

CARACTERIZAÇÃO DE LESÕES PRECURSORAS EM PACIENTES DE ALTO RISCO PARA CÂNCER COLORRETAL

ISABELA PESSOA ELIAS

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Fábio de Oliveira Ferreira

Co-Orientador: Dr. Afonso Henrique Silva e Sousa

**Júnior, Prof. Dr. Benedito Mauro Rossi, Dra. Renata
de Almeida Coudry**

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Elias, Isabela Pessoa

Caracterização de lesões precursoras em pacientes de alto risco para câncer colorretal / Isabela Pessoa Elias - São Paulo, 2010.
109p.

Dissertação (Mestrado) - Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fábio de Oliveira Ferreira

Descritores: 1. CÂNCER COLORRETAL 2. CÂNCER COLORRETAL SEM
POLIPOSE HEREDITÁRIO 3. MUTAÇÃO EM LINHAGEM GERMINATIVA
4. COLONOSCOPIA 5. IMUNOISTOQUÍMICA.

DEDICATÓRIA

À minha mãe Júlia que, apesar do destino ter nos separado tão precocemente, o amor dedicado a mim foi tão grande que construiu a base de toda a minha existência.

À minha filha Isadora, a caminho para tornar minha felicidade completa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai Célio que me deu suporte e amor para prosseguir minha caminhada. Exemplo na profissão e no caráter ilibado.

Ao Eder pela compreensão, paciência e amor. Desculpe-me pela ausência demasiada que minha profissão trouxe desde o princípio. Este mestrado não seria possível sem o apoio incondicional do melhor marido do mundo!

Ao meu orientador Dr. Fábio pela presença constante, pela ajuda valiosa, pela confiança, e pela oportunidade de trabalhar em hospital tão renomado ao lado de profissionais tão competentes.

Ao meu co-orientador Dr. Benedito pelo carinho, incentivo e pelos ensinamentos na fascinante área do câncer hereditário. Foi uma honra tê-lo como meu co-orientador.

A minha co-orientadora Dra. Renata, pessoa fundamental na realização do meu trabalho dentro do laboratório de anatomia patológica, tão árduo para mim, seria impossível sem o seu auxílio.

Agradeço em especial ao meu co-orientador Dr. Afonso Henrique pela confiança depositada em mim desde aquele tempo de estágio no Hospital das Clínicas. Por acreditar em mim desde o princípio e por ter me dado oportunidades tão valiosas! Obrigada!

A Mila que me acolheu com sua amizade e fez esta caminhada menos árdua, mais alegre e divertida. Obrigada pelo companheirismo!

A Ligia que esteve ao meu lado desde o começo, quando eu me sentia um peixinho fora d'água.

A Érika pela ajuda indispensável.

A Suely Nonogaki pela competência com que realizou minhas reações de imunoistoquímica.

A todos dos departamentos de Cirurgia Pélvica, Anatomia Patológica e Endoscopia Digestiva que, de alguma forma, ajudaram na realização deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação Dr. Marcelo Averbach e Dr. Stênio Zequi pelas correções e sugestões.

Agradeço a FAPESP e ao CNPq pelo financiamento deste projeto.

A todos os amigos que fiz e que vou sentir saudades...

RESUMO

Isabela IP. **Caracterização de lesões precursoras em pacientes de alto risco para câncer colorretal.** São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: A Síndrome de Lynch ou Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC) é uma das principais síndromes hereditárias relacionadas ao câncer colorretal. Possui um padrão de herança autossômica dominante, causada por mutação germinativa em um dos genes responsáveis pelo sistema de reparo do DNA: *MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *MSH6*. A colonoscopia é, atualmente, o mais importante recurso, útil não apenas para o diagnóstico, como também para o estadiamento, tratamento e prevenção do câncer colorretal (CCR). Possui elevada sensibilidade e especificidade, além de permitir a execução de biópsias e remoção de lesões, reduzindo significativamente a incidência e a mortalidade do CCR. A colonoscopia com *Narrow Band Imaging* (NBI) aumenta a sensibilidade e a especificidade do exame convencional podendo apresentar um impacto positivo na prevenção de câncer colorretal em pacientes de alto risco. **Objetivos:** 1- Verificar a frequência das lesões precursoras de câncer colorretal em pacientes considerados de alto risco para CCR, por meio de colonoscopia com NBI. 2- Descrever as características clínicas, anatomopatológicas e moleculares das lesões precursoras de CCR, em pacientes de alto risco. 3-Verificar a associação entre as características clínicas, moleculares e anatomopatológicas. **Pacientes e métodos:** Foram incluídos no estudo 67 indivíduos pertencentes ao Registro de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C. Camargo, que preenchem os Critérios de Amsterdam, Câncer Colorretal Familiar ou Bethesda. Foi realizada colonoscopia com NBI nestes pacientes e encontradas 58 lesões que foram ressecadas ou biopsiadas. Neste material foi realizado exame anatomopatológico, estudo imunoistoquímico das proteínas MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, p53, COX-2 e β -catenina, e avaliação do perfil de mutação dos genes *KRAS* e *BRAF*. **Resultados:** A colonoscopia com NBI apresentou uma taxa de detecção de lesões de 0,87 por paciente, uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 83% na diferenciação entre lesões neoplásicas e não neoplásicas. Dos 25 pacientes que apresentaram lesões, seis (24%) apresentaram ausência de expressão protéica para pelo menos uma das proteínas de reparo do DNA. Das 23 lesões nas quais foi

possível a realização do pirosequenciamento, foram identificadas mutações de KRAS em 39% e em BRAF em 35%. **Conclusões:** A colonoscopia com NBI tem uma boa taxa de detecção de lesões e boa acurácia na diferenciação de lesões *in vivo*. Desta maneira é um excelente método para rastreamento e vigilância de CCR em pacientes de alto risco. É possível a realização de imunoistoquímica das proteínas de reparo do DNA, p53, COX-2 e β -catenina, e do pirosequenciamento dos genes KRAS e BRAF em adenomas, quando este é o único tecido neoplásico disponível para testes na busca do diagnóstico da Síndrome de Lynch. Entretanto, não foi possível verificar o *status* de metilação do gene MLH1 pela escassez de DNA.

SUMMARY

Isabela IP. [Characterization of precursor lesions in high risk patients for colorectal cancer]. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Lynch syndrome or Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC) is the most prevalent hereditary colorectal cancer syndrome. It has an autosomal dominant mode of inheritance and it is caused by a germline mutation in one of the DNA mismatch repair genes: *MSH2*, *MLH1*, *PMS2* or *MSH6*. Colonoscopy surveillance in Lynch syndrome patients dramatically reduces colorectal cancer incidence and mortality. Narrow band imaging (NBI) technology is based on modifying the center wavelength and bandwidth of an endoscope's light into narrow band illumination. NBI provides visualization of the mucosal vascular network and surface structure. Utilization of NBI enhances the sensitivity and specificity of conventional colonoscopy and may represents a significant improvement in the effectiveness of colorectal cancer surveillance, in high risk patients. **Aims:** 1- To verify the frequency of colorectal cancer precursor lesions in high risk patients with NBI colonoscopy. 2- Characterize these lesions clinically, morphologically and molecularly. 3- To verify the association between the clinical, morphological and molecular features of these lesions. **Methods:** Sixty-seven individuals that fulfill the Amsterdam, Familial Colorectal Cancer or one of the Bethesda's criteria, with colonoscopies performed for the purpose of screening or surveillance, were prospective selected for this study. Fifty-eight lesions were detected and resected or biopsied. **Results:** NBI colonoscopy had an overall mean lesion detection rate of 0.87 per patient. NBI had a sensitivity of 93% and a specificity of 83% in differentiating between neoplastic from nonneoplastic lesions. Of the 25 patients that had lesions diagnosed on their colonoscopies, six (24%) had loss of expression of at least one of the mismatch repair proteins. Thirty-nine percent of the lesion had *KRAS* mutation and 35% had *BRAF* mutation. **Conclusions:** NBI has a good adenoma detection rate and good accuracy in differentiating colorectal

polyps in vivo. Therefore, NBI magnification is a very effective method for screening and surveillance of high risk patients. It is possible to perform immunohistochemistry of mismatch repair proteins, p53, COX-2 and β -catenin, and pyrosequencing of *KRAS* e *BRAF* genes in adenomas, when this is the only neoplastic tissue available for testing, in high risk individuals for Lynch syndrome. Nevertheless, it was not possible verifying the methylation status of *MLH1* because of DNA paucity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diferença entre a luz branca e o NBI. O NBI consiste no uso de apenas dois filtros (azul e verde) de ondas curtas e bandas estreitas (415 ± 30 nm e 540 ± 30 nm).....	31
Figura 2	Fotografia de um adenoma à colonoscopia com NBI.....	54
Figura 3	Fotomicrografia demonstrando um caso de um pólipó de 3 mm com ausência de expressão protéica do dímero MSH2/MSH6 à imunoistoquímica.....	58
Figura 4	Fotomicrografia demonstrando casos com expressão protéica intensa de p53 e β -catenina à imunoistoquímica.....	70
Figura 5	Fotografias de um adenoma de 3 mm à colonoscopia.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Critérios de Amsterdam I.....	5
Quadro 2	Critérios de Amsterdam II.....	6
Quadro 3	Critérios de Bethesda.....	7
Quadro 4	Critérios de Bethesda Revisados.....	8
Quadro 5	Recomendações para o processo de avaliação molecular de pacientes de alto risco, baseado nos Critérios de Bethesda.....	14
Quadro 6	Classificação da história de CCR.....	36
Quadro 7	Recomendações para prevenção de CCR em indivíduos de alto risco para desenvolver CCR de acordo com a classificação da história familiar.....	37
Quadro 8	Classificação de lesões colorretais da Sociedade Japonesa de Pesquisa em Câncer Colorretal.....	42
Quadro 9	Classificação dos microvasos da mucosa colônica de lesões colorretais para o NBI segundo Hirata.....	42
Quadro 10	Anticorpos utilizados para análise imunoistoquímica.....	44
Quadro 11	Mix-PCR.....	48
Quadro 12	Programa de ciclagem utilizado para o PCR.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação de todos os pacientes segundo a história familiar.....	52
Tabela 2	Classificação dos pacientes com lesões segundo a história familiar.....	52
Tabela 3	Frequência de probandos e familiares da amostra total e dos pacientes que apresentavam lesões.....	52
Tabela 4	Classificação da história familiar dos pacientes em relação à presença de lesões.....	53
Tabela 5	Características das lesões colorretais.....	53
Tabela 6	Classificação das lesões segundo Hirata.....	54
Tabela 7	Classificação anatomopatológica das lesões colorretais.....	55
Tabela 8	Grau de displasia dos adenomas colorretais.....	55
Tabela 9	Sensibilidade e especificidade do NBI na diferenciação entre lesões neoplásicas e não neoplásicas.....	56
Tabela 10	Valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo do NBI na diferenciação entre lesões neoplásicas e não neoplásicas.....	56
Tabela 11	Avaliação da expressão das proteínas de reparo do DNA.....	57
Tabela 12	Discriminação da expressão protéica por imunoistoquímica nos 25 pacientes que apresentaram lesões à colonoscopia.....	57

Tabela 13	Classificação clínica das famílias dos pacientes em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	59
Tabela 14	Resultado do sequenciamento dos genes de reparo do DNA em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	60
Tabela 15	Histopatologia das lesões em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	61
Tabela 16	Histopatologia (agrupada) das lesões em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	61
Tabela 17	Tamanho das lesões em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	62
Tabela 18	Localização das lesões em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo do DNA.....	62
Tabela 19	Nível de expressão das proteínas p53, COX-2 e β -catenina avaliada por imunoistoquímica.....	63
Tabela 20	Análise da associação entre a proteína p53 nuclear e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.....	64
Tabela 21	Análise da associação entre a proteína COX-2 epitelial e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.....	65
Tabela 22	Análise da associação entre a proteína COX-2 estromal e variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.....	66

Tabela 23	Análise da associação entre a proteína β -catenina nuclear e variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.....	67
Tabela 24	Análise da associação entre a proteína β -catenina citoplasmática e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.....	70
Tabela 25	Análise da associação entre a proteína β -catenina na membrana e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.....	71
Tabela 26	Frequência de mutações do gene <i>KRAS</i> identificadas através do pirosequenciamento.....	71
Tabela 27	Frequência de mutações do gene <i>KRAS</i> identificadas através do pirosequenciamento.....	71
Tabela 28	Frequência de mutações do gene <i>BRAF</i> identificadas através do pirosequenciamento.....	72
Tabela 29	Análise da associação entre a mutação em <i>KRAS</i> e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.....	73
Tabela 30	Análise da associação entre a mutação em <i>BRAF</i> e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	adenosina 5'fosfossulfato
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CCR	Câncer Colorretal
DEPC	Dietil Pirocarbonato
dNTP	desoxiribonucleotídeos trifosfato
FAP	<i>Familial Adenomatosis Polyposis</i> (Polipose Adenomatosa Familiar)
HNPCC	<i>Hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i> (Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose)
HE	Hematoxilina e Eosina
<i>hMLH1</i>	human mutL homolog 1
<i>hMSH2</i>	human mutS homolog 2
<i>hMSH6</i>	human mutS homolog 6
<i>hPMS1</i>	human postmeiotic segregation 1
<i>hPMS2</i>	human postmeiotic segregation 2
ICG/HNPCC	<i>International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer</i> (Grupo Colaborativo Internacional em Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose)
JRSCCR	Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (Sociedade Japonesa de Pesquisa em Câncer Colorretal)
LCM	Microdissecção e Captura a Laser
MSI	Microsatellite Instability (Instabilidade de Microssatélites)
MSI-H	Microsatellite Instability-High (Alta Instabilidade de Microssatélites)
MSI-L	<i>Microsatellite Instability-Low</i> (Baixa Instabilidade de Microssatélites)
MSS	<i>Microsatellite Stable</i> (Microssatélites Estáveis)
NBI	<i>Narrow Band Imaging</i> (Imagem de Banda Estreita)
NCI	National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)

PPi	pirofosfato
RCCH	Registro de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C. Camargo
RER	<i>Replication Error</i> (Erro de Replicação)
SL	Síndrome de Lynch
SSA	adenoma séssil serreado
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer colorretal.....	1
1.2	Síndrome de Lynch.....	2
1.3	Imunoistoquímica das proteínas de reparo do DNA.....	10
1.4	Instabilidade de Microssatélites.....	12
1.5	Metilação de MLH1 e Mutação em BRAF.....	14
1.6	Mutação em KRAS.....	16
1.7	P53 e CCR.....	18
1.8	COX-2, β -Catenina e CCR.....	21
1.9	Seguimento na SL.....	22
1.10	Sequência adenoma-carcinoma.....	24
1.11	Vias de carcinogênese colorretal.....	25
1.12	Lesões não-polipóides.....	26
1.13	Colonoscopia.....	28
1.14	Colonoscopia com NBI.....	29
2	OBJETIVOS.....	34
3	PACIENTES.....	35
3.1	Aspectos éticos.....	35
3.2	Critério de inclusão.....	35
3.3	Critérios de exclusão.....	36
3.4	Seleção de indivíduos.....	36
3.5	Dados clínicos.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Exame colonoscópico.....	40
4.2	Exame anatomopatológico.....	42
4.3	Imunoistoquímica.....	43

4.3.1	Anticorpos.....	43
4.3.2	Análise imunoistoquímica	44
4.4	Avaliação do perfil de mutação dos genes <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i>	45
4.4.1	Extração de DNA.....	46
4.4.2	Amplificação por PCR.....	47
4.4.3	Pirossequenciamento.....	48
4.5	Avaliação do <i>status</i> de metilação do gene <i>MLH1</i>	49
4.6	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Exame colonoscópico e anatomopatológico	51
5.2	Análise imunoistoquímica	56
5.3	Pirossequenciamento de <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i>	70
6	DISCUSSÃO.....	76
7	CONCLUSÃO	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

ANEXOS

- Anexo 1** Termo de consentimento livre e esclarecido
- Anexo 2** Características clínicas dos pacientes
- Anexo 3** Ficha de colonoscopia
- Anexo 4** Protocolo utilizado para imunoistoquímica
- Anexo 5** Protocolo de isolamento de DNA genômico de tecidos
- Anexo 6** Protocolo para utilização da estação de vácuo e do
pirosequenciador (PyroMark ID – Biotage)

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) é um problema de ordem mundial com uma incidência anual de mais de um milhão de casos (IARC 2002). O risco acumulado de desenvolvimento de CCR ao longo da vida é de 6% (FRANCO-DUARTE e FRANCO 2005). Nos Estados Unidos da América, em 2009 o CCR ocupou o terceiro lugar tanto em incidência quanto em mortalidade por câncer, em ambos os sexos, com um número estimado de 106.000 novos casos (52.000 homens e 54.000 mulheres) (JEMAL et al. 2009). No Brasil, o CCR é o quarto tipo de câncer mais comum em homens (superado pelos cânceres de pulmão, estômago e próstata) e o terceiro em mulheres (superado pelos cânceres de mama e colo de útero), sem considerar os tumores de pele não melanoma. Entretanto, na região sudeste do país, o CCR é o terceiro câncer mais comum em homens e o segundo mais comum em mulheres. O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados pelo Instituto Nacional do Câncer para o Brasil, no ano de 2008, é de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos para cada 100 mil homens e de 15 para cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2007). Mundialmente, a maior incidência ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas o risco aumenta a partir dos 40 anos (PARKIN et al. 2001).

Estima-se que cerca de 15% dos CCR tenham um componente familiar e outros 10% sejam hereditários (LYNCH et al. 2006). As principais síndromes

hereditárias de predisposição relacionadas ao CCR são a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e a Síndrome de Lynch (SL) também chamada de Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC – *Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer*) (CHURCH e FAZIO 2005; DOUGLAS e BURN 2005; ROSSI et al. 2005). A FAP é responsável por cerca de 1% e a SL por 2% a 6% dos casos de CCR (MÜLLER et al. 2001; JONG et al. 2004; BOLAND 2005).

1.2 SÍNDROME DE LYNCH

A Síndrome de Lynch é uma doença hereditária autossômica dominante de alta penetrância, responsável por 2% a 6% dos casos de CCR (MÜLLER et al. 2001; JONG et al. 2004; BOLAND 2005). Esta síndrome é caracterizada pelo aparecimento precoce de tumores malignos, predileção ao cólon direito, múltiplos cânceres colorretais, carcinogênese acelerada, ausência de polipose e pela ocorrência de tumores extra-colônicos. O risco cumulativo de desenvolvimento de CCR nos Estados Unidos é de aproximadamente 6% (HENDRIKS et al. 2006). Os pacientes com SL possuem 60% a 80% de risco de desenvolver CCR durante a vida (GOECKE et al. 2006). A idade média do diagnóstico do CCR sintomático é de 46 anos nos portadores da síndrome. Além do CCR, os cânceres de endométrio, intestino delgado, estômago, pelve renal e ureter, ovários, pâncreas, cérebro e tumores sebáceos também estão associados à síndrome. Na SL a progressão de um adenoma para carcinoma pode levar menos de três anos comparada com 10 a 15 anos nos casos esporádicos. Microscopicamente, os tumores colorretais são caracterizados por padrão de crescimento cribriforme sólido, infiltração linfocitária, reação linfocítica

peritumoral tipo doença de Crohn (*Crohn-like*), componente mucinoso exuberante, pobre diferenciação e presença de células em anel de sinete. Vários estudos demonstram que pacientes portadores de CCR e SL apresentam maior sobrevida que os casos esporádicos de mesmo estágio clínico (VASEN 2005). A síndrome é causada por mutação germinativa em um dos genes responsáveis pelo sistema de reparo do DNA (LYNCH e SMYRK 1996): *hMSH2* (human mutS homolog 2), no cromossomo 2p16 (FISHEL et al. 1993; LEACH et al. 1993); *hMLH1* (human mutL homolog 1), no 3p21 (BRONNER et al. 1994; PAPADOPOULOS et al. 1994); *hPMS1* (human postmeiotic segregation 1), no 2q31-33 (NICOLAIDES et al. 1994); *hPMS2* (human postmeiotic segregation 2), no 7p22 (NICOLAIDES et al. 1994); *hMSH6/GTBP* (human mutS homolog 6), no 2p16, a 0,5 megabase do *hMSH2* (DRUMMOND et al. 1994; PALOMBO et al. 1995). Mais recentemente, relatos de novos genes de reparo envolvidos têm sido descritos como o *hMLH3* e o *hMSH3*, entretanto a relevância biológica de mutações nestes genes ainda não foi esclarecida. (JIRICNY e NYSTRÖM-LAHTI 2000; LIPKIN et al. 2000; LYNCH et al. 2005).

O primeiro relato na literatura de uma família com características clínicas da SL data do início do século XX, quando Aldred Warthin, um patologista da Universidade de Michigan, descreveu a família G. Esta família possuía uma linhagem clássica de vários casos de câncer, sendo que a maioria deles se localizava no cólon, estômago ou útero. Em 1966 Henry Lynch descreveu as famílias N e M (devido a sua procedência de Nebraska e Michigan), com linhagens de câncer semelhantes à família G. James French, médico sucessor de Warthin na Universidade de Michigan, reconheceu a similaridade entre as famílias N, M e G e entregou a Lynch todos os documentos de Warthin sobre a patologia, a clínica e a genealogia da

Família G. Lynch, em colaboração com Ann Krush, uma assistente social da área médica, reuniu mais de 600 descendentes da família G e catalogou a inequívoca herança autossômica dominante, presente por mais de seis gerações desta família (BOLAND 2005; LYNCH et al. 2005).

No final dos anos 70, famílias como as descritas por Lynch eram denominadas “fraternidades cancerosas” ou portadoras de “câncer colônico hereditário sítio-específico” ou “síndrome do câncer familiar”. Em 1984, o termo Síndrome de Lynch foi proposto, em homenagem à pessoa que, com seus estudos, preencheu o enorme intervalo entre a primeira descrição da síndrome em 1913 e a descoberta dos genes responsáveis por ela em 1993. O termo Síndrome de Lynch I descreveria famílias portadoras apenas de CCR, e Síndrome de Lynch II descreveria famílias com CCR e tumores extra-colônicos. Em 1985, Lynch introduziu o termo HNPCC – Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) para distinguir esta síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar – FAP, porém focalizou apenas o câncer colorretal. Atualmente, é consenso que HNPCC, apesar de ser o nome mais usado, não é o termo ideal, pois a predisposição ao câncer não é confinada ao cólon. Além disto, não é mais necessário referenciar negativamente a FAP, já que esta e a SL possuem fenótipos clínico, patológico e molecular distintos e bem definidos atualmente. Desta forma, na conferência internacional (*International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* – ICG/HNPCC) organizada pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute* – NCI) em Bethesda em 2002, foi proposto que o termo Síndrome de Lynch seria o mais apropriado para designar a forma específica de predisposição hereditária ao câncer causada por mutação

germinativa em um dos genes do sistema de reparo do DNA. (UMAR et al. 2004; BOLAND 2005; JASS 2006). Mais recentemente, alguns autores sugerem que o termo “Síndrome de Lynch” seja aplicado apenas àqueles pacientes com deficiência do mecanismo de reparo do DNA documentada; e o termo “HNPCC clínico” deva ser atribuído a famílias com agregação de câncer, consistente com os critérios de Amsterdam, nas quais não se identifique mutações germinativas ou deficiência no mecanismo de reparo do DNA (PONZ DE LEON et al. 2007). LINDOR et al. (2005) demonstraram que os pacientes que preenchem os critérios de Amsterdam, mas não exibem mutação nos genes de reparo, apresentam um padrão de incidência de câncer diferente daqueles que possuem a mutação: o câncer colorretal aparece em idade mais avançada e a ocorrência de um segundo tumor primário e o risco de tumores extracolônicos são menores. Para estes pacientes os autores sugerem que seja usado o termo “câncer colorretal familiar tipo X” até que a etiologia seja esclarecida.

Em 1991, antes da descoberta da deficiência dos genes de reparo como causa da SL, o ICG-HNPCC publicou os chamados Critérios de Amsterdam I, com a intenção de promover uma padronização internacional no diagnóstico clínico da síndrome (VASEN et al. 1991) (Quadro 1).

Quadro 1 - Critérios de Amsterdam I.

- Pelo menos três membros de uma mesma família com CCR;
- Um dos membros parente em primeiro grau dos outros 2;
- Pelo menos duas gerações acometidas;
- Pelo menos um dos membros com CCR e idade menor que 50 anos;
- Exclusão de polipose adenomatosa familiar (FAP).

Os Critérios de Amsterdam I tiveram aceitação internacional e foram de extrema valia para a padronização do diagnóstico clínico da SL, porém foram criticados por serem muito restritivos e não considerarem os tumores extra-colônicos. Em 1999, o mesmo ICG-HNPCC reconheceu a importância dos tumores extra-colônicos nesta síndrome e revisaram os critérios anteriormente estabelecidos, criando os Critérios de Amsterdam II (VASEN et al. 1999) (Quadro 2).

Quadro 2 - Critérios de Amsterdam II.

- Pelo menos três membros de uma mesma família com CCR ou tumor extra-colônico: câncer de endométrio, intestino delgado, pelve renal ou ureter.
- Um dos membros parente em primeiro grau dos outros 2;
- Pelo menos duas gerações acometidas;
- Pelo menos um dos membros com CCR e idade menor que 50 anos;
- Exclusão de polipose adenomatosa familiar (FAP);

O espectro de diagnóstico da Síndrome de Lynch foi ampliado com os novos Critérios de Amsterdam II, entretanto, permaneceram críticas, principalmente devido à dificuldade de diagnóstico clínico em famílias pequenas. O uso dos Critérios de Amsterdam alcançou o seu propósito original, mais específico do que sensível, de selecionar as famílias portadoras de SL para estudos multicêntricos, promovendo uniformidade na literatura, antes da era da biologia molecular. Entretanto, muitas famílias portadoras de mutações nos genes de reparo seriam excluídas se estes critérios fossem utilizados como diagnóstico de SL.

O espectro de mutações nos genes do sistema de reparo do DNA que podem causar a SL é amplo e heterogêneo. Desta forma, o rastreamento das mutações é demorado e caro. Estas dificuldades tornam necessária uma pré-seleção de pacientes

de alto risco para os testes genéticos. Visando aprimorar o rastreamento de pacientes com SL, em 1996, foram propostas algumas recomendações pelo ICG-HNPCC, conhecidas como Critérios de Bethesda. Estes critérios têm o intuito de identificar indivíduos cujos tumores deveriam ser submetidos ao teste de instabilidade de microssatélites (MSI – Microsatellite Instability), seguido de análise de mutações naqueles com alta instabilidade de microssatélites (MSI-high ou MSI-H) (BOLAND et al. 1998) (Quadro 3).

Quadro 3 - Critérios de Bethesda.

- Indivíduos com câncer que preenchem os Critérios de Amsterdam;
- Indivíduos com dois tumores relacionados à síndrome, incluindo CCR sincrônico e metacrônico ou associado a tumores extracolônicos;
- Indivíduos, e um parente de primeiro grau, com CCR e/ou tumor extracolônico relacionado à síndrome e/ou adenoma colorretal; um dos tumores diagnosticados antes dos 45 anos, e o adenoma diagnosticado antes dos 40 anos;
- Indivíduos com CCR ou câncer endometrial diagnosticado antes de 45 anos;
- Indivíduos com CCRs no cólon direito com padrão histológico indiferenciado (sólido/cribiforme) antes dos 45 anos;
- Indivíduos com CCR com células em anel de sinete diagnosticado antes dos 45 anos;
- Indivíduos com adenomas diagnosticados antes dos 40 anos.

Posteriormente em 2004, os Critérios de Bethesda foram revisados, conforme Quadro 4 (UMAR et al. 2004).

Quadro 4 - Critérios de Bethesda Revisados.

- CCR diagnosticado em paciente com menos de 50 anos;
- Presença de CCR sincrônico ou metacrônico ou outro tumor extracolônico associado à síndrome, independente da idade;
- CCR com histologia MSI-H* diagnosticado em paciente com menos de 60 anos;
- Indivíduo com CCR e um ou mais parentes de primeiro grau com tumor relacionado à síndrome, com um dos tumores tendo sido diagnosticado antes dos 50 anos;
- Indivíduo com CCR e dois ou mais parentes de primeiro ou segundo grau com tumores relacionados à síndrome, independente da idade.

* A histologia MSI-H representa a presença de linfócitos infiltrando o tumor, reação linfocítica Crohn-like, diferenciação mucinosa ou em anel de sinete ou padrão de crescimento medular.

Estudos demonstram que a presença de mutação (valor preditivo positivo) em pacientes que preenchem os critérios de Amsterdam é cerca de 50%, e naqueles que preenchem os critérios de Bethesda é em torno de 10 a 20% (WIJNEN et al. 1998). A sensibilidade dos critérios de Amsterdam para a detecção de mutação é de 40%, e dos critérios de Bethesda aproximadamente 90% (VASEN et al. 2007). Isto significa que, mesmo usando os critérios menos restritivos, ainda assim, cerca de 10% dos portadores de mutação não seriam diagnosticados. Entretanto, devido ao alto custo de se realizar MSI em todos os casos de CCR, os critérios de Bethesda se tornam uma ferramenta apropriada na seleção de indivíduos para os testes genéticos. Por outro lado, a MSI nem sempre reflete uma mutação germinativa em um gene de reparo. Aproximadamente 15% dos casos de CCR esporádico apresentam MSI devido ao silenciamento adquirido de *MLH1*, como discutiremos mais adiante.

Os genes de reparo envolvidos na SL são: *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* e *MSH6*. Já foram descritas mais de 500 mutações germinativas patogênicas diferentes nestes genes: 50% relacionadas ao *MLH1*, 40% ao *MSH2* e 10% distribuídas entre os outros genes de reparo (DA SILVA et al. 2009).

O sistema de reparo do DNA consiste em várias proteínas nucleares que agem em conjunto na detecção e no reparo de erros de pareamento das seqüências de DNA que ocorrem durante sua replicação, na fase S do ciclo celular, em razão do deslizamento da DNA-polimerase. Uma mutação que inativa algum desses genes leva a um acúmulo de mutações em uma variedade de outros genes na célula, a cada divisão celular, resultando na transformação maligna (BLANES e DIAZ-CANO 2006). As proteínas de reparo formam complexos de heterodímeros. O complexo MutS é responsável pelo reconhecimento do erro de pareamento e pelo recrutamento do complexo MutL para o local de ocorrência do erro, iniciando assim a cascata de reparo. O heterodímero MutS α é formado pelo complexo MSH2-MSH6, o MutS β por MSH2-MSH3, o MutL α por MLH1-PMS2, o MutL β por MLH1-PMS1 e o MutL γ MLH1-MLH3. MutL α é o mais ativo destes complexos e é responsável pelo reparo iniciado pelo complexo MutS (DA SILVA et al. 2009).

Para que ocorra o câncer na SL deve ocorrer a inativação bialélica em um dos genes de reparo, conforme a teoria dos dois eventos (*two-hit theory*) proposta por KNUDSON em 1971, para o retinoblastoma. Segundo esta teoria, na forma hereditária do câncer, a mutação em um dos alelos está presente no DNA germinativo, e é herdada desta forma, criando um estado de predisposição, mas não o câncer em si. Um segundo evento de inativação adquirida do alelo selvagem remanescente ainda é necessário para produzir o fenótipo do câncer. Em contrapartida, nas formas esporádicas de câncer, os dois eventos, que inativam os dois alelos, devem ser adquiridos somaticamente. Isto explica a ocorrência precoce e múltipla de câncer na SL, assim como em outras síndromes hereditárias de predisposição ao câncer (LYNCH et al. 2005). Na SL a inativação do alelo selvagem

remanescente pode ocorrer através de perda de heterozigose (LOH), mutação somática ou metilação do promotor, sendo o primeiro mecanismo o mais frequente (IMAI e YAMAMOTO 2008).

1.3 IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS DE REPARO DO DNA

A imunoistoquímica é utilizada para detectar a presença de antígeno nos cortes histológicos de tecidos pelo uso de anticorpo específico para aquele antígeno, ligado a uma enzima. A enzima converte um substrato incolor em uma substância insolúvel colorida que se precipita no sítio do corte do tecido onde está o anticorpo e também, o antígeno, observado posteriormente por microscopia de luz convencional (OLIVEIRA 2008). Esta técnica está disponível como parte do arsenal rotineiro em laboratórios de patologia.

A grande maioria das mutações nos genes de reparo resulta em expressão imunoistoquímica anormal de suas respectivas proteínas (KIRK 2006; BOLAND 2005). Através da imunoistoquímica, a presença ou ausência das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 pode ser visualizada usando-se anticorpos específicos. Portanto, uma ferramenta diagnóstica importante nos pacientes suspeitos para a SL é a análise da expressão imunoistoquímica dessas proteínas, o que tem se mostrado eficaz como exame de rastreamento para indicação do sequenciamento do respectivo gene (BAUDHUIN 2005; MÜLLER et al. 2001).

Devido ao fato das proteínas de reparo formarem complexos de heterodímeros, padrões distintos de imunoistoquímica podem ser observados. MSH2

dimeriza com MSH6, e MLH1 com PMS2. As proteínas MSH2 e MLH1 são as parceiras obrigatórias de seu respectivo heterodímero. A anormalidade nestas proteínas resulta em degradação proteolítica do dímero e consequentemente a perda da proteína obrigatória e da secundária. Entretanto, quando a alteração ocorre na proteína secundária (MSH6 e PMS2) não há perda concomitante da proteína obrigatória (MSH2 e MLH1). Isto ocorre porque a função das proteínas secundárias pode ser compensada por outras proteínas, como MSH3, MLH3 e PMS1 (SHIA 2008). Portanto, na presença de mutação germinativa de *MSH2* a ausência da respectiva proteína é usualmente vista em conjunto com a ausência de expressão de MSH6. Da mesma forma quando há mutação germinativa de *MLH1* a imunoistoquímica evidenciará perda de expressão de MLH1 e também de PMS2. Já os tumores com mutação de *PMS2* ou *MSH6* mostram perda de expressão isolada de suas respectivas proteínas na imunoistoquímica. Desta forma, os indivíduos podem ser selecionados para a análise de mutação no gene indicado pela imunoistoquímica. (BOLAND et al. 2008).

De acordo com HALVARSSON et al. (2006), a imunoistoquímica utilizando os anticorpos contra as proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 permite identificar deficiências no reparo do DNA com uma sensibilidade de 95%.

As proteínas do sistema de reparo atuam no núcleo das células reparando o DNA. Desta forma, a marcação apresentada pela técnica de imunoistoquímica utilizando anticorpos contra tais proteínas apresenta padrão de coloração nuclear. A ausência de coloração nuclear em uma célula tumoral é indicativo de deficiência no sistema de reparo do DNA. As células tumorais que apresentem coloração citoplasmática ao invés de nuclear devem ser consideradas como apresentando um

padrão anormal de coloração, de forma que o resultado deve ser interpretado como inconclusivo.

1.4 INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES

Microssatélites são sequências curtas e repetitivas de DNA, com uma a seis bases, distribuídas por todo o genoma humano. Quando o tecido tumoral de pacientes portadores de SL é analisado encontra-se instabilidade destes microssatélites, o que caracteriza esses tumores como positivos para erros de replicação, ou fenótipo de erro de replicação (RER) (DUNLOP et al. 1997). A instabilidade de microssatélites (MSI) é causada por uma falência do mecanismo de reparo do DNA durante a replicação e é caracterizada por um acúmulo acelerado de mutações de nucleotídeos únicos e por alterações na extensão das sequências repetitivas por todo o genoma (BOLAND et al. 1998). A maioria dos erros que ocorre durante a replicação do DNA são imediatamente corrigidos pela atividade de exonuclease da DNA polimerase. Estima-se que 99,9% das mutações que escapam a esta correção (deslizamento da DNA polimerase) são reparadas pelo mecanismo de reparo do DNA. As sequências repetitivas são mais propensas aos erros de replicação que as não repetitivas (ZHANG 2008). Desta forma os tumores provenientes da deficiência no mecanismo de reparo do DNA possuem uma “assinatura genética”: a instabilidade de microssatélites.

A MSI pode ser analisada comparando-se o padrão eletroforético do DNA do tumor com o padrão do DNA do tecido normal, amplificados por PCR (OLIVEIRA 2008). O procedimento padrão para a análise de instabilidade de microssatélites

recomendado pelo NCI – ICG/HNPCC – é o estudo de tecido tumoral e de tecido normal usando-se um painel de referência de cinco marcadores. Este painel inclui dois mononucleotídeos (BAT25 e BAT26) e três dinucleotídeos (D2S123, D5S346 e D17S250). O número de marcadores que exibe instabilidade define três grupos diferentes de tumores: aqueles com dois ou mais (≥ 30 -40%) marcadores instáveis são considerados como MSI-H (alta instabilidade de microsatélites), aqueles com apenas um (<30-40%) marcador instável são considerados MSI-L (baixa instabilidade de microsatélites) e aqueles sem marcadores instáveis são considerados MSS (microsatélites estáveis) (UMAR et al. 2004). A probabilidade de se detectar uma mutação germinativa em *MSH2* ou *MLH1* em pacientes de alto risco, com tumor MSI-H é maior que 60% (TERDIMAN et al. 2001). O fenótipo MSI-H requer a inativação bialélica (teoria dos dois eventos de Knudson) do gene de reparo responsável pelo desenvolvimento do tumor.

As recomendações propostas pelo ICG-HNPCC para o processo de avaliação molecular de pacientes de alto risco para a SL estão descritas a seguir na Quadro 5 (UMAR et al 2004).

Quadro 5 - Recomendações para o processo de avaliação molecular de pacientes de alto risco, baseado nos Critérios de Bethesda.

1- A melhor alternativa para a avaliação é a instabilidade de microssatélites (MSI) ou a análise imunoistoquímica (IHQ) de tumores, seguido de testes* dos genes <i>MSH2/MLH1</i> em pacientes com tumores MSI-H ou tumores com perda da expressão de um dos genes de reparo**.
2- Após identificação da mutação, parentes sob risco devem ser encaminhados para aconselhamento genético e testes genéticos se quiserem.
3- Como alternativa, se não houver tecido disponível para testes, pode-se analisar diretamente os genes <i>MSH2</i> e <i>MLH1</i> .
4- Se não for encontrada mutação em um dos genes de reparo em um probando com tumor MSI-H e/ou diagnóstico clínico de HNPCC, o resultado do teste genético será não-informativo. Os pacientes e os indivíduos sob risco (familiares) devem ser aconselhados como se HNPCC fosse confirmada e a vigilância de alto risco deve ser realizada.
5- É necessário garantir confidencialidade aos pacientes para amenizar o medo relacionado à discriminação baseada no <i>status</i> genético.

* As técnicas padronizadas de detecção de mutação incluem *single-strand conformational polymorphism*, *denaturing gradient gel-electrophoresis analysis* e seqüenciamento de DNA. Técnicas alternativas de detecção de mutação incluem *monoallelic expression analysis*, *Southern analysis*, e cadeia de reação de polimerase quantitativa; estes métodos podem detectar certas mutações como grandes rearranjos genômicos que podem não ser diagnosticados pelos métodos mais convencionais.

** Para famílias com forte suspeita de HNPCC, testes genéticos germinativos devem ser considerados mesmo se MSI-L, MSS, ou expressão imunoistoquímica normal. A probabilidade de se encontrar mutação germinativa em *MSH2* e *MLH1* em pacientes cujos tumores não são MSI-H é supostamente baixa; entretanto, esta probabilidade ainda não foi extensamente estudada.

1.5 METILAÇÃO DE *MLH1* E MUTAÇÃO EM *BRAF*

A maioria dos CCRs com MSI não fazem parte da SL. Um mecanismo mais freqüente de perda da atividade do sistema de reparo do DNA é a inativação de *MLH1* por metilação de seu promotor, o que acontece em cerca de 15% dos casos de CCR esporádicos (BOLAND et al. 2008).

A metilação da região promotora de um gene resulta em seu silenciamento, um processo que normalmente acompanha o envelhecimento. Trata-se de um evento epigenético (afeta a função do gene sem alterar a sequência de DNA), potencialmente reversível, onde a região promotora dos genes alvos sofrem

metilação nas citosinas das ilhas CpGs, o que impede o reconhecimento dos fatores de transcrição, culminando com seu silenciamento. Cerca de metade dos promotores de genes humanos contém ilhas CpGs e são susceptíveis ao silenciamento induzido por metilação, mas certos genes são mais frequentemente afetados que outros. O fenótipo metilador das ilhas CpGs (CIMP) no CCR é caracterizado pela metilação de múltiplas ilhas CpGs principalmente em genes supressores de tumor, como o *MLH1* (BOLAND et al. 2009).

Recentemente mutações somáticas no oncogene *BRAF* têm sido usadas para distinguir entre tumores associados à SL e tumores esporádicos que exibem instabilidade de microssatélites. Aproximadamente 10% dos cânceres colorretais esporádicos possuem mutações em *BRAF*, sendo que a mutação é quase sempre a V600E. Tal mutação é freqüentemente associada à metilação do promotor do gene *MLH1*, e quase nunca encontrada em tumores da SL (ROBINSON et al. 2007).

BOLAND et al. (2009) analisaram 15 CCRs esporádicos com MSI e metilação de *MLH1*, e 21 CCRs de pacientes portadores de SL. Os autores encontraram mutações somente em *BRAF* (e nunca em *KRAS*) em CCRs esporádicos com MSI, e somente em *KRAS* (e nunca em *BRAF*) em CCRs da SL (BOLAND et al. 2009).

DENG et al. (2004) demonstraram que mutação no gene *BRAF* (V600E) não estava presente em 4/4 linhagens celulares com mutação de *MLH1* ou em 20/20 tumores da SL com MSI-H. Em outros estudos a mutação do gene *BRAF* estava ausente em 18/18 tumores da SL (KAMBARA et al. 2004), em 37/37 tumores da SL (DOMINGO et al. 2005), em 111/111 tumores da SL e em 45/45 casos com ausência de expressão imunoistoquímica de MSH2 (DOMINGO et al. 2004). Baseado nestes

estudos, conclui-se que a presença de mutação no gene *BRAF* exclui a presença de mutações germinativas nos genes de reparo do DNA em tumores colorretais com uma especificidade de 100%. Tumores que apresentam mutação no gene *BRAF* e metilação do promotor do gene *MLH1* são quase certamente esporádicos.

Assim, a análise de mutação no gene *BRAF* no tecido tumoral é uma estratégia efetiva e de baixo custo para distinguir entre o evento somático da hipermetilação e uma possível mutação germinativa no gene *MLH1*. Se a mutação específica V600E for encontrada no gene *BRAF*, no DNA tumoral, a análise de mutação no gene *MLH1* não será indicada (HENDRIKS et al. 2006). No estudo de ROBINSON et al. (2007), a presença da mutação V600E excluiu o diagnóstico da SL em cinco famílias de sete que não preenchiam os critérios de Amsterdam e que mostraram ausência de expressão de *MLH1*.

1.6 MUTAÇÃO NO GENE *KRAS*

As proteínas RAS são moléculas que regulam as células por ativação de receptores de vias que controlam diversas respostas celulares, incluindo proliferação, diferenciação e sobrevivência. Os genes *RAS* são os alvos mais comuns para mutações somáticas com ganho de função nos cânceres humanos. Muitos destes alelos mutantes codificam proteínas com propriedades funcionais e bioquímicas aberrantes, que resultam em respostas celulares anormais. As proteínas RAS são pequenas GTPases que ciclam entre a inativação com GDP (RAS-GDP) e a ativação com GTP (RAS-GTP). A RAS-GTP regula uma complexa rede de sinalização que modula o comportamento celular por se ligar ou ativar distintas classes de moléculas

efetoras. A cascata RAF-MEK-ERK é a via alvo de RAS melhor caracterizada (SCHUBBERT et al. 2007).

De acordo com SCHUBBERT et al. (2007), mutações em *RAS* ocorrem em aproximadamente 30% dos cânceres humanos, e OLIVEIRA et al. (2004) demonstraram que mutações em *KRAS* são identificadas em 33% de todos os CCRs. Mutações ativadoras do gene *KRAS* representam o tipo mais comum de anormalidade de um oncogene dominante em câncer humano, com especificidade e tipo de mutação variando de acordo com o tipo de tumor (BOS 1989). A mutação do gene *KRAS* está dentre as alterações críticas que promovem a tumorigênese colorretal e ocorre precocemente na progressão de adenoma para carcinoma (FEARON e VOGELSTEIN 1990).

Um estudo demonstrou padrões distintos de mutação do gene *KRAS* em CCRs de acordo com a deficiência germinativa de reparo do DNA e do *status* de metilação do gene *MLH1*. A mutação do gene *KRAS* foi observada em 40% dos tumores da SL e a frequência da mutação variou de acordo com o gene de reparo afetado: 32% em *MLH1*, 48% em *MSH2*, e 83% em *MSH6*. A frequência de mutação no gene *KRAS* é semelhante entre tumores da SL e tumores esporádicos com microssatélites estáveis (MSS). Entretanto, os casos de CCRs esporádicos com MSI-H e hipermetilação do promotor do gene *MLH1*, assim como suas lesões precursoras, apresentam uma frequência muito baixa de mutação do gene *KRAS*. A maioria destas lesões apresenta mutação no gene *BRAF*, enquanto que esta mutação não ocorre nos tumores da SL (OLIVEIRA et al. 2004).

As mutações pontuais no gene *KRAS* se localizam no domínio de ligação da guanosina trifosfato (GTP) (códon 12 e 13) ou no domínio GTPase (códon 61) e

levam a substituições específicas de aminoácidos que ativam permanentemente a proteína RAS p21. Os códons 12 e 13 são preferencialmente afetados, como demonstrado por OLIVEIRA e et al. (2004) em uma série de 335 casos de CCRs com mutação do gene *KRAS*. Nesta série, 98% das mutações se localizavam nos códons 12 e 13. Também foi observado que as mutações do códon 12 são mais comuns em casos esporádicos enquanto as mutações do códon 13 predominam na SL (OLIVEIRA et al. 2004).

1.7 COX-2, β -CATENINA E CCR

A família das enzimas das ciclooxigenases (COX) consiste em duas isoformas, a ciclooxigenase-1 (COX-1), que é expressa constitutivamente e possui funções *housekeeping*, e a ciclooxigenase-2 (COX-2), uma isoforma induzível que participa de respostas inflamatórias. A COX-2 não é detectada na maioria dos tecidos normais, mas é rapidamente induzida em resposta a mitógenos, citocinas e promotores tumorais, levando a um acúmulo crescente de prostanóides nos tecidos inflamados e neoplásicos (EISINGER et al. 2007).

A COX-2 catalisa a conversão do ácido aracdônico em prostaglandina, envolvida em numerosas funções fisiológicas, mas também com papel importante na tumorigênese. Dados genéticos e farmacológicos suportam a noção de que a COX-2 é regulada negativamente pela proteína APC (polipose adenomatosa colônica) e que a perda de função da APC, com subsequente desregulação da expressão de COX-2, promova a tumorigênese, incluindo proliferação celular, motilidade, sobrevivência imune e apoptose (EISINGER et al. 2007).

A COX-2 é expressa em níveis muito baixos na mucosa normal. Entretanto, apresenta-se elevada em 50% dos pólipos benignos e em 80% a 85% dos adenocarcinomas (KARNES 2000).

KARNES (2000) demonstrou que o nível de expressão protéica de COX-2 é significativamente mais baixo em tumores com MSI do que naqueles MSS. Os autores sugerem que os tumores com deficiência do mecanismo de reparo do DNA se desenvolvem independentemente da expressão de COX-2. Este fato pode ter implicações relacionadas à eficácia de inibidores de COX-2 na prevenção do câncer colorretal em pacientes com deficiência no mecanismo de reparo do DNA.

Um estudo demonstrou que a frequência e a intensidade de expressão de COX-2 é significativamente menor em tumores da SL em comparação com os esporádicos. Neste estudo COX-2 foi detectada por imunoistoquímica em 67% dos CCR de pacientes com SL e em 92% dos casos esporádicos (SINICROPE et al. 1999).

KAWASAKI et al. (2008) demonstraram que a hiperexpressão de COX-2 é infrequente em pólipos hiperplásicos (4,2% de expressão intensa à imunoistoquímica), adenomas sésseis serreados (SSA) e pólipos mistos (SSA e adenoma) (0% de expressão intensa), quando comparados com adenomas não serreados (28% de expressão intensa). Os adenomas serreados tradicionais e os adenomas não serreados apresentaram frequência semelhante de hiperexpressão de COX-2. À medida que houve progressão do grau de displasia das lesões, houve um aumento da frequência de hiperexpressão de COX-2, demonstrando a correlação positiva entre expressão de COX-2 e grau de displasia em adenomas. A

frequência de hiperexpressão de COX- 2 foi semelhante entre adenocarcinomas serreados e não serreados (65% de expressão intensa).

O uso regular de aspirina, inibidora da COX-2, diminui o risco de CCR e adenoma. Evidências epidemiológicas demonstram que aspirina previne CCR através da inibição de COX-2. O celecoxib, inibidor seletivo da COX-2, inibe o crescimento de células de câncer colorretal *in vitro*. Estudos randomizados demonstraram que celecoxib diminui o risco de adenomas recorrentes em pacientes de alto risco (KAWASAKI et al. 2008).

Na ausência da sinalização Wnt, os níveis intracelulares de β -catenina são regulados por um complexo multiprotéico que compreende quinases como a GSK3 β (glicogênio sintase quinase-3 β) e CK1 (caseína quinase 1) e proteínas como APC, Axina1 e Axina2. Este complexo de destruição se liga e fosforila a β -catenina em resíduos de serina e treonina, levando a sua ubiquitinação e degradação proteolítica.

Na maioria dos casos esporádicos de CCR, o evento iniciador é representado pela ativação da via de sinalização Wnt. Quando a via Wnt está ativa, há uma inibição do complexo de destruição da β -catenina, e esta não é fosforilada e então não é direcionada a degradação no proteossoma. Assim, a β -catenina se estabiliza, se acumula no citoplasma e se transloca ao núcleo onde interage com os fatores de transcrição TCF e LEF, levando a expressão de genes alvo e induzindo o programa de proliferação celular. (EISINGER et al. 2007; FODDE e BRABLETZ 2007).

Na maioria dos casos de CCR esporádicos e na FAP, mutações inativadoras do gene *APC* iniciam a formação do tumor. A perda da função de APC leva a estabilização citoplasmática de β -catenina e sua translocação para o núcleo. Em casos de CCRs sem mutação de *APC*, ocorre mutação de β -catenina que a torna

resistente a degradação proteolítica. Em ambos os casos ocorre a desregulação na transcrição de um amplo espectro de genes alvo. Esta alteração no padrão de expressão gênica induz a proliferação e diferenciação das células epiteliais intestinais, levando a uma desorganização da arquitetura do tecido e formação de tumores benignos (FODDE e BRABLETZ 2007).

1.8 GENE *TP53* E CCR

O gene *TP53*, conhecido como o “Guardião do Genoma”, está localizado no braço curto do cromossomo 17 (BEGGS e HODGSON 2008). A proteína p53 é um fator de transcrição que regula o ciclo celular ligando-se ao DNA. Participa das vias que governam a divisão celular e o balanço entre sobrevivência e morte celular. No nível celular, perdas, deleções e mutações no gene *TP53* possuem um papel crucial na patogênese de vários tumores, incluindo câncer colorretal. Não existe dúvida sobre o papel das mutações no gene *TP53* na progressão dos tumores colorretais. A proteína p53 é importante na manutenção da integridade do material genético. Danos ao DNA resultam em parada do ciclo celular na fase G1 por p53, seguida de reparo, e caso o dano seja muito grande, a proteína p53 induz a célula a apoptose. Dessa maneira, a perda de função de p53, por mutações ou deleções, permite que a célula acumule mutações pelo genoma, o que resulta em instabilidade cariotípica, prejudica a interrupção do ciclo celular, e reduz a apoptose. Mutações pontuais no gene *TP53* ocorrem em mais de 75% dos CCR e geralmente estão associadas à perda de heterozigose daquele locus, implicando em perda do alelo selvagem e retenção do alelo mutante. A proteína p53 selvagem possui uma meia vida intracelular curta de apenas 15 minutos, enquanto a p53 mutante possui uma meia vida mais longa de

várias horas. Isto resulta em um aumento na quantidade de proteína intracelular suficiente para ela ser detectada por métodos imunoistoquímicos. As formas mutantes de p53 também podem se ligar à proteína selvagem estabilizando-a e inativando sua função supressora de tumor por alterar sua conformação (KAKLAMANIS et al. 1993). Desta forma, altos níveis celulares da proteína p53 podem ser interpretados como evidência indireta de mutação no respectivo gene.

Estudos demonstram a superexpressão de p53 em aproximadamente 60% dos casos de câncer colorretal (GEORGESCU et al. 2007), enquanto que em adenomas esta porcentagem é bem menor (8 a 26%) (PURDIE et al. 1991; KAKLAMANIS et al. 1993). Estudos sugerem que a inativação funcional de p53 seja um dos fatores necessários para a transição adenoma-carcinoma no cólon (LESLIE et al. 2002).

1.9 SEGUIMENTO NA SL

Os portadores da SL possuem risco aumentado de desenvolver CCR (60 a 70% aos 70 anos), carcinoma endometrial (30% a 40% aos 70 anos) e, com menores riscos, carcinomas de intestino delgado, de células transicionais do trato urinário superior, câncer de ovário, câncer de estômago, tumores cerebrais (Síndrome de Turcot), e tumores de glândulas sebáceas (Síndrome de Muir-Torre) (HENDRIKS et al. 2006). A maioria dos estudos demonstra que a média de idade do diagnóstico do primeiro câncer nestes pacientes é em torno dos 45 anos, sendo que na população geral a média de idade do diagnóstico do câncer colorretal é de 64 anos. Dois terços dos tumores colorretais nos pacientes com SL são localizados no cólon proximal. A ocorrência de um segundo tumor primário é comum na SL: em cerca de 40% dos pacientes, após sete anos do diagnóstico do primeiro tumor (LINDOR et al. 2006).

Apropriados testes pré-sintomáticos podem ser oferecidos para reduzir a mortalidade entre os membros das famílias de risco. A identificação de uma mutação germinativa em um dos genes de reparo do DNA, além de confirmar o diagnóstico de SL em um indivíduo, identifica também os familiares portadores da mutação e que necessitam seguimento intensivo. É essencial identificar indivíduos com risco aumentado para oferecer programas de seguimento adequados e prevenir o desenvolvimento de tumores ou reconhecê-los em estágio precoce. Outro grande benefício do teste genético é o de excluir aqueles familiares não portadores da mutação. A exclusão de mutação evita um seguimento intensivo desnecessário nestes indivíduos, reduzindo custos e *stress* psicológico (LYNCH et al. 2007; HENDRIKS et al. 2006).

O seguimento de famílias com diagnóstico clínico e/ou molecular de SL deve ser feito com base nas seguintes orientações (LYNCH e SMYRK 1996): colonoscopia com 1-2 anos de intervalo e início entre os 20-25 anos; ultrassonografia transvaginal anual, com início entre os 25-35 anos; ultrassonografia abdominal e pélvica anual, com início entre os 25-35 anos; exame de urina tipo I e citologia urinária anual, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais; endoscopia digestiva alta com 1-3 anos de intervalo, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com tumores gástricos; dosagem de CA-125 anual, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com câncer de ovário (ROSSI et al. 1998).

Para pacientes com SL que irão se submeter à ressecção cirurgia de um câncer colorretal, a colectomia subtotal (em oposição à colectomia parcial) é um alternativa que deve ser considerada. Esta conduta se deve ao alto risco de

desenvolvimento de um segundo tumor colorretal primário nestes indivíduos. Entretanto, a preferência do paciente e fatores relacionados à aderência às colonoscopias de seguimento, devem ser levados em conta nesta decisão. Para as mulheres que irão se submeter à ressecção colônica, e que não desejam preservar a fertilidade, devido ao alto risco de desenvolvimento de câncer de endométrio e ao risco moderadamente aumentado de câncer de ovário, deve ser oferecido a histerectomia e ooforectomia bilateral profiláticas (LINDOR et al. 2006).

1.10 SEQUÊNCIA ADENOMA-CARCINOMA

A maioria dos casos de CCR parece seguir o modelo sequencial adenoma-carcinoma proposto por FEARON e VOGELSTEIN (1990). Estima-se que 10% dos pólipos adenomatosos sofram transformação maligna ao longo da vida, se não tratados (KIM e LANCE 1997). Entretanto, em pacientes portadores de SL, acredita-se que quase todos os pólipos não tratados evoluirão para adenocarcinomas (DUARTE-FRANCO e FRANCO 2005).

Existem descrições na literatura de pacientes que apresentam evolução rápida e agressiva de lesões mínimas para CCR, a partir de pólipos adenomatosos (JASS e STEWART 1992; LANSPA et al. 1994). Um estudo realizado na Finlândia comparou a incidência de CCR e as taxas de óbito, analisando dois grupos de pacientes com SL. O primeiro grupo foi submetido à colonoscopias regularmente, e o segundo grupo foi formado por pacientes que se recusavam a realizar o exame. Ficou demonstrado que um CCR foi prevenido para cada 2,8 pólipos ressecados em pacientes com SL (SANKILA et al. 1996). Na população geral, um CCR é prevenido para cada 41 a 119 polipectomias realizadas (WINAWER et al. 1993). A

carcinogênese acelerada é característica conhecida da SL, sendo que um adenoma mínimo pode se transformar em CCR em dois a três anos, enquanto na população geral esta transição leva entre oito e dez anos (LYNCH et al 2006). Daí a grande importância do diagnóstico de lesões precoces em indivíduos de alto risco, muitas vezes somente possível, através de colonoscopias com o recurso da magnificação de imagem e da cromoendoscopia (ABDEL-RAHMAN et al. 2006) ou do NBI.

1.11 VIAS DE CARCINOGENESE COLORRETAL

Supunha-se que a grande maioria dos CCRs fazia parte de um grupo homogêneo a nível molecular, caracterizado por uma seqüência linear e uniforme de eventos, com a inativação do gene *APC* iniciando os adenomas, e alterações genéticas adicionais, principalmente mutação no gene *KRAS* e inativação do gene *TP53* promovendo o surgimento de subclones celulares progressivamente mais agressivos. Entretanto, nos últimos 20 anos, os estudos têm demonstrado que o CCR desenvolve-se através de múltiplas vias de carcinogênese, e que apenas cerca de 10% dos casos são caracterizados por este genótipo clássico (JASS 2007).

Estas vias podem ser definidas com base em dois aspectos moleculares: (1) instabilidade de microssatélites do DNA (MSI), estratificada em instabilidade alta (MSI-H), baixa (MSI-L) e estável (MSS), e (2) fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP), estratificado em CIMP alta (CIMP-H), CIMP baixa (CIMP-L) e CIMP negativa (CIMP-neg). Segundo a classificação de JASS (2007), considerando-se aspectos clínicos, morfológicos e moleculares, cinco categorias são contempladas: (1) tipo 1 – origem em pólipos serrados, corresponde a 12% dos CCRs, conhecida como “MSI-H esporádico” (CIMP-H, metilação do gene *MLH1*, mutação no gene

BRAF, estabilidade cromossômica, MSI-H); (2) tipo 2 – origem em pólipos serrados, corresponde a 8% dos CCRs (CIMP-H, metilação parcial do gene *MLH1*, mutação no gene *BRAF*, estabilidade cromossômica, MSS ou MSI-L); (3) tipo 3 – origem em adenomas ou pólipos serrados, corresponde a 20% dos CCRs (CIMP-L, mutação no gene *KRAS*, metilação do gene *MGMT*, instabilidade cromossômica, MSS ou MSI-L); (4) tipo 4 – origem em adenomas, corresponde a 57% dos CCRs, pode ser esporádica, associada à FAP ou Polipose MUTYH (CIMP-neg, instabilidade cromossômica, maioria MSS); (5) tipo 5 – origem em adenomas, corresponde a 3%, relacionada à SL (CIMP-neg, mutação no gene *BRAF* negativa, estabilidade cromossômica, MSI-H). A abordagem desta classificação do CCR deve acelerar o entendimento de suas causas, com impacto no manejo clínico relacionado à prevenção e tratamento desta doença.

A aquisição de um fenótipo maligno completo depende da desorganização combinada de todas as principais vias de sinalização. Entretanto, os CCRs MSI-H familiares (SL) e esporádicos se originam de diferentes vias de carcinogênese. Existe, porém uma considerável sobreposição na expressão gênica alterada nos dois tipos, o que não contradiz o conceito de que as vias se diferem em um nível fundamental (JASS 2007).

1.12 LESÕES NÃO-POLIPÓIDES

É vastamente aceito que a maioria dos CCR desenvolve-se vagarosamente através de um crescimento polipóide. Entretanto estudos recentes revelam que lesões não-polipóides (planas ou deprimidas) compreendem mais de 30% de todas as lesões colorretais e que elas possuem um potencial de malignização significativamente mais

alto que as lesões polipóides (MINAMOTO et al. 1993). As lesões não-polipóides aparecem morfológicamente pouco elevadas, completamente planas, ou pouco deprimidas. Apesar de seu pequeno tamanho, elas apresentam displasia de alto grau em mais de 40% dos casos (HURLSTONE et al. 2003), mostrando um potencial maligno maior que o esperado em relação ao seu tamanho (MUTO et al. 1985).

Um grande estudo japonês avaliou 14.014 adenomas ou carcinomas precoces e encontrou uma proporção de 55,5% de lesões polipóides contra 44,5% de lesões não-polipóides. As lesões deprimidas correspondiam a 2,3% das neoplasias colorretais, mas eram responsáveis por 32,4% dos carcinomas diagnosticados. Além disso, 29,5% das lesões deprimidas tinham invasão da submucosa, contra 2,1% dos pólipos e 0,6% das lesões pouco elevadas superficialmente. Um trabalho americano estudou 1.000 pacientes que se submeteram a colonoscopia com cromoscopia para avaliar áreas suspeitas de CCR. De 290 adenomas, 63% eram polipóides, 36% planos e 0,6% deprimidos. Dos 31 adenomas com alto grau de displasia, 15 eram polipóides, 15 eram planos e um era deprimido. E dos seis cânceres invasivos iniciais, dois eram polipóides, dois eram planos e dois eram deprimidos. Assim, o risco de uma lesão deprimida conter um alto grau de displasia ou câncer invasivo é de 75% quando comparado com 14,3% e 8,3% nas lesões planas ou polipóides, respectivamente (SOETIKNO et al. 2006). O estudo da prevalência das lesões não-polipóides nos Estados Unidos feito com 211 pacientes encontrou tais lesões em 22,7% dos pacientes com a utilização da colonoscopia com cromoscopia e magnificação (SAITOH et al. 2001).

Estudos demonstram que pequenos carcinomas planos invadem mais facilmente a submucosa e estão associados a um risco aumentado de metástases

linfonodais e vasculares quando comparados a carcinomas com padrão polipóide de crescimento. Um estudo evidenciou invasão venosa e linfática em 32% de carcinomas polipóides comparado a 77% de invasão nos carcinomas não-polipóides. (SHIMODA et al. 1989).

Os indícios demonstram que as lesões planas podem representar uma entidade pré-maligna mais agressiva que as polipóides. As lesões deprimidas são responsáveis por CCR em proporções mais altas do que os outros tipos de lesões, além disso, são mais avançadas no momento do diagnóstico, apesar de menores. Certamente, estas lesões são responsáveis por grande parte da imperfeição da colonoscopia na prevenção do CCR. Desta forma, o aumento na detecção destas lesões é crucial para a melhora da efetividade dos programas de rastreamento colonoscópico de CCR.

1.13 COLONOSCOPIA

A colonoscopia é, atualmente, o mais importante recurso, útil não apenas para o diagnóstico, como também para o estadiamento e tratamento do CCR. Possui elevada sensibilidade e especificidade, além de permitir a execução de biópsias e remoção de lesões precursoras de CCR. A história natural do CCR é condizente com uma prevenção eficaz. Esta doença, na maioria dos casos, é proveniente de uma lesão pré-maligna, o adenoma, que pode ser detectado e ressecado através da colonoscopia, prevenindo sua progressão para o câncer. As estatísticas dos Estados Unidos da América demonstram um declínio acentuado na incidência de CCR entre 1998 e 2005, o que se deve, em grande parte, ao aumento do rastreamento por colonoscopia, com detecção e remoção das lesões pré-malignas (JEMAL et al. 2009).

Um estudo caso-controle com 252 pacientes, durante 15 anos, demonstrou que a colonoscopia a cada três anos reduz o risco de CCR e sua mortalidade em mais de 60% (STRATE e SYNGAL 2005). O prognóstico dos pacientes com CCR é estritamente dependente da detecção precoce de lesões, entretanto a colonoscopia convencional pode deixar de diagnosticar 20% a 30% dos pólipos entre 2 mm e 5 mm, e até 5% dos pólipos maiores ou iguais a 1 cm (OLIVEIRA 2005).

A colonoscopia com *Narrow Band Imaging* (NBI) e magnificação possui a habilidade de identificar lesões não-polipóides e diminutas que não seriam identificadas com a colonoscopia convencional. Além disto, o NBI tem sido usado para a distinção entre lesões neoplásicas e não-neoplásicas tornando possível a diminuição do número de ressecções desnecessárias enquanto permite a ressecção seletiva de lesões clinicamente significantes. Esta estratégia reduz o número de complicações associadas a ressecções e evita a sobrecarga dos serviços de histopatologia. O NBI torna possível a observação do padrão da arquitetura microvascular da mucosa colorretal. Isto permite evidenciar características de invasão das lesões neoplásicas, auxiliando no planejamento terapêutico, como por exemplo, optar pela ressecção endoscópica ou apenas pela biópsia e tatuagem da lesão para posterior intervenção cirúrgica.

1.14 COLONOSCOPIA COM NBI

A tecnologia do sistema NBI é baseada na modificação das características espectrais, através do estreitamento das bandas de transmitância espectral e do uso de dois filtros ópticos para iluminação azul e verde. Desenvolvida no *National Cancer Center Hospital East* - Japão, sua utilidade para o exame do trato gastrointestinal foi

descrita em 2001 por SANO et al. (2001). Em 2004, foi publicado o primeiro estudo piloto que demonstrou que o NBI permite melhor visualização do padrão vascular da mucosa colônica do que a colonoscopia convencional, e que o NBI e a cromoendoscopia foram similares na diferenciação entre lesões neoplásicas e não-neoplásicas (MACHIDA et al. 2004).

A profundidade de penetração da luz depende do comprimento de onda e da largura da banda. A diferença na profundidade de penetração entre filtros de banda estreita é maior do que entre filtros de banda larga. Na mucosa do trato gastrointestinal, a luz azul de banda estreita penetra superficialmente, a luz verde de banda estreita tem uma penetração intermediária e a luz vermelha de banda estreita penetra profundamente. A luz de onda curta (azul) está na faixa de pico de absorção da hemoglobina. Desta forma, o sistema NBI utiliza filtros ópticos para a iluminação azul e verde (ondas curtas) e estreita suas bandas de transmitância espectral. Estas características da luz permitem que a microvascularização da mucosa colônica, invisível à colonoscopia convencional, adquira coloração marrom escura, contrastando com a mucosa adjacente, o que possibilita sua visão detalhada (GONO et al. 2003). Figura 1

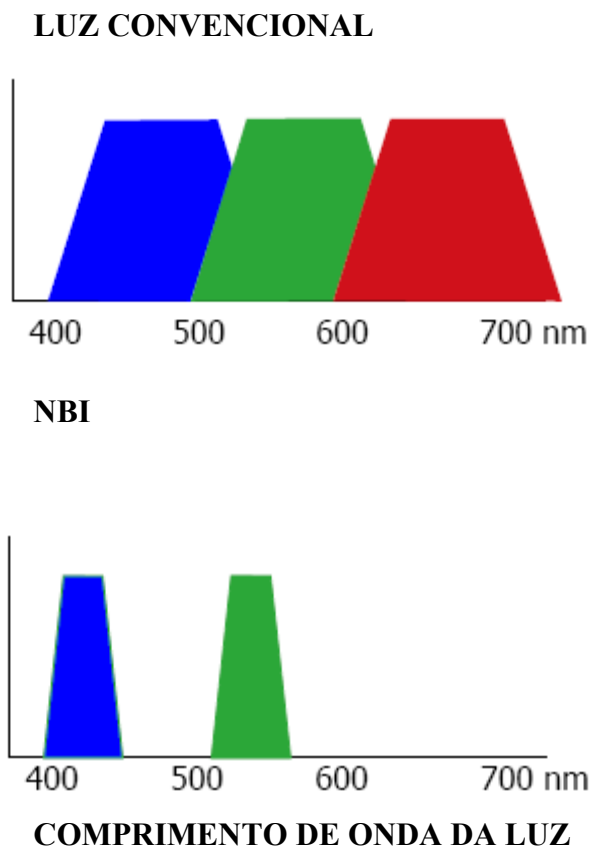


Figura 1 - Diferença entre a luz branca e o NBI. O NBI consiste no uso de apenas dois filtros (azul e verde) de ondas curtas e bandas estreitas (415 ± 30 nm e 540 ± 30 nm).

Em 2007, HIRATA et al. publicaram um estudo no qual 189 lesões colorretais foram analisadas endoscopicamente com NBI/magnificação e classificadas em relação às características microvasculares de acordo com a espessura e a regularidade dos microvasos. A espessura dos microvasos foi classificada em: vasos invisíveis, finos ou grossos. A regularidade dos microvasos foi classificada em: vasos invisíveis, regulares, pouco irregulares ou muito irregulares. As imagens endoscópicas foram comparadas com os achados histopatológicos. A sensibilidade e a especificidade de vasos invisíveis no diagnóstico de pólipos hiperplásicos foram de 90 e 99% respectivamente. Microvasos irregulares ocorreram

significativamente mais em carcinomas. A acurácia no diagnóstico de invasão maciça da submucosa em lesões caracterizadas por microvasos grossos e muito irregulares foi de 100%. Os autores demonstraram que as características dos microvasos obtidas através do NBI/magnificação estão associadas com o grau histológico e com a profundidade de invasão submucosa das lesões. Concluindo então, que este recurso endoscópico é útil para a decisão terapêutica em lesões colorretais (HIRATA et al. 2007).

A cromoendoscopia pan-colônica é efetiva no aumento de detecção de pequenos adenomas segundo vários autores (BROOKER et al. 2002; HURLSTONE et al. 2004; LE RHUN et al. 2006; LAPALUS et al. 2006). Entretanto este método é laborioso e demanda tempo excessivo, o que o torna pouco prático para uso rotineiro, sendo pouco adotado pelos endoscopistas ocidentais.

Com o uso do NBI, os microvasos da mucosa colorretal adquirem uma coloração marrom escura e, desta forma, há um aumento do contraste entre as lesões neoplásicas e a mucosa adjacente, facilitando sua identificação.

INOUE et al. (2008) compararam as taxas de detecção de adenomas em pacientes submetidos à colonoscopia convencional e à colonoscopia com NBI pan-colônico, através de um estudo prospectivo controlado randomizado. O uso do NBI aumentou significativamente o número global de adenomas e o número de adenomas diminutos (<5 mm) diagnosticados, sem prolongar o tempo de extubação colônica.

EAST et al. (2008a) realizaram um estudo prospectivo com pacientes portadores de SL para avaliar a taxa de perda de adenomas na colonoscopia convencional. O estudo demonstrou que uma segunda passagem com NBI no cólon proximal (do ceco até a junção descendente-sigmóide) quase dobrou o número de adenomas detectados. A proporção de adenomas planos detectados durante a segunda passagem com o NBI foi significativamente maior do que na primeira passagem com

a luz branca. Os autores sugerem que um subtipo morfológico específico de adenomas estão sendo detectados com o uso do NBI, morfologia esta que os torna mais difíceis de serem detectados com a luz branca.

RASTOGI et al. (2008) diagnosticaram 40% de adenomas adicionais com uma reavaliação segmentar da mucosa com o NBI após uma primeira passagem com a luz branca.

Um estudo publicado recentemente mostrou que o NBI detectou mais adenomas em comparação com a luz branca. Porém, quando analisaram subgrupos consecutivos de 100 pacientes houve um aumento contínuo na taxa de detecção de adenomas de oito para 26.5% no grupo de pacientes examinados com luz branca, enquanto esta taxa permaneceu inalterada no grupo de pacientes examinados com NBI. Os autores especularam um potencial efeito de aprendizagem resultante do uso do NBI, aumentando a habilidade dos examinadores em diagnosticar lesões com a luz branca (ADLER et al. 2008).

Como já mencionado, a seqüência adenoma-carcinoma é mais acelerada na SL. VASEN et al. (2007) identificaram cinco cânceres de intervalo em 3,5 anos após uma colonoscopia normal em um estudo prospectivo de rastreamento em pacientes com SL. Entretanto, além da carcinogênese acelerada, outra razão que pode explicar estes achados seria a não identificação de lesões durante a colonoscopia, mesmo por profissionais experientes. Como o NBI pode aumentar a detecção de lesões diminutas, planas e deprimidas, esta técnica pode ser de grande valia na vigilância de pacientes com SL, pois apesar de pequenas, estas lesões possuem grande risco de progressão para o câncer. Desta forma, o NBI tem o potencial de melhorar a eficiência da colonoscopia no seguimento de pacientes de alto risco.

2 OBJETIVOS

- o Verificar a frequência de lesões precursoras de câncer colorretal em pacientes considerados de alto risco para CCR e seus familiares de primeiro grau, por meio de colonoscopia com NBI.
- o Verificar as características histopatológicas e moleculares (a expressão imunohistoquímica das proteínas MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, p53, COX-2 e β -catenina, o perfil de mutação dos genes *KRAS* e *BRAF* e o status de metilação do gene MLH1) das lesões colônicas ressecadas durante o exame colonoscópico destes pacientes.
- o Verificar a associação entre as características clínicas, histopatológicas e moleculares.

3 PACIENTES

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi conduzido de acordo com a Resolução 196/96 que regulamenta a pesquisa em seres humanos; e a resolução 340/04 que regulamenta a pesquisa em genética humana. Todos os pacientes que aceitaram participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os resultados dos testes são confidenciais e divulgados apenas ao paciente, se assim o desejar. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital A.C. Camargo e obteve parecer favorável em 01 de novembro de 2007 sob todos os aspectos analisados sendo, portanto, aprovado com a identificação 994/07.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- o Indivíduos com ou sem câncer, maiores de 18 anos, pertencentes a famílias do Registro de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C. Camargo que preencham os critérios de Amsterdam, Bethesda ou Câncer Colorretal Familiar (Quadro 6).

Quadro 6 – Classificação da história de CCR.

Categoria	Critérios
Síndrome de Lynch – Amsterdam I	A família deve preencher todos os critérios de Amsterdam I (descritos anteriormente).
Síndrome de Lynch – Amsterdam II	A família deve preencher todos os critérios de Amsterdam II (descritos anteriormente).
Câncer Colorretal Familiar	Famílias que preenchem quatro dos cinco critérios de Amsterdam I ou II.
Critérios de Bethesda	Um indivíduo da família deve preencher um dos critérios de Bethesda (descritos anteriormente).

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- o Indivíduos submetidos à proctocolectomia total;
- o Indivíduos pertencentes a famílias com síndromes hereditárias de câncer colorretal polipóides (polipose adenomatosa familiar, polipose adenomatosa familiar atenuada, Síndrome de Peutz-Jeghers, polipose juvenil, polipose hiperplásica).

3.4 SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS

Os sujeitos de pesquisa foram selecionados através do Registro de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C. Camargo (RCCH).

O RCCH iniciou suas atividades em 1992, e tem como missão “contribuir para a redução da morbidade e mortalidade do câncer, através da educação de famílias sobre os riscos e implicações do câncer colorretal hereditário e dos tumores

associados; coordenar as atividades de seguimento desta população e gerar subsídios para pesquisas que possam contribuir com o melhor entendimento sobre a hereditariedade associada ao câncer”.

Dentre as atividades do registro está a identificação de indivíduos com alto risco para desenvolver CCR através da história familiar e a orientação quanto às medidas de prevenção primária e secundária do câncer colorretal.

Após a classificação do risco de câncer colorretal, os indivíduos são orientados a realizar colonoscopias, cuja idade de início e frequência varia de acordo com a classificação de risco apresentada no Quadro 7.

Quadro 7 – Recomendações para prevenção de CCR em indivíduos de alto risco para desenvolver CCR de acordo com a classificação da história familiar.

Classificação	Recomendações
Síndrome de Lynch – Amsterdam I e II*	Colonoscopia anual com início entre os 20 e 25 anos de idade
Câncer Colorretal Familiar	Colonoscopia anual com início 10 anos antes da idade de diagnóstico de câncer colorretal mais jovem na família
CrITÉRIOS de Bethesda	Colonoscopia anual com início 10 anos antes da idade de diagnóstico de câncer colorretal mais jovem na família

* Recomendação para indivíduos com diagnóstico clínico da síndrome ou diagnóstico molecular de mutação em genes de reparo de DNA.

Serão identificados os probandos com teste genético realizado nos projetos:

- o “Avaliação de frequência de mutações nos genes do sistema de reparo de DNA em pacientes com suspeita de câncer colorretal hereditário sem polipose: estudo colaborativo sul-americano”, projeto nº781/06, aprovado

pelo CEP e CONEP em 25 de julho de 2006 e com financiamento pela FAPESP;

- O “Predisposição hereditária ao câncer colorretal e ao câncer de mama: manejo de pacientes de alto risco e suas famílias – diagnóstico clínico e molecular, aconselhamento genético e implantação de um sistema de registro e gerenciamento de dados oncogenéticos”, projeto nº870/06, aprovado pelo CEP e com financiamento do CNPq.

A partir da identificação dos probandos, que foram incluídos no presente estudo, foram também selecionados seus familiares de primeiro grau (pais, irmãos e/ou filhos), que são considerados como portadores presumidos, ou seja, uma vez que o probando tenha mutação identificada, presume-se que estes familiares tenham 50% de probabilidade de possuírem a mesma mutação.

Os indivíduos que preenchem os critérios de inclusão e com colonoscopia de seguimento programada foram convidados a participar do estudo. Após a orientação quanto aos procedimentos e objetivos do estudo, todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

Dessa maneira, foram incluídos no projeto 72 pacientes do Registro de Câncer Colorretal Hereditário, Departamento de Cirurgia Pélvica, Hospital A.C. Camargo – São Paulo, Brasil.

3.5 DADOS CLÍNICOS

Foram levantados os dados clínicos dos pacientes. Foram incluídos na ficha os seguintes itens:

- Idade;
- Gênero;
- História pessoal de câncer/pólipos;
- Classificação familiar do risco de câncer colorretal;
- Mutação identificada na família – gene mutado, tipo de mutação, local da mutação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXAME COLONOSCÓPICO

Antes da colonoscopia foi preenchida a ficha de características clínicas do paciente (Anexo 2) e durante a colonoscopia foi preenchida a ficha de descrição do exame e de seus achados (Anexo 3).

Os exames colonoscópicos foram realizados utilizando-se o colonoscópio CF-H180AI/L e o vídeo-processador Evis Exera II CV-180 (Olympus, Japão). Este colonoscópio possui um campo de visão de 170°, maior que os aparelhos convencionais. O vídeo-processador usa uma lâmpada de xenônio como fonte de luz e um CCD (*charge-coupled device*) que produz uma imagem em alta definição (1080 linhas horizontais de resolução) usada com um monitor de alta resolução (HDTV). O filtro de banda dupla de NBI (415 nm e 540 nm $\pm$ 30 nm) é acionado por meio de um botão na manopla do colonoscópio e é desativado pelo mesmo botão. A mudança da imagem convencional para a do NBI no monitor leva aproximadamente 1-2 segundos. O vídeo-processador também é equipado com um recurso de magnificação eletrônica de 1,2 ou 1,5 vezes, que é ativado por meio de outro botão no colonoscópio e proporciona uma magnificação total de até 70 vezes. Após a intubação do pólo cecal ou do íleo terminal é realizada a extubação colônica com exame minucioso da mucosa colorretal. A cada 10 cm realiza-se o exame com a visão convencional e em seguida com o NBI. As lesões encontradas são identificadas quanto à: **(1)** localização: cólon proximal (ceco, ascendente e transversal) e cólon

distal (descendente, sigmóide e reto); **(2)** tamanho: até 5 mm, de 6 a 10 mm e maior ou igual a 11 mm e **(3)** conformação macroscópica segundo a classificação da Sociedade Japonesa de Pesquisa de Câncer Colorretal (JRSCCR 1983): Ip, Isp, Is, Ila, Ila+Ilc, Iib, Iic, Iic+Ila, ou tumoral (Quadro 8). É realizada a magnificação das lesões sob o NBI, que são então, classificadas de acordo com a arquitetura vascular proposta por HIRATA et al. (2007), levando-se em conta a: **(1)** regularidade dos vasos: invisíveis, regulares, pouco irregulares, muito irregulares; e **(2)** espessura dos vasos: invisíveis, finos, grossos (Quadro 9).

Todas as lesões identificadas são biopsiadas, ressecadas por polipectomia ou mucosectomia, ou encaminhadas para ressecção cirúrgica, de acordo com a indicação mais adequada. As lesões e biópsias obtidas são fixadas em solução de formol diluído a 10% em água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato), um eficiente inibidor de DNase/RNase. Em seguida, o material é encaminhado para exame anatomopatológico e pesquisa molecular, que foram realizados pelos pesquisadores do estudo.

Quadro 8 - Classificação de lesões colorretais da Sociedade Japonesa de Pesquisa em Câncer Colorretal.

Tipo	Classificação	Conformação
Elevado	Ip	Pedicularado
	Isp	Subpedicularado
	Is	Séssil
Superficialmente elevado	Ila	Elevação plana
	Ila+Ilc	Elevação plana com depressão
Plano	Ilb	Plano
Deprimido	Ilc	Levemente deprimido
	Ilc+Ila	Deprimido com bordos elevados

Quadro 9 - Classificação dos microvasos da mucosa colônica de lesões colorretais para o NBI segundo Hirata.

Tipo	Classificação
Espessura	Invisível
	Fino
	Grosso
Regularidade	Invisível
	Regular
	pouco irregular
	muito irregular

4.2 EXAME ANATOMOPATOLÓGICO

Foi realizado o exame anatomopatológico das lâminas confeccionadas a partir das lesões coletadas utilizando-se a classificação da *World Health Organization* (WHO), internacionalmente aceita. As lesões foram classificadas em: pólipos

hiperplásico, adenoma tubular, adenoma viloso, adenoma túbulo-viloso, adenoma serreado e adenocarcinoma. Foi também caracterizado o grau de displasia glandular dos adenomas em baixo grau ou alto grau (HAMILTON et al. 2000).

4.3 IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, COX-2, β -CATENINA E P53

A imunoistoquímica é a técnica que envolve o uso de anticorpos de espécies pré-definidas, com sistema de alta sensibilidade de detecção, o que resulta em uma reação com um produto colorido quando observado ao microscópio. O poder desta técnica é a observação simultânea da morfologia do tecido, permitindo a integração da morfologia e das informações imunoistoquímicas da área de interesse.

4.3.1 Anticorpos

A análise imunoistoquímica das proteínas de reparo (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) e de p53, COX-2 e β -catenina foi realizada em cortes parafinados, pela técnica de polímero sem biotina, utilizando-se os anticorpos conforme o Quadro 10 e seguindo o protocolo conforme o Anexo 4.

Quadro 10 - Anticorpos utilizados para análise imunoistoquímica.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
p53	DO-7	1:100	DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca, cod # M7001
β-catenina	14	1:800	BD Transduction, EUA, cod # 610154
COX-2	4H12	1:6000	Novocastra, New Castle, Reino Unido, cod # NCL-COX2
MLH1	G168-728	1:1000	BD Biosciences Pharmigen cat#51-1327GR, San Jose, CA, EUA
MSH2	G219-1129	1:1000	BD Pharmingen cat # 556349
MSH6	44/MSH6	1:100	BD Pharmingen cat # 610919
PMS2	A16-4	1:500	BD Pharmingen, cat # 556415

4.3.2 Análise imunoistoquímica

Foram analisados sete anticorpos, levando-se em consideração a localização (núcleo, citoplasma, membrana, matriz extracelular), a extensão e a intensidade da marcação. As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e controle negativo, realizado com a omissão do anticorpo primário. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum.

Os cortes histológicos das lesões foram examinados, e foi considerado perda do gene de reparo quando ocorreu negatividade nuclear na coloração imunoistoquímica para MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, porém com presença de expressão protéica em mucosa colônica normal adjacente e/ou células do estroma.

Para as proteínas p53, COX-2 e β-catenina a extensão da positividade foi estabelecida em uma escala de 0 a 4; **0**, representando negatividade da proteína; **1**, de 1% a 25% das células positivas; **2**, mais de 25% e até 50%; **3**, mais de 50% e até 75%; e **4**, quando a positividade foi presente em mais de 75% das células. Para viabilizar os cálculos estatísticos, foi necessário agrupar as categorias. Para p53 e β-catenina as categorias **0**, **1** e **2** foram considerados como pouco expressiva e negativa

e agrupadas na categoria 1; e as categorias **3** e **4** foram consideradas como expressão intermediária e intensa e agrupadas na categoria 2.

Para a proteína COX-2, avaliamos também a intensidade da expressão, que foi medida de 0 a 3+, onde **0** representa a não expressão da proteína, **1+** pouca intensidade, **2+** moderada intensidade e **3+** grande intensidade. A medida final foi obtida multiplicando-se as duas variáveis (extensão e intensidade), com as medidas variando de 0 a 12. Quando o resultado variou de 0 a 4 foi considerado como pouco expressivo, de 5 a 8 como uma expressão intermediária e de 9 a 12 como uma expressão intensa. Para viabilizar os cálculos estatísticos, foi necessário agrupar as categorias. Foi considerado pouco expressiva e negativo de 0 a 4 (categoria 1) e expressão intermediária e intensa de 5 a 12 (categoria 2).

Na avaliação da expressão de β -catenina também foi discriminada sua sub-localização na célula (membrana, citoplasma e núcleo).

Para a proteína COX-2 foi avaliada sua localização no citoplasma das células epiteliais e estromais.

As expressões protéicas foram correlacionadas com as variáveis clínicas e anatomopatológicas como a classificação familiar de risco de CCR, localização, tamanho e histopatologia das lesões.

4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MUTAÇÃO DOS GENES *KRAS* E *BRAF*

Para a avaliação de mutação nos genes *KRAS* e *BRAF* foi utilizada a técnica de pirosequenciamento. No entanto, para uma confirmação diagnóstica destes

resultados foi também realizada a técnica de sequenciamento de Sanger, já que esta tem sido considerada padrão ouro na avaliação da mutação destes genes. O sequenciamento direto foi realizado a partir de nova extração das amostras de interesse e processado no laboratório Fleury.

4.4.1 Extração do DNA

As lesões ressecadas durante a colonoscopia, fixadas em solução de formol diluído a 10% em água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato), foram processadas em processador automático, passando por banhos de álcoois para desidratação e xilóis para diafanização celular, incluídas em blocos de parafina e cortadas em micrótomo (micrótomo manual Leica), para a confecção de oito lâminas histológicas de cada bloco, com espessura tecidual de 5 μ cada, que foram armazenadas em *freezer* a -80°C. Uma lâmina de cada bloco foi corada com hematoxilina e eosina (HE) e avaliada pelo patologista responsável pelo estudo (R.A.C.), com demarcação da área de interesse. As demais lâminas foram utilizadas para a obtenção de células para a extração do DNA, através da raspagem (*scrape*) do tecido, utilizando-se a lâmina de HE marcada como molde. Quando não foi possível obter uma área na lâmina de HE com mais de 70% de células de interesse a amostra foi encaminhada para o método de Microdissecção e Captura a Laser (LCM). Entretanto, como novos cortes tiveram que ser feitos para a realização da LCM, e como as lesões eram diminutas, o material se esgotou e não foi possível a microdissecção e a extração de DNA destas lesões.

As lâminas selecionadas foram desparafinizadas em estufa à 60° C por 30 minutos, posteriormente com dois banhos de xilol 5 minutos cada, dois banhos em

álcool absoluto 5 minutos cada. Com um bisturi as células foram raspadas das lâminas e o DNA genômico extraído usando-se o QIAamp® DNA Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA) seguindo o protocolo descrito no Anexo 5.

O DNA extraído foi quantificado utilizando-se 1µl de DNA no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) em comprimento de onda 260/280 e 260/230 e a qualidade do DNA foi checada em gel de agarose.

4.4.2 Amplificação por PCR

Após a extração do DNA foi realizada a reação de PCR (*polymerase chain reaction*) para amplificar a região de interesse. Cada reação de PCR contém a mistura (Mix-PCR) descrita no Quadro 11 com um volume total de 50 µl. Os ciclos foram realizados em uma máquina de PCR Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY) utilizando o programa de ciclagem descrito na tabela 12. A amplificação da região específica foi verificada pela visualização do amplicon em um gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo. A purificação da fita simples de DNA utilizada como molde na reação de sequenciamento foi realizada em uma placa de 96 poços (Eppendorf). Vinte µl do produto biotilado foram purificados utilizando esferas de sefarose marcadas com estreptoavidina (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) e processados utilizando-se o kit PSQ 96 Sample Preparation Kit (Pyrosequencing AB, Westborough, MA). A reação de síntese por sequenciamento da fita complementar foi realizada automaticamente por pirosequenciamento pelo aparelho PyroMark ID (Biotage) em temperatura ambiente usando reagentes PyroGold (Biotage).

Quadro 11 – Mix-PCR.

10 x Buffer (-MgCl ₂)	5,0 µl
MgCl ₂ 1,5mM	1,5 µl
DNTP 10mM	1,0 µl
PRIMER – F (oligonucleotídeo iniciador senso) 10mM	1,0 µl
PRIMER – R (oligonucleotídeo iniciador antisenso) 10mM	1,0 µl
TAQ PLATINO	0,25 µl
DNA 10ng/µl	1,0 µl
H ₂ O (ddW)	39,25 µl
Volume final	50,0 µl

Quadro 12 – Programa de ciclagem utilizado para o PCR.

Lid = 105°C
Tubo = 0,2ml
Vol = 50 µl
T = 95°C – 15min.
T = 95°C – 20seg.
T = 58°C – 20seg.
T = 72°C – 20seg.
GO TO – 2 Rep 44
T = 72°C – 5min.
HOLD – 4°C

4.4.3 Pirosequenciamento

Foram avaliadas mutações no códon 600 do gene *BRAF* e códon 12 e 13 do gene *KRAS* pela técnica de pirosequenciamento, que foi realizada conforme o protocolo para utilização da estação de vácuo e do pirosequenciador (PyroMark ID – Biotage) descrito no Anexo 6. O pirosequenciamento é uma tecnologia acurada de análise de grande quantidade de sequências curtas e médias de DNA. Nesta técnica, um iniciador de sequenciamento é hibridizado ao DNA de fita simples amplificado

por PCR e incubado com as enzimas DNA polimerase, ATP sulfurilase, luciferase e apirase, e com os substratos adenosina 5'fosfossulfato (APS) e luciferina. Em seguida, o primeiro dos quatro desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP) é adicionado à reação. A DNA polimerase catalisa a incorporação do dNTP à fita de DNA caso ele seja complementar à base da fita molde. Cada evento de incorporação é acompanhado pela liberação de pirofosfato (PPi) em uma quantidade equimolar a do nucleotídeo incorporado. A ATP sulfurilase converte quantitativamente o PPi em ATP na presença de adenosina 5' fosfossulfato (APS). Este ATP induz a conversão mediada pela luciferase da luciferina em oxiluciferina. Esta reação gera uma quantidade de luz visível proporcional a quantidade de ATP. A luz produzida na reação catalisada pela luciferase é detectada por uma câmera de CCD (*charge coupled device*) e é vista como um pico, construindo-se assim um “pirograma”. A altura de cada pico (sinal de luz) é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados. A apirase é uma enzima de degradação de nucleotídeos e degrada continuamente o ATP e os dNTPs que não foram incorporados. Isto pára a emissão de luz e regenera a solução de reação. O próximo dNTP é então adicionado. Cada dNTP é adicionado separadamente. Enquanto o processo continua a fita complementar de DNA é formada e a sequência de nucleotídeos é determinada pelos sinais de pico no “pirograma”.

4.5 AVALIAÇÃO DO STATUS DE METILAÇÃO DO GENE *MLH1*

Seria avaliado o status de metilação no gene *MLH1* pela técnica de pirosequenciamento. Entretanto, não foi possível realizar esta técnica, pois não

obtivemos quantidade suficiente de DNA para tal. Isto ocorreu devido ao pequeno tamanho dos pólipos e a grande quantidade de DNA necessária para o procedimento.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa de computador SPSS for Windows, versão 16.0, SPSS Inc.

As variáveis foram descritas sob a forma de frequência, média e mediana. Para verificar a associação entre as características clínicas, anatomopatológicas e moleculares das lesões identificadas foram utilizados os testes do qui-quadrado e exato de Fisher.

Para viabilizar alguns cálculos estatísticos, foi necessário agrupar algumas categorias, como ocorreu no caso das expressões protéicas, em que as expressões negativas e baixas foram categorizadas em grupo I e as expressões médias e altas em grupo II.

Em todos os testes estatísticos foi admitido o nível de significância em 5%.

5 RESULTADOS

5.1 EXAME COLONOSCÓPICO E ANATOMOPATOLÓGICO

Foram realizados 71 exames colonoscópicos completos e um exame incompleto, que foi excluído do estudo. Quarenta e dois exames não evidenciaram lesões (59%). Dos 29 pacientes nos quais foram diagnosticadas lesões colorretais, quatro foram excluídos do estudo, pois dois deles foram posteriormente diagnosticados como portadores da Síndrome de Li-Fraumeni, com mutação documentada do gene *TP53*, e dois deles como portadores de Polipose Adenomatosa Familiar. Do total de 67 pacientes incluídos no estudo, a maioria era mulher (57%), com uma média de idade de 42 anos (desvio-padrão 12,5), tendo 18 anos o paciente mais jovem e 72 anos o paciente mais idoso. Nos 25 pacientes incluídos no estudo que apresentaram lesões, foram diagnosticadas e ressecadas 58 lesões (média de 0,87 lesão por paciente), variando de uma a 16 lesões por paciente. Do total de pacientes, 29 (43,3%) pertenciam a famílias que preenchiam os Critérios de Amsterdam. Daqueles pacientes que apresentaram lesões, 11 (44%) pertenciam a famílias que preenchiam os Critérios para Câncer Colorretal Familiar, ou seja, preenchiam apenas quatro dos cinco Critérios de Amsterdam (Tabelas 1 e 2). Não foi possível obter a história familiar de três pacientes.

Tabela 1 - Classificação de todos os pacientes segundo a história familiar.

	N	%
Amsterdam I	26	38,8
Amsterdam II	3	4,5
Câncer Colorretal Familiar	16	23,9
Crítérios de Bethesda	19	28,4
Desconhecido	3	4,5
Total	67	100

Tabela 2 – Classificação dos pacientes com lesões segundo a história familiar.

	N	%
Amsterdam I	8	32
Amsterdam II	0	0
Câncer Colorretal Familiar	11	44
Crítérios de Bethesda	6	24
Total	25	100

Dos 67 pacientes incluídos no estudo, 11 (16%) eram probandos e já tinham sido submetidos à ressecção colorretal parcial prévia devido a CCR. Os demais pacientes eram familiares de primeiro grau de probandos (não necessariamente incluídos no estudo) (Tabela 3). Dos 25 pacientes que apresentaram lesões, oito (32%) já tinham ressecção colorretal prévia, sete (28%) eram probandos e 18 (72%) eram familiares de primeiro grau de probandos.

Tabela 3 - Frequência de probandos e familiares da amostra total e dos pacientes que apresentavam lesões.

	Amostra total	Pacientes com lesões
Probando	11 (16,4%)	7 (28%)
Familiar de primeiro grau	53 (79,1%)	18 (72%)
Desconhecido	3 (4,5%)	0 (0%)
Total	67 (100%)	25 (100%)

A Tabela 4 mostra a classificação da história familiar dos pacientes em relação à presença de lesões nos exames colonoscópicos. Nesta análise avaliamos apenas 64 pacientes, pois excluimos aqueles três pacientes cuja história familiar é desconhecida.

Tabela 4 – Classificação da história familiar dos pacientes em relação à presença de lesões.

	Presença de lesões	Ausência de lesões
Amsterdam I e II	8 (27,5%)	21 (72,4%)
Câncer Colorretal Familiar	11 (69%)	5 (31%)
Crítérios de Bethesda	6 (31,5%)	13 (68,5%)
Total	25 (39%)	39 (61%)

A Tabela 5 mostra a localização, a classificação da JRSCCR e o tamanho das lesões encontradas nos exames colonoscópicos. A Tabela 6 mostra a classificação de Hirata para as lesões. O tamanho das lesões variou de 3 a 80 mm, com uma mediana de 5 mm e um desvio-padrão de 12,5.

Tabela 5 – Características das lesões colorretais.

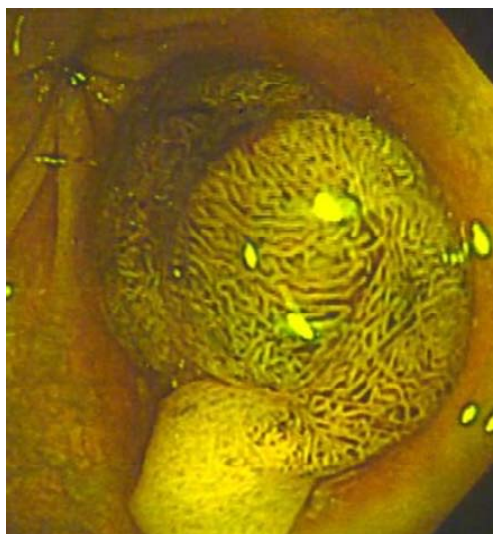
	N	%
Localização		
Proximal	29	50
Distal	29	50
Classificação JRSCCR*		
IIa	4	6,9
Ip	3	5,2
Is	35	60,3
Isp	13	22,4
tumoral	3	5,2
Tamanho		
≤ 5 mm	39	67
De 6 a 10 mm	10	17
≥ 11 mm	9	16

* Sociedade Japonesa de Pesquisa em Câncer Colorretal

Tabela 6 – Classificação das lesões segundo Hirata.

	Invisíveis	Regulares	Pouco irregulares	Muito irregulares
Invisíveis	21	0	0	0
Finos	0	31	3	0
Grossos	0	0	0	3

A Figura 2 representa a fotografia de um adenoma diagnosticado à colonoscopia com NBI, demonstrando a presença de vasos finos, com distribuição regular, destacados pela coloração marrom escura.

**Figura 2** – Fotografia de um adenoma à colonoscopia com NBI.

A Tabela 7 mostra as características anatomopatológicas das lesões encontradas na colonoscopia.

Tabela 7 – Classificação anatomopatológica dos achados encontrados ao exame colonoscópico.

	N	%
Pólipo hiperplásico	11	19
Pólipo inflamatório	2	3,4
Adenoma tubular	35	60,3
Adenoma túbulo-viloso	4	6,9
Adenoma viloso	0	0
Adenocarcinoma	3	5,2
Mucosa normal	2	3,4
Mucosa colônica com intensos artefatos de fulguração	1	1,7
Total	58	100

A Tabela 8 mostra o grau de displasia dos adenomas encontrados na colonoscopia.

Tabela 8 – Grau de displasia dos adenomas colorretais.

Displasia	N	%
Baixo grau	38	97,4
Alto grau	1	2,6
Total	39	100

Neste estudo o NBI apresentou uma sensibilidade de 93%, uma especificidade de 83%, com valor preditivo positivo de 97% e valor preditivo negativo de 67% na diferenciação entre lesões neoplásicas e não neoplásicas. Isto significa que o NBI apresentou uma taxa de classificação correta de 86%. Apresentou também uma acurácia de 100% no diagnóstico de adenocarcinomas.

As Tabelas 9 e 10 mostram a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo do NBI na diferenciação entre lesões

neoplásicas e não neoplásicas das 57 lesões encontradas nos exames colonoscópicos, excluindo-se aquela que apresentou intensos artefatos de fulguração, devido a ressecção com alça diatérmica e, portanto não pôde ser avaliada ao exame anatomopatológico.

Tabela 9 - Sensibilidade e especificidade do NBI na diferenciação entre lesões neoplásicas e não neoplásicas.

	Histopatologia não neoplasia	Histopatologia neoplasia	Total
NBI não neoplasia	14 (93%)	7 (17%)	21 (37%)
NBI neoplasia	1 (7%)	35 (83%)	36 (63%)
Total	15 (100%)	42 (100%)	57 (100%)

Tabela 10 - Valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo do NBI na diferenciação entre lesões neoplásicas e não neoplásicas.

	Histopatologia não neoplasia	Histopatologia neoplasia	Total
NBI não neoplasia	14 (67%)	7 (33%)	21 (100%)
NBI neoplasia	1 (3%)	35 (97%)	36 (100%)
Total	15 (26%)	42 (74%)	57 (100%)

5.2 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Foi realizada análise imunoistoquímica das proteínas de reparo do DNA (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) no material obtido dos 25 pacientes que apresentaram lesões. Destes, seis pacientes (24%) apresentaram ausência de expressão protéica do dímero MSH2/MSH6. Nenhum caso apresentou ausência de expressão de MLH1 e/ou PMS2. Dois casos apresentaram resultados inconclusivos,

mesmo após a repetição do procedimento. Um dos casos apresentou-se inconclusivo para o dímero MLH1/PMS2 e outro isoladamente para MSH2.

Tabela 11 – Avaliação da expressão das proteínas de reparo do DNA.

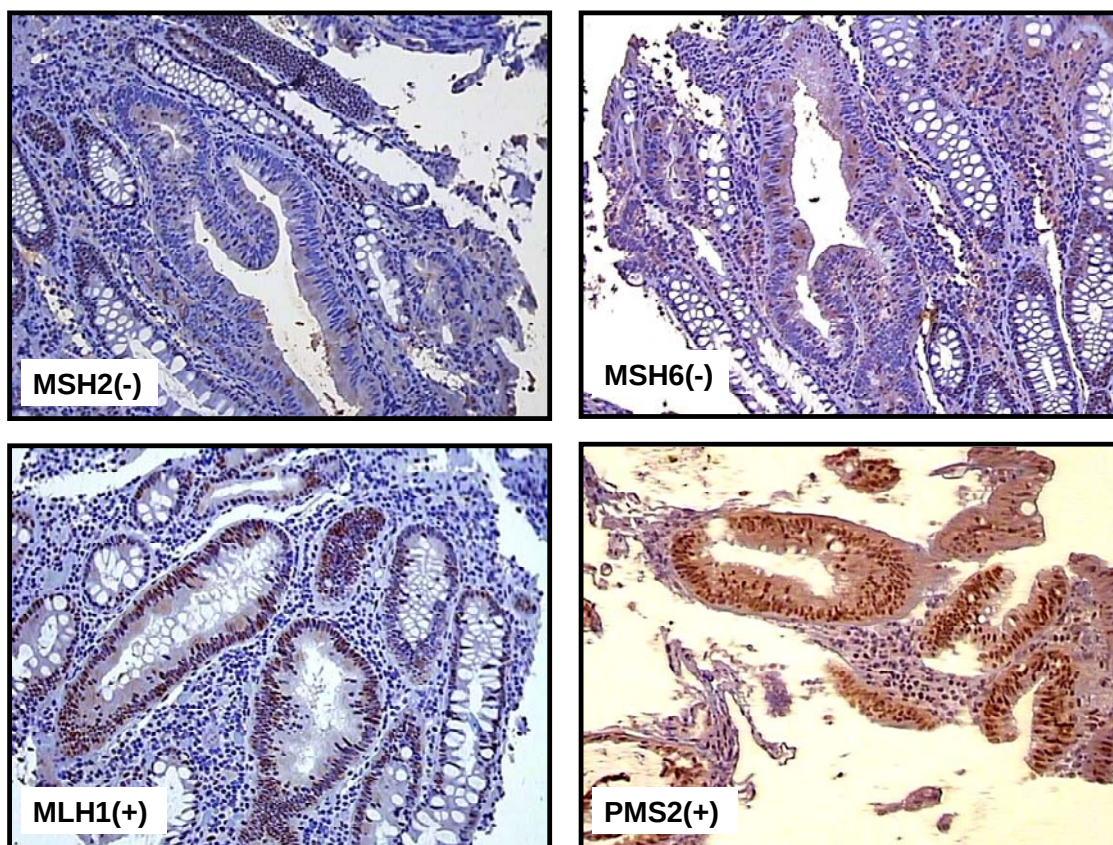
Expressão protéica	N	%
Presente	17	68
Ausente	06	24
Inconclusivo	02	08
Total	25	100

A Tabela 12 mostra os achados de ausência protéica (na tabela relatado como negatividade) para as proteínas de reparo individualmente, ou em dímeros, para os 25 pacientes analisados.

Tabela 12 – Discriminação da expressão protéica por imunoistoquímica nos 25 pacientes que apresentaram lesões à colonoscopia.

Imunoistoquímica	N	%
Positivos	17	68
MSH2/MSH6 negativos	6	24
MLH1/PMS2 inconclusivos	1	4
MSH2 inconclusivo	1	4
Total	25	100

A Figura 3 representa um dos casos (adenoma tubular de 3 mm) em que houve perda da expressão do heterodímero MSH2/MSH6, com positividade do heterodímero MLH1/PMS2.



Legenda: (-) indica ausência de expressão. (+) indica presença de expressão.

Figura 3 - Fotomicrografia demonstrando um caso de um pólipó de 3 mm com ausência de expressão protéica do dímero MSH2/MSH6 à imunoistoquímica.

A Tabela 13 mostra os achados da imunoistoquímica das proteínas de reparo do DNA em relação à classificação das famílias dos indivíduos analisados. Nesta tabela excluímos os dois pacientes que apresentaram testes inconclusivos.

Tabela 13 – Classificação clínica das famílias dos pacientes em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Classificação		Sem alteração IHQ	Com alteração IHQ	Total
Amsterdam	N	5	2	7
	%	71	29	30
CCF*	N	8	3	11
	%	73	27	48
Bethesda	N	4	1	5
	%	80	20	22
Total	N	17	6	23
	%	74	26	100

p = 1,0 (Teste exato de Fisher)

*CCF = Câncer Colorretal Familiar (pacientes que preenchem pelo menos 4 dos critérios de Amsterdam)

O resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre a classificação da história familiar e a alteração na imunoistoquímica.

Dos 25 pacientes que apresentaram lesões neste estudo, 18 foram submetidos ao sequenciamento dos genes de reparo do DNA ou possuíam algum parente de primeiro grau que foi submetido ao sequenciamento, através de outro estudo realizado no Hospital A.C. Camargo. A Tabela 14 mostra a relação entre os achados da imunoistoquímica e os achados do sequenciamento genético nestes pacientes. Nesta tabela excluímos os dois pacientes que apresentaram resultado inconclusivo à imunoistoquímica.

Tabela 14 - Resultado do sequenciamento dos genes de reparo do DNA em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Sequenciamento		Sem alteração IHQ	Com alteração IHQ	Total
Ausência de mutação	N	7	0	7
	%	100	0	44
Presença de mutação	N	4	5	9
	%	44	56	56
Total	N	11	5	16
	%	69	31	100

p = 0,029 (Teste exato de Fisher)

O resultado mostra que houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de mutação no sequenciamento genético dos genes de reparo do DNA e a alteração na imunoistoquímica. Pode-se observar que todos os pacientes que apresentaram alteração imunoistoquímica também apresentaram mutação em um dos genes de reparo do DNA ao sequenciamento genético. Além disto, o gene mutado ao sequenciamento coincidiu em 100% dos casos com o gene não expresso à imunoistoquímica.

Nas análises seguintes consideramos as lesões ressecadas e não os pacientes, podendo haver mais de uma lesão por paciente. Foram excluídos destas análises dois pólipos inflamatórios, um material com intensos artefatos de fulguração, e dois pólipos que foram identificados durante o exame colonoscópico, porém o exame anatomopatológico demonstrou se tratar de mucosa colônica normal. Foram analisadas, portanto 53 lesões.

A Tabela 15 mostra os achados da imunoistoquímica das proteínas de reparo do DNA em relação à histopatologia das lesões encontrados.

Tabela 15 - Histopatologia das lesões em relação às alterações encontradas na imunohistoquímica das proteínas de reparo.

Histopatologia		Sem alteração IHQ	Com alteração IHQ	Total
Adenoma baixo grau	N	33	5	38
	%	87	13	71
Adenoma alto grau	N	1	0	1
	%	100	0	2
Pólipo hiperplásico	N	11	0	11
	%	100	0	21
Adenocarcinoma	N	1	2	3
	%	33	67	6
Total	N	46	7	53
	%	87	13	100

Para a análise estatística agrupamos as lesões em neoplásicas (adenoma de baixo e alto grau e adenocarcinoma) e não-neoplásicas (pólipos hiperplásicos), conforme a Tabela 16.

Tabela 16 – Histopatologia (agrupada) das lesões em relação às alterações encontradas na imunohistoquímica das proteínas de reparo.

Histopatologia		Sem alteração IHQ	Com alteração IHQ	Total
Neoplasia	N	35	7	42
	%	83	17	79
Não-neoplasia	N	11	0	11
	%	100	0	21
Total	N	46	7	53
	%	87	13	100

p = 0,146 (Teste do Qui-quadrado)

Pode-se notar na tabela que nenhum pólipo hiperplásico demonstrou ausência de expressão das proteínas de reparo à imunohistoquímica, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre a histopatologia e a alteração imunohistoquímica.

A Tabela 17 mostra os achados da imunoistoquímica das proteínas de reparo do DNA em relação ao tamanho das lesões analisadas.

Tabela 17 – Tamanho das lesões em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Tamanho		Sem alteração IHQ	Com alteração IHQ	Total
≤ 5 mm	N	32	2	34
	%	94	6	64
6 a 10 mm	N	9	2	11
	%	81	19	21
≥ 11 mm	N	5	3	8
	%	62,5	37,5	15
Total	N	46	7	53
	%	87	13	100

p = 0,11 (Teste exato de Fisher)

O resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre o tamanho das lesões e a presença de alteração na imunoistoquímica. Neste estudo obtivemos ausência de expressão protéica em pólipos diminutos, medindo 3 mm o menor deles.

A Tabela 18 mostra os achados da imunoistoquímica das proteínas de reparo do DNA em relação à localização das lesões analisados.

Tabela 18 – Localização das lesões em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo do DNA.

Localização		Sem alteração IHQ	Com alteração IHQ	Total
proximal	N	22	5	27
	%	81	19	51
distal	N	24	2	26
	%	92	8	49
Total	N	46	7	53
	%	87	13	100

p = 0,42 (Teste exato de Fisher)

O resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre a localização das lesões e a presença de alteração na imunoistoquímica.

Foi realizada também a análise da expressão imunoistoquímica das proteínas p53, COX2 e β -catenina das 53 lesões incluídas neste estudo.

A Tabela 19 mostra os resultados da expressão protéica de p53, COX2 e β -catenina avaliadas por imunoistoquímica.

Tabela 19 – Nível de expressão das proteínas p53, COX-2 e β -catenina avaliada por imunoistoquímica.

Proteína	Expressão	
	Negativa/Fraca	Moderada/Intensa
p53	15 (28%)	38 (72%)
COX-2 epitélio	3 (6%)	50 (94%)
COX-2 estroma	50 (94%)	3 (6%)
β-catenina membrana	2 (4%)	51 (96%)
β-catenina citoplasma	21 (40%)	32 (60%)
β-catenina núcleo	50 (94%)	3 (6%)

As tabelas seguintes mostram os achados da imunoistoquímica das proteínas p53, COX-2 e β -catenina em relação às variáveis clínicas e anatomopatológicas estudadas.

Tabela 20 - Análise da associação entre a proteína p53 nuclear e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

Variáveis	Expressão da proteína p53		Valor de p
	Negativa/Fraca	Moderada/intensa	
Classificação familiar			0,006*
Amsterdam	4 (13%)	26 (87%)	
CCF***	5 (36%)	9 (64%)	
Bethesda	6 (67%)	3 (33%)	
Localização			0,005**
Proximal	3 (11%)	24 (89%)	
Distal	12 (46%)	14 (54%)	
Tamanho			0,748*
≤ 5 mm	11 (32%)	23 (68%)	
6 a 10 mm	2 (18%)	9 (82%)	
≥ 11 mm	2 (25%)	6 (75%)	
Histopatologia			<0,001*
adenocarcinoma	1 (33%)	2 (67%)	
Adenoma	3 (8%)	36 (92%)	
pólipo hiperplásico	11 (100%)	0 (0%)	

* Teste Exato de Fisher

** Teste do Qui-quadrado

*** Câncer Colorretal Familiar

O resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da proteína p53 nuclear e o tamanho das lesões. Entretanto houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão desta proteína e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões. A maioria dos pacientes que preenchem Critérios de Amsterdam ou para Câncer Colorretal Familiar (87 e 64% respectivamente) apresentou expressão imunoistoquímica moderada a intensa de p53. Enquanto 67% dos pacientes que preenchem os Critérios de Bethesda apresentaram expressão fraca ou negativa desta proteína. Em relação à localização, 89% das lesões situadas no cólon proximal e 54% das lesões situadas no cólon distal apresentaram expressão moderada a intensa de p53. Em relação à histopatologia, a maioria dos

adenomas e adenocarcinomas (92 e 67% respectivamente) apresentaram expressão moderada a intensa de p53. Entretanto 100% dos pólipos hiperplásicos apresentaram expressão negativa desta proteína na área de diferenciação/maturação (nestes pólipos houve expressão de p53 apenas na área proliferativa, o que é considerado como expressão normal).

Tabela 21 – Análise da associação entre a proteína COX-2 epitelial e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

Variáveis	Expressão da proteína COX-2 epitelial		Valor de p
	Negativa/Fraca	Moderada/intensa	
Classificação familiar			0,019*
Amsterdam	0 (0%)	30 (100%)	
CCF**	3 (21%)	11 (79%)	
Bethesda	0 (0%)	9 (100%)	
Localização			0,610*
Proximal	1 (4%)	26 (96%)	
Distal	2 (8%)	24 (92%)	
Tamanho			0,023*
≤ 5 mm	0 (0%)	34 (100%)	
6 a 10 mm	1 (9%)	10 (91%)	
≥ 11 mm	2 (25%)	6 (75%)	
Histopatologia			0,262*
adenocarcinoma	1 (33%)	2 (67%)	
Adenoma	2 (5%)	37 (98%)	
pólipo hiperplásico	0 (0%)	11 (100%)	

* Teste Exato de Fisher

** Câncer Colorretal Familiar

O resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da proteína COX-2 no citoplasma das células do epitélio e a localização e histopatologia das lesões. Entretanto houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão desta proteína e a classificação da história familiar e o

tamanho das lesões. Dos pacientes que preenchiam Critérios de Amsterdam e Bethesda, 100% apresentaram expressão moderada e intensa de COX-2 epitelial, e 79% dos pacientes que preenchiam Critérios para Câncer Colorretal Familiar apresentaram esta expressão. Pode-se notar através da tabela que houve uma diminuição progressiva da porcentagem de lesões que apresentaram expressão moderada e intensa de COX-2 epitelial à medida que o tamanho delas aumentou.

Tabela 22 - Análise da associação entre a proteína COX-2 estromal e variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

Variáveis	Expressão da proteína COX-2 estromal		Valor de p
	Negativa/Fraca	Moderada/intensa	
Classificação familiar			0,567*
Amsterdam	28 (93%)	2 (7%)	
CCF**	14 (100%)	0 (0%)	
Bethesda	8 (89%)	1 (11%)	
Localização			0,610*
Proximal	26 (96%)	1 (4%)	
Distal	24 (92%)	2 (8%)	
Tamanho			0,737*
≤ 5 mm	31 (91%)	3 (9%)	
6 a 10 mm	11 (100%)	0 (0%)	
≥ 11 mm	8 (100%)	0 (0%)	
Histopatologia			1,000*
adenocarcinoma	3 (100%)	0 (0%)	
Adenoma	36 (92%)	3 (8%)	
pólipo hiperplásico	11 (100%)	0 (0%)	

* Teste Exato de Fisher

** Câncer Colorretal Familiar

O resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da proteína COX-2 no citoplasma das células do estroma e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

Tabela 23 – Análise da associação entre a proteína β -catenina nuclear e variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

Variáveis	Expressão da proteína β -catenina nuclear		Valor de p
	Negativa/Fraca	Moderada/intensa	
Classificação familiar			0,238*
Amsterdam	29 (97%)	1 (3%)	
CCF**	12 (86%)	2 (14%)	
Bethesda	9 (100%)	0 (0%)	
Localização			1,000*
Proximal	25 (93%)	2 (7%)	
Distal	25 (96%)	1 (4%)	
Tamanho			0,481*
≤ 5 mm	32 (94%)	2 (6%)	
6 a 10 mm	11 (100%)	0 (0%)	
≥ 11 mm	7 (88%)	1 (12%)	
Histopatologia			0,262*
adenocarcinoma	2 (67%)	1 (33%)	
Adenoma	37 (95%)	2 (5%)	
pólipo hiperplásico	11 (100%)	0 (0%)	

* Teste Exato de Fisher

** Câncer Colorretal Familiar

O resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da proteína β -catenina nuclear e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões. Entretanto pode-se observar que 100% dos pólipos hiperplásicos apresentaram expressão negativa de β -catenina nuclear e quase a totalidade dos adenomas (95%) também apresentaram expressão negativa e fraca desta proteína. Contudo, um terço dos adenocarcinomas apresentou expressão moderada a intensa de β -catenina no núcleo celular.

Tabela 24 - Análise da associação entre a proteína β -catenina citoplasmática e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

Variáveis	Expressão da proteína β -catenina citoplasmática		Valor de p
	Negativa/Fraca	Moderada/intensa	
Classificação familiar			0,189**
Amsterdam	10 (33%)	20 (67%)	
CCF***	5 (36%)	9 (64%)	
Bethesda	6 (67%)	3 (33%)	
Localização			0,340**
Proximal	9 (33%)	18 (67%)	
Distal	12 (46%)	14 (54%)	
Tamanho			0,664*
≤ 5 mm	15 (44%)	19 (56%)	
6 a 10 mm	4 (36%)	7 (64%)	
≥ 11 mm	2 (25%)	6 (75%)	
Histopatologia			<0,001*
adenocarcinoma	1 (33%)	2 (67%)	
Adenoma	9 (23%)	30 (77%)	
Pólipo hiperplásico	11 (100%)	0 (0%)	

* Teste Exato de Fisher

** Teste do Qui-quadrado

*** Câncer Colorretal Familiar

O resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da proteína β -catenina citoplasmática e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões, exceto pela histopatologia. Todos os pólipos hiperplásicos apresentaram expressão negativa ou fraca de β -catenina citoplasmática enquanto que, a maioria dos adenomas (77%) e dos adenocarcinomas (67%) apresentou expressão moderada ou intensa desta proteína.

Tabela 25 – Análise da associação entre a proteína β -catenina na membrana e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

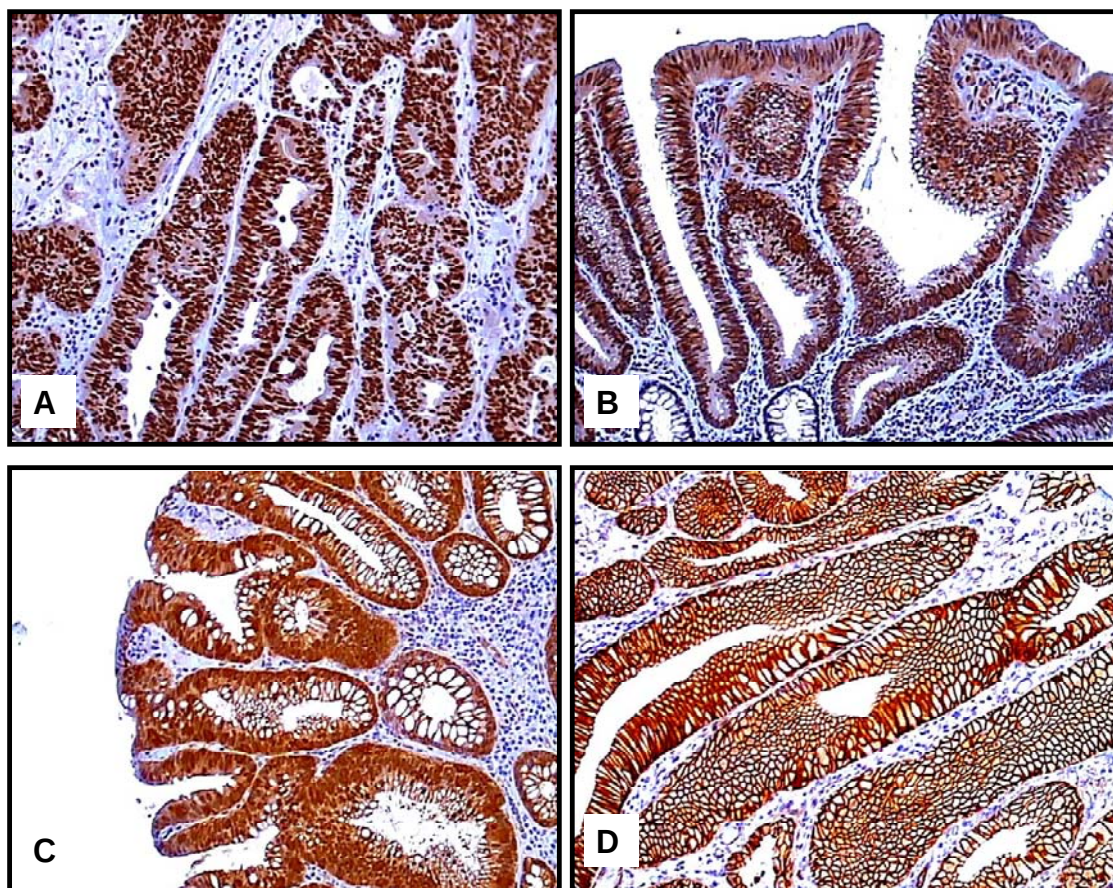
Variáveis	Expressão da proteína β -catenina na membrana		Valor de p
	Negativa/Fraca	Moderada/intensa	
Classificação familiar			0,684*
Amsterdam	1 (3%)	29 (97%)	
CCF**	1 (7%)	13 (93%)	
Bethesda	0 (0%)	9 (100%)	
Localização			0,491*
Proximal	2 (7%)	25 (93%)	
Distal	0 (0%)	26 (100%)	
Tamanho			1,000*
≤ 5 mm	2 (6%)	32 (94%)	
6 a 10 mm	0 (0%)	11 (100%)	
≥ 11 mm	0 (0%)	8 (100%)	
Histopatologia			1,000*
adenocarcinoma	0 (0%)	3 (100%)	
Adenoma	2 (5%)	37 (95%)	
Hiperplásico	0 (0%)	11 (100%)	

* Teste Exato de Fisher

** Câncer Colorretal Familiar

O resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da proteína β -catenina na membrana celular e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

A Figura 4 representa casos em que houve expressão intensa de p53 e β -catenina.



Legenda: **A** – Adenocarcinoma com positividade para p53, aumento de 20X. **B** – Adenoma com positividade para p53, aumento de 20X. **C** – Adenoma com positividade citoplasmática e nuclear para β -catenina, aumento de 20X. **D** – Adenoma com positividade em membrana para β -catenina, aumento de 20X.

Figura 4 - Fotomicrografia demonstrando casos com expressão protéica intensa de p53 e β -catenina à imunoistoquímica.

5.3 PIROSSEQUENCIAMENTO DE *KRAS* E *BRAF*

Foram avaliadas mutações no códon 600 do gene *BRAF* e códon 12 e 13 do gene *KRAS* pela técnica de pirosequenciamento. Conseguimos DNA em quantidade e qualidade suficientes para o pirosequenciamento somente de 23 lesões. As análises seguintes se referem então, a estas 23 lesões.

A Tabela 26 mostra a frequência de mutações do gene *KRAS* identificadas através do pirosequenciamento.

Tabela 26 – Frequência de mutações do gene *KRAS* identificadas através do pirosequenciamento.

	N	%
Não mutado	14	61
Mutado	9	39
Total	23	100

A Tabela 27 mostra a frequência de mutações dos códons 12 e 13 do gene *KRAS* identificadas através do pirosequenciamento.

Tabela 27 – Frequência de mutações do gene *KRAS* identificadas através do pirosequenciamento.

	N	%
Códon 12	6	67
Códon 13	2	22
Códon 12 e 13	1	11
Total	9	100

A Tabela 28 mostra a frequência de mutações do gene *BRAF* identificadas através do pirosequenciamento.

Tabela 28 – Frequência de mutações do gene *BRAF* identificadas através do pirosequenciamento.

	N	%
Não mutado	15	65
Mutado	8	35
Total	23	100

Ao analisar os dados nota-se que, por exceção de um caso em que o pirosequenciamento demonstrou mutação em ambos os genes *KRAS* e *BRAF*, em todos os outros casos as mutações foram excludentes entre si. Isto é, quando houve mutação de um dos genes o outro não se mostrou mutado. O mesmo caso que apresentou mutação dos dois genes apresentou também mutação nos dois códon (12 e 13) do gene *KRAS*.

A Tabela 29 mostra a associação entre a mutação do gene *KRAS* e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

Tabela 29 – Análise da associação entre a mutação do gene *KRAS* e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

Variáveis	Pirosequenciamento do gene <i>KRAS</i>		Valor de p
	Não Mutado	Mutado	
Classificação familiar			0,556*
Amsterdam	8 (67%)	3 (33%)	
CCF**	4 (57%)	3 (43%)	
Bethesda	2 (40%)	3 (60%)	
Localização			0,179*
Proximal	3 (38%)	5 (62%)	
Distal	11 (73%)	4 (27%)	
Tamanho			0,556*
≤ 5 mm	8 (73%)	3 (27%)	
6 a 10 mm	3 (43%)	4 (57%)	
≥ 11 mm	3 (60%)	2 (40%)	
Histopatologia			1,000*
adenocarcinoma	1 (50%)	1 (50%)	
Adenoma	8 (62%)	5 (38%)	
Pólipo hiperplásico	5 (63%)	3 (37%)	
IHQ proteínas de reparo			1,000*
sem alteração	12 (60%)	8 (40%)	
com alteração	2 (67%)	1 (33%)	

* Teste Exato de Fisher

** Câncer Colorretal Familiar

O resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de mutação do gene *KRAS* e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões. Ao analisar separadamente as mutações nos códons 12 e 13 do gene *KRAS* também não houve nenhuma associação estatisticamente significativa com as variáveis estudadas.

A Tabela 30 mostra a associação entre a mutação do gene *BRAF* e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

Tabela 30 – Análise da associação entre a mutação do gene *BRAF* e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

Variáveis	Pirosequenciamento do gene <i>BRAF</i>		Valor de p
	Não Mutado	Mutado	
Classificação familiar			0,283*
Amsterdam	9 (75%)	3 (15%)	
CCF **	4 (57%)	3 (43%)	
Bethesda	2 (40%)	3 (60%)	
Localização			0,176*
Proximal	7 (88%)	1 (2%)	
Distal	8 (53%)	7 (47%)	
Tamanho			0,203*
≤ 5 mm	5 (45%)	6 (55%)	
6 a 10 mm	6 (86%)	1 (14%)	
≥ 11 mm	4 (80%)	1 (20%)	
Histopatologia			0,014*
adenocarcinoma	2 (100%)	0 (0%)	
Adenoma	11 (89%)	2 (11%)	
pólipo hiperplásico	2 (20%)	6 (80%)	
IHQ proteínas de reparo			0,526*
sem alteração	12 (63%)	8 (37%)	
com alteração	3 (100%)	0 (0%)	

* Teste Exato de Fisher

** Câncer Colorretal Familiar

O resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de mutação no gene *BRAF* e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões, com exceção da histopatologia. Analisando-se os resultados observamos que nenhum paciente que apresentou perda de expressão das proteínas de reparo do DNA à imunoistoquímica apresentou mutação no gene *BRAF*. Todos os adenocarcinomas e a maioria dos adenomas (89%) não apresentaram mutação no gene *BRAF*, entretanto 80% dos pólipos hiperplásicos apresentaram mutação neste gene.

Para confirmação dos resultados do pirosequenciamento a Dra Renata Coudry gentilmente, realizou o sequenciamento de Sanger dos genes *KRAS* e *BRAF* nas lesões no laboratório Fleury. Das 23 lesões avaliadas, quatro demonstraram resultados divergentes entre o pirosequenciamento e o sequenciamento direto. Um caso não mostrou mutação do gene *BRAF* no pirosequenciamento, mas mostrou mutação no sequenciamento direto. Dois casos apresentaram mutação do gene *KRAS* no pirosequenciamento, porém não mostraram mutação ao sequenciamento direto. Um caso não mostrou mutação do gene *KRAS* no pirosequenciamento, mas mostrou mutação ao sequenciamento direto. Para a análise estatística foram utilizados os resultados do pirosequenciamento.

6 DISCUSSÃO

HIRATA et al. (2007) demonstraram que microvasos invisíveis ao NBI correspondem a lesões hiperplásicas e microvasos finos e regulares correspondem a adenomas. Demonstraram também que microvasos grossos e muito irregulares ao NBI correspondem a adenocarcinomas com invasão maciça da submucosa com uma acurácia de 100%.

Em 2008a, EAST et al. publicaram uma metanálise de 11 estudos que compararam o diagnóstico de neoplasias baseado no NBI com a histopatologia, considerada padrão-ouro. Esta metanálise englobou 582 pacientes e 1108 lesões. Os autores demonstraram uma sensibilidade global do NBI de 94% e uma especificidade de 83%, concluindo que este é um método acurado e de alta precisão para o diagnóstico de neoplasia *in vivo* (EAST et al. 2008b). No nosso estudo a colonoscopia com NBI apresentou uma sensibilidade de 93%, uma especificidade de 83%, valores muito semelhantes aos obtidos nesta metanálise.

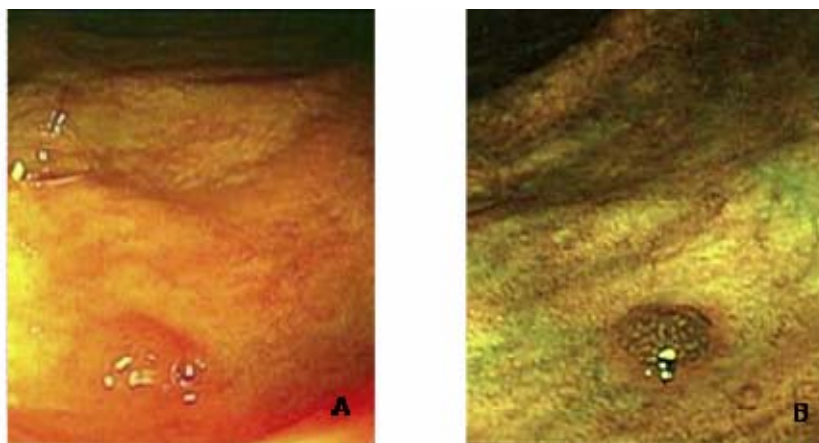
A colonoscopia convencional é considerada padrão-ouro para a detecção de pólipos adenomatosos. Entretanto, uma revisão sistemática de estudos publicados com colonoscopias *back-to-back*, isto é, pacientes submetidos a duas colonoscopias seguidas, demonstrou uma taxa de perda de adenomas de 22% (VAN RIJN et al. 2006).

Estudos demonstraram que a cromoendoscopia pan-colônica com índigo carmim aumentou significativamente a detecção de adenomas em pacientes com SL, e que esta técnica pode ser útil na prevenção de CCR em pacientes com risco elevado

(HURLSTONE et al. 2005; LECOMTE et al. 2005). Entretanto este é um método laborioso e demorado, o que o torna pouco prático para uso rotineiro, sendo pouco adotado nos países ocidentais.

EAST et al. (2008a) realizaram colonoscopia com NBI no seguimento de 62 pacientes com SL (critérios de Amsterdam ou diagnóstico genético) e demonstraram que o uso do NBI no cólon proximal aumentou significativamente a detecção de lesões, principalmente daquelas com morfologia plana. No presente estudo o NBI apresentou uma taxa de detecção de lesões de 0,87 por paciente. Este resultado foi idêntico ao do estudo de East, onde os colonoscopistas eram todos experientes.

A transição adenoma-carcinoma é acelerada na SL. Estudos observacionais têm demonstrado a identificação de câncer, em pacientes portadores de SL, em intervalos menores que dois anos após uma colonoscopia sem lesões pré-neoplásicas (câncer de intervalo) (VASEN et al. 1995; VASEN et al. 2010). Estes cânceres de intervalo se devem, em grande parte, a adenomas não identificados (perdidos) durante a colonoscopia. Desta forma, se o NBI pode facilitar a identificação de lesões planas e diminutas, diminuindo a taxa de perda de lesões na colonoscopia, sugerimos que ele também possa melhorar a efetividade deste exame na prevenção do câncer na vigilância de pacientes com SL. A Figura 5 representa duas fotografias de um mesmo adenoma de 3 mm, com visão à luz branca e com visão ao NBI, demonstrando como o NBI facilita a identificação de lesões diminutas durante o exame colonoscópico.



Legenda: **A** – Visão com luz branca. **B** – Visão com NBI.

Figura 5 - Fotografias de um adenoma de 3 mm à colonoscopia.

Está bem documentada a predileção dos tumores da SL pelo cólon direito. Entretanto a literatura não é consistente quanto à localização preferencial dos adenomas no cólon direito na síndrome, variando de 27 a 70% (RIJCKEN et al. 2002). No nosso estudo os adenomas apresentaram distribuição uniforme entre o cólon proximal e distal.

Sessenta por cento das lesões encontradas no presente estudo eram adenomas tubulares com displasia de baixo grau e 67% eram menores ou iguais a 5 mm. As características das lesões encontradas no nosso estudo contradizem os dados da literatura que demonstram que os adenomas da SL são maiores, apresentam arquitetura vilosa e alto grau de displasia (DE JONG et al. 2004a). Entretanto um estudo que comparou 100 pólipos de portadores de SL com 152 pólipos esporádicos demonstrou que aqueles da SL eram menores e mais frequentemente tubulares que os esporádicos, mas que possuíam grau de displasia semelhante. Este estudo também demonstrou que apesar da distribuição uniforme dos adenomas na SL (50% localizados no cólon proximal), aqueles com alto grau de displasia se localizavam mais frequentemente no cólon proximal (55%) do que os esporádicos (15%). Os

adenomas do cólon proximal eram menores na SL, entretanto mais frequentemente com alto grau de displasia que os esporádicos (36% *versus* 13%). Baseados nestes resultados, os autores sugerem que os adenomas da SL localizados no cólon proximal são mais propensos a transformação maligna que aqueles localizados no cólon distal (RIJCKEN et al. 2002). Uma possível explicação para nossos achados é que todos os pacientes foram submetidos à colonoscopias para rastreamento/seguimento e, portanto eram assintomáticos. Contudo, não podemos excluir a hipótese que nossos exames tenham sido realizados com atenção especial pelo fato dos pacientes serem de alto risco. Desta forma estes exames podem ter identificado lesões mais precoces.

Em indivíduos com câncer e suspeitos de serem portadores de SL, a pesquisa de MSI e/ou imunoistoquímica das proteínas de reparo deve ser realizada em tecido tumoral, e em casos positivos, prosseguir com o sequenciamento genético. Idealmente, o diagnóstico da SL deveria ser feito antes da ocorrência de tumores invasivos. Desta forma, o paciente pode ser inserido em um programa rigoroso de vigilância, prevenindo-se o câncer. Como o reconhecimento da SL vem aumentando, vários indivíduos sob risco e pré-sintomáticos procuram aconselhamento genético. Em famílias com mutação identificada, o sequenciamento genético permite a identificação de portadores e não portadores. Entretanto, frequentemente nos deparamos com adenomas sendo o único tecido neoplásico disponível para testes em famílias com mutação ainda não identificada. Desta forma, a análise destes pólipos é uma alternativa interessante para o diagnóstico molecular da SL.

Nos critérios de Bethesda originais recomendava-se a pesquisa de MSI em adenomas identificados em pacientes com menos de 40 anos, independente de outros fatores de risco, na expectativa de que a adoção desta recomendação pudesse levar ao

diagnóstico de SL, antes da ocorrência do câncer. Em sua última revisão, este item foi removido dos critérios de Bethesda, provavelmente pela escassez de informações sobre o valor e a utilidade desta recomendação como ferramenta para identificar novos casos de SL. Entretanto, pesquisas nesta área foram propostas como prioridade pelo comitê que revisou os critérios (UMAR et al. 2004).

Nos tumores colorretais da SL, a frequência de MSI é de 80 a 95%, enquanto que nos CCR esporádicos é de 10 a 15%. Os adenomas de pacientes com SL frequentemente apresentam MSI. AALTONEN et al. (1994) encontraram MSI em 57% dos adenomas de pacientes portadores de SL. LOUKOLA et al. (1999) encontraram mutação germinativa em um dos genes de reparo do DNA em cinco de seis pacientes (83%) que apresentavam MSI em adenomas, demonstrando assim alta especificidade deste teste em adenomas. FERREIRA et al. (2008) encontraram MSI em adenomas de sete pacientes jovens que preenchiam os critérios de Amsterdam, sendo que seis (86%) destes pacientes eram portadores de mutação germinativa em um dos genes de reparo do DNA. IINO et al. (2000) demonstraram que 80% dos adenomas de pacientes com diagnóstico clínico ou genético de SL apresentaram MSI-H (67%) ou MSI-L (33%). Entretanto, apenas 0 a 3% dos adenomas esporádicos apresentam MSI. O MSI é um evento precoce na SL e usualmente tardio nos casos esporádicos (AALTONEN et al. 1994; KONISHI et al. 1996; SAMOWITZ e SLATTERY 1997).

DE JONG et al. (2004a) demonstraram que a deficiência do mecanismo de reparo do DNA está envolvida no desenvolvimento inicial dos adenomas na SL, através da imunoistoquímica das proteínas de reparo, sugerindo que a inativação bialélica dos genes de reparo é um evento precoce no processo tumorigênico da SL.

Dos 31 adenomas diagnosticados em 22 indivíduos sabidamente portadores de mutação germinativa em um dos genes de reparo do DNA, 23 (74%) apresentaram perda da expressão de pelo menos uma das proteínas de reparo à imunoistoquímica. Neste estudo, adenomas grandes (≥ 7 mm) e com alto grau de displasia apresentaram ausência de expressão protéica com maior frequência do que adenomas pequenos (< 7 mm) e com baixo grau de displasia. Os autores sugerem que a imunoistoquímica seja realizada em adenomas grandes e com alto grau de displasia, identificados em pacientes jovens, no auxílio à identificação de pacientes com SL.

MÜLLER et al. (2006) demonstraram que 82% dos adenomas de pacientes com diagnóstico de SL apresentaram MSI-H e/ou perda de expressão de pelo menos uma proteína de reparo do DNA. Dos 71 adenomas estudados, todos aqueles que eram contíguos ou se localizavam a menos de 5 cm de distância de um adenocarcinoma possuíam MSI-H e/ou perda de expressão protéica. Entretanto, daqueles que se localizavam a mais de 5 cm de um adenocarcinoma ou eram metacrônicos, apenas 77% apresentaram MSI-H e/ou perda de expressão protéica. Estes achados indicam que a deficiência do mecanismo de reparo do DNA é um evento precoce na carcinogênese de tumores da SL, porém a expressão de todas as proteínas de reparo ou a ausência de MSI em adenomas de pacientes com suspeita clínica de SL não deve excluí-lo de um programa de vigilância intensivo.

Recentemente, PINO et al. (2009) estudaram 40 adenomas em 15 pacientes portadores de mutação germinativa em um dos genes de reparo do DNA. Demonstraram que MSI, ausência de expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo, ou ambos, se correlacionaram com a presença de mutação em 58, 70 e 73% respectivamente. Neste estudo a sensibilidade da imunoistoquímica foi superior a

análise de MSI, sugerindo que a deficiência protéica pode ocorrer antes do desenvolvimento de MSI, que requer múltiplas divisões celulares para se manifestar. A imunoistoquímica identificou 100% das mutações de *MLH1* e apenas 57% das mutações em *MSH2*, consistente com o fenótipo atenuado observado em famílias portadoras de mutação em *MSH2*. A perda de expressão protéica e MSI ocorreram em maior frequência em adenomas maiores que 5 mm. Os autores também estudaram cinco pólipos hiperplásicos encontrados nestes pacientes e nenhum deles apresentou perda de expressão protéica ou MSI, demonstrando que estes pólipos não possuem um papel significativo na patogênese de tumores na SL.

HALVARSSON et al. (2005) estudaram 35 adenomas de 26 pacientes com SL (diagnóstico clínico ou genético) e encontraram perda de expressão de proteínas de reparo do DNA em 66% dos adenomas. Quando agrupados por tamanho houve perda de expressão em 88% dos adenomas maiores que 5 mm e em 47% daqueles que mediam até 5 mm. Dos adenomas proximais, 87% apresentaram perda de expressão comparado com apenas 50% dos adenomas distais. Todos os pólipos hiperplásicos estudados (12) apresentaram expressão protéica preservada. Os autores concluíram que a imunoistoquímica para as proteínas de reparo do DNA em adenomas tem alta especificidade e pode direcionar o sequenciamento do gene afetado.

IINO et al. (2000) demonstraram perda de expressão protéica de *MLH1* ou *MSH2* em 75% de 24 adenomas de pacientes com diagnóstico clínico ou genético de SL.

No presente estudo, 24% dos pacientes avaliados apresentaram perda de expressão de proteínas de reparo do DNA à imunoistoquímica. Todas as perdas de

expressão protéica se referiam ao dímero MSH2/MSH6. Todos os pacientes com perda de expressão protéica, ou um de seus parentes de primeiro grau, possuíam mutação germinativa em um dos genes de reparo do DNA. A perda de expressão do dímero MSH2/MSH6 coincidiu em todos os casos com mutação germinativa do gene *MSH2*. Nenhum pólipó hiperplásico apresentou perda de expressão das proteínas de reparo à imunoistoquímica, corroborando com estudos que sugerem que estas lesões não têm um papel significativo na patogênese do câncer colorretal na SL. RIJCKEN et al. (2003) estudaram 90 pólipos hiperplásicos de pacientes com suspeita de SL e nenhum deles apresentou perda de expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo do DNA.

No presente estudo, 71% das lesões que apresentaram perda de expressão de proteínas de reparo se localizavam no cólon proximal. Entretanto, não houve associação estatisticamente significativa entre a localização das lesões e a presença de alteração imunoistoquímica. Este resultado se deve provavelmente, ao pequeno tamanho da amostra. Contudo, sugerimos que apesar da predileção dos tumores da SL pelo cólon proximal, os adenomas localizados no cólon distal também possuem potencial de malignização.

Neste estudo, as lesões com perda de expressão de proteínas de reparo se distribuíram uniformemente em relação ao tamanho: duas pequenas (≤ 5 mm), duas médias (de 6 a 10 mm) e três grandes (> 10 mm). Entretanto, em revisão de literatura, alguns estudos dividiram os pólipos em apenas duas categorias: pequenos (≤ 5 mm ou < 7 mm) e grandes (> 5 mm ou ≥ 7 mm) e nestes casos obtiveram associação estatisticamente significativa entre o tamanho do pólipo e a ausência de expressão protéica. Se no nosso estudo, agruparmos os pólipos médios e grandes em

apenas uma categoria, obteremos então, uma associação significativa ($p = 0,049$) entre tamanho e alteração imunoistoquímica. Concluimos assim que, quanto mais avançados os pólipos, maiores as chances de encontrarmos alterações à imunoistoquímica, entretanto a perda de expressão protéica pode ocorrer em pólipos diminutos e estes não devem ser descartados da análise no rastreamento da SL.

Sugerimos algumas explicações para a imperfeição da imunoistoquímica em demonstrar a deficiência do mecanismo de reparo do DNA nos adenomas:

1- Nos pacientes portadores de mutação podem ocorrer adenomas devido à deficiência do mecanismo de reparo do DNA assim como adenomas esporádicos que não exibem MSI ou perda de expressão das proteínas de reparo.

2- A mutação no gene de reparo causadora da síndrome (mutações *missense* ou inserção/deleção *in-frame*) pode resultar em expressão de uma proteína não funcionante, mas antigenicamente intacta, que ainda pode ser detectada pelo anticorpo usado na imunoistoquímica. Estes tipos de mutações são comuns no gene *MLH1*, entretanto à imunoistoquímica teremos a presença de expressão de *MLH1*, com ausência de expressão de *PMS2*. DE JONG et al. (2004b) realizaram um estudo onde a ausência de expressão de *PMS2* detectou 23% dos tumores com mutação no gene *MLH1* que não foram detectadas pela imunoistoquímica de *MLH1*.

3- Os adenomas que expressam as proteínas poderiam apresentar sua ausência mais tardiamente com a sua progressão (aumento de tamanho e do grau de displasia).

4- A deficiência de reparo do DNA não seria responsável pela iniciação do adenoma, mas determinaria a progressão subsequente da lesão. Esta deficiência não

é o primeiro evento a ocorrer, mas certamente é precoce na tumorigênese das lesões da SL, e leva a progressão para displasia de alto grau.

A MSI pode identificar tumores com deficiência no mecanismo de reparo do DNA, mas que possuem expressão protéica preservada devido a mutações *missense* ou mutações em outros genes de reparo não incluídos no painel imunoistoquímico ou ainda não conhecidos.

MSI pode ocorrer em 10 a 15 % dos tumores esporádicos devido à hipermetilação de *MLH1*, portanto não é específico de tumores da SL. Entretanto vimos anteriormente que a MSI é um evento mais precoce, e ocorre mais frequentemente nos adenomas da SL do que nos adenomas esporádicos. Por outro lado, a imunoistoquímica também não tem a capacidade de diferenciar entre a ausência de expressão protéica de *MLH1* por mutação germinativa ou por hipermetilação do promotor deste gene. Neste caso, outros testes como pesquisa de mutação no gene *BRAF* e determinação do *status* de metilação do gene *MLH1* são necessários para evitar o sequenciamento desnecessário de *MLH1*, que é caro e demorado.

Tumores com mutação germinativa no gene *MSH6* podem não apresentar MSI-H devido à redundância da função das proteínas MSH6 e MSH3. O heterodímero MSH2/MSH6 (MutS α) reconhece erros de pareamento base-base e de inserção-deleção de *loops*, enquanto MSH2/MSH3 (MutS β) reconhece principalmente erros de inserção-deleção maiores que um nucleotídeo. Portanto, quando *MSH6* está mutado, e o dímero MSH2/MSH3 está funcionando, a instabilidade pode estar restrita a repetições de mononucleotídeos e assim os testes resultarem em MSI-L ou MSS. Entretanto, *MSH6* também pode apresentar mutações

missense, com antigenicidade protéica preservada e expressa à imunoistoquímica (ZHANG 2008).

Concluímos que a MSI e a imunoistoquímica são complementares entre si no rastreamento de pacientes com SL. Ambos os testes podem não identificar casos que são identificados pelo outro, e a imunoistoquímica pode direcionar o sequenciamento específico do gene afetado. O uso dos dois testes aumenta a sensibilidade na detecção da SL. É importante o reconhecimento das vantagens e limitações de cada técnica para uma interpretação adequada dos resultados.

Por muitas décadas acreditou-se que o CCR fosse uma entidade homogênea. Porém, tem sido demonstrado que ele se origina de múltiplas vias de carcinogênese. Estas vias moleculares são determinadas em um estágio precoce e são completamente estabelecidas em lesões pré-malignas (JASS 2007) (vide item 1.11). No presente estudo avaliamos a expressão imunoistoquímica de p53, COX-2 e β -catenina nas lesões ressecadas durante o exame colonoscópico de pacientes com diagnóstico ou suspeita de SL. Estas proteínas estão relacionadas com a via clássica de carcinogênese adenoma-carcinoma (tipo 4). No entanto, os tumores da SL se originam de uma via molecular distinta (tipo 5). Desta forma, procuramos avaliar a contribuição destes marcadores na carcinogênese da SL.

SHANMUGAM et al. (2008) avaliaram o acúmulo nuclear de p53 através de sua expressão imunoistoquímica em 90 tumores colorretais e seus componentes adenomatosos contíguos. Os autores demonstraram que a expressão de p53 estava significativamente aumentada em tumores (39%) e adenomas contíguos aos tumores (14%) quando comparados à mucosa normal (0). Todos os casos de adenomas contíguos a tumores que expressaram p53 também expressavam a proteína em seus

tumores. Este achado sugere que um adenoma que exhibe p53 é mais propenso à transformação maligna. Os pacientes que expressaram p53 em seus tumores e adenomas contíguos aos tumores apresentaram sobrevida mediana significativamente menor que aqueles que não expressavam esta proteína (35.9 X 80.5 meses). Este achado está em concordância com outros estudos que demonstram que a expressão imunoistoquímica anormal de p53 é marcador de prognóstico desfavorável do CCR.

KAKLAMANIS et al. (1993) demonstraram a expressão proteica de p53 em 19 (26%) do total de 72 adenomas colorretais esporádicos avaliados por imunoistoquímica, e na maioria dos casos o foco de positividade ocorreu nas áreas mais displásicas, porém também ocorreu em glândulas histologicamente normais. Os autores sugerem que a expressão de p53 pode ser um método para a detecção de células com uma vantagem de crescimento durante o processo neoplásico em adenomas.

LESLIE et al. (2006) demonstraram mutações em p53 em apenas 4% dos 78 adenomas estudados por sequenciamento direto.

Em nosso estudo a maioria dos adenomas e adenocarcinomas (92 e 67% respectivamente) apresentaram expressão moderada a intensa de p53, enquanto que 100% dos pólipos hiperplásicos apresentou expressão negativa desta proteína na área de diferenciação/maturação (nestes pólipos houve expressão de p53 apenas na área proliferativa, o que é considerado como expressão normal).

No nosso estudo houve uma associação estatisticamente significativa e inversa entre a expressão de COX-2 e o tamanho das lesões colorretais. Além disto, 67% dos adenocarcinomas, 98% dos adenomas e 100% dos pólipos hiperplásicos apresentaram expressão moderada a intensa de COX-2 no epitélio. Esta diferença

não alcançou significado estatístico, porém estes resultados foram o inverso dos encontrados em outros estudos, e não encontramos na literatura uma explicação para este resultado. MCLEAN et al. (2008) avaliaram a expressão de COX-2 em 64 adenomas esporádicos e em 40 pólipos hiperplásicos. Os autores observaram um aumento da expressão de COX-2 com o aumento do tamanho e do grau de displasia dos adenomas. Dos pólipos hiperplásicos estudados, 55% apresentaram expressão de COX-2. KAWASAKI et al. (2008) demonstraram que a hiperexpressão de COX-2 é infrequente em pólipos hiperplásicos (4,2% de expressão intensa à imunohistoquímica), quando comparados com adenomas (28% de expressão intensa) e adenocarcinomas (65% de expressão intensa). À medida que houve progressão do grau de displasia das lesões, houve um aumento da frequência de hiperexpressão de COX-2, demonstrando uma correlação positiva entre expressão de COX-2 e grau de displasia em adenomas. PISANO et al. (2005) demonstraram que, tanto a expressão epitelial quanto a expressão estromal de COX-2 foi maior em pólipos grandes (>4 mm) do que em pólipos pequenos (< ou =4 mm). Outro estudo demonstrou um aumento acentuado nos níveis de RNA mensageiro de COX-2 (*Northern blot analysis*) em 86% dos adenocarcinomas e 50% dos adenomas colorretais comparados com a mucosa normal (EBERHART et al. 1994).

Na maioria dos CCR esporádicos, o evento iniciador do câncer é representado por mutações inativadoras do gene *APC*. A perda da função de APC leva a estabilização citoplasmática de β -catenina e sua translocação para o núcleo, onde ela se liga a fatores de transcrição promovendo a proliferação e diferenciação celular.

No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da proteína β -catenina nuclear e as variáveis clínicas e anatomopatológicas

das lesões. Entretanto pode-se observar que 100% dos pólipos hiperplásicos apresentaram expressão negativa de β -catenina nuclear e quase a totalidade dos adenomas (95%) também apresentaram expressão negativa e fraca desta proteína. Contudo, um terço dos adenocarcinomas apresentou expressão moderada a intensa de β -catenina no núcleo celular. Esta baixa expressão de β -catenina no núcleo dos adenomas sugere que alterações na via Wnt não ocorram tão precocemente na SL como ocorre nos CCRs esporádicos.

Todos os pólipos hiperplásicos apresentaram expressão negativa ou fraca de β -catenina citoplasmática enquanto que, a maioria dos adenomas (77%) e dos adenocarcinomas (67%) apresentou expressão moderada ou intensa desta proteína no citoplasma celular. Nosso resultado mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da proteína β -catenina na membrana celular e as variáveis clínicas e anatomopatológicas das lesões.

Alterações em outros componentes da via Wnt, principalmente a mutação ativadora do gene *CTNNB1* (codifica para β -catenina), podem substituir as mutações do gene *APC*. O gene *CTNNB1* está algumas vezes mutado em CCRs MSI-H. Na maioria das vezes, esta mutação está limitada a tumores da SL e raramente detectada em tumores MSI-H esporádicos (JASS 2007). Nosso estudo demonstrou expressão moderada/intensa de β -catenina no núcleo de um terço dos adenocarcinomas, e no citoplasma da maioria dos adenomas e adenocarcinomas. Nos tumores MSI-H esporádicos, a β -catenina apresenta um padrão de distribuição normal ao longo das membranas celulares laterais à imunoistoquímica, enquanto a translocação aberrante para o núcleo é infrequente (JASS 2007). Um estudo japonês demonstrou que mutações do gene *CTNNB1* foi negativamente associado à mutação no gene *BRAF* e

a metilação do gene *MLH1*, que são as alterações genéticas características dos CCRs MSI-H esporádicos (KOINUMA et al. 2004).

Cerca de 15% dos CCRs esporádicos se originam de pólipos serreados, através da via de carcinogênese serreada, onde há inativação do gene *MLH1* por metilação de seu promotor, MSI-H e mutação no gene *BRAF* (BOLAND et al. 2008). Recentemente, um estudo avaliou 17 pólipos esporádicos e demonstrou que mutações nos genes *KRAS* e *BRAF* são excludentes entre si e ocorrem na maioria (64%) destas lesões pré-malignas. Mutações no gene *KRAS* (códon 12 e 13) ocorreram em 35% e no gene *BRAF* (V600E) em 29% dos pólipos. Todos os pólipos com mutação no gene *BRAF* apresentaram arquitetura serreada, sustentando a idéia que a ativação do gene *BRAF* é o eixo da via de carcinogênese serreada. Nenhum pólipo demonstrou MSI ou metilação do gene *MLH1*, demonstrando que a mutação no gene *BRAF* precede estas alterações (VELHO et al. 2008).

LESLIE et al. (2006) demonstraram mutações no gene *KRAS* em 27% dos 78 adenomas esporádicos estudados por sequenciamento direto. OLIVEIRA et al. (2004) encontraram mutação no gene *KRAS* em 40% dos 158 tumores de pacientes com SL estudados (portadores de mutação germinativa em um dos genes de reparo do DNA).

No presente estudo foram encontradas mutações no gene *KRAS* em 39% dos casos e no gene *BRAF* em 35% dos casos avaliados. Em todos os casos as mutações foram excludentes entre si, com exceção de um caso em que o pirosequenciamento demonstrou mutação em ambos os genes. Este mesmo caso foi o único que apresentou mutação nos dois códon avaliados do gene *KRAS* (12 e 13).

Foi observado que as mutações no códon 12 são mais comuns em casos esporádicos enquanto as mutações no códon 13 predominam na SL (OLIVEIRA et al. 2004). Entretanto, no nosso estudo, das mutações encontradas no gene *KRAS*, 67% se localizavam no códon 12, 22 % no códon 13 e em um caso foram encontradas mutações em ambos os códons. Apenas um paciente com perda de expressão protéica à imunoistoquímica apresentou mutação no gene *KRAS* e esta se localizava no códon 12.

Em nosso estudo, podemos observar que nenhum paciente que apresentou perda de expressão protéica à imunoistoquímica apresentou mutação no gene *BRAF*. Este resultado está de acordo com a literatura que demonstra que mutações no gene *BRAF* nunca acontecem na SL e, portanto a pesquisa da mutação V600E neste gene é um método efetivo e de baixo custo para simplificar o diagnóstico genético da SL (DENG et al. 2004; DOMINGO et al. 2004, 2005; ROBINSON et al. 2007; BOLAND et al. 2009). Portanto, apesar de pequena a nossa amostra, pudemos demonstrar que esta estratégia também é factível de ser realizada em adenomas, quando este é o único tecido neoplásico disponível em pacientes suspeitos, sendo útil no diagnóstico diferencial entre a SL e os casos esporádicos com MSI-H e metilação do promotor do gene *MLH1*.

Das 23 lesões avaliadas, quatro demonstraram resultados divergentes entre o pirosequenciamento e o sequenciamento de Sanger. Um caso não mostrou mutação do gene *BRAF* no pirosequenciamento, mas mostrou mutação no sequenciamento de Sanger. Dois casos apresentaram mutação do gene *KRAS* no pirosequenciamento, porém não mostraram mutação ao sequenciamento de Sanger. Um caso não mostrou

mutação do gene *KRAS* no pirosequenciamento, mas mostrou mutação ao sequenciamento de Sanger.

Os tumores malignos e benignos representam um tecido heterogêneo que contém células tumorais e células não neoplásicas (mesenquimais, endoteliais e inflamatórias). O rastreamento e a identificação de mutações genéticas nestes tecidos são geralmente realizados por amplificação por PCR seguida de sequenciamento de DNA. O sequenciamento é considerado padrão-ouro para confirmar e determinar a identidade de mutações específicas. Entretanto, ele pode não detectar uma minoria de sequências de DNA mutantes presente em meio a sequências selvagens abundantes. A identificação de mutações ativadoras em oncogenes, como o *KRAS*, representa um desafio em particular. Cada célula não-neoplásica no tecido tumoral pode contribuir com dois alelos selvagens, e cada célula tumoral pode conter uma cópia de um alelo selvagem. Este problema é particularmente importante em tumores com determinadas características, como por exemplo, a presença abundante de células inflamatórias em CCRs MSI-H, e a exígua quantidade de células malignas em tumores submetidos a radio e quimioterapia, dentre outras (OGINO et al. 2005).

O pirosequenciador é um sequenciador de nucleotídeos em tempo real, não eletroforético, com habilidade de determinar a quantidade relativa do alelo mutante com alta acurácia. OGINO et al. (2005) demonstraram que esta técnica possui uma sensibilidade analítica mais alta para a detecção de DNA mutante misturado com DNA selvagem, quando comparado com o sequenciamento (BigDie Terminator). O limite de detecção no pirosequenciamento do gene *KRAS* foi aproximadamente 3 a 5% de alelo mutante. Os autores apontaram como uma das vantagens do pirosequenciamento a sua capacidade de quantificar cada alelo com acurácia.

No presente estudo, não foi possível a avaliação do *status* de metilação do gene *MLH1*, por meio do pirosequenciamento, nas lesões obtidas. Para a realização desta técnica é necessário um grande quantidade de DNA, e como a maioria das lesões consistiam em pequeninos pólipos, o material se esgotou na realização dos outros procedimentos do estudo.

Nos últimos 15 anos, houve uma grande evolução nos conhecimentos sobre a SL, sobre os genes de reparo do DNA e suas funções na susceptibilidade hereditária ao câncer. A aplicabilidade clínica destes conhecimentos já faz parte do arsenal disponível na atualidade. Entretanto, o custo elevado desta tecnologia não permite que todas as pessoas tenham acesso a ela em nosso país e apenas centros especializados detêm este privilégio. Esforços devem ser dirigidos para disponibilizar as ferramentas diagnósticas para a população.

7 CONCLUSÃO

- 1) O presente estudo verificou a frequência de lesões colorretais em pacientes com diagnóstico ou suspeita de SL, por meio de colonoscopia com NBI. Este estudo comprovou que o NBI é um método acurado para o diagnóstico *in vivo* da histopatologia das lesões colorretais e possui uma boa taxa de detecção de lesões.
- 2) Este estudo demonstrou ser possível a realização de imunoistoquímica das proteínas de reparo do DNA, p53, COX-2 e β -catenina e a pesquisa de mutação nos genes *KRAS* e *BRAF* em pólipos colônicos.
- 3) Neste estudo não foi possível a determinação do *status* de metilação do gene *MLH1* em pólipos devido a escassez de DNA.
- 4) Algumas associações importantes foram verificadas:
 - Todos os pacientes com perda de expressão imunoistoquímica do dímero MSH2/MSH6 possuíam mutação documenta no gene *MSH2* e nenhum deles apresentou mutação no gene *BRAF* ao pirosequenciamento.
 - As mutações dos genes *KRAS* e *BRAF* foram excludentes entre si, com exceção de um caso.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer Res** 1994; 54:1645-8.

Abdel-Rahman WM, Mecklin JP, Peltomaki P. The genetics of HNPCC: application to diagnosis and screening. **Crit Rev Oncol/Hematol** 2006; 58:208-20.

Adler A, Papanikolaou IS, Abou-Rebyeh H, et al. A prospective randomized study on narrow band imaging versus conventional colonoscopy for adenoma detection: does narrow band imaging induce a learning effect? **Gut** 2008; 57:59-64.

Baudhuin LM, Burgart J, Leontovich O, Thibodeau SN. Use of microsatellite instability and immunohistochemistry testing for the identification of individuals at risk for Lynch syndrome. **Fam Cancer** 2005; 4:255-65.

Beggs AD, Hodgson SV. The genomics of colorectal cancer: state of the art. **Curr Genomics** 2008; 9:1-10.

Blanes A, Diaz-Cano SJ. Complementary analysis of microsatellite tumor profile and mismatch repair defects in colorectal carcinomas. **World J Gastroenterol** 2006; 12:5932-40.

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

Boland CR. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. **Fam Cancer** 2005; 4:211-8.

Boland CR, Shin SK, Goel A. Promoter methylation in the genesis of gastrointestinal cancer. **Yonsei Med J** 2009; 50:309-21.

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

Brooker JC, Saunders BP, Shah SG, et al. Total colonic dye-spray increases the detection of diminutive adenomas during routine colonoscopy: a randomized controlled trial. **Gastrointest Endosc** 2002; 56:333-8.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. **Nature** 1994; 368:258-61.

40.

Church J, Fazio VW. Polipose adenomatosa familiar, síndrome de Gardner e síndrome de Turcot. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Júnior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Tecmedd/Lemar; 2005. p.609-20.

da Silva FC, Valentin MD, Ferreira Fde O, Carraro DM, Rossi BM. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. **São Paulo Med J**. 2009; 127:46-51.

De Jong AE, Morreau H, Van Puijbroek M, et al. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. **Gastroenterology** 2004a; 126:42-8.

De Jong AE, van Puijbroek M, Hendriks Y, et al. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2004b; 10:972-80.

Deng G, Bell I, Crawley S, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2004; 10:191-5.

Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. **J Med Genet** 2004; 41:664-8.

Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, et al. BRAF V600E is not involved in colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 e MSH2 genes. **Oncogene** 2005; 24:3995-8.

Douglas F, Burn J. Câncer colorretal hereditário sem polipose e síndrome de Muir-Torre. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Júnior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Tecmedd/Lemar; 2005. p.595-600.

Drummond JT, Li GM, Longley MJ, et al. Isolation of an *hMSH2*-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. **Science** 1994; 268:1909-12.

Duarte-Franco E, Franco E. Epidemiologia e fatores de risco em câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.43-54.

Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair genes mutations. **Hum Mol Genet** 1997; 6:105-10.

East JE, Suzuki N, Stavriniadis M, et al. Narrow band imaging for colonoscopy surveillance in hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Gut** 2008a; 57:65-70.

East JE, Tan EK, Bergman JJ, et al. Meta-analysis: narrow band imaging for lesion characterization in the colon, oesophagus, duodenal ampulla and lung. **Aliment Pharmacol Ther** 2008b; 28:854-67.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology** 1994; 107:1183-8.

Eisinger AL, Prescott SM, Jones DA, Stafforini DM. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology** 1994; 107:1183-8.

Eisinger AL, Prescott AM, Jones DA, Stafforini AM. The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer. **Prostaglandins Other Lipid Mediat** 2007 Jan;82(1-4):147-54

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

Ferreira FO, Ferreira CCN, Rossi BM, et al. Frequency of extra-colonic tumors in HNPCC and familial colorectal cancer Brazilian families. **Fam Cancer** 2004; 3:41-7.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, et al. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell** 1993; 75:1027-38.

Fodde R, Brabletz T. Wnt/ β -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. **Curr Opin Cell Biol** 2007; 19:150-8.

Franco-Duarte E, Franco EL. Epidemiologia e fatores de risco em câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.3-22.

Georgescu CV, Saftoiu A, Georgescu CC, Ciurea R, Ciurea T. Correlations of proliferation markers, p53 expression and histological findings in colorectal carcinoma. **J Gastrointestin Liver Dis** 2007; 16:133-9.

Goecke T, Schulmann K, Engel C, et al. German HNPCC Consortium. Genotype-phenotype comparison of German MLH1 and MSH2 mutation carriers clinically affected with Lynch syndrome: a report by the German HNPCC Consortium. **J Clin Oncol** 2006; 24:4285-92.

Gono K, Yamazaki K, Dogushi N, et al. Endoscopic observation of tissue by narrowband illumination. **Opt Rev** 2003; 10:1-5.

Halvarsson B, Lindblom A, Johansson L, et al. Loss of mismatch repair protein immunostaining in colorectal adenomas from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Mod Pathol** 2005; 18:1095-101.

Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E, Lagerstedt K, Nilbert M. The added value of PMS2 immunostaining in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Fam Cancer** 2006; 5:353-8.

Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. **Pathology and genetics of tumours of the digestive system**. Lyon: IARC Press; 2000. p.111-3.

Hendriks YM, de Jong AE, Morreau H, et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. **CA Cancer J Clin** 2006; 56:213-25.

Hirata M, Tanaka S, Oka S, et al. Evaluation of microvessels in colorectal tumors by narrow band imaging magnification. **Gastrointest Endosc** 2007; 68:945-52.

Hurlstone DP, Brown S, Cross SS. The role of flat and depressed colorectal lesions in colorectal carcinogenesis: new insights from clinicopathological findings in high magnification chromoscopy colonoscopy. **Histopathology** 2003; 43:413-26.

Hurlstone DP, Cross SS, Slater R, et al. Detecting diminutive colorectal lesions at colonoscopy: a randomized controlled trial of pan-colonic versus target chromoscopy, **Gut** 2004; 53:376-80.

Hurlstone DP, Karajeh M, Cross SS, et al. The role of high magnification-chromoscopic colonoscopy in hereditary nonpolyposis colorectal cancer screening: a prospective “back-to-back” endoscopy study. **Am J Gastroenterol** 2005; 100:2167-73.

Iino H, Simms L, Young J, et al. DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Gut** 2000; 47:37-42.

Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. **Carcinogenesis** 2008; 29:673-80.

Inoue T, Murano M, Murano N, et al. Comparative study of conventional colonoscopy and pan-colonic narrow-band imaging system in the detection of neoplastic colonic polyps: a randomized, controlled trial. **J Gastroenterol** 2008; 43:45-50.

[IARC]. International Agency for Research on Cancer: **The GLOBOCAN 2002 database**. Available from: <URL:<http://www-dep.iarc.fr/>> [2010 12 abr]

Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Gut** 1992; 33:783-6.

Jass JR. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: the rise and fall of a confusing term. **World J Gastroenterol** 2006; 12:4943-50.

Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. **Histopathology** 2007; 50:113-30.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2009. **CA Cancer J Clin** 2009; 59:225-49.

Jiricny J, Nyström-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. **Curr Opin Genet Dev** 2000; 10:157-61.

Kaklamanis L, Gatter KC, Mortensen N, et al. P53 expression in colorectal adenomas. **Am J Pathol** 1993; 142:87-93.

Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. **Gut** 2004; 53:1137-44.

Karnes WE Jr. Implications of low COX-2 expression in colorectal neoplasms with defective DNA mismatch repair. **J Cell Biochem Suppl** 2000; 34:23-7.

Kawasaki T, Nosho K, Ohnishi M, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression is common in serrated and non-serrated colorectal adenoma, but uncommon in hyperplastic polyp and sessile serrated polyp/adenoma. **BMC Cancer** 2008; 8:33-40.

Kim EC, Lance P. Colorectal polyps and their relationship to cancer. **Gastroenterol Clin North Am** 1997; 26:1-17.

Kirk JA. How can we best detect hereditary non-polyposis colorectal cancer? **Med J Austr** 2006; 184:206-7.

Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Nat Acad Sci** 1971; 68:820-3.

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

Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, et al. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. **Gastroenterology** 1996; 111:307-17.

Lanspa SJ, Jenkins JX, Cavalieri J, et al. Surveillance in Lynch syndrome: how aggressive? **Am J Gastroenterol** 1994; 89:1978-80.

Lapalus MG, Helbert T, Napoleon B, et al. Does chromoendoscopy with structure enhancement improve the colonoscopy adenoma detection rate? **Endoscopy** 2006; 38:444-8.

Le Rhun M, Coron E, Parlier D, et al. High resolution colonoscopy with chromoscopy versus standard colonoscopy for the detection of colonic neoplasia: a randomized study. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2006; 4:349-54.

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cell** 1993; 75:1215-25.

Lecomte T, Cellier C, Meatchi T, et al. Chromoendoscopic colonoscopy for detecting preneoplastic lesions in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2005; 3:897-902.

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

Leslie A, Stewart A, Baty DU, et al. Chromosomal changes in colorectal adenomas: relationship to gene mutations and potential for clinical utility. **Genes Chromosomes Cancer** 2006; 45:126-35.

Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. **JAMA** 2005; 293:1979-85.

Lindor NM, Petersen GM, Hadley DW, et al. Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review. **JAMA** 2006; 296:1507-17.

Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, et al. *MLH3*: a novel DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. **Nat Genet** 2000; 24:27-35.

Loukola A, Salovaara R, Kristo P, et al. Microsatellite instability in adenomas as a marker for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Am J Pathol** 1999, 155:1849-53.

Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): an update review. **Cancer** 1996; 78:1149-67.

Lynch HT, Shaw TG, Lynch JF, et al. Histórico do câncer colorretal hereditário sem polipose. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Júnior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Tecmedd/Lemar; 2005. p.575-94.

Lynch HT, Boland RC, Gong G, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome; diagnostic, surveillance and management implications. **Eur J Human Genet** 2006; 14:390-402.

Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM. Toward a consensus in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:261-3.

Machida H, Sano Y, Hamamoto Y. Narrow-band imaging in the diagnosis of colorectal mucosal lesions: a pilot study. **Endoscopy** 2004; 36:1094-98.

McLean MH, Murray GI, Fyfe N, et al. COX-2 expression in sporadic colorectal adenomatous polyps is linked to adenoma characteristics. **Histopathology** 2008; 52:806-15.

Minamoto T, Mai M, Ogino T, et al. Early invasive colorectal carcinomas metastatic to the lymph node with attention to their nonpolypoid development. **Am J Gastroenterol** 1993; 88:1035-9.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2008 - Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Muto T, Kamijia J, Sawada T, et al. Small flat adenoma of the large bowel with special reference to its clinicopathologic features. **Dis Colon Rectum** 1985; 28:847-51.

Müller A, Beckmann C, Westphal G, et al. Prevalence of the mismatch-repair-deficient phenotype in colonic adenomas arising in HNPCC patients: results of a 5-year follow up study. **Int J Colorectal Dis** 2006; 21:632-41.

Müller W, Burgart LJ, Krause-Paulus R, et al. ICG-HNPCC (International Collaborative Group). The reliability of immunohistochemistry as a prescreening method for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) - results of an international collaborative study. **Fam Cancer** 2001; 1:87-92.

Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, et al. Mutations of two *PMS* homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature** 1994; 371:75-80.

Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al. Sensitive sequencing method for *KRAS* mutation detection by pyrosequencing. **JMD** 2005; 7:314-21.

Oliveira C, Westra JL, Arango D, et al. Distinct patterns of *KRAS* mutation in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and *hMLH1* methylation status. **Human Mol Genet** 2004; 13:2303-11.

Oliveira LAR. Técnica, magnificação de imagem e uso de corantes em colonoscopia. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. Ribeirão Preto: Tecmedd/Lemar; 2005. p.151-74.

Oliveira LP. **Avaliação de instabilidade de microssatélites e expressão imunoistoquímica das proteínas hMLH1 e hMSH2 em pacientes com suspeita de câncer colorretal hereditário sem polipose**. São Paulo; 2008 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Palombo F, Gallinari P, Iaccaraino I, et al. *GTBP*, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. **Science** 1995; 268:1912-4.

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, et al. Mutation of a *mutL* homolog in hereditary colon cancer. **Science** 1994; 263:1625-9.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. **Int J Cancer** 2001; 94:153-6.

Pino MS, Mino-Kenudson M, Wildemore BM, et al. Deficient DNA mismatch repair is common in Lynch syndrome-associated colorectal adenomas. **JMD** 2009; 11:238-47.

Pisano C, Ottaiano A, Tatangelo F, et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with increased size in human sporadic colorectal adenomas. **Anticancer Res** 2005; 25:2065-8.

Ponz de Leon M, Bertario L, Genuardi M, et al. Identification and classification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): adapting old concepts to recent advancements. Report from the Italian Association for the Study of Hereditary Colorectal Tumors Consensus Group. **Dis Colon Rectum** 2007; 50:2126-34.

Purdie CA, O'Grady J, Piris J, et al. p53 expression in colorectal tumors. **Am J Pathol** 1991; 138:807-13.

Rastogi A, Bansal A, Wani S, et al. Narrow band imaging colonoscopy – a pilot feasibility study for the detection of polyps and correlation of surface patterns with polyp histologic diagnosis. **Gastrointest Endosc** 2008; 67:280-6.

Rijcken FEM, Hollema H, Kleibeuker JH. Proximal adenomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer are prone to rapid malignant transformation. **Gut** 2002; 50:382-6.

Rijcken FEM, Sluis T, Hollema H, et al. Hyperplastic polyps in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Am J Gastroenterol** 2003; 98:2306-11.

Robinson LK, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, Papadopoulos N, Kinzler KW, et al. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:291-9.

Rossi BM, Terabe F, Ferreira FO. Tratamento cirúrgico do câncer colorretal hereditário. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Júnior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Tecmedd/Lemar; 2005. p.645-61.

Saitoh Y, Waxman I, West AB, et al. Prevalence and distinctive biologic features of flat colorectal adenomas in a North American population. **Gastroenterology** 2001; 120:1657-65.

Samowitz WS, Slattery ML. Microsatellite instability in colorectal adenomas. **Gastroenterology** 1997; 112:1515-9.

Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ, et al. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. **Gastroenterology** 1996; 110:682-7.

Sano Y, Kobayashi M, Hamamoto Y, et al. New diagnostic method based on color imagin using narrow-band imaging (NBI) system for gastrointestinal tract. **Gastrointest Endosc** 2001; 53:AB125.

Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive ras in developmental disorders and cancer. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:295-308.

Shanmugam C, Katkoori VR, Jhala NC, et al. p53 nuclear accumulation and Bcl-2 expression in contiguous adenomatous components of colorectal adenocarcinomas predict aggressive tumor behavior. **J Histochem Cytochem** 2008; 56:305-12.

Shia J. Immunohistichemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. **J Mol Diagn** 2008; 10:293-300.

Shimoda T, Ikegami M, Fujisaki J, et al. Early colorectal carcinoma with special reference to its development *de novo*. **Cancer** 1989; 64:1138-46.

Sinicrope FA, Lemoine M, Xi L, et al. Reduced expression of cyclooxygenase 2 proteins in hereditary nonpolyposis colorectal cancers relative to sporadic cancers. **Gastroenterology** 1999; 117:350-8.

Soetikno R, Friedland S, Kaltenbach T, et al. Nonpolypoid (flat and depressed) colorectal neoplasms. **Gastroenterology** 2006; 130:566-76.

Strate LL, Syngal S. Hereditary colorectal cancer syndromes. **Cancer Causes Control** 2005; 16:201-13.

Terdiman JP, Gum JR, Conrad PG, et al. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. **Gastroenterology** 2001; 120:21-30.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:261-8.

Van Rijn JC, Reitsma JB, Stoker J, et al. Polyp miss rate determined by tandem colonoscopy: a systematic review. **Am J Gastroenterol** 2006;101:343-50.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, et al. The International Collaborative Group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). **Dis Colon Rectum** 1991; 34:424-5.

Vasen HF, Nagengast FM, Khan PM. Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). **Lancet** 1995; 345:1183-4.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. **Gastroenterology** 1999; 116:1453-6.

Vasen HF. Clinical description of the Lynch syndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. **Fam Cancer** 2005; 4:219-25.

Vasen HF, Moslein G, Alonso A. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer). **J Med Genet** 2007; 44:353-62.

Vasen HF, Abdirahman M, Brohet R, et al. 1–2-year Surveillance Intervals Reduce Risk of Colorectal Cancer in Families with Lynch Syndrome. **Gastroenterology** 2010 Mar 2. [Epub ahead of print]

Velho S, Moutinho K, Cirnes L, et al. *BRAF*, *KRAS* and *PIK3CA* mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? **BMC Cancer** 2008; 8:255-60.

Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, et al. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. **N Engl J Med** 1998; 339:511-8.

Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, et al. The national polyp study. **Eur J Cancer Prev** 1993; Suppl 2:83-7.

Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. **J Mol Diagn** 2008; 10:301-7.

Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução N. 196/96 e resolução CNS 252/97 do Ministério da Saúde)

PROJETO: Caracterização da Mucosa do Cólon e de Lesões Precursoras em Pacientes de Alto Risco para Câncer Colorretal

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE:

Sexo: ☐ masculino ☐ feminino Data de nascimento: ____/____/____

Documento de identidade n.:

Endereço:

Número: Complemento:

Cidade: Estado:

CEP: TEL:

RESPONSÁVEL:

Sexo: ☐ masculino ☐ feminino Data de nascimento: ____/____/____

Documento de identidade n.:

Endereço:

Número: Complemento:

Cidade: Estado:

CEP: TEL:

II. OBJETIVOS DO ESTUDO

Você foi convidado a participar deste estudo, pois sua família tem risco aumentado para desenvolver câncer colorretal. Em algumas pessoas que têm história família de câncer de intestino grosso é possível ver alterações genéticas (mudança no código que comanda as células do intestino) que podem dar origem ao câncer.

Este estudo tem por objetivo verificar a quantidade, forma e características de alterações na mucosa (parte interna) do intestino grosso identificadas pela colonoscopia, e também verificar alterações genéticas.

A colonoscopia é a passagem de um tubo por todo o intestino grosso. Com a colonoscopia é possível identificar o câncer de intestino grosso em uma fase inicial e também alterações que não são cânceres, mas se não retiradas, podem com o tempo se transformar em um tumor maligno. Na colonoscopia serão usadas duas técnicas: a cromoscopia e a magnificação. A cromoscopia é a aplicação de um corante na mucosa do intestino. Com este corante é possível identificar alterações na mucosa intestinal que não seria possível sem a realização da coloração. A magnificação é o uso de uma espécie de lente de aumento no colonoscópio que permite a identificação de alterações pequenas que não podem ser vistas com o colonoscópio comum.

III. PROCEDIMENTOS

O seu seguimento/tratamento não será alterado. Após a assinatura deste consentimento (autorização para o estudo) você deverá agendar a sua colonoscopia de rotina. O preparo para o exame é o mesmo para a colonoscopia sem cromoscopia e magnificação. Durante a colonoscopia, o médico irá aplicar direto na mucosa do seu intestino grosso um corante que não tem propriedades tóxicas, o que tornará mais fácil a visualização de alterações. No exame, o médico preencherá uma ficha com as características do exame. O médico retirará pequenos fragmentos do intestino que apresentarem alterações e também fragmentos de intestino normal, e depois encaminhará este material para um exame de patologia. Neste exame, um médico patologista irá verificar as características das células em um microscópio e dará um resultado de lesão benigna ou maligna. Neste material também serão estudadas possíveis alterações genéticas que podem ocorrer em pessoas que fazem parte de famílias com câncer intestinal familiar.

O resultado da colonoscopia e do exame da patologia serão comparados com as características da sua história familiar e também com o resultado do teste genético que foi realizado em seu familiar.

IV. BENEFÍCIOS

O uso do corante pode melhorar a identificação de alterações no intestino grosso; no entanto, a participação estudo pode não trazer benefícios para você ou para os membros de sua família, mas pode ajudar-nos a compreender como lesões benignas e o câncer do intestino grosso se desenvolvem.

V. RISCOS

Os riscos são os mesmos de uma colonoscopia convencional: cólicas intestinais, sangramento, e muito raramente, perfuração do intestino.

VI. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado por um Comitê de Ética. A confidencialidade das suas informações será mantida, ou seja, apenas as pessoas envolvidas diretamente nesse estudo terão acesso aos resultados do seu exame. Seu nome e informações pessoais não serão incluídos em nenhuma divulgação dos resultados deste estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária, e você tem o direito de retirar-se do estudo a qualquer momento. Sua recusa ou desistência não irá prejudicar seu acompanhamento e tratamento.

Qualquer dúvida sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a enfermeira Erika Maria Monteiro Santos ou com o pesquisador principal Dr. Fábio de Oliveira Ferreira no telefone 2189 5000 ramal 2304 no departamento de cirurgia pélvica do Hospital A.C. Camargo. Se o pesquisador principal não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital do Câncer – SP, pelo telefone 2189 5020.

Declaro que fui esclarecido:

- sobre os procedimentos, riscos e benefícios sobre este estudo;
- que tenho liberdade em retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo ao meu acompanhamento/tratamento;
- que não haverá remuneração financeira para este estudo;
- sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial.

Concordo em participar deste estudo.

São Paulo, ____ de _____ de ____.

Assinatura do paciente ou responsável/representante local

Nome da pessoa que explicou este consentimento

Assinatura do pesquisador ou representante

Anexo 2 – Características clínicas dos pacientes

Iniciais do probando: RGH:

Nome do indivíduo: RGH:

Classificação da história familiar

1 (☐) HNPCC – Critério de Amsterdam I 2 (☐) Critério de Amsterdam II

3 (☐) CCF 4 (☐) Critério Bethesda

Se critérios de Bethesda preenchido, determinar qual(is) o(s) critério(s) utilizado(s):

1 (☐) Câncer colorretal diagnosticado em um paciente com menos de 50 anos de idade.

2 (☐) Presença de tumor colorretal sincrônico, metacrônico, ou tumores associados ao HNPCC (tumor de endométrio, estômago, ovário, pâncreas, ureter, pelve renal, trato biliar, cérebro, adenoma de glândula sebácea, ceratoacantomas, tumor intestino delgado) independente da idade

3 (☐) Câncer colorretal com histologia MSI-H (tumor com infiltrado linfocitário, reação linfocítica Crohn-like, diferenciação anel de sinete/mucínica, crescimento de padrão medular) em indivíduo com menos de 60 anos

4 (☐) Câncer colorretal diagnosticado em um ou mais parentes de primeiro grau com tumor associado ao HNPCC, com um dos tumores diagnosticados antes dos 50 anos

5 (☐) Câncer colorretal diagnosticado em dois ou mais parentes de primeiro ou segundo graus com tumores associados ao HNPCC, independente da idade

História pessoal de pólipos/câncer

0 (☐) sem câncer ou pólipos 1 (☐) Pólipos hiperplásicos

2 (☐) Adenoma 3 (☐) CCR

4 (☐) Tumores relacionados ao HNPCC 5 (☐) Outros tumores

Idade de diagnóstico:

Pólipos hiperplásicos: _____ Adenoma:

CCR: _____ Tumores relacionados ao HNPCC: _____

Outros tumores: _____

História familiar de pólipos/câncer

0 (☐) sem câncer ou pólipos 1 (☐) Pólipos hiperplásicos

2 (☐) Adenoma 3 (☐) CCR

4 (☐) Tumores relacionados ao HNPCC 5 (☐) Outros tumores

Idade de diagnóstico:

Pólipos hiperplásicos: _____ Adenoma:

CCR: _____ Tumores relacionados ao HNPCC: _____

Outros tumores: _____

Investigação molecular

0 () não 1 () sim

Seqüenciamento

hMSH2	0 () sem mutação	1 () polimorfismo	2 () mutação	9() ign/não realizado
hMLH1	0 () sem mutação	1 () polimorfismo	2 () mutação	9() ign/não realizado
hMSH6	0 () sem mutação	1 () polimorfismo	2 () mutação	9() ign/não realizado
PMS2	0 () sem mutação	1 () polimorfismo	2 () mutação	9() ign/não realizado
CHEK2	0 () sem mutação	1 () polimorfismo	2 () mutação	9() ign/não realizado
TP53	0 () sem mutação	1 () polimorfismo	2 () mutação	9() ign/não realizado

Tipo de mutação :

Descrição da mutação:

Anexo 3 – Ficha de Colonoscopia

Nome do indivíduo: _____RGH: _____

Data: _____ **Realizada por:** _____

Lesões identificadas

0 () não 1 () sim

Características das lesões

[illegible]

Anexo 4 - Protocolo utilizado para imunoistoquímica

Os cortes histológicos presentes nas lâminas foram submetidos ao seguinte protocolo para todos os anticorpos:

1) **Desparafinização das lâminas:**

Desparafinização dos cortes de 3 µm de espessura, do material incluído em parafina, em lâminas previamente tratadas e deixadas por 24 horas em estufa 60°C:

- a. Xilol a 60°C por 20 minutos
- b. Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos
- c. Etanol 100% 30 segundos
- d. Etanol 95% 30 segundos
- e. Etanol 70% 30 segundos
- f. Lavar as lâminas em água corrente e destilada.

2) **Recuperação antigênica**

• **p53, COX-2, β-catenina, MLH1, MSH2 e MSH6**

Panela de Pressão e Tampão citrato pH 6,0

- a. Ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna[®], Nigro) destampada.
- b. Mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta.
- c. Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Contar 4 minutos após esse sinal.
- d. Deixar a panela fechada sob água corrente até a despressurização total.
- e. Destampar a panela e lavar as lâminas em água corrente e destilada

• **PMS2**

Banho-maria e Tampão EDTA + Tris pH 9,0

- a. Ferver a solução tampão Tris EDTA 1 mM pH 9.0 em panela de pressão (Eterna[®], Nigro) destampada.
- b. Mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta.

- c. Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Contar 4 minutos após esse sinal.
- d. Deixar a panela fechada sob água corrente até a despressurização total.
- e. Destampar a panela e lavar as lâminas em água corrente e destilada.

3) Bloqueio da peroxidase endógena

- a. Incubar as amostras em H₂O₂ 3% (água oxigenada 10 vol) por 4 trocas de 5 minutos cada.
- b. Lavar em água corrente e destilada.
- c. Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.
- d. Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, conforme tabela 10, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.
- f. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

4) Sistemas de amplificação

- a. Incubar por 30 min a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido).
- b. Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.
- c. Incubar com o NovoLink Polymer por 30 min a 37° C.
- d. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

5) Revelação com cromógeno

- a. Incubar as lâminas em solução substrato: 100 mg% 3, 3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.
- b. Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.
- c. Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.

- 6) Contra coloração
- a. Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.
 - b. Lavar bem em água corrente e destilada
 - c. Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.
- 7) Desidratação e montagem das lâminas
- a. Etanol 80%, 30 segundos
 - b. Etanol 95%, 30 segundos
 - c. Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada
 - d. Xilol 4 vezes, 30 segundos cada
 - e. Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha)

Soluções utilizadas para imunoistoquímica

- 1) Tampão citrato 10 mM pH 6,0
- a. 12,6 g de ácido cítrico
 - b. água destilada q.s.p. 6,0 L
 - c. corrigir o pH com NaOH 2N
- 2) Tampão Tris-EDTA pH 9,0
- a. 0,372 g de EDTA
 - b. 1,21 g de Tris
 - c. água destilada q.s.p. 1,0 L
 - d. corrigir o pH com NaOH 2N
- 3) Tampão PBS 0,01 M pH 7,4 20X (concentrado)
- a. 160 g de NaCl
 - b. 27,31 g de fosfato de sódio dibásico
 - c. 4,86 g de fosfato de sódio monobásico
 - d. água destilada q.s.p. 1,0 L

Anexo 5 - Protocolo de isolamento de DNA genômico de tecidos

QIAamp® DNA extration kit

Procedimentos:

1º dia

- a. Transferir o tecido desparafinado (scrape) para um tubo de micro centrifuga de 1,5 ml.
- b. Imediatamente adicionar 180µl do *Buffer ATL* (estabilizar a temperatura ambiente 15° a 25°C antes do uso).
- c. Adicionar 20µl de *Proteinase K* e misturar por pulso vórtex por 15 segundos.
- d. Colocar o tudo de 1,5ml no termomixer e incubar a 56°C *overnight*.

2º dia

- a. Adicionar 200µl do *Buffer AL*, fechar a tampa do tubo e dar um pulso vórtex de 15 segundos. Se for necessário o uso de carregador de RNA , realizar nesta fase, adicionando 1µl antes de realizar o vórtex.
- b. Adicionar 110µl de etanol absoluto (96-100%), fechar o tubo, e misturar por pulso vórtex por 15 segundos.
- c. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (15 a 25°C).
- d. Rapidamente centrifugar os tubos de 1,5 ml para remover gotas que estejam na tampa.
- e. Transferir o material para uma coluna específica (*QIAamp MinElute Column*), sem molhar a borda, fechar o tubo e centrifugar a 6000 xg (ou 8000 rpm) por 1 minuto.
- f. Retirar a coluna e colocá-la em um tubo de 2 ml (*collection tube*). Descartar o tubo anterior contendo o resíduo de centrifugação.
- g. Abrir a coluna e adicionar 500µl de *Buffer AW1* sem molhar a borda. Fechar o tubo e centrifuguear a 6000 xg (ou 8000 rpm) por 1 minuto.
- h. Retirar a coluna e colocá-la em um tubo de 2 ml (*collection tube*). Descartar o tubo anterior contendo o resíduo de centrifugação.

- i. Abrir a coluna e adicionar 500µl de *Buffer AW2* sem molhar a borda. Fechar o tubo e centrifugar a 6000 xg (ou 8000 rpm) por 1 minuto.
- j. Retirar a coluna e colocá-la em um tubo de 2 ml (*collection tube*). Descarte o tubo anterior contendo o resíduo de centrifugação.
- i. Centrifugar na velocidade máxima (20.00xg ou 14.000 rpm) por 3 minutos para secar a membrana completamente.
- j. Colocar a coluna específica (*QIAamp MinElute Column*) em um tubo de micro centrífuga de 1,5 ml. Descarte o tubo de coleção com o resíduo de centrifugação.
- l. Abrir a tampa da coluna e aplicar 20 a 100µl de *Buffer AE* ou de água destilada no centro da membrana e fechar a tampa.
- m. Incubar em temperatura ambiente (15 a 25°C) por 1 minuto.
- n. Centrifugar por 1 minuto em velocidade máxima (20.00 xg ou 14.000 rpm).
- o. Retirar a coluna e quantificar o DNA extraído no Nanodrop.

Anexo 6 - Protocolo para utilização da estação de vácuo e do pirosequenciador (PyroMark ID – Biotage)

- Ligar o aparelho de Pyromark ID pelo menos 30 minutos antes de iniciar a corrida.
- Preparar a corrida no software. Ver protocolo do software.
- Colocar as soluções (solução de denaturação, EtOH 70%, água destilada e *washing buffer*) nos respectivos recipientes na estação de vácuo.
- Transferir 25µL das amostras amplificadas para uma placa de 96 poços Eppendorf.
- Preparar a mistura contendo as esferas (*beads*) de sefarose conforme protocolo descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Mistura de esferas de sefarose.

Reagente	Volume para uma amostra
<i>Beads</i> de sefarose	3µL
<i>Binding buffer</i>	40µL
Água (ddW)	15µL

- Adicionar 55µL da mistura de esferas de sefarose às amostras amplificadas. O volume final será de 80µL.
- Agitar a placa por 15 minutos a 1350 rpm.
- Preparar a mistura com os iniciadores de sequenciamento conforme protocolo descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Mistura de iniciadores de sequenciamento

Reagente	Volume para uma amostra
Primer 100µM	0,2µL
<i>Annealing buffer</i>	39,8µL

- Distribuir na placa de pirosequenciamento (Biotage), 40µL da mistura contendo o iniciador de sequenciamento em cada *well*.
- Colocar as placas nos locais corretos da estação de vácuo.
- Ligar a bomba de vácuo e a estação de vácuo.
- Lavar o aparato de filtros no primeiro recipiente de água destilada, por aproximadamente 30 segundos.
- Posicionar o aparato de filtros dentro da placa contendo a mistura de esferas e o produto do PCR. Esta placa não deve ficar mais de 3 minutos sem manipulação após a agitação para evitar a precipitação das esferas.
- Esperar 1 minuto para que todo o volume dos *wells* seja absorvido. As amostras presas às esferas ficam retidas na ponta dos filtros.
- Lavar as amostras em EtOH 70%.
- Colocar o aparato de filtros no recipiente de EtOH 70% e, assim que a solução começar ser absorvida, incubar por 5 segundos.
- Denaturar as amostras.
- Colocar o aparato de filtros no recipiente de solução de denaturação e, assim que a solução começar ser absorvida, incubar por 5 segundos.
- Lavar as amostras.
- Colocar o aparato de filtros no recipiente de *buffer* de lavagem e, assim que a solução começar ser absorvida, incubar por 5 segundos.
- Posicionar o aparato de filtros sobre a placa de iniciadores de sequenciamento.
- Desligar o vácuo, na estação de vácuo.
- Colocar os filtros em contato com a mistura de iniciadores de sequenciamento. Agitar o aparato de filtros e incubar por 1 minuto.
- Incubar a placa com a mistura de iniciadores de sequenciamento a 80°C por 2 minutos.
- Retirar a placa com a bandeja e deixar por 5 minutos à temperatura ambiente.
- Retirar a placa da bandeja e deixar à temperatura ambiente por 5 minutos. A solução dentro dos *wells* deve adquirir coloração leitosa devido à presença das esferas.
- Preencher o cartucho. Posicionar o cartucho com a etiqueta voltada para você.

- Preencher o cartucho com a enzima, o substrato e os nucleotídeos.
- Bater o cartucho levemente na bancada para que possíveis bolhas sejam eliminadas.
- Colocar a placa de sequenciamento no aparelho. Em seguida, colocar o cartucho.
- Iniciar o pirosequenciamento.