisa de IMS (FUZIKAWA *et al.*, 1997; ANACLETO *et al.*, 2005) quanto nos *MMR*, principalmente nos genes *hMLH1* e *hMSH2* (ROSSI *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2002). Fuzikawa *et al.* (1997) realizaram um trabalho sobre a detecção de microssatélites em CCR em Minas Gerais. Rossi *et al.* (2002) estudaram 25 famílias que tinham suspeita de serem portadoras da síndrome do *HNPCC*, pela

identificação de mutações nos genes *hMLH1* e *hMSH2* em São Paulo. Anacleto *et al.* (2005) pesquisaram em 106 pacientes a presença de IMS e mutações em genes envolvidos no processo de carcinogênese colônica em São Paulo. Coura *et al.* (2005) realizaram um trabalho de revisão sobre o *HNPCC*, sua predisposição hereditária, diagnóstico e prevenção no Rio Grande do Sul. Neto *et al.* (2006) estudaram as características clínicas e anátomo-patológicas em pacientes portadores de CCR com idade inferior a 40 anos no Maranhão.

Como resultados apresentados nesses trabalhos podemos citar que, Fuzikawa *et al.* (1997) relataram que a amplificação alélica foi obtida com sucesso em todas as amostras e que foi detectado em torno de 25% de pacientes com IMS. Rossi *et al.* (2002) relataram a detecção de dez mutações nas famílias estudadas, com uma taxa em torno de 40%, distribuídas em regiões codificadoras nos genes *hMLH1* e *hMSH2*. Neto *et al.* (2006) relataram que a maior prevalência de CCR foi em indivíduos com idade entre 31 e 35 anos, que devido à ausência de dados não foi possível determinar a presença de *HNPCC* nas famílias estudadas. Houve maior prevalência do tumor no lado esquerdo do cólon, os tumores corresponderam a adenocarcinoma, principalmente moderadamente diferenciados e foi observada uma maior prevalência de tumores classificados como pT3.

O CCR é um dos melhores sistemas de múltiplos estágios estudados em carcinogênese humana (VENDRELL *et al.*, 2005). Devido à heterogeneidade dos marcadores nos CCR de diferentes populações, das diferenças nas metodologias, além da proporção exata e das várias nuances entre os estudos (RUDZKI *et al.*, 2003), os portadores de CCR devem ser avaliados precocemente e, atualmente os testes moleculares devem ser empregados como ferramentas para a avaliação de prognóstico e de terapias adjuvantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos casos de carcinoma colorretal

Foram selecionados, a partir da base de dados do Serviço de Patologia Gastrointestinal do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG, 62 pacientes com diagnóstico de carcinoma colorretal (CCR) com idade até 40 anos, operados consecutivamente no Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), no período de 1993 a 2006. Dois pacientes com 41 anos de idade foram acrescentados, um portador de síndrome de Lynch e o outro apresentava suspeita de câncer familiar.

As peças cirúrgicas, fixadas em formol a 10%, foram encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG. No Laboratório, foram examinadas de acordo com o protocolo do Serviço (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2005) e processadas rotineiramente para exame histológico. O diagnóstico de CCR foi feito segundo a classificação da OMS (HAMILTON *et al.*, 2000) e o estadiamento foi feito de acordo com as classificações de Dukes (DUKES, 1932), Astler-Coller (ASTLER & COLLER, 1954) e TNM (SOBIN & WITTEKIND, 2002).

As lâminas coradas em hematoxilina-eosina e os blocos de parafina foram desarquivados do Serviço e procedeu-se à análise do material e à revisão dos casos. Dos 64 pacientes inicialmente selecionados, 28 do sexo masculino e 36 do sexo feminino, 16 casos foram excluídos, pois não apresentavam material adequado para o estudo ou tinham o diagnóstico de *FAP*. Os 48 casos restantes tinham material adequado para o estudo e compreendiam 23 pacientes do sexo masculino e 25 do sexo feminino, com média de idade de 34,9 anos

(variação de 20 a 41 anos). Nestes casos selecionaram-se à microscopia óptica, as áreas do tumor e da mucosa normal retirada da margem cirúrgica mais adequadas para a realização dos testes moleculares.

4.2. Dissecção, extração e amplificação do DNA

A padronização dos procedimentos de dissecção do material em parafina, extração e amplificação do DNA inicialmente foram realizadas numa amostra de mucosa colônica normal incluída em parafina.

Para a padronização do processo de dissecção do material testaram-se seis protocolos diferentes onde se variaram os procedimentos de corte, distensão e desparafinização do material (Anexo 1).

Nos protocolos 1 a 5 foram feitos de seis a dez cortes histológicos de 12 μm de espessura em média, utilizando-se micrótomo limpo e navalhas descartáveis. Os cortes histológicos foram coletados com auxílio de pinças estéreis e distendidos em lâminas novas, lavadas e estéreis. No protocolo 6, a área de interesse foi raspada com lâmina estéril de bisturi e transferida diretamente do bloco de parafina para tubo eppendorff de 1,5 ml. A desparafinização nos protocolos 1 a 4 e 6 foi feita utilizando-se soluções de xilol PA e álcool absoluto PA. No protocolo 5, a desparafinização foi feita utilizando-se forno microondas, de acordo com a metodologia definida pelo Laboratório.

A extração do DNA para todos os protocolos foi feita utilizando-se *kit* comercial (QIAmp® DNA Mini Kit – Qiagen, Califórnia, USA) conforme recomendado pelo fabricante e como descrito abaixo:

1. Adicionaram-se 180 µl de *Buffer* ATL no fragmento de tecido dissecado no tubo eppendorff de 1,5 ml e homogeneizou-se por vórtex.
2. Adicionaram-se 25 µl de solução de Proteinase K, homogeneizou-se por vórtex durante 15 min, seguido de pulso de centrifugação e incubou-se a 56°C por 24 h em banho seco até completa lise do fragmento de tecido. Periodicamente, homogeneizou-se por vórtex para a dispersão da amostra, seguido de pulso de centrifugação.
3. Adicionaram-se 200 µl do *Buffer* AL e incubou-se a 70°C por 10 min em banho quente.
4. Adicionaram-se 200 µl de etanol (96-100%) e homogeneizou-se por vórtex por 15 seg.
5. Cuidadosamente, a mistura da etapa 4 foi aplicada numa coluna Spin e centrifugada a 8000 rpm por 1 min. Após a centrifugação, desprezou-se o tubo coletor com o centrifugado trocando-o por um limpo.
6. Adicionaram-se 500 µl do *Buffer* AW1 na coluna Spin e centrifugou-se a 8000 rpm por 1 min. Após a centrifugação, desprezou-se o tubo coletor com o centrifugado trocando-o por um limpo.
7. Adicionaram-se 500 µl do *Buffer* AW2 na coluna Spin e centrifugou-se a 14000 rpm por 3 min. Após a centrifugação, desprezou-se o tubo coletor com o centrifugado.
8. A coluna Spin foi colocada num tubo eppendorff de 1,5 ml e adicionaram-se 50 µl do *Buffer* AE de eluição. Incubou-se à temperatura ambiente por 1 min e centrifugou-se a 8000 rpm por 1 min.
9. A amostra extraída foi identificada e armazenada a -20°C.

A amplificação do DNA extraído foi feita pela *PCR* utilizando-se *primers* do gene da β -globina e um padrão comercial de DNA controle (K562, Promega, Wisconsin, USA), com concentração conhecida de 10 ng/ μ l. Avaliou-se a presença de DNA na amostra e comparou-se a intensidade das bandas entre eles (teste qualitativo). As eletroforeses foram feitas em dois géis, um de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% utilizando como corante o nitrato de prata e o outro, de agarose utilizando como corante o brometo de etídio. A amplificação dos alelos da β -globina que mais se aproximou do padrão e que era mais intensa em ambos os géis (com maior quantidade de DNA) foi a do material processado segundo o Protocolo 1, conforme descrito abaixo:

1. Os cortes histológicos foram colocados em solução álcool absoluto/água destilada, passados para o banho-maria histológico com água destilada e distendidos em lâminas.
2. A desparafinização foi feita mergulhando as lâminas em dois banhos de xilol, por 5 min cada um, seguidos por dois banhos de álcool absoluto, por 2 min cada um.
3. Após a desparafinização, a área de interesse do corte foi dissecada utilizando-se lâminas estéreis de bisturi, uma para cada amostra, e transferidas para tubos eppendorff de 1,5 ml.

Padronizadas as condições descritas acima, foram iniciados os testes com as amostras dos casos selecionados de CCR nos cinco microssatélites a serem testados: BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S250[Mfd15CA].

4.3. Reação em cadeia da polimerase

4.3.1. Padronização em amostra de sangue

Os primeiros testes de padronização da *PCR* foram realizados em uma amostra de sangue, em virtude da quantidade de DNA extraído ser maior, de haver menor quantidade de impurezas e de se obter um DNA menos degradado, contribuindo para uma melhor análise da amplificação dos *primers* (SAIKI *et al.*, 1985). As condições foram avaliadas em separado e individualmente para cada microssatélite, levando-se em conta a região genômica em que cada um se localiza e o número de pares de bases que cada um possui.

A concentração dos reagentes utilizados para a preparação do produto da *PCR* foi a mesma para todos os microssatélites testados. Para um volume final de 25,0 µl, utilizaram-se 2,5 µl de sangue; 1,0 pmol/µl de *primer* e *primer* reverso; 5,0 µl de tampão; 0,5 µl de trifosfato de deoxinucleotídeo (dNTP) (dNTP Set, 100 mM Solutions, GE Healthcare UK Limited, Amershan Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK); 3,0 µl de enzima *Taq Polymerase* e 12,0 µl de água estéril para *PCR*.

Foram testadas duas enzimas *Taq Polymerase* diferentes, GoTaq (GoTaq® DNA *Polymerase*, Promega, Madison, Wisconsin, USA) e Phoneutria (Phoneutria Biotecnologia e Serviços, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) para se avaliar qual teria melhor atividade. As condições de cada reação foram idênticas, somente variando-se a enzima utilizada. Comparando-se as duas enzimas, ambas tiveram o mesmo rendimento prático, pois não houve diferença de intensidade nos alelos amplificados. Optou-se pela enzima Phoneutria por ela apresentar um custo mais reduzido quando comparado ao da enzima GoTaq.

A reação da *PCR* foi feita em um termociclador (GeneAmp®PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA) variando para cada um dos microssatélites os tempos e as temperaturas das etapas de desnaturação, anelamento e alongamento e foram descritas individualmente conforme segue abaixo. Nas eletroforeses foram aplicados 2,5 µl de produto da *PCR* juntamente com um padrão de peso molecular (105-404 pb – *ladder*) num gel de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% corado com solução de nitrato de prata.

BAT25

A reação começou com uma temperatura de desnaturação de 95°C por 2 min. Subsequentemente, cada ciclo iniciou-se com desnaturação de 94°C por 15 seg, anelamento de 54°C por 30 seg e alongamento de 72°C por 15 seg, num total de 35 ciclos. O final do alongamento ocorreu a 72°C por 10 min. Após a eletroforese, detectou-se a presença dos alelos na região em torno de 110-130 pb, onde o microssatélite BAT25 é amplificado.

BAT26

A reação começou com uma temperatura de desnaturação de 95°C por 2 min. Subsequentemente, cada ciclo iniciou-se com desnaturação de 94°C por 15 seg, anelamento de 54°C por 30 seg e alongamento de 72°C por 15 seg, num total de 35 ciclos. O final do alongamento ocorreu a 72°C por 10 min. Após a eletroforese, detectou-se a presença dos alelos na região em torno de 100-120 pb, onde o microssatélite BAT26 é amplificado.

D2S123

A reação começou com uma temperatura de desnaturação de 95°C por 2 min. Subsequentemente, cada ciclo iniciou-se com desnaturação de 94°C por 30 seg, anelamento de 55°C por 45 seg e alongamento de 72°C por 15 seg, num total de 30 ciclos. O final do

elongamento ocorreu a 72°C por 10 min. Após a eletroforese, detectou-se a presença dos alelos na região em torno de 200-230 pb, onde o microssatélite D2S123 é amplificado.

D5S346

A reação começou com uma temperatura de desnaturação de 95°C por 2 min. Subsequentemente, cada ciclo iniciou-se com desnaturação de 94°C por 30 seg, anelamento de 53°C por 45 seg e alongamento de 72°C por 15 seg, num total de 30 ciclos. O final do alongamento ocorreu a 72°C por 10 min. Após a eletroforese, detectou-se a presença dos alelos na região em torno de 100-130 pb, onde o microssatélite D5S346 é amplificado.

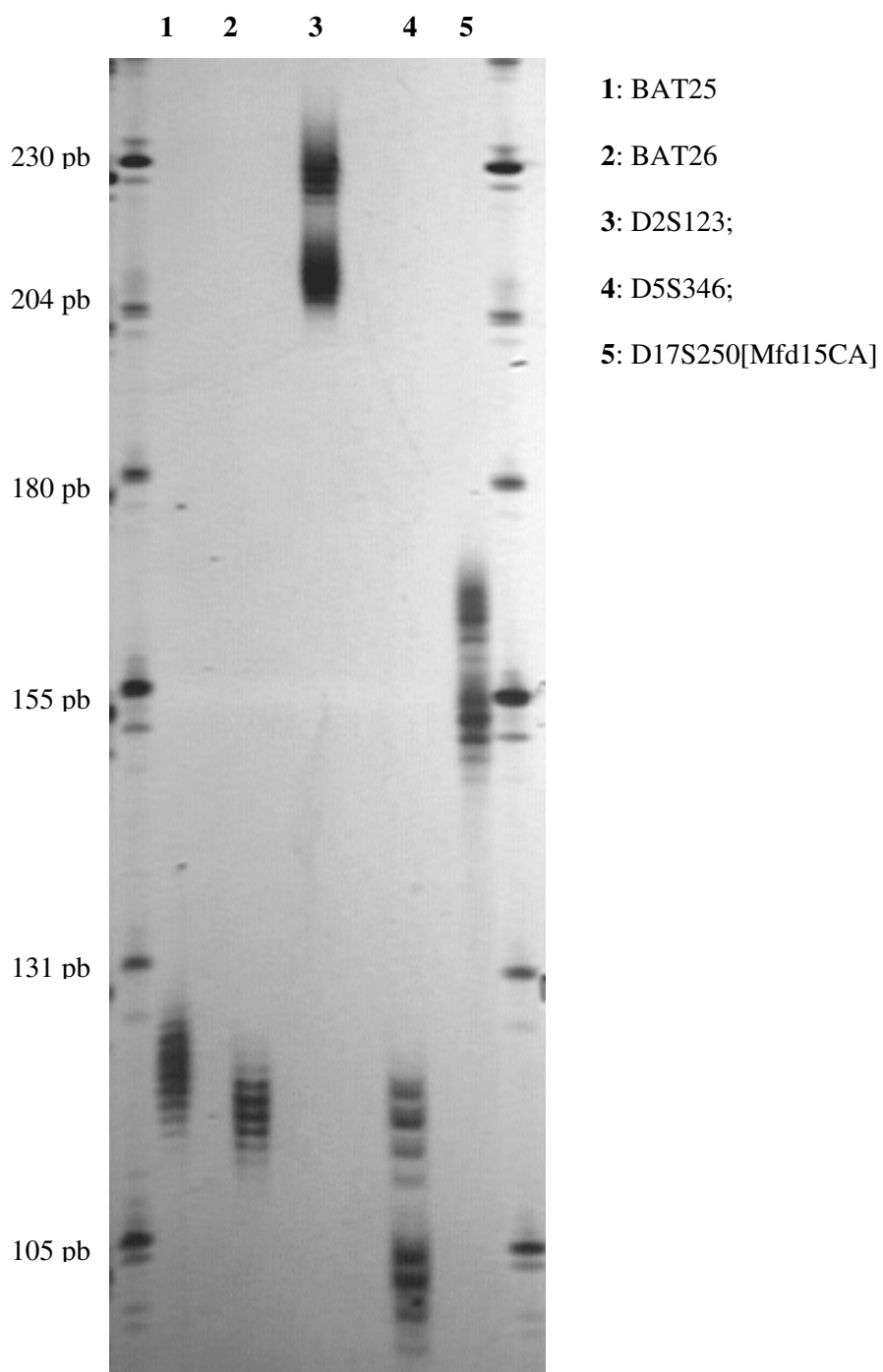
D17S250[Mfd15CA]

A reação começou com uma temperatura de desnaturação de 95°C por 2 min. Subsequentemente, cada ciclo iniciou-se com desnaturação de 94°C por 30 seg, anelamento de 48°C por 45 seg e alongamento de 72°C por 15 seg, num total de 30 ciclos. O final do alongamento ocorreu a 72°C por 10 min. Após a eletroforese, detectou-se a presença dos alelos na região em torno de 140-170 pb, onde o microssatélite D17S250[Mfd15CA] é amplificado.

Após a padronização inicial nos cinco microssatélites e verificação da amplificação alélica, as temperaturas de anelamento foram modificadas para otimizar a especificidade e a sensibilidade das reações de *PCR*: BAT25 e BAT26 - aumento de 54°C para 56°C; D2S123 - aumento de 55°C para 59°C; D5S346 - aumento de 53°C para 59°C e D17S250[Mfd15CA] - aumento de 48°C para 52°C. Após nova avaliação da amplificação, ocorreu uma melhora significativa na especificidade e na sensibilidade das reações, com bandas mais definidas e

com uma amplificação mais forte dos alelos. Essas modificações foram mantidas nos testes seguintes (Figura 1).

Figura 1: Amplificação alélica dos cinco microssatélites estudados numa amostra de sangue. Eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% corado com solução de nitrato de prata.



Definidas as condições de padronização das reações de *PCR* na amostra de DNA de sangue, foram iniciados os testes com os casos de CCR.

4.3.2. Casos de carcinoma colorretal

Para cada caso testado, foram feitas duas reações de *PCR*, uma referente à amostra da mucosa normal e outra referente à amostra do tumor, seguindo as condições de padronização feitas na amostra de sangue. Não houve amplificação do DNA nas amostras testadas. As condições das reações foram revistas para todos os microssatélites. Dobraram-se as concentrações dos reagentes no preparo do produto da *PCR* e aumentou-se o número de ciclos para 45. Após nova eletroforese observou-se amplificação do DNA em todos os microssatélites, na maioria das amostras da mucosa normal e do tumor.

Entretanto, os resultados não foram satisfatórios em alguns casos, pois o DNA extraído da mucosa normal, do tumor ou de ambos apresentou uma amplificação fraca ou não foi visualizada nenhuma amplificação. Essa variação ocorreu entre as amostras num mesmo microssatélite e entre microssatélites diferentes, possivelmente devido a fatores ligados à própria conservação do DNA. Portanto, as modificações que se seguiram foram feitas especificamente no DNA:

- a. aumentou-se ainda mais a quantidade de DNA na preparação do produto da *PCR* para 7,5 μ l ou 10,0 μ l;
- b. aumentou-se a quantidade de DNA aplicado na eletroforese para 5,0 μ l, 7,5 μ l e 10,0 μ l;
- c. triplicou-se a quantidade de reagentes utilizados na preparação do produto da *PCR* para um volume final de 75 μ l;

- d. realizou-se novas extrações com mais cortes para aumentar o DNA extraído (15 cortes histológicos de 12 μ m de espessura).

4.4. Instabilidade de microssatélites – análise da presença de erros de replicação do DNA

A análise da IMS foi feita em cada microssatélite separadamente, pela comparação entre os alelos detectados na amostra do tumor com os alelos detectados na amostra da mucosa normal, num mesmo caso. O microssatélite foi considerado estável quando o número de alelos na amostra do tumor era igual ao da amostra da mucosa normal. O microssatélite foi considerado instável quando continha um número adicional de alelos na amostra do tumor quando comparado ao da amostra da mucosa normal, indicando a presença de *RER*.

A IMS foi classificada em alta ou baixa. Um caso foi considerado como alta instabilidade quando dois ou mais dos microssatélites testados apresentaram *RER* e como baixa instabilidade quando um dos microssatélites testados apresentou *RER*.

Todos os casos positivos para a instabilidade foram repetidos para a confirmação dos resultados, além dos casos em que os resultados foram duvidosos.

4.5. Correlação com características anátomo-patológicas dos carcinomas colorretais

As informações referentes ao exame anátomo-patológico foram retiradas da base de dados do Serviço de Patologia Gastrointestinal. Os dados do *status RER* dos casos foram correlacionados com o gênero dos pacientes e com as características anátomo-patológicas dos tumores referentes à localização, tipo histológico, estadiamento, invasão vascular e neural, resposta linfocítica peritumoral e estadiamento pT e pN.

4.6. Análise estatística

A frequência de IMS e de IMS-B e IMS-A foram analisadas entre os grupos pelo teste de Qui-Quadrado. Utilizaram-se os testes de Yates e de Fisher. A presença de IMS foi analisada em relação à intensidade da resposta linfocítica peritumoral e em relação ao estadiamento (pT e pN) pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância estabelecido foi de $p \leq 0,05$.

4.7. Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG – COEP (ETIC 389/05). O consentimento informado foi obtido previamente de cada paciente ou do responsável pelo mesmo.

5. RESULTADOS

5.1. Extração e amplificação do DNA

Extraíu-se DNA adequado para a pesquisa de IMS no tumor e na respectiva mucosa em todos os casos. Com as devidas modificações realizadas e otimização dos sistemas, as condições testadas das reações de *PCR* e eletroforese para cada microssatélite foram padronizadas com melhora significativa da especificidade e sensibilidade das mesmas, tanto para a amostra em sangue (Figura 1) quanto para os casos de CCR incluídos em parafina. Entretanto, em um dos casos (caso 52), observamos amplificação alélica apenas no microssatélite BAT26. Nos outros quatro *loci* não houve amplificação.

A amplificação dos alelos nos microssatélites BAT26, BAT25 e D5S346 foi a que gerou melhores resultados. No microssatélite BAT26 houve amplificação em todos os casos (100%) e nos microssatélites BAT25 e D5S346 houve amplificação em 47 casos (97,9%). Por outro lado, nos microssatélites D17S250[Mfd15CA] e D2S123 a amplificação dos alelos foi não-informativa ou inconclusiva num maior número de casos. No microssatélite D17S250[Mfd15CA] houve amplificação em 44 casos (91,7%) e no microssatélite D2S123 houve amplificação em 40 casos (83,3%).

5.2. Análise da instabilidade de microssatélites – classificação do *status* erros de replicação do DNA

A frequência de *RER* foi analisada para cada um dos microssatélites. A maior frequência de *RER* foi observada no microssatélite D17S250[Mfd15CA] (n=17; 35,4%), seguindo-se os microssatélites D5S346 (n=14; 29,1%), BAT25 e BAT26 (n=12; 25%), respectivamente. A

Tabela 2 mostra os resultados da amplificação alélica em todos os casos testados e a frequência de *RER* nos cinco microssatélites estudados.

Tabela 2: Frequência de erros de replicação do DNA em cinco microssatélites estudados em 48 casos de carcinoma colorretal.

Microssatélites	Erros de Replicação do DNA			Total (%)
	<i>RER+</i> (%)	<i>RER-</i> (%)	NI (%)	
D17S250[Mfd15CA]	17 (35,4)	27 (56,3)	4 (8,3)	48 (100)
D5S346	14 (29,1)	33 (68,8)	1 (2,1)	48 (100)
BAT25	12 (25)	35 (72,9)	1 (2,1)	48 (100)
BAT26	12 (25)	36 (75)	0	48 (100)
D2S123	9 (18,8)	31 (64,5)	8 (16,7)	48 (100)

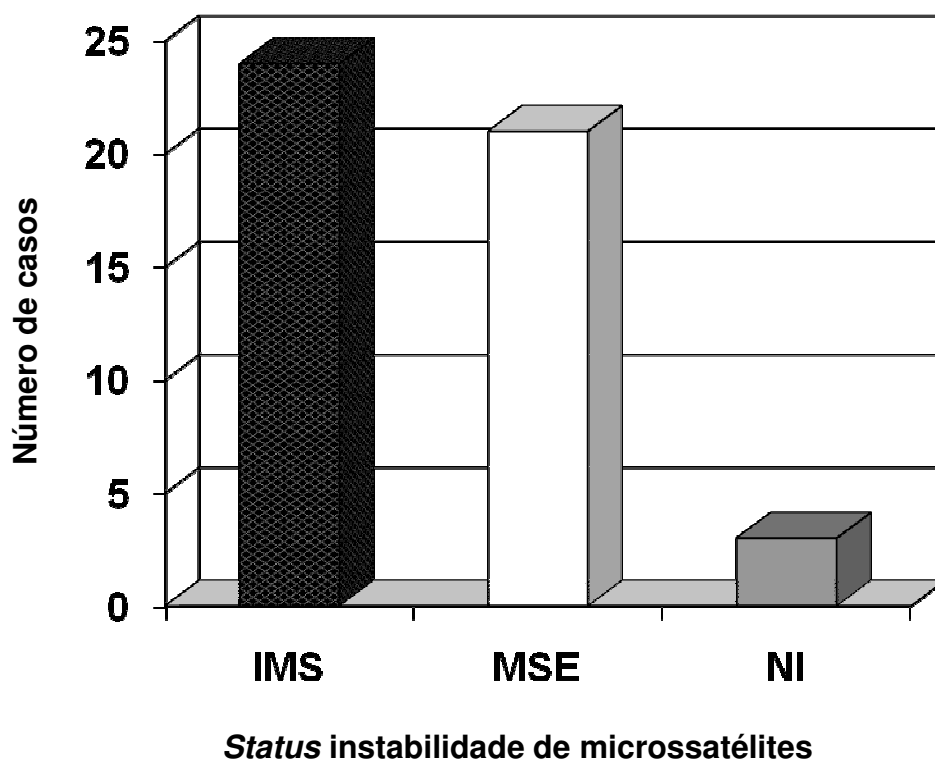
NI: Não informativo

RER-: Ausência de erro de replicação do DNA

RER+: Presença de erro de replicação do DNA

Em 24 casos (50%) foi observado *RER* em pelo menos um dos cinco microssatélites, caracterizando o fenômeno de IMS. Em 21 casos (43,8%), não foi observado *RER* em qualquer dos microssatélites, sendo considerados MSE. Em três casos (6,2%), devido à não amplificação do DNA nos microssatélites D2S123 e D17S250[Mfd15CA], não foi possível determinar a presença ou ausência de IMS. Estes casos foram considerados como não-informativos. O Gráfico 1 mostra a frequência de *RER* nos casos de CCR estudados.

Gráfico 1: Classificação do *status* erros de replicação do DNA em 48 casos de carcinoma colorretal.



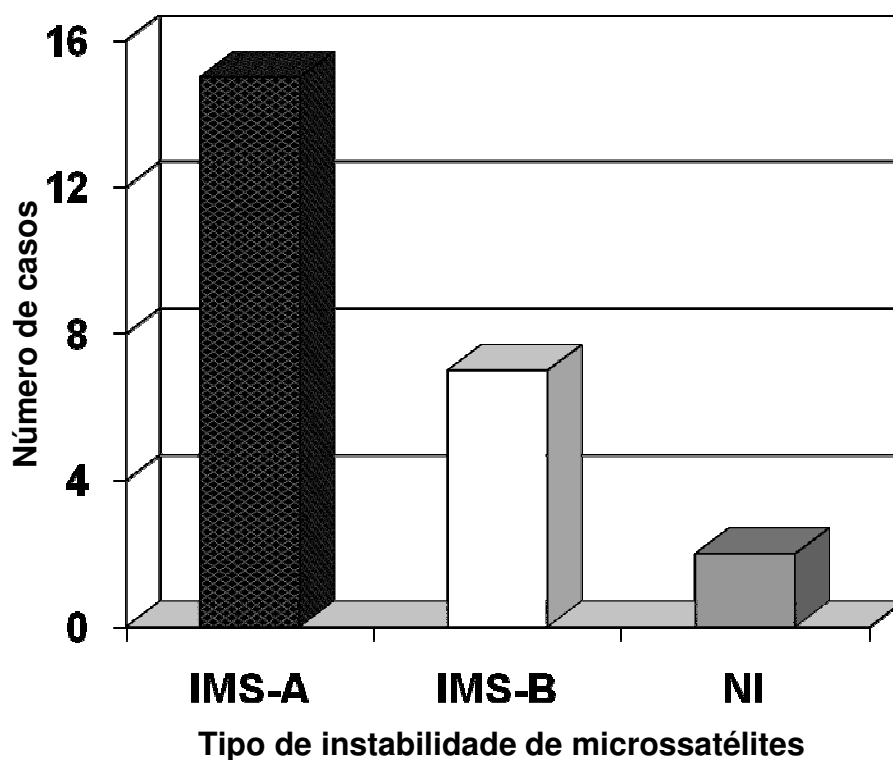
IMS: Instabilidade de microssatélites




MSE: Microssatélites estáveis

NI: Não informativo

Considerando-se os 24 casos com IMS, 15 (62,5%) foram classificados como IMS-A, pois foi detectada a presença de *RER* em dois ou mais microssatélites e sete (29,2%) foram classificados como IMS-B, pois foi detectada a presença de *RER* em apenas um microssatélite. Em dois casos (8,3%) não foi possível definir a instabilidade como alta ou baixa, devido à não amplificação em todos os microssatélites. Os resultados podem ser visualizados no Gráfico 2.

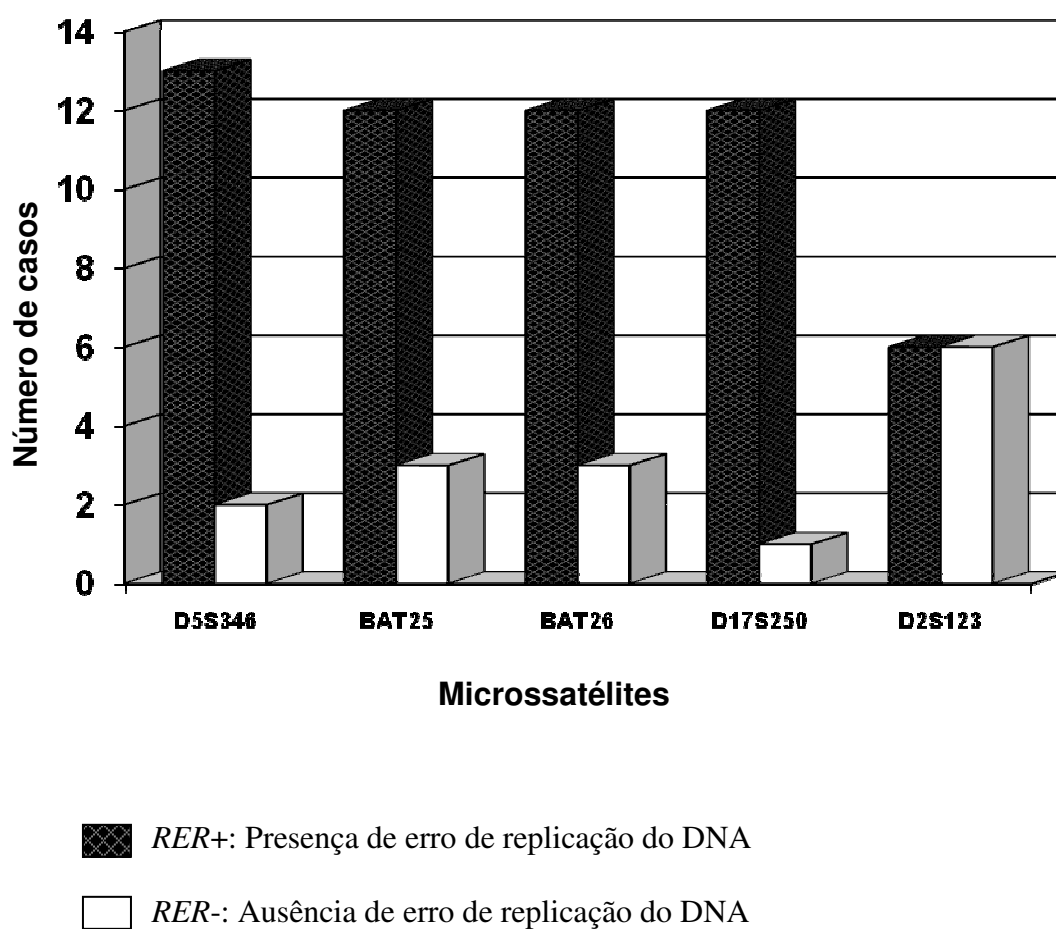
Gráfico 2: Frequência alta e baixa instabilidade de microssatélites em 24 casos de casos de carcinoma colorretal.



-  IMS-A: Instabilidade de microssatélites alta
-  IMS-B: Instabilidade de microssatélites baixa
-  NI: Não informativo

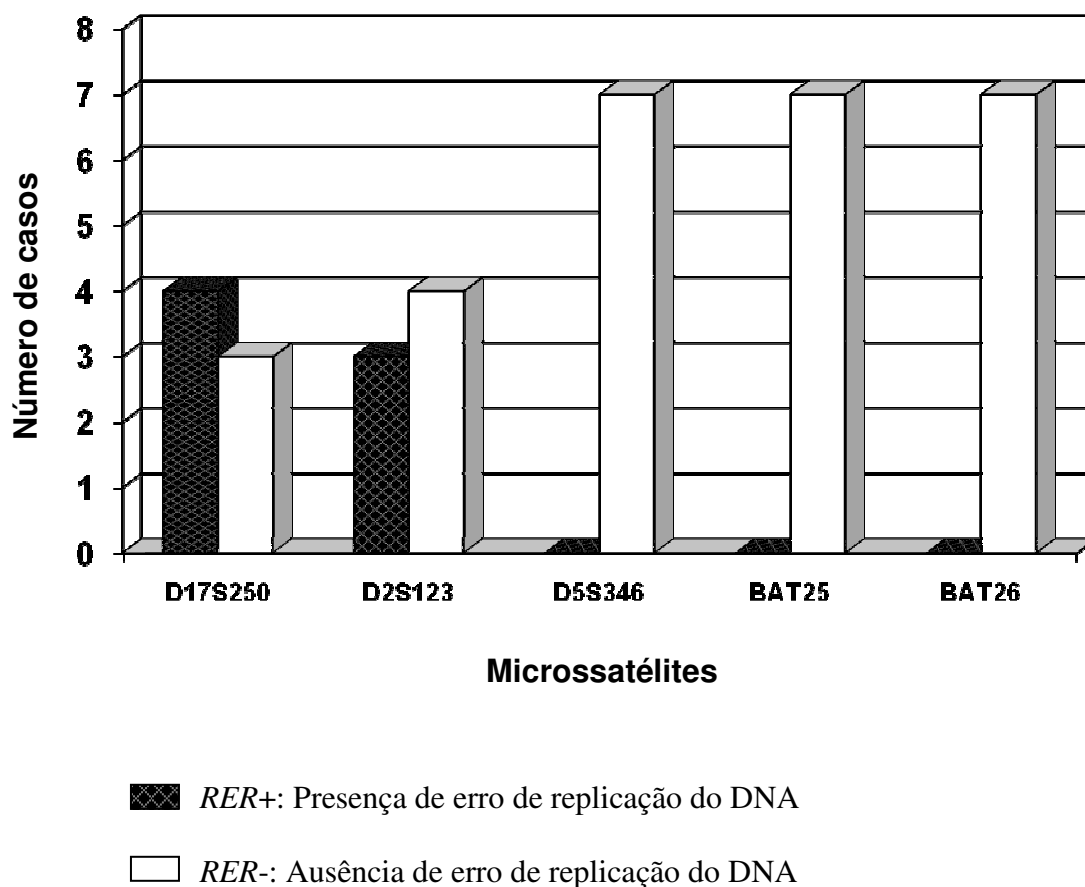
Nos casos com IMS-A, a presença de *RER* foi observada com maior frequência no microssatélite D5S346 (n=13; 86,7%), seguido dos microssatélites BAT25, BAT26 e D17S250[Mfd15CA], igualmente (n=12; 80%). Os dados estão apresentados no Gráfico 3.

Gráfico 3: Frequência de erros de replicação do DNA nos cinco microssatélites estudados em 15 casos de carcinoma colorretal com alta instabilidade de microssatélites.



Nos casos com IMS-B, a presença de *RER* foi observada com maior frequência no microssatélite D17S250[Mfd15CA] (n=4; 57,1%), seguido do microssatélite D2S123 (n=3; 42,9%). Em todos os casos (n=7; 100%) não foi detectada a presença de *RER* nos microssatélites BAT25, BAT26 e D5S346. Os dados estão apresentados no Gráfico 4.

Gráfico 4: Frequência de erros de replicação do DNA nos cinco microssatélites estudados em sete casos de carcinoma colorretal com baixa instabilidade de microssatélites.



A Tabela 3 mostra conjuntamente a frequência de *RER* nos cinco microssatélites estudados em relação à classificação de alta ou baixa instabilidades.

Tabela 3: Frequência de microssatélites instáveis por tipo de instabilidade encontrada em 24 casos de carcinoma colorretal.

Microssatélite	Tipo de instabilidade de microssatélites					
	Baixa (%)			Alta (%)		
	<i>RER+</i>	<i>RER-</i>	NI	<i>RER+</i>	<i>RER-</i>	NI
BAT25	0	7 (100)	0	12 (80)	3 (20)	0
BAT26	0	7 (100)	0	12 (80)	3 (20)	0
D5S346	0	7 (100)	0	13 (86,7)	2 (13,3)	0
D17S250[Mfd15CA]	4 (57,1)	3 (42,9)	0	12 (80)	1 (6,7)	2 (13,3)
D2S123	3 (42,9)	4 (57,1)	0	6 (40)	6 (40)	3 (20)

NI: Não informativo

RER-: Ausência de erro de replicação do DNA

RER+: Presença de erro de replicação do DNA

A Tabela 4 mostra detalhadamente os resultados de todos os casos com IMS. As Figuras 2, 3, 4 e 5 mostram exemplos de amplificação alélica dos cinco microssatélites nos casos de CCR MSE e IMS, com IMS-B e IMS-A.

Tabela 4: Número de microssatélites instáveis em 24 casos de carcinoma colorretal.

Caso	Microssatélites instáveis	Tipo de instabilidade
02	D17S250[Mfd15CA]	IMS-B
10	D5S346	NI
16	D17S250[Mfd15CA]	IMS-B
20	D17S250[Mfd15CA]	IMS-B
26	D17S250[Mfd15CA]	NI
28	D2S123	IMS-B
43	D2S123	IMS-B
60	D2S123	IMS-B
61	D17S250[Mfd15CA]	IMS-B
05	D5S346, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A
38	BAT26, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A
42	D5S346, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A
18	BAT25, D5S346, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A
29	BAT25, BAT26, D5S346	IMS-A
34	BAT25, BAT26, D5S346	IMS-A
58	BAT25, BAT26, D5S346	IMS-A
32	BAT25, BAT26, D5S346, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A
64	BAT25, BAT26, D5S346, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A
65	BAT25, BAT26, D2S123, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A
25	BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A
31	BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A
57	BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A
59	BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A
62	BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250[Mfd15CA]	IMS-A

IMS-A: Instabilidade de microssatélites alta

IMS-B: Instabilidade de microssatélites baixa

NI: Não informativo

Figura 2: Caso de carcinoma colorretal com estabilidade em todos os microsstatélites estudados. Eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% corado com solução de nitrato de prata.

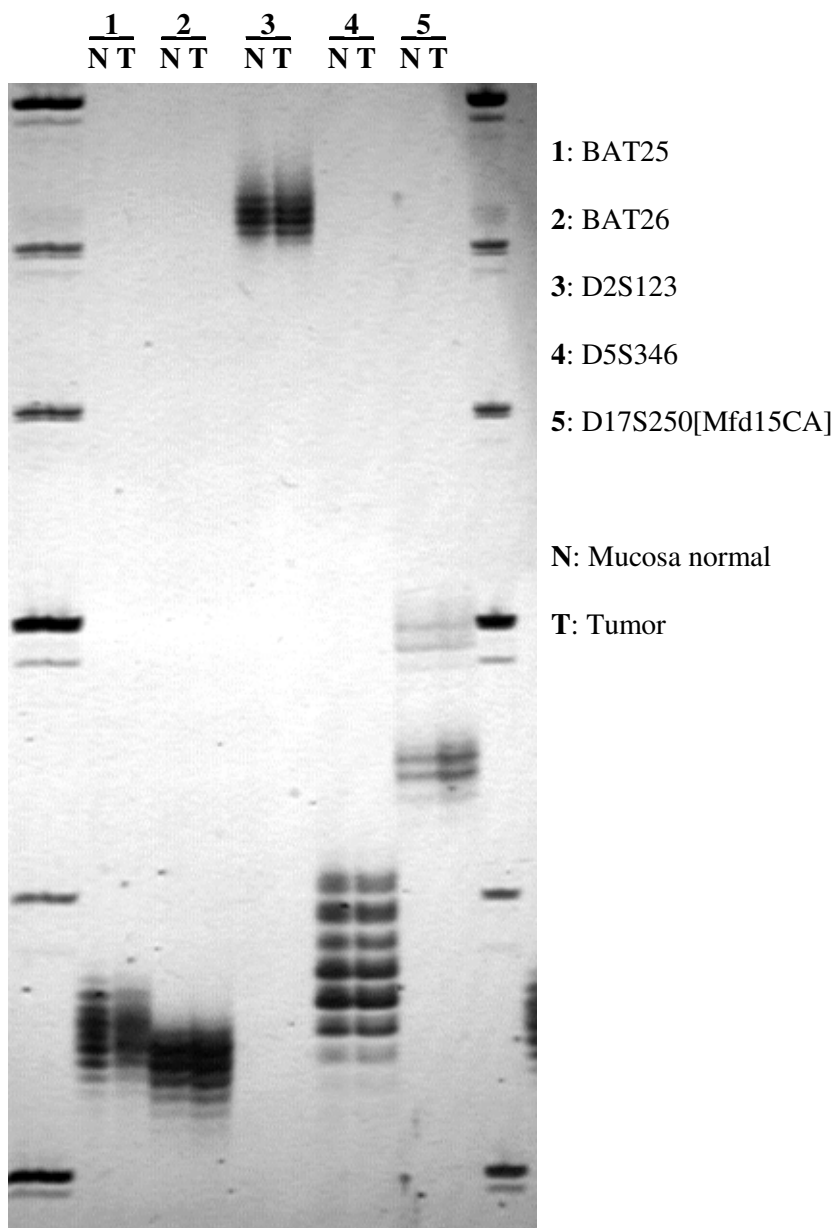


Figura 3: Caso de carcinoma colorretal com instabilidade em todos os microssatélites estudados, caracterizando alta instabilidade. As setas indicam os alelos extras que surgem a partir dos erros de replicação do DNA na amostra do tumor. Eletroforese em gel de poli-acrilamida com uréia desnaturante a 6% corado com solução de nitrato de prata.

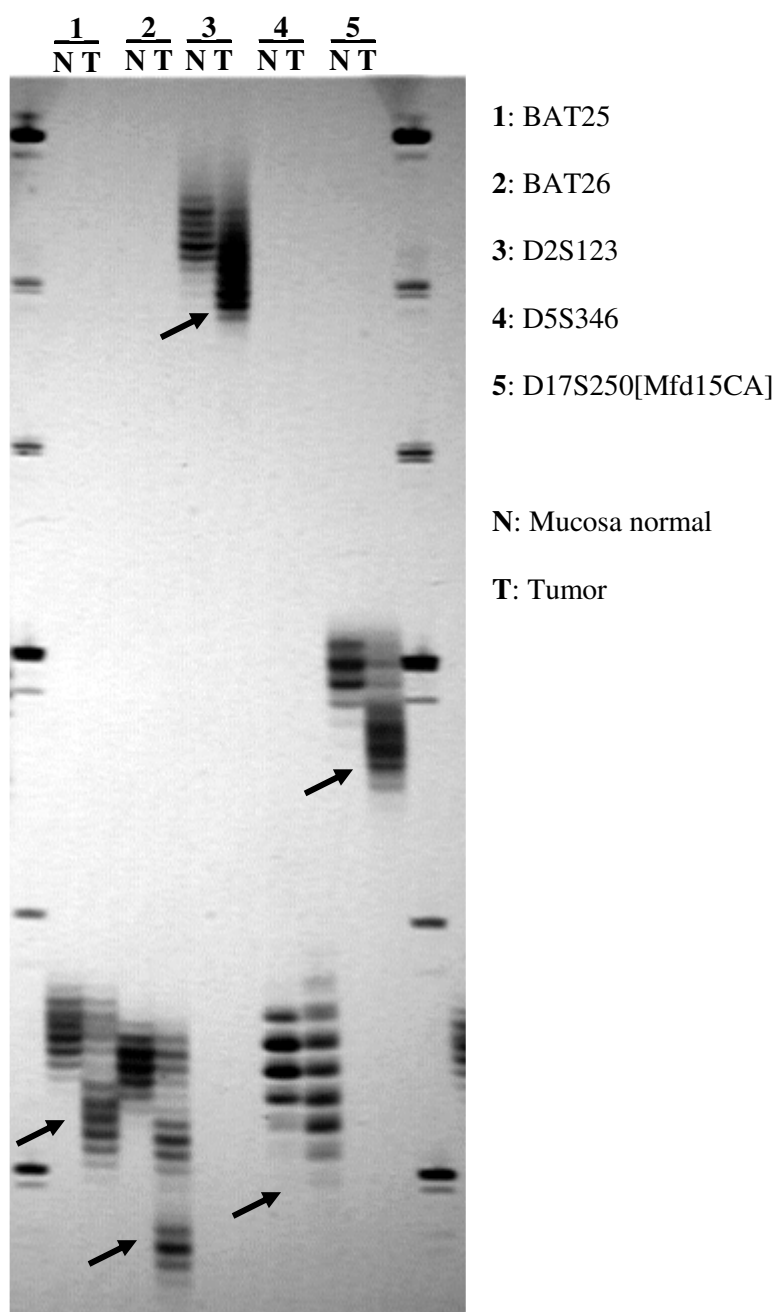


Figura 4: Caso de carcinoma colorretal com instabilidade nos microssatélites BAT25, BAT26, D5S346 e D17S250[Mfd15CA], caracterizando alta instabilidade. As setas indicam os alelos extras que surgem a partir dos erros de replicação do DNA na amostra do tumor. Eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% corado com solução de nitrato de prata.

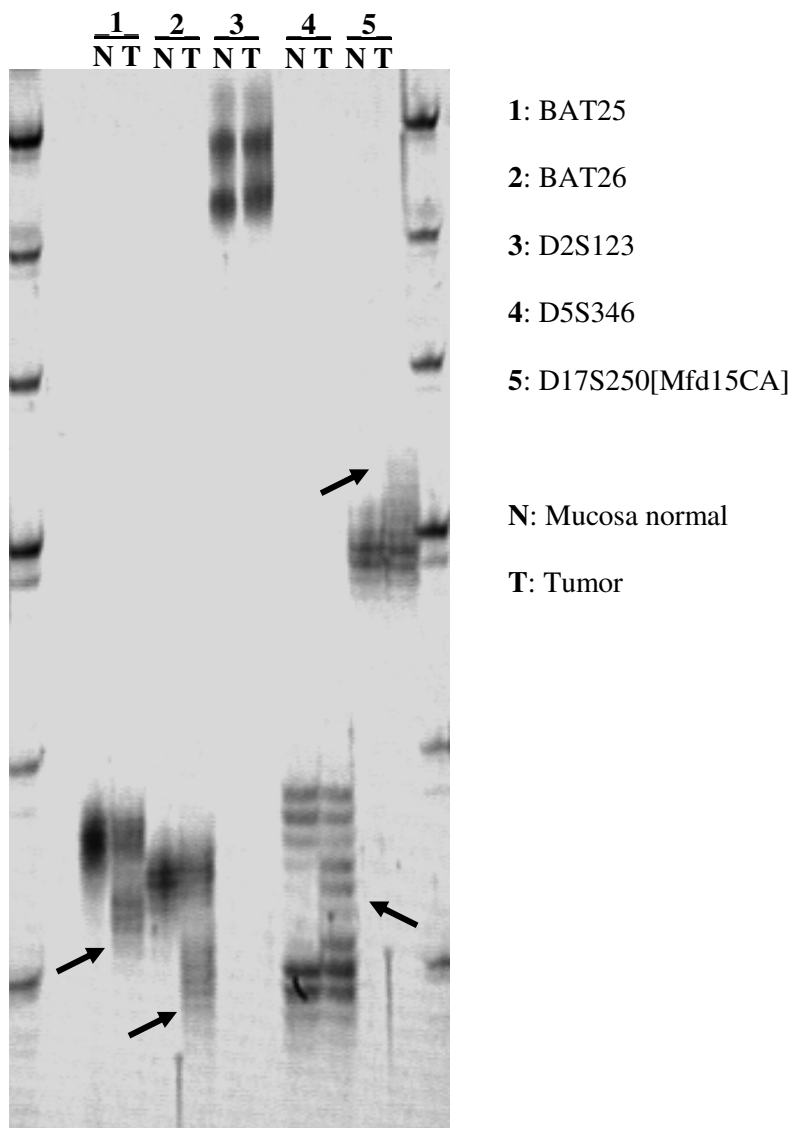
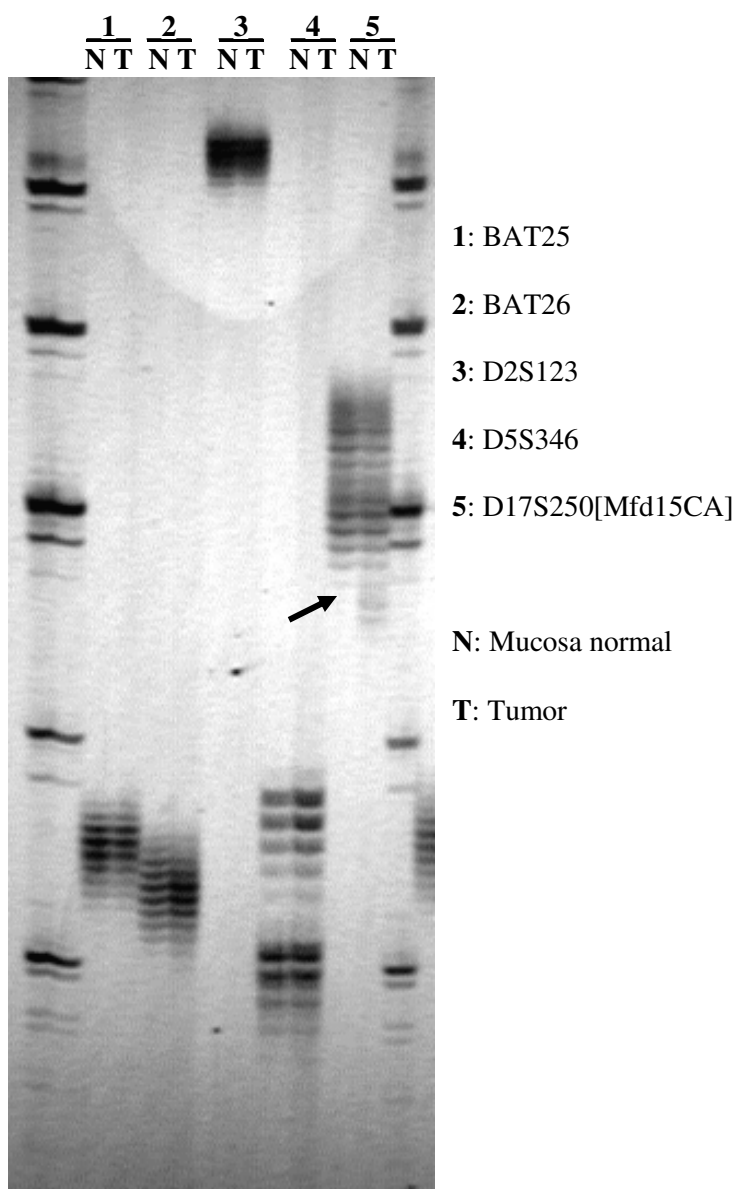


Figura 5: Caso de carcinoma colorretal com instabilidade no microssatélite D17S250[Mfd15CA], caracterizando baixa instabilidade. A seta indica os alelos extras que surgem a partir dos erros de replicação do DNA na amostra do tumor. Eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia desnaturante a 6% corado com solução de nitrato de prata.



5.3. Correlação da instabilidade microssatélites com os dados clínico-patológicos dos carcinomas colorretais

A Tabela 5 mostra as características clínico-patológicas dos casos estudados em relação aos subgrupos MSE e IMS, com IMS-A e IMS-B.

A maioria dos CCR (n=26; 60,5%) localizava-se no cólon esquerdo, isto é, da flexura esplênica ao reto e eram predominantemente anulares-constritivos (n=18; 41,9%) e úlcero-infiltrativos (n=14; 32,6%). Histologicamente, 33 casos (76,7%) eram adenocarcinomas sem especificação (SOE) e os restantes eram tumores muco-secretóres (n=10; 23,3%). Havia infiltração de vasos linfáticos em 22 casos (55%), venosa em oito casos (20,5%) e neural em oito casos (20%). A resposta linfocítica em torno do tumor era discreta a moderada na maior parte dos casos (n=32; 74,4%). A maioria dos tumores foi estadiada como pT3 (n=31; 67,4%) e 14 casos (38,9%) tinham metástases em linfonodos.

Ao se comparar as características clínicas dos tumores MSE e com IMS, observou-se que os tumores com instabilidade eram mais frequentes em homens (p=0,09), localizavam-se preferencialmente no cólon direito (p=0,01) e a resposta linfocítica peritumoral era mais frequentemente encontrada e era mais intensa (p=0,04). Quanto às características histológicas, os tumores com IMS eram mais frequentemente muco-secretóres (33%) que os tumores MSE (14%), mas a diferença não foi estatisticamente significativa. No que diz respeito à invasão de vasos linfáticos, não se observaram diferenças entre os tumores MSE e com IMS. No entanto, a invasão de linfáticos era menos frequente nos tumores com IMS-A (28,6%) do que os tumores com IMS-B e MSE (70%) (p=0,01).

Tabela 5: Correlação entre as características clínico-patológicas e o *status* erros de replicação do DNA nos casos de carcinoma colorretal estudados.

Características clínico-patológicas		MSE (%)	IMS	
			Baixa (%)	Alta (%)
Gênero	Masculino	7 (66,7)	4 (57,1)	11 (73,3)
	Feminino	14 (33,3)	3 (42,9)	4 (26,7)
Localização	Cólon direito	4 (19)	4 (57,1)	9 (60)
	Cólon esquerdo	17 (81)	3 (42,9)	6 (40)
Macroscopia	Úlcero-infiltrativo	5 (23,8)	2 (28,6)	7 (46,7)
	Anular-constritivo	11 (52,4)	4 (57,1)	3 (20)
	Polipóide	5 (23,8)	1 (14,3)	3 (20)
	Séssil/placa	0	0	2 (13,4)
Tipo histológico*	Adenocarcinoma (SOE)	18 (85,7)	4 (57,1)	11 (73,3)
	Mucinoso	3 (14,3)	1 (14,3)	3 (20)
	Sinete	0	2 (28,6)	1 (6,7)
Infiltração de veias	Sim	6 (28,6)	1 (14,3)	1 (6,7)
	Não	14 (66,7)	4 (57,1)	13 (86,7)
Infiltração de linfáticos	Sim	14 (66,7)	4 (57,1)	4 (26,7)
	Não	6 (28,6)	2 (28,6)	10 (66,7)
Infiltração neural	Sim	5 (23,8)	0	3 (20)
	Não	15 (71,4)	6 (85,7)	11 (73,3)
Resposta linfocítica peritumoral	Ausente	8 (38,1)	1 (14,3)	3 (20)
	Discreta	11 (52,4)	3 (42,9)	5 (33,3)
	Moderada	2 (9,5)	3 (42,9)	5 (33,3)
	Acentuada	0	0	1 (6,7)
pT**	pT2	5 (23,8)	0	1 (6,7)
	pT3	13 (61,9)	7 (100)	8 (53,3)
	pT4	3 (14,3)	0	6 (40)
pN**	pN0	9 (42,9)	1 (14,3)	10 (66,7)
	pN1	7 (33,3)	3 (42,9)	1 (6,7)
	pN2	3 (14,3)	1 (14,3)	2 (13,3)

* Classificação OMS

** Estadiamento TNM

IMS: instabilidade de microssatélites

MSE: microssatélites estáveis

SOE: sem especificação

Em relação às demais características, ou seja, aspecto macroscópico, infiltração de veias, invasão de nervos, pT e pN, não se observaram diferenças entre os tumores com e sem IMS ou entre os tumores com IMS-B ou IMS-A. Quando agrupamos os tumores MSE com os que apresentavam IMS-B e comparamos com aqueles que tinham IMS-A, não se observaram diferenças entre os grupos em qualquer das características.

6. DISCUSSÃO

A avaliação da IMS em CCR reveste-se de grande importância, tanto para investigar possíveis casos herdados, quanto para realizar a análise da patogênese desses tumores, ou mesmo para avaliar a resposta terapêutica ao tratamento (PELTOMAKI *et al.*, 1993; BOLAND *et al.*, 1998; RAUT *et al.*, 2004). Em decorrência da necessidade do desenvolvimento de ferramentas para a realização de estudos moleculares, desenvolveram-se técnicas de extração e amplificação por *PCR* que permitiram a utilização de material parafinado arquivado (ODA *et al.*, 1997; COOMBS *et al.*, 1999; FERNANDES *et al.*, 2004).

Os dados publicados concernentes à extração e amplificação do DNA pela técnica da *PCR* em material de exames anátomo-patológicos rotineiros emblocados em parafina são variáveis. Trabalhos mais antigos, em que a extração do DNA era realizada com fenol-clorofórmio, mostraram baixo rendimento nas reações de biologia molecular (COOMBS *et al.*, 1999; BAREA *et al.*, 2004). Burton *et al.* (1998) demonstraram que a amplificação por *PCR* do DNA extraído de tecidos arquivados em parafina e corados com hematoxilina/eosina era frequentemente desfavorável. Diversos fatores podem influenciar a quantidade, a pureza e a integridade do DNA nos processos de extração, tais como, o tempo de conservação das amostras no arquivo (BAREA *et al.*, 2004; SALTO-TELLEZ *et al.*, 2005), a má conservação dos blocos de parafina, a degradação do DNA conservado (MESQUITA *et al.*, 2001), o tempo nos quais as células estiveram em contato com os reagentes ou as concentrações dos mesmos (MESQUITA *et al.*, 2001) e a ausência ou fragmentação das células-alvo a estudar (BAREA *et al.*, 2004). Por outro lado, Coombs *et al.* (1999) estudando diferentes métodos de extração de DNA mostraram melhores resultados com o uso de *kit* comercial, citando o *kit* de extração comercial Qiagen, para a amplificação alélica do DNA. Fernandes *et al.* (2004) e Coura *et al.*

(2005) relataram que amostras extraídas de blocos de parafina utilizando-se *kit* comercial apresentavam um melhor desempenho na amplificação do DNA. Em concordância com estes autores, no nosso estudo utilizou-se *kit* comercial para a extração do DNA a partir de material processado rotineiramente e emblocado em parafina. A extração do DNA genômico resultou em um material com quantidade e pureza satisfatórias para amplificação do DNA pela técnica da *PCR*. Porém, em alguns casos, não houve amplificação em determinados microssatélites, o que gerou resultados inconclusivos ou não informativos. Especificamente em um caso (caso 52) não foi obtida amplificação satisfatória do DNA em quatro microssatélites, possivelmente devido à degradação do mesmo no material arquivado em parafina.

A intensidade da amplificação das seqüências de DNA dos microssatélites testados não foi igual em todas as reações. No nosso trabalho, analisou-se e comparou-se a freqüência de amplificação alélica de cada microssatélite separadamente e entre eles, para avaliar a sensibilidade das reações testadas. Os microssatélites em que a amplificação foi mais freqüente ou que apresentaram-se mais sensíveis à amplificação dos alelos, foram BAT26 (100%), BAT25 e D5S346 (97,9%, igualmente em ambos) e os microssatélites em que houve menor freqüência de amplificações foram D17S250[Mfd15CA] (91,7%) e D2S123 (83,3%). Corroborando esta observação, Joerg Trojan *et al.* (2002) relataram que fragmentos curtos de *PCR*, por exemplo, aqueles dos microssatélites BAT25, BAT26 e D5S346, os quais contêm 110 a 130pb, foram considerados mais sensíveis, pois apresentavam sinais mais fortes de amplificação que fragmentos longos, como os dos microssatélites D2S123 e D17S250[Mfd15CA]. Estes achados também foram relacionados à degradação do DNA obtido pelos processos de extração (JOERG TROJAN *et al.*, 2002).

Atualmente já foi demonstrado que uma proporção de casos de CCR apresenta uma via de carcinogênese que é caracterizada pela presença de defeitos nos genes de reparo do DNA e que é definida fenotipicamente pela presença de instabilidade de microssatélites (WARD *et al.*, 2001). Os microssatélites são seqüências curtas repetitivas presentes em todo genoma humano e são definidos pelo número de bases que possuem. A detecção da instabilidade foi observada pela presença do fenótipo *RER* em cada microssatélite individualmente, para definir o *status* IMS num mesmo caso, quando são analisados todos os microssatélites testados (BOLAND *et al.*, 1998). O fenótipo *RER* foi definido como uma variação somática freqüente no tamanho dos microssatélites no DNA do tumor quando comparado com o DNA do tecido normal, num mesmo paciente (HOANG *et al.*, 1997; BOLAND *et al.*, 1998). Este fenótipo foi primeiramente observado em CCR, tanto na síndrome do *HNPCC* quanto em tumores esporádicos (HOANG *et al.*, 1997). Portanto, o CCR foi reconhecidamente classificado em termos do entendimento de mecanismos que dirigem o fenótipo de instabilidade de microssatélites (BOLAND *et al.*, 1998; LYNCH *et al.*, 2007). Foram relatados três tipos de fenótipo: MSE (microssatélites estáveis) ou ausência de instabilidade, IMS-A (instabilidade de microssatélites de alta freqüência) e IMS-B (instabilidade de microssatélites de baixa freqüência) (BOLAND *et al.*, 1998; JASS, 1999). Na nossa casuística, a freqüência de casos com IMS (50%) foi maior que a de MSE (43,8%). Diferente dos achados de diversos autores, em que a freqüência de casos MSE variou de 62% a 87%. Thibodeau *et al.* (1998) testaram 11 microssatélites em 508 casos de pacientes portadores de CCR entre 25 anos e 88 anos, nos quais a maioria era MSE (62,4%). Gryfe *et al.* (2000) testaram de 5 a 10 microssatélites, incluindo aqueles recomendados pelo *NCI*. Relataram que 80% dos 607 casos de CCR de pacientes com idade igual ou abaixo de 50 anos, foram caracterizados como MSE.

Ward *et al.* (2001) estudaram a IMS, nos microssatélites estabelecidos pelo NCI, em 310 pacientes com CCR com idade entre 29 anos e 95 anos de idade, e observaram que a maioria era MSE (82,6%). Xicola *et al.* (2007) testaram o painel de cinco microssatélites estabelecido pelo NCI em 531 CCR, os pacientes tinham idade entre 69 anos e 71 anos, nos quais 87% dos casos eram MSE. Yearsley *et al.* (2006) estudaram 482 CCR utilizando o painel de microssatélites recomendados pelo NCI com a inclusão de mais um microssatélite e 82,6% dos casos foram caracterizados MSE. Luceri *et al.* (2002) pesquisaram a IMS em 57 CCR utilizando sete microssatélites, dentre os quais o BAT26, D2S123 e D5S346 e encontraram 63,15% de casos MSE. A discrepância de frequências entre nossos resultados poderia ser explicada pela amostragem de pacientes com idade igual ou inferior a 40 anos. Por outro lado, como a série que estudamos foi pequena, a frequência de casos que apresentaram MSE foi inferior aos casos com IMS. Foi demonstrado, conforme definido pelos “Critérios de Bethesda”, que pacientes nessa faixa etária apresentavam maior probabilidade de, ao desenvolverem CCR, estarem predispostos à expressão da síndrome do *HNPCC* (PELTOMAKI *et al.*, 1993; BOLAND *et al.*, 1998). Apesar de termos introduzido um viés, consideramos importante a seleção de pacientes abaixo de 40 anos porque o primeiro objetivo do estudo era padronizar o método de análise em material emblocado em parafina. Ao se selecionar os pacientes jovens, teríamos maior probabilidade de obter casos com IMS (JASS, 2003), o que seria mais útil para a padronização.

No que respeita à caracterização da IMS, a maioria dos estudos relata maior frequência de IMS-A que IMS-B. Gryfe *et al.* (2000) observaram que dos CCR, 17% foram caracterizados como IMS-A e 3% como IMS-B. Ward *et al.* (2001) encontraram 10,6% de casos com IMS-A e 6,8% com IMS-B. Xicola *et al.* (2007) observaram que 7,5% dos casos eram IMS-A e 5,5% eram IMS-B. Em concordância com estes dados, no nosso trabalho observamos uma

frequência maior de casos com IMS-A (31,3%) que os casos com IMS-B (14,7%). Por outro lado, Thibodeau *et al.* (1998) e Luceri *et al.* (2002) relataram um maior número de casos com IMS-B (57,1%; 22,8%), respectivamente, em relação aos casos com IMS-A (42,9%; 12,28%).

No painel definido pelo *NCI*, foram estabelecidos cinco microssatélites para a pesquisa de IMS em CCR, BAT25 e BAT26, mononucleotídeos, D2S123, D5S346 e D17S250[Mfd15CA], dinucleotídeos (BOLAND *et al.*, 1998). Estes microssatélites permitiriam caracterizar em torno de 60% a 70% de todos os CCR como MSE. Os outros CCR, com IMS, estariam subdivididos entre os fenótipos de alta e baixa instabilidades (BOLAND *et al.*, 1998). As características que permitiram distinguir os tumores que demonstravam alta instabilidade daqueles que demonstravam baixa instabilidade foram geralmente aceitas pelos participantes do consenso. Entretanto, foi consideravelmente debatido e controverso a separação entre tumores com baixa instabilidade e os MSE. Foi sugerido que estes dois fenótipos fizessem parte de um único grupo, incluindo o fato de que a taxa de mutações de base para os microssatélites nos CCR aparentemente estáveis não era precisamente conhecida (BOLAND *et al.*, 1998). A distinção entre estes dois grupos parece ser altamente dependente do tipo e do número de microssatélites analisados (BOLAND *et al.*, 1998). Dado o uso de muitos microssatélites, poder-se-ia dizer que todos os CCR exibiriam algum nível de IMS (BOLAND *et al.*, 1998). Com o painel recomendado de cinco microssatélites, foi observado que o número de microssatélites seria insuficiente para concluir com precisão se um tumor era aparentemente estável ou não, pois se o painel fosse expandido, o mesmo poderia demonstrar algum nível de IMS (BOLAND *et al.*, 1998). Thibodeau *et al.* (1998) observaram que a probabilidade de que, pelo menos um microssatélite apresentasse *RER* num dado tumor, aumentava quando um número maior de microssatélites era testado. Para o CCR, aproximadamente seis microssatélites se mostraram adequados para a realização

dos testes de IMS. Se um grande número de microsatélites fosse testado, deveria ser realizada a pesquisa de defeitos nos MMR, para diferenciar o tipo de IMS. Ward *et al.* (2001) sugeriram que o fenótipo IMS-B refletiria uma via distinta de carcinogênese, envolvendo outras seqüências que não as das repetições mononucleotídicas (microsatélites BAT25 e BAT26). De acordo com o *NCI*, os tumores com IMS-B deveriam ser testados com um *set* adicional de microsatélites, para caracterizá-los com maior acurácia. Além disso, deveria ser testado um painel secundário de microsatélites mononucleotídeos nos tumores classificados como IMS-A com o fenótipo *RER* somente em microsatélites dinucleotídeos, para excluir dos casos com fenótipo de IMS-B. No nosso estudo, foi testado o painel dos cinco microsatélites recomendados pelo *NCI* (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S250[Mfd15CA]) para a pesquisa de IMS em pacientes portadores de CCR. Testes subseqüentes com outros microsatélites e pesquisa de defeitos nos *MMR* poderão ser realizados posteriormente, dependendo das características clínicas dos pacientes.

O mononucleotídeo BAT26 foi considerado ser um microsatélite altamente sensível e específico para a identificação de CCR com alta instabilidade de microsatélites (THIBODEAU *et al.*, 1998). Ele está localizado no quinto *intron* do gene *hMSH2*, que é um dos genes responsáveis pelo erro de pareamento do DNA, gene este envolvido no processo de carcinogênese dos CCR (MUKHERJEE *et al.*, 2002). Todavia, Ward *et al.* (2001) observaram que em 90,9% dos casos, o microsatélite BAT26 apresentou *RER* e que, em 6,1%, dos casos os microsatélites BAT25 e BAT26 foram considerados estáveis. Quanto à frequência de instabilidade dos dinucleotídeos nos casos com IMS-A, o microsatélite D5S346 (52%) foi o que apresentou maior frequência de *RER*, seguido dos microsatélites D2S123 (30%) e D17S250[Mfd15CA] (20%), respectivamente. Nossos resultados foram semelhantes, pois nos casos com IMS-A os microsatélites BAT25 e BAT26 apresentaram *RER* em 80% e

estabilidade em 20% dos casos e o microssatélite dinucleotídeo que apresentou maior frequência de *RER* foi o D5S346 (86,7%), seguido dos microssatélites D17S250[Mfd15CA] (80%) e D2S123 (40%).

Nos casos com IMS-B, Ward *et al.* (2001) relataram que todos os casos de CCR eram estáveis para os microssatélites BAT25 e BAT26 e que havia um predomínio do fenótipo *RER* em microssatélites dinucleotídicos. Nossos dados corroboram estas observações, pois os casos classificados como IMS-B não apresentaram *RER* nos microssatélites BAT25 e BAT26 e, o D17S250[Mfd15CA] (57,1%) que é um dinucleotídeo, foi o microssatélite com *RER* mais freqüentemente encontrado. Por outro lado, Xicola *et al.* (2007) relataram IMS-B em um caso que apresentou IMS no mononucleotídeo BAT26. Este caso foi submetido a outros testes com outros microssatélites mononucleotídeos. Thibodeau *et al.* (1998) também relataram que nos casos com IMS-A, somente um caso não apresentou *RER* no microssatélite BAT26 e que, nos casos com IMS-B somente um caso apresentou *RER* no microssatélite BAT26. No nosso estudo, nenhum caso de baixa instabilidade apresentou *RER* no BAT26. Estes dados confirmam o uso deste microssatélite para distinguir os casos MSE/IMS-B daqueles com IMS-A.

Com relação aos parâmetros clínicos e patológicos dos CCR observaram-se diferenças entre os casos com IMS em comparação com os tumores MSE, tal como registrado na literatura (KIM *et al.*, 1994; GRYFE *et al.*, 2000; LUCERI *et al.*, 2002; YEARSLEY *et al.*, 2006). Os tumores com IMS foram mais freqüentes em homens, embora a diferença não fosse estatisticamente significativa. Segundo alguns dados publicados, os CCR com IMS, especialmente com alta instabilidade, seriam mais freqüentes em mulheres (JASS, 2003), mas

em outras casuísticas, houve maior número de casos de CCR com IMS em homens (GRYFE *et al.*, 2000).

A maioria dos CCR envolve o lado esquerdo do cólon (NAIDOO *et al.*, 2000; PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2005). Entretanto, os tumores com IMS, especialmente aqueles com IMS-A, localizam-se preferencialmente no cólon direito (LUCERI *et al.*, 2002; YEARSLEY *et al.*, 2006), como observamos no nosso trabalho.

Está bem estabelecido que a frequência de CCR com IMS-A é relativamente aumentada em determinadas populações selecionadas que incluíam indivíduos jovens que apresentavam tumores mucinosos (WARD *et al.*, 2001) ou que tumores com IMS são frequentemente mucinosos (YEARSLEY *et al.*, 2006). Neste estudo, observamos que os tumores com IMS eram mais frequentemente mucinosos quando comparados com os tumores MSE, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, o que pode ser devido ao pequeno tamanho da nossa amostra.

Observamos que a resposta linfocítica em torno do tumor era mais intensa e freqüente nos CCR com IMS que naqueles MSE. O aumento da resposta linfocítica está de acordo com os achados de Yearsley *et al.* (2006), que relataram maior predomínio de infiltrado linfocitário em torno dos tumores com IMS-A.

Finalmente, observamos que a invasão de vasos linfáticos era mais freqüente em CCR com IMS-B ou MSE, quando comparados aos CCR com IMS-A. Não encontramos na literatura outros trabalhos que tivessem analisado essa característica. Todavia, indiretamente, essa

observação está de acordo com o comportamento biológico mais freqüente que é relatado para os CCR com IMS-A (KIM *et al.*, 1994).

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho podemos concluir que:

O método de extração escolhido utilizando-se *kit* comercial, as condições da *PCR* e eletroforese padronizadas foram úteis e satisfatórias para a obtenção e amplificação do DNA dos casos de CCR processados rotineiramente para diagnóstico anatomopatológico.

O resultado da detecção da amplificação alélica do DNA nos casos de CCR utilizando o painel de microssatélites utilizado recomendado pelo *NCI* variou conforme o microssatélite testado. O microssatélite mais sensível foi o BAT26 (100%) e o menos sensível foi o D2S123 (83,3%).

A frequência de casos MSE foi menor que a de casos com IMS. Entre os casos instáveis, a frequência de casos com IMS-A foi maior que a de casos com IMS-B. Estes resultados podem ser devido à seleção os pacientes com idade igual ou menor que 40 anos e ao pequeno tamanho da amostra.

Nos casos com IMS-A, o microssatélite mais frequentemente instável foi o D5S346. Nos casos com IMS-B o microssatélite mais frequentemente instável foi o D17S250[Mfd15CA].

Nos casos com IMS-B a instabilidade foi detectada somente em microssatélites dinucleotídeos (D2S123 ou D5S346 ou D17S250[Mfd15CA]). Não foi encontrada instabilidade nos microssatélites mononucleotídeos (BAT25 e BAT26).

Os CCR com IMS foram mais frequentes em homens, localizavam-se preferencialmente no cólon direito, com macroscopia úlcero-infiltrativa, tipo histológico predominante de adenocarcinoma sem especificação, com resposta linfocítica peritumoral de discreta a moderada.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as características clínico-patológicas dos tumores com IMS-A e IMS-B.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, J., T. Watanabe, *et al.* Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. Am J Pathol, v.158, n.2, Feb, p.527-35. 2001.

Anacleto, C., A. M. Leopoldino, *et al.* Colorectal cancer "methylator phenotype": fact or artifact? Neoplasia, v.7, n.4, Apr, p.331-5. 2005.

Astler, V. B. e F. A. Collier. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. Ann Surg, v.139, n.6, Jun, p.846-52. 1954.

Barea, J. A., M. I. M. C. Pardini, *et al.* Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas: revisão e apontamentos sobre as possíveis aplicações. NewsLab, ed.63, p.96-114. 2004.

Baudhuin, L. M., M. J. Ferber, *et al.* Characterization of hMLH1 and hMSH2 gene dosage alterations in Lynch syndrome patients. Gastroenterology, v.129, n.3, Sep, p.846-54. 2005.

Boland, C. R., S. N. Thibodeau, *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res, v.58, n.22, Nov 15, p.5248-57. 1998.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA 2006.

Burton, M. P., B. G. Schneider, *et al.* Comparison of histologic stains for use in PCR analysis of microdissected, paraffin-embedded tissues. Biotechniques, v.24, n.1, Jan, p.86-92. 1998.

Carretero, J. E., J. M. Herrerias Esteban *et al.* Oncogenes y cáncer colorrectal. Revis Gastroenterol, v.3, n.3, p.181-198. 2001.

Chao, A., F. Gilliland, *et al.* Patient and tumor characteristics of colon cancers with microsatellite instability: a population-based study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.9, n.6, Jun, p.539-44. 2000.

Clarens, D. C-B., Genética molecular del cáncer colorectal. Rev Esp Enferm Dig, v.96, n.1, p.48-59. 2004.

Coombs, N. J., A. C. Gough, *et al.* Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucleic Acids Res, v.27, n.16, Aug 15, p.e12. 1999.

Coura, R., J. C. Prolla, *et al.* An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. J Clin Pathol, v.58, n.8, Aug, p.894-5. 2005.

Coura Rdos, S., P. Ashton-Prolla, *et al.* Hereditary non-polipomatous colorectal cancer: hereditary predisposition, diagnosis and prevention. Arq Gastroenterol, v.42, n.2, Apr-Jun, p.99-106. 2005.

Cutait, R., G. Cotti *et al.* Instabilidade de microssatélites em portadores de câncer colo-retal. Rev Bras Coloproct, 2002. (4):225-232.

Dietmaier, W., W. Riedlinger *et al.* Detection of microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) in colorectal tumors by fluorescence-based multiplex microsatellite PCR. Biochemica, n.2, 1999.

Dukes, C. E. The classification of cancer of the rectum. J Pathol Bacteriol, 1932; 35:323-32.

Feng, F., X. H. Liu, *et al.* Expression and mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. World J Gastroenterol, v.9, n.11, Nov, p.2548-51. 2003.

Fernandes, J. V., R. V Meissner, *et al.* Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. J Bras Patol Med Lab, v.40, n.3, Jun, p.141-6. 2004.

Fuzikawa, A. K., L. A. Haddad, *et al.* Utilization of microsatellites for the analysis of genomic alterations in colorectal cancers in Brazil. Braz J Med Biol Res, v.30, n.8, Aug, p.915-21. 1997.

Gonzalez-Garcia, I., V. Moreno, *et al.* Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. J Natl Cancer Inst, v.92, n.7, Apr 5, p.544-9. 2000.

Gruber, S. B. New developments in Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. Gastroenterology, v.130, n.2, Feb, p.577-87. 2006.

Gryfe, R., H. Kim, *et al.* Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. N Engl J Med, v.342, n.2, Jan 13, p.69-77. 2000.

Hamilton, S. R., L. A. Aaltonen. World Health Organization Classification of Tumors, Pathology & Genetics. Tumors of the digestive system. Lyon. 2000. p.104-46.

Hatch, S. B., H. M. Lightfoot, Jr., *et al.* Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors. Clin Cancer Res, v.11, n.6, Mar 15, p.2180-7. 2005.

Hoang, J. M., P. H. Cottu, *et al.* BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. Cancer Res, v.57, n.2, Jan 15, p.300-3. 1997.

Honchel, R., K. C. Halling, *et al.* Genomic instability in neoplasia. Semin Cell Biol, v.6, n.1, Feb, p.45-52. 1995.

Ionov, Y., M. A. Peinado, *et al.* Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature, v.363, n.6429, Jun 10, p.558-61. 1993.

Ishikubo, T., Y. Nishimura, *et al.* The clinical features of rectal cancers with high-frequency microsatellite instability (MSI-H) in Japanese males. Cancer Lett, v.216, n.1, Dec 8, p.55-62. 2004.

Jass, J. R. Clinical significance of early-onset "sporadic" colorectal cancer with microsatellite instability. Dis Colon Rectum, v.46, n.10, Oct, p.1305-9. 2003.

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

Jass, J. Towards a molecular classification of colorectal cancer. Int J Colorectal Dis, v.14, n.4-5, Nov, p.194-200. 1999.

Kakar, S., S. Aksoy, *et al.* Mucinous carcinoma of the colon: correlation of loss of mismatch repair enzymes with clinicopathologic features and survival. Mod Pathol, v.17, n.6, Jun, p.696-700. 2004.

Kambara, T., N. Matsubara, *et al.* High frequency of low-level microsatellite instability in early colorectal cancer. Cancer Res, v.61, n.21, Nov 1, p.7743-6. 2001.

Kim, H., J. Jen, *et al.* Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. Am J Pathol, v.145, n.1, Jul, p.148-56. 1994.

Knudson, A. G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A, v.68, n.4, Apr, p.820-3. 1971.

Laiho, P., V. Launonen, *et al.* Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. Cancer Res, v.62, n.4, Feb 15, p.1166-70. 2002.

Lin, S. C., C. L. Liu, *et al.* Clinical implications of C-kit gene mutation in patients with large gastrointestinal stromal tumors. J Gastroenterol Hepatol, v.21, n.10, Oct, p.1604-8. 2006.

Lindor, N. M., L. J. Burgart, *et al.* Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. J Clin Oncol, v.20, n.4, Feb 15, p.1043-8. 2002.

Liu, B., N. C. Nicolaides, *et al.* Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. Nat Genet, v.9, n.1, Jan, p.48-55. 1995.

Luceri, C., C. De Filippo, *et al.* Microsatellite instability in a population of sporadic colorectal cancers: correlation between genetic and pathological profiles. Dig Liver Dis, v.34, n.8, Aug, p.553-9. 2002.

Lynch, H. T. e A. De La Chapelle. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med, v.348, n.10, Mar 6, p.919-32. 2003.

Lynch, H. T. HNPCC (Lynch Syndrome): differential diagnosis, molecular genetics, surveillance and management. Acta Oncol Bras, v.24, n.1, p.565-67, Jan-mar. 2004.

Lynch, H. T., J. F. Lynch, *et al.* Toward a consensus in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). J Natl Cancer Inst, v.99, n.4, Feb 21, p.261-3. 2007.

Markowitz, S. DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. J Clin Oncol, v.18, n.21 Suppl, Nov 1, p.75S-80S. 2000.

Markowitz, S. D., D. M. Dawson, *et al.* Focus on colon cancer. Cancer Cell, v.1, n.3, Apr, p.233-6. 2002.

Mesquita, R. A., Anzai, E. K., *et al.* Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. Pesqui Odontol Bras, v.15, n.4, p.314-319, out./dez. 2001.

Messerini, L., M. Ciantelli, *et al.* Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic mucinous colorectal cancers. Hum Pathol, v.30, n.6, Jun, p.629-34. 1999.

Mitchell, R. J., S. M. Farrington, *et al.* Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review. Am J Epidemiol, v.156, n.10, Nov 15, p.885-902. 2002.

Mukherjee, M., V. Minal, *et al.* Allelic variation of BAT-26 and BAT-40 poly-adenine repeat loci in North Indians. Int J Mol Med, v.9, n.1, Jan, p.91-4. 2002.

Naidoo, R., M. Tarin, *et al.* A comparative microsatellite analysis of colorectal cancer in patients <35 years and >50 years of age. Am J Gastroenterol, v.95, n.11, Nov, p.3266-75. 2000.

Nash, G. M., M. Gimbel, *et al.* Automated, multiplex assay for high-frequency microsatellite instability in colorectal cancer. J Clin Oncol, v.21, n.16, Aug 15, p.3105-12. 2003.

Neto, J. D. C., J. B. P. Barreto *et al.* Câncer colorretal: características clínicas e anatomopatológicas em pacientes com idade inferior a 40 anos. Rev Bras Coloproct, v.26, n.4, p.430-35. 2006.

Oda, S., E. Oki, *et al.* Precise assessment of microsatellite instability using high resolution fluorescent microsatellite analysis. Nucleic Acids Res, v.25, n.17, Sep 1, p.3415-20. 1997.

Ollila, S., L. Sarantaus, *et al.* Pathogenicity of MSH2 missense mutations is typically associated with impaired repair capability of the mutated protein. Gastroenterology, v.131, n.5, Nov, p.1408-17. 2006.

Parc, Y., S. Gueroult, *et al.* Prognostic significance of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of MSH2 and MLH1 in sporadic T3N0M0 colon cancer. Gut, v.53, n.3, Mar, p.371-5. 2004.

Parc, Y. R., K. C. Halling, *et al.* HSMH6 alterations in patients with microsatellite instability-low colorectal cancer. Cancer Res, v.60, n.8, Apr 15, p.2225-31. 2000.

Peltomaki, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol, v.21, n.6, Mar 15, p.1174-9. 2003.

Peltomaki, P. DNA mismatch repair gene mutations in human cancer. Environ Health Perspect, v.105 Suppl 4, Jun, p.775-80. 1997.

Peltomaki, P., L. A. Aaltonen, *et al.* Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. Science, v.260, n.5109, May 7, p.810-2. 1993.

Pereira Júnior, T., A. J. C. Alves, A. M. M. Ferreira. Câncer colorretal: análise anatomopatológica de 476 colectomias consecutivas em Belo Horizonte (MG). J Bras Patol Med Lab, v.41, n.3, p. 175-184. 2005.

Perez, R. O., Habr-Gama A. *et al.* A genética do câncer colorretal – princípios para o cirurgião. Rev Bras Coloproct, 1998; 18(1): 5-10.

Pinho, M., B. M. Rossi. Conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal. Rev Bras Coloproct, v.19, n.1, p.57-60. 1999.

Raut, C. P., T. M. Pawlik, *et al.* Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. Mutat Res, v.568, n.2, Dec 21, p.275-82. 2004.

Rossi, B. M., Ferreira, F. O., *et al.* Câncer colorretal hereditário sem polipose – HNPCC. Acta Oncol Bras, v.22, p.238-244, 2002.

Rossi, B. M., A. Lopes, *et al.* hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Ann Surg Oncol, v.9, n.6, Jul, p.555-61. 2002.

Rudzki, Z., M. Zazula, *et al.* Low-level microsatellite instability colorectal carcinomas: do they really belong to a "gray zone" between high-level microsatellite instability and microsatellite-stable cancers? Int J Colorectal Dis, v.18, n.3, May, p.216-21. 2003.

Saiki, R. K., S. Scharf, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, v.230, n.4732, Dec 20, p.1350-4. 1985.

Salto-Tellez, M., S. Y. Tan, *et al.* Dinucleotide microsatellite repeats are essential for the diagnosis of microsatellite instability in colorectal cancer in Asian patients. World J Gastroenterol, v.11, n.18, May 14, p.2781-3. 2005.

Sinicrope, F. A., R. L. Rego, *et al.* Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. Gastroenterology, v.131, n.3, Sep, p.729-37. 2006.

Sobin, L. TNM Classification of malignant tumours. 6th.ed. New York: Wiley-Liss; 2002. p.72-6.

Thibodeau, S. N., A. J. French, *et al.* Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. Cancer Res, v.58, n.8, Apr 15, p.1713-8. 1998.

Toyota, M. e J. P. Issa. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. Semin Cancer Biol, v.9, n.5, Oct, p.349-57. 1999.

Trojan, J., J. Raedle, *et al.* Detection of microsatellite instability from archival, hematoxylin-eosin-stained colorectal cancer specimen. Arch Pathol Lab Med, v.126, n.2, Feb, p.202-4. 2002.

Umar, A. Lynch syndrome (HNPCC) and microsatellite instability. Dis Markers, v.20, n.4-5, p.179-80. 2004.

Umar, A., C. R. Boland, *et al.* Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst, v.96, n.4, Feb 18, p.261-8. 2004.

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

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

Vendrell, E., C. Morales, *et al.* Genomic determinants of prognosis in colorectal cancer. Cancer Lett, v.221, n.1, Apr 18, p.1-9. 2005.

Wahlberg, S. S., J. Schmeits, *et al.* Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. Cancer Res, v.62, n.12, Jun 15, p.3485-92. 2002.

Ward, R., A. Meagher, *et al.* Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. Gut, v.48, n.6, Jun, p.821-9. 2001.

Xicola, R. M., X. Llor, *et al.* Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. J Natl Cancer Inst, v.99, n.3, Feb 7, p.244-52. 2007.

Yamashita, K., T. Dai, *et al.* Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. Cancer Cell, v.4, n.2, Aug, p.121-31. 2003.

Yearsley, M., H. Hampel, *et al.* Histologic features distinguish microsatellite-high from microsatellite-low and microsatellite-stable colorectal carcinomas, but do not differentiate germline mutations from methylation of the MLH1 promoter. Hum Pathol, v.37, n.7, Jul, p.831-8. 2006.

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolos de disseção

Protocolo 1

1. Os cortes histológicos foram colocados em solução álcool absoluto/água destilada, passados para o banho-maria histológico com água destilada e distendidos em lâminas.
2. A desparafinização foi feita mergulhando as lâminas em dois banhos de xilol, por 5 min cada um, seguindo-se de dois banhos de álcool absoluto, por 2 min cada um.
3. Após a desparafinização, a área de interesse do corte foi dissecada (raspada) com lâminas de bisturi estéreis (uma para cada amostra) em tubos eppendorff de 1,5 ml.

Protocolo 2

1. Os cortes histológicos foram colocados diretamente no banho-maria histológico de água destilada e distendidos nas lâminas, não passando pela solução álcool absoluto/água destilada.
2. A desparafinização foi feita mergulhando as lâminas em dois banhos de xilol, por 5 min cada um, seguindo-se de dois banhos de álcool absoluto, por 2 min cada um.
3. Após a desparafinização, a área de interesse do corte foi dissecada (raspada) com lâminas de bisturi estéreis (uma para cada amostra) em tubos eppendorff de 1,5 ml.

Protocolo 3

1. Os cortes histológicos foram colocados em solução álcool absoluto/água destilada, passados para o banho-maria histológico com água destilada e distendidos em lâminas.
2. A área de interesse do corte foi dissecada (raspada) com lâminas de bisturi estéreis (uma para cada amostra) em tubos eppendorff de 1,5 ml.
3. A desparafinização do material dissecado foi feita nos próprios tubos eppendorf de 1,5 ml, à temperatura ambiente, com 1,0 ml de xilol por 10 min, homogeneização por vortex e pulso de centrifugação. O sobrenadante foi desprezado, seguido de mais uma lavagem com xilol nas mesmas condições descritas acima. O precipitado foi reidratado com álcool absoluto, duas vezes, por 10 min cada lavagem, homogeneização por vortex e pulso de centrifugação. O sobrenadante foi desprezado, restando no fundo do tubo o material de interesse.

Protocolo 4

1. Os cortes histológicos foram colocados diretamente no banho-maria histológico de água destilada e distendidos nas lâminas, não passando pela solução álcool absoluto/água destilada.
2. A área de interesse do corte foi dissecada (raspada) com lâminas de bisturi estéreis (uma para cada amostra) em tubos eppendorff de 1,5 ml.
3. A desparafinização do material dissecado foi feita nos próprios tubos eppendorf de 1,5 ml, à temperatura ambiente, com 1,0 ml de xilol por 10 min, homogeneização por

vortex e pulso de centrifugação. O sobrenadante foi desprezado, seguido de mais uma lavagem com xilol nas mesmas condições descritas acima. O precipitado foi reidratado com álcool absoluto, duas vezes, por 10 min cada lavagem, homogeneização por vortex e pulso de centrifugação. O sobrenadante foi desprezado, restando no fundo do tubo o material de interesse.

Protocolo 5

1. Os cortes histológicos foram colocados em solução álcool absoluto/água destilada, passados para o banho-maria histológico com água destilada e distendidos em lâminas.
2. A área de interesse do corte foi dissecada (raspada) com lâminas de bisturi estéreis (uma para cada amostra) em tubos eppendorff de 1,5 ml.
3. A desparafinização foi feita seguindo-se protocolo estabelecido no NUPAD utilizando-se forno microondas. Adicionou-se 1,0 ml de *buffer* de digestão (EDTA 0,5 M, pH 8,0; Tris 100 mM, pH 8,5; SDS 10%) ao tubo eppendorff de 1,5 ml. Homogeneizou-se durante 5 min por vortex seguido de pulso de centrifugação. O tubo eppendorff de 1,5 ml foi aquecido em forno microondas por 15 seg, em potência 6 (média-alta) por 2 a 3 vezes com intervalos de 30 seg. Em seguida, foi centrifugado a 14000 rpm por 10 min. A capa de parafina foi retirada restando no fundo do tubo o material de interesse.

Protocolo 6

1. A área de interesse foi raspada com bisturi estéril diretamente do bloco de parafina para o tubo eppendorff de 1,5 ml.

2. A desparafinização do material dissecado foi feita nos próprios tubos eppendorf de 1,5 ml, à temperatura ambiente, com 1,0 ml de xilol por 10 min, homogeneização por vortex e pulso de centrifugação. O sobrenadante foi desprezado, seguido de mais uma lavagem com xilol nas mesmas condições descritas acima. O precipitado foi reidratado com álcool absoluto, duas vezes, por 10 min cada lavagem, homogeneização por vortex e pulso de centrifugação. O sobrenadante foi desprezado, restando no fundo do tubo o material de interesse.